

应用 Multiple-SNaPshot 技术无创性产前检测唐氏综合征

杨 岚¹, 孙海燕², 肖建平¹, 王峻峰¹, 唐 叶¹, 陈道桢^{1*}

(¹南京医科大学附属无锡妇幼保健院产前诊断中心, 江苏 无锡 214002; ²上海复旦大学生命科学院基因研究室, 上海 200433)

[摘要] 目的:探讨1种相对便捷、准确、经济的适用于杂合型 SNP 位点的无创性产前检测胎儿唐氏综合征的方法。方法:选择50例孕整倍体胎儿(孕15~21周)、13例孕21三体胎儿(孕19~26周)的母血浆样本,应用 Multiple-SNaPshot 法检测胎盘源性 PLAC4 基因上5个 SNP 等位基因的基因比率及其杂合性,从而对杂合型 SNP 位点的胎儿无创性产前检测唐氏综合征;同时对我国苏南地区200例人群的5个 SNP 位点进行基因型别研究。结果:从63例单胎孕妇外周血中成功提取到 PLAC4 mRNA, 检测出17例 PLAC4 上为杂合型 SNP 的样本,通过分析 SNP 等位基因比率检测出14例正常整倍体胎儿及3例21三体胎儿。苏南地区人群 PLAC4 上 Rs8130833 和 Rs4818219 位点的杂合度分别为0.278和0.343。结论:对 PLAC4 基因上为杂合型 SNP 位点的胎儿,用 Multiple-SNaPshot 法检测其等位基因比率可用于无创性产前筛查唐氏综合征。苏南地区人群 PLAC4 基因上 SNP 杂合度较高的位点有 Rs8130833 和 Rs4818219。

[关键词] Multiple-SNaPshot; PLAC4; 单核苷酸多态性; 无创性产前诊断; 产前筛查; 唐氏综合征

[中图分类号] R714.53

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-664-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140526

Application of SNaPshot assay in the noninvasive prenatal detection of trisomy 21

Yang Lan¹, Sun Haiyan², Xiao Jianping¹, Wang Junfeng¹, Tang Ye¹, Chen Daozhen^{1*}

(¹Department of the Center of Prenatal Diagnosis, Wuxi Maternal and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214002; ²State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** Non-invasive prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies has been achieved by measuring the ratio of two alleles of a single nucleotide polymorphism (SNP) in circulating placental mRNA (the RNA-SNP allelic ratio approach) in maternal plasma. This research is conducted to develop a rapid, accurate and cost-effective assay for the non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 21. **Methods:** Maternal plasma samples were collected from 50 euploid pregnancies (gestational age range: 15 to 21 weeks) and 13 trisomy 21 pregnant cases (gestational age range: 19 to 26 weeks). With the application of Multiple-SNaPshot assay in measuring five SNP allelic ratios and heterozygosity for the chromosome 21 transcribed placenta-specific-4 (PLAC4) mRNA in maternal plasma, we successfully achieved noninvasive prenatal detection of trisomy 21 in cases with the heterozygous SNPs on PLAC4 mRNA. Also the genotypes of the SNPs located in the transcribed regions of the gene PLAC4 were detected in population samples collected from 200 volunteers in Southeast China by SNaPshot assay. **Results:** PLAC4 mRNA was detected in peripheral blood of all pregnant women. Of all 63 singleton pregnancies, 17 gravidas were found at least one heterozygous SNP on PLAC4 mRNA in maternal plasma. Among them, 3 pregnancies with a trisomy-21 fetus and 14 pregnancies with an euploid fetus were detected by the analysis of the RNA-SNP allelic ratio. The highest heterozygosity frequencies of five SNPs on gene PLAC4 were Rs8130833 and Rs4818219, which were estimated to be 0.278, 0.343, respectively. **Conclusion:** The plasma placental RNA allelic ratio can be used for noninvasive prenatal detection of Down's Syndrome, if SNPs on PLAC4 mRNA in maternal plasma are heterozygous. The two SNPs with higher heterozygosity frequencies on gene PLAC4 were Rs8130833 and Rs4818219 in population of Southeast China.

