

应用 MLPA 技术和 aCGH 技术检测额外小标记染色体

张菁菁,李 璃,马定远,胡 平,秦 岭,许争峰*

(南京医科大学附属南京妇幼保健院产前诊断中心,江苏 南京 210004)

[摘要] 目的:应用多重连接依赖探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification,MLPA)技术和微阵列比较基因组杂交(array comparative genomic hybridization,aCGH)技术检测 1 例额外小标记染色体。方法:应用 MLPA 技术对外周血 G 显带诊断的 1 例智力低下患儿携带小标记染色体(染色体核型为 47,XY,+Mar)进行分析,确定小标记染色体的来源,并进一步通过 aCGH 技术对患儿进行全基因组高分辨率扫描确定小标记染色体的大小及具体来源区域。结果:MLPA 分析结果显示患儿 18 号染色体 p11.21 和 p11.32 两个区域探针信号高于正常值范围,提示这两个区域存在拷贝数的增加;aCGH 分析结果显示拷贝数增加的区域为 p11.21~p11.32,范围约为 15 Mb。两项技术分析结果均证实额外小标记染色体来源于 18 号短臂,即该患儿为 18p 三体。结论:应用 MLPA 技术和 aCGH 技术可确定额外小标记染色体的来源,并能明确其来源染色体的具体区域范围,从而为判断标记染色体的遗传学效应提供帮助

[关键词] 多重连接依赖探针扩增技术;微阵列比较基因组杂交技术;额外小标记染色体;18p 三体

[中图分类号] Q343.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)02-201-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130212

Application of MLPA and aCGH technology in diagnosing small supernumerary marker chromosome

Zhang Jingjing, Li Li, Ma Dingyuan, Hu Ping, Qin Ling, Xu Zhengfeng*

(Center of Prenatal Diagnosis, Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To identify small supernumerary marker chromosome by application of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and array comparative genomic hybridization (aCGH). **Methods:** One case with abnormal mentality was indentified with de novo small supernumerary marker chromosome. G-banding analysis indicated that the patient has a karyotype of 47,XY,+Mar. MLPA was applied to investigate the origin of small supernumerary marker chromosome. Moreover,aCGH was used to define the precise location and size of de novo chromosome. **Results:** The result of MLPA showed the patient had duplication in 18p11.21 and 18p11.32;aCGH revealed that there was 15 Mb duplication from 18 p11.21-p11.32 in the patient. MLPA and aCGH revealed the presence of small supernumerary marker chromosome, which was derivative from the short arm of chromosome 18. **Conclusion:** The technologies of MLPA and aCGH can be used for identifying the origin of small supernumerary marker chromosome and defining the loci of the chromosome and can be applied to genetics analysis.

[Key words] MLPA technology;aCGH technology;small supernumerary marker chromosome;trisomy 18p

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 201-205]

额外小标记染色体(small supernumerary marker chromosome,sSMC)是指染色体结构异常,不能用传统

的细胞遗传学显带技术完全识别其来源的染色体^[1]。额外小标记染色体在新生儿的发生率为 0.044%,在胎儿中的发生率为 0.075%,在智力低下儿中的发生率为 0.3%^[2-3]。具有额外染色体的个体遗传效应差异很大,取决于标记染色体的来源,片段大小和常染色质成分。据报道,70%的额外染色体为新发生的突变,而 70%新发生的额外染色体均无表型效应。由

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(2011NJ-MU215);南京市卫生青年人才培养工程(第三层次)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:njzxf@126.com

于额外染色体本身形态结构异常,无法用传统 G 显带技术辨别,在对于新发生的额外染色体的诊断和遗传咨询中,需要更精确的分子遗传学技术的检测,以鉴定其染色体的来源和覆盖的染色体区段,分析其表型效应。本研究即联合多重连接依赖探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)技术和微阵列比较基因组杂交(array comparative genomic hybridization, aCGH)技术检测 1 例 18

号染色体短臂来源的 sSMC。

1 对象与方法

1.1 对象

患儿,4 岁,不明原因智力低下于南京医科大学附属南京妇幼保健院优生遗传门诊就诊。夫妇双方染色体核型正常(图 1A,B),患儿外周血染色体核型示 47,XY,+Mar(图 1C)。