[Key words] multiple-SNaPshot; PLAC4; RNA-SNP; non-invasive prenatal diagnosis; prenatal screening; down's syndrome

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 664-668]

[基金项目] 无锡市科技局指令性资助项目(CSEYIN1109);江苏省“科教兴卫工程”专项经费资助项目(RC201103);江苏省妇幼保健重点资助项目(F201315)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chendaozhen@163.com

唐氏综合征(Down's syndrome, DS)是活产胎儿中最常见的染色体异常综合征之一,目前 DS 的产前诊断通常采用羊水中穿刺和绒毛膜穿刺检查等方法,该方法虽为诊断的金标准,但属有创操作,对胎儿均有一定的危险性^[1-2],且耗时长、工作量大、通量低。近年来用于无创性产前诊断唐氏综合征的方法已有多种,受 Lo 等^[3]的启发,胎盘源性的血浆 RNA 等位基因比率可用于无创性发现产前非整倍体染色体疾病,Heung 等^[4]在后来的研究中也证实母体血浆中的胎盘源性的胎儿 mRNA 比母体全血中更容易检测到,最近 Tsui 等^[5]联合应用质谱分析法和数字化 PCR 检测 RNA-SNP 等位基因比例用于产前检测唐氏综合征的试验也获得了成功,其中数字化 PCR 检测方法已有学者验证了它具有较高的灵敏度和特异性^[6]。目前也有研究表明并行高通量测序技术对产前检测 21 三体胎儿具有较高的特异性和检出率^[7],但这些方法设备昂贵、试验成本较高,本研究旨在探寻一种便捷、准确且相对低成本的可用于无创性产前检测唐氏综合征的方法。本研究采用 SNaPshot 技术平台结合多重 PCR 技术实现了孕妇外周血中胎儿特异性表达的 PLAC4 基因上 5 个 SNP 位点的杂合比例检测,从而成功地在产前进行无创性唐氏综合征检测,研究结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2012 年在本院做羊水穿刺行产前诊断的母血浆样本,以苏南地区孕妇为主,其中对照组:阴性样本(孕正常单胎儿孕妇)50 例,病例组:阳性样

本(孕 21 三体单胎儿孕妇)13 例。两组均以后期的核型分析作为结果对照;选取苏州、上海等东南地区 200 例正常体检者的全血样本,进行 PLAC4 上 5 个 SNP 位点的杂合度研究。

1.2 方法

1.2.1 样本准备、mRNA 提取

无创性采集孕妇血样,置 4℃保存,于 6 h 内收集血浆;血样以 1 600 g、4℃离心 10 min,吸取血浆分装入聚丙烯离心管中,再以 16 000 g、4℃离心 10 min;每 0.25 ml 血浆中加入 0.75 ml Trizol LS 试剂,震荡混匀后保存于-80℃。所有实验操作均由对胎儿核型分析结果未知的实验员进行。

mRNA 提取:按 mRNA 提取试剂盒说明书提取母血浆 mRNA,各样本均提取双份,提取后用 15 μl DEPC 水溶解,全部用于反转录。

1.2.2 cDNA 的合成(RT-PCR)

用 TOYOBO 反转录试剂盒对上述处理的 RNA 进行 RT-PCR 扩增得到 cDNA。反应条件:取 15 μl 总 RNA,65℃加热 5 min 后立即放入冰上;配制反转录体系:2 μl 5×Transfer Mix,1 μl RT Enzyme Mix,2 μl Primer Mix;将置于冰上的 RNA 加入到配好的体系中,总反应体积 20 μl。于 37℃,45 min,95℃,5 min,得到的 cDNA-20℃保存,用于多重 PCR。

1.2.3 PLAC4 基因的 SNP 位点选取及引物设计

根据 NCBI 上选取亚洲人群杂合度较高的 5 个 SNP 位点:Rs8130833、Rs9977003、Rs59066201、Rs4818219、Rs3804026。设计扩增引物和单碱基延伸引物序列分别见表 1、表 2。

表 1 SNP 位点扩增引物序列及其反应终浓度

Table 1 PCR primers for 5 SNPs and concentrations of primers

SNP 位点	序列(5'→3')	反应终浓度(μmol/L)
Rs8130833	上游 ATAGGCATGGGGACAACAAG	0.15
	下游 AGTAACGTGATCCAGTATAGAGCCAT	
Rs9977003	上游 TGGGCAACAAGGTAACCACT	0.10
	下游 GTGTTGGGCAAGTGAAAAAC	
Rs59066201	上游 TTCCAGGAACCATCGGCA	0.15
	下游 CTGCTTCAGCTTTGTGTGGGT	
Rs4818219	上游 ATTTACAGATGAGGAAAACAGAGGCT	0.08
	下游 TTTTGAATCAGAAAAGCCACTGAC	
Rs3804026	上游 CAACAAGGCCATTTCCCAAG	0.10
	下游 TATACAACCTCGGCGCTGC	