A: 患儿父方染色体核型 46,XY; B: 患儿为母方染色体核型 46,XX; C: 患儿的核型 47,XY,+Mar。

图 1 染色体核型图

Figure 1 G-band chromosomes karyotype

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

抽取患儿 2 ml 外周血,根据基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物公司)说明书抽取外周血基因组 DNA,并测定 DNA 浓度。

1.2.2 MLPA 检测

采用荷兰 MRC-Holland 公司的 SALSA MLPA P095 Kit 染色体非整倍体检测试剂盒,其中含有 21,18,13,X 染色体 8 对探针,Y 染色体 4 对探针。稀释样本浓度至 20 ng/ μ l,取 5 μ l DNA 98 $^{\circ}$ C 变性 5 min,加入探针后,95 $^{\circ}$ C 1 min 后 60 $^{\circ}$ C 杂交 16 h。将温度降至 54 $^{\circ}$ C,加入连接混合物 35 min,98 $^{\circ}$ C 5 min 后将温度降至 15 $^{\circ}$ C,保存产物进行 PCR 反应。取 5 μ l 连接产物加入 PCR 反应液中,混匀后进行 PCR 反应,反应条件 95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 0.9 μ l 产物,0.1 μ l 分子量标记物(ABI 公司,美国),9 μ l HiDi(ABI 公司,美国),于 95 $^{\circ}$ C 变性 2 min 后降至 4 $^{\circ}$ C,经 ABI3130 基因分析仪进行毛细管电泳,结果经 GeneMapper 软件分析得出峰高、峰面积和片段长度等数据。将 GeneMapper 软件分析所得数据导入 RH-MLPA-Analysis (Version5.21)软件,该软件将每条探针的峰面积通过与同组峰面积的平均值相除得出标准化值,样本的标准化值与软件内参的正常二倍体样本值进行比较得出的比值即反映了该样本 DNA 的拷贝数,正常值范围为 0.7~1.3。

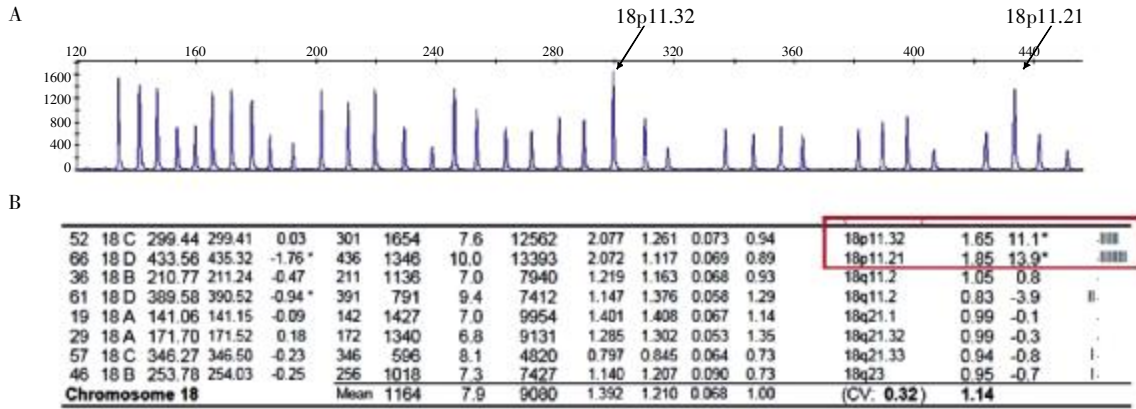
1.2.3 单核苷酸 aCGH

选用 HumanCytoSNP-12 Bead Chip Kits (Illuminate 公司,美国)芯片,进行比较基因组学杂交,该芯片含有约 114 万个 SNP 检测位点。采用 iscan 扫描系统进行数据采集,结果采用 Karyostudio 1.3.11 Build36.1 (CNV Plugin V0.7.0,美国 Illuminate 公司)软件进行分析。分析方法包括均一化的信号比值对数值(smoothed LogR)值和 B 等位基因频率(B allele Freq)值,将拷贝数变异(copy number variations, CNVs)的检测阈值参数设定为 10 个探针,500 kb 大小,可信度数值 > 85,正常二倍型有 3 种等位基因分布(AA,AB,BB),B 等位基因频率散点约位于 0,1,2/1,1;三倍体有 4 种等位基因分布(AAA,AAB,ABB,BBB),其 B 等位基因频率散点约分布于 0,1/3,2/3,1。

2 结果

2.1 患儿的 MLPA 检测结果

经过 SALSA MLPA P095 Kit 染色体非整倍体检测试剂盒检测,结果显示 18p11.32 和 18p11.21 探针信号异常,其余 6 个针对 18 号染色体长臂的探针信号正常,RH-MLPA-Analysis (Version5.21)软件分析试剂盒中每个探针的信号值正常值范围为 0.7~1.3,18p11.32 和 18p11.21 位置探针信号值分别为 1.65 和 1.85,提示 18 号染色体短臂存在部分三体,而长臂拷贝数正常(图 2)。



A: MLPA 电泳图, 箭头所示 18p11.32 和 18p11.21 探针信号异常; B: RH-MLPA-Analysis (Version 5.21) 软件分析结果, 红框所示 18p11.32 和 18p11.21 位置探针信号值分别为 1.65 和 1.85, 高于正常值范围(0.7-1.3)。

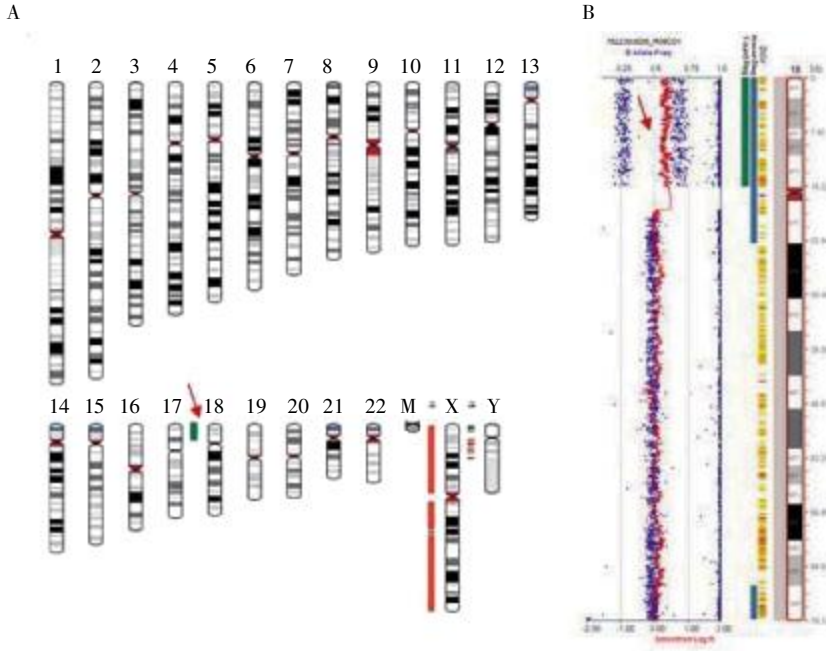
图 2 MLPA 结果

Figure 2 The results of multiplex ligation-dependent probe amplification

2.2 患儿的 aCGH 检测结果

对患儿的基因组 DNA 进行 aCGH 检测。Array-CGH 结果中均一化的信号比值对数值和 B 等位基因频率值均显示存在染色体不平衡: 在 18p 区域 (18p11.21~p11.32, 12842~15375878, 15.4 Mb) 均一

化的信号比值对数值偏大, B 等位基因频率出现了 4 种形式, 表明此区段 DNA 发生了重复, 结合 G 显带核型图分析结果判断患儿额外染色体来源于 18 号染色体 p11.21~p11.32 区域, 核型可表示为 47, XY, +dup(p11.21~p11.32)(图 3)。



A: 核型示意图, 红色箭头表示染色体重复区域; B: 18 染色体结果示意图, 红色箭头显示在 18p11.21~p11.32 区域出现重复。

图 3 aCGH 扫描结果示意图

Figure 3 The results of array-CGH

3 讨论

标记染色体在细胞遗传学分析中能识别其存在, 但由于传统 G 显带技术带型特征不明确, 无法

识别其来源, 所以必须依靠其他分子细胞遗传学技术以明确诊断, 如多重荧光免疫原位杂交技术(multiplex FISH)、显微切割技术、光谱核型分析技术(spectral karyotyping, SKY)、MLPA 技术、aCGH 技术