1.2.4 多重 PCR 扩增目标产物(touch-down)

PCR 反应总体积:10 μl。反应体系:0.2 μl TransTaq DNA Polymerase (1 U),1 μl 10×TransTaq

DNA Polymerase buffer,0.2 μl dNTP Mix(10 μmol/L),0.2 μl primer Mix (各引物终浓度见表 1),2 μl cDNA,余用 ddH₂O 补足。多重 PCR 采用 touch-down 程

表2 各SNP位点基因型及相关参数

Table 2 Characteristics of the five SNP markers in this study

SNP位点	等位基因型	单碱基延伸引物序列(5'→3')	延伸产物长度(bp)	Snapshot 峰型颜色
Rs8130833	A/G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATGTTTAGGCCAGATATATTCGTC	45	蓝/绿
Rs9977003	A/G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATATTTACACCTTGTGGCCC	40	红/黑
Rs59066201	A/C	TTTTTTTTTGCAACGACTCCAAGTGTGACC	30	红/蓝
Rs4818219	A/G	TTTTTGTGTGGCTTGCAGCAGTG	22	蓝/绿
Rs3804026	A/T	TTTTTTTTTTTTTTCCCTTTATGGTACCCTGGAA	35	红/绿

序:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,63~57℃退火 40 s,每个循环减 0.5℃,12个循环,72℃延伸 1.5 min;95℃变性 30 s,57℃退火 30 s,45个循环,72℃延伸 1.5 min,72℃,7 min,产物 4℃保存,K960热循环扩增仪(杭州晶格公司)中进行。

1.2.5 第一次纯化 PCR 产物

取 PCR 产物 8 μl,加入 SAP 1 μl (1 U/μl),0.05 μl EXO1 (20 U/μl),反应总体积 10 μl,混匀后于 37℃反应 60 min,75℃终止反应 15 min,4℃保存。

1.2.6 单碱基延伸反应

反应体系 6 μl,其中含纯化产物 1.5 μl,ddH₂O 2.5 μl,SNaPshot Multiplex Mix(ABI公司,美国) 0.5 μl,5个位点的延伸引物混合物 1.5 μl,PCR反应条件:95℃预变性 3 min,95℃变性 10 s,50℃退火 5 s,65℃延伸 10 s,30个循环,4℃保存。

1.2.7 二次纯化延伸产物

取延伸产物 6 μl,加入 1.5 μl SAP 酶 (1 U)(TaKaRa公司,日本),震荡混匀,37℃ 80 min,75℃保温 15 min以灭活酶,4℃保存。

1.2.8 HiDi 变性后毛细管电泳、数据分析

每反应体系中加入 HiDi 甲酰胺 (ABI公司,美国)8 μl,样本(二次纯化产物)2 μl,混匀离心后先在 95℃ 5 min 变性成单链,再置冰上 5 min,于 ABI公司 3730XL型 DNA 序列检测仪进行毛细管电泳,应用 GeneMapper4.0 软件进行数据分析,等位基因比率通过毛细管峰形图面积比显示,进行相对定量,比值≥2即为杂合型 SNP 三体样本;比值为 1 左右即为杂合型 SNP 阴性样本。