等^[4-7]。本例中,应用 MLPA 和 aCGH 技术对 sSMC 进行检测。MLPA 是 2002 年荷兰学者 Schouten 等报道的一种高通量、针对待测核酸中靶序列进行定性和定量分析的新技术,可用于检测染色体拷贝数异常、基因缺失或重复。SALSA MLPA P095 试剂盒能快速检测 21, 18, 13, X, Y 染色体拷贝数的异常。该试剂盒含有 21, 18, 13, X 染色体 8 对探针, Y 染色体 4 对探针。本研究检测结果显示 18 号染色体短臂(18p11.21 和 18p11.23)上 2 个探针信号值均高于正常值范围,提示 18 号染色体短臂存在部分三体。在 MLPA 检测结果的基础上,应用 aCGH 技术进一步明确 18 号染色体短臂拷贝数异常的具体区域。aCGH 是分析拷贝数变异的高分辨率检测技术,它用不同的荧光标记待检样本和参照样本,再与芯片杂交,通过扫描荧光信号软件分析拷贝数异常的染色体区域^[8]。通过 aCGH 发现该病例 18 号染色体 p11.21~p11.32 区域存在重复,范围约为 15 Mb。

单纯 18p 的三体比较罕见,从 1975~2010 年国际上共报道了 11 例有关 18 号染色体短臂三体的病例资料,所有的病例都没有统一的表型特征,智力水平从正常到中度损害表现不一。1975 年 Taylor 等^[9]首次报道了 18p 三体的病例,Takeda 等^[10]和 Wolff 等^[11]也陆续报道了 2 例 18p 三体的病例,以上患者均未发现生理和精神发育的异常。相反,1994 年 Moog 等^[12]报道了携带 18p 三体的母亲及其后代,其中母亲为 18p 三体的嵌合体,而其后代为纯合 18p 三体,二者均具有中度的智力缺陷,母亲在外观上无明显异常,而其后代具有轻微的颅面部异常。Oner 等^[13]也报道了 18p 三体患者除具有中度的智力发育迟缓,还包含了颈项皮肤增厚、手指异常、听力损害等发育异常。Rodriguez 等^[14]报道了新发现的 1 例 18p 三体同时伴有 13/21 染色体着丝粒部位的三体,该病例表现为一侧足内翻,先天性心脏病(房间隔缺损),未发现有智力发育迟缓,而该患者的母亲具有相同的染色体核型但却仅表现为轻度的智力缺陷,由于着丝粒部位为异染色质,无临床表型,所以作者认为患者的临床表型与 18p 三体相关。迄今为止,对于 18p 三体的表型特点尚无定论,需结合父母双方的染色体核型和表型进行判定。本例中的患儿具有 18p 三体,临床表型为中度的智力缺陷,无其他外观畸形,而父母双方的染色体均为正常,临床表型也无异常,所以判定该患儿的智力缺陷与 18p 三体相关。

本例中的患儿主要表现为智力低下,智力低下

在儿童中的总发病率为 3%,而染色体异常是智力低下的主要致病原因^[15]。当出现染色体核型异常时,应首先检查父母染色体核型,判断其是否为亲代来源,如果来源于父方或母方,其表型效应是与父方或母方一致。对于新出现的 sSMC 明确其来源是判断其是否具有表型效应的关键。在本病例中,患儿染色体核型显示 47,XY,+Mar,应用 MLPA 技术和 aCGH 技术对 sSMC 进行检测,结果显示其来源于 18 号染色体短臂,进而分析判断 18p 三体与该患儿的智力低下相关。在该患儿母亲再次妊娠时,对胎儿进行羊水染色体核型分析显示染色体核型正常。

本研究应用传统 G 显带染色体核型分析技术、MLPA 以及 aCGH 技术对 1 例 sSMC 进行了分析,染色体核型分析证实 sSMC 的存在,MLPA 结合 aCGH 技术检测结果显示小标记染色体来源于 18 号染色体短臂,区域为 p11.21~p11.32,范围约为 15 Mb。MLPA 技术可以对 21, 18, 13, X, Y 这 5 条常见染色体拷贝数异常进行检测;而 aCGH 技术能检测到拷贝数异常的染色体区域,并且 aCGH 技术的检测范围可涉及所有染色体。综上所述,传统的细胞遗传学技术已不能满足日益复杂的病例检测需要,先进的分子技术对诊断 sSMC 病例上具有直观、快速、准确的特点,有利于指导遗传学分析。

[参考文献]

- [1] Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2004, 107(1-2):55-67
- [2] Liehr T. Characterization of prenatally assessed de novo small supernumerary marker chromosomes by molecular cytogenetics[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 444:27-38
- [3] Liehr T, Ewers E, Kosyakova N, et al. Handling small supernumerary marker chromosomes in prenatal diagnostics [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009, 9(4):317-324
- [4] 叶志纯, 祝兴元, 赵蕊, 等. 应用荧光原位杂交技术检测小标记染色体患儿[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2008, 25(6):720-721
- [5] 廖灿, 潘敏, 李东至, 等. 光谱核型分析技术在标记染色体诊断中的应用[J]. *中华妇产科杂志*, 2008, 43(5):321-324
- [6] Van Opstal D, Boter M, Noomen P, et al. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for rapid distinction between unique sequence positive and negative marker chromosomes in prenatal diagnosis[J]. *Mol Cytogenet*, 2011, 4:2
- [7] Bi W, Breman AM, Venable SF, et al. Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide

- array CGH[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(10):943-949
- [8] 周璐, 邬玲仟, 梁德生, 等. 应用比较基因组杂交技术鉴定标记染色体的来源 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2007, 32(2): 264-267
- [9] Taylor KM, Wolfinger HL, Brown MG, et al. Origin of a small metacentric chromosome: familial and cytogenic evidence[J]. Clin Genet, 1975, 8(5):364-369
- [10] Takeda K, Okamura T, Hasegawa T. Sibs with tetrasomy 18p born to a mother with trisomy 18p[J]. J Med Genet, 1989, 26(3): 195-197
- [11] Wolff DJ, Raffel LJ, Ferre MM, et al. Prenatal ascertainment of an inherited dup(18p) associated with an apparently normal phenotype[J]. Am J Med Genet, 1991, 41(3):319-321
- [12] Moog U, Engelen JJ, de Die-Smulders CE, et al. Partial trisomy of the short arm of chromosome 18 due to inversion duplication and direct duplication[J]. Clin Genet, 1994, 46(6):423-429
- [13] Oner G, Jauch A, Eggermann T, et al. Mosaic rearrangement of chromosome 18: characterization by FISH mapping and DNA studies shows trisomy 18p and monosomy 18p both of paternal origin[J]. Am J Med Genet, 2000, 92(2): 101-106
- [14] Rodríguez L, Liehr T, Mrasek K, et al. Small supernumerary chromosome marker generating complete and pure trisomy 18p, characterized by molecular cytogenetic techniques and review[J]. Am J Med Genet A, 2007, 143A(22):2727-2732
- [15] Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation [J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2003, 117C(1):15-24
- [收稿日期] 2012-09-18

《南京医科大学学报(社会科学版)》简介

《南京医科大学学报(社会科学版)》于 2000 年底创刊, 2011 年改版为双月刊, 是江苏省教育厅主管, 南京医科大学主办的社科类期刊。十年来一直秉承为我国医疗卫生事业服务的办刊宗旨, 为卫生事业改革、医院管理、医学法学、生命伦理学、医学教育等领域提供学术交流的平台。《南京医科大学学报(社会科学版)》为《中国核心期刊(遴选)数据库》全文收录期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊、《万方数据库——数字化期刊群》入编期刊, 连续两届荣获全国理工农医院校优秀社科学报, 2011 年更荣获全国理工农医院校优秀编辑团队的称号。

近期公布的 CNKI 中国学术期刊影响因子年报(人文社会科学 2012 版)显示, 《南京医科大学学报(社会科学版)》计量评价指标与 2011 年版相比有明显提高: 复合影响因子 0.513, 在学科内排名 165/674; 期刊综合影响因子为 0.372, 较去年比较增幅达 40%, 影响因子学科排名首次进入前百位(72/662); 基金论文比为 0.43, 增幅达 39%; 期刊综合即年指标(期刊发表的论文在当年被引用的情况)增幅达 81%。2013 年全新推出, 欢迎投稿, 欢迎订阅!

地 址: 江苏省南京市汉中路 140 号 2 号楼 352 室

电 话: 025-86862036, 86862862

邮 箱: nyxb_sh@njmu.edu.cn