1.2.9 PLAC4 上 5 个 SNP 位点的杂合度研究

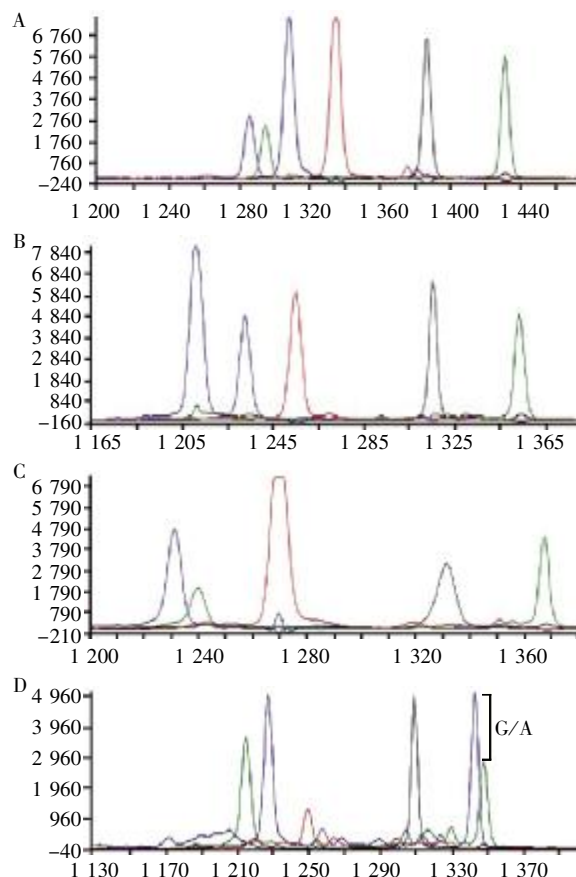
采用 SNaPshot 技术对苏南地区 200 例体检者 PLAC4 基因上 5 个 SNP 位点进行基因分型。对体检者用碱裂碱法抽提 DNA 后,进行 SNaPshot 基因分型、杂合度分析,检测步骤同上。

2 结果

2.1 基因分型检测

通过 Snapshot 技术对 50 例对照组样本 PLAC4 的基因分型检测,共检出 12 例单杂合型。

SNP 位点、2 例双杂合 SNP 位点样本,14 例杂合型 SNP 样本的等位基因比率均为 1 左右(图 1A),其余均为该 5 个检测位点的纯合子样本(图 1B)。同时对 13 例病例组样本 PLAC4 基因的 SNP 分型研究发现,10 例为纯合型 SNP 位点样本,其 5 个检测位点均为单峰(图 1C);3 例为单杂合型 SNP 位点样本,其等位基因比率均>2:1(图 1D)。



A: 杂合子阴性样本毛细管电泳图谱(Rs8130833 双峰,G/A 峰形面积比≈1.0);B: 纯合子阴性样本的毛细管电泳图谱(5个SNP位点均为单峰);C: 纯合子阳性样本的毛细管电泳图谱(cDNA,5个SNP位点均为单峰);D: 杂合子阳性样本的毛细管电泳图谱(gDNA, Rs8130833G/A 峰形面积比>2.0)。

图1 基因分型检测结果

Figure 1 The results of genotyping detection by SNaPshot assay

2.2 PLAC4 上 5 个 SNP 位点的杂合度结果分析

采用 SNaPshot 技术对苏南地区 200 名体检者 PLAC4 基因上 5 个 SNP 位点进行基因分型, 结果 Rs8130833、Rs4818219 的杂合度分别为 0.278、0.343; 其余位点 Rs9977003、Rs59066201、Rs3804026 接近 0。

3 讨 论

3.1 多重 SNaPshot 反应原理

SNaPshot 反应是针对每个待测 SNP 位点在其上游或下游设计 1 条单向寡核苷酸引物, 在 *Ampli-Taq* 聚合酶和 4 种不同荧光标记的 ddNTP 作用下, 各条引物与各自互补 DNA 模板结合, 聚合酶在引物的 3' 末端延伸单个碱基反应即终止, 不同荧光标记的 ddNTP 发射不同波长, 通过荧光检测系统显示不同颜色以区分不同的碱基。其荧光标记的延伸产物通过 DNA 测序仪进行毛细管电泳分析, 其中纯合子表现为单峰, 杂合子表现为双峰, 适合于多个 SNP 位点的基因分型^[8]。新近已被用于心血管系统疾病(如长 QT 间期综合征)的突变检测^[9]及 Y 染色体上新 SNP 基因座的发现^[10]等遗传学领域, 应用广泛。

3.2 PLAC4 基因分型结果

对 63 例孕妇血浆样本 PLAC4 上 5 个 SNP 位点的研究发现, 从母血浆中 PLAC4 上 SNP 等位基因比率的分析可判断出其相应胎儿 21 号染色体的相对含量, 对 17 例 SNP 中有杂合型位点的样本, 通过毛细管电泳峰形比值判断出其等位基因比率, 检测出 14 例整倍体胎儿和 3 例 21 三体胎儿, 除去 1 例未提取成功的阳性样本, 直接诊断灵敏度和特异性分别为 25%、28%; 对 PLAC4 上的杂合型样本而言, 其诊断灵敏度、特异性均接近 100%, 这截然不同于用血清生化标记物来筛查唐氏综合征^[11-12]。对苏南地区人群 PLAC4 基因上 5 个 SNP 位点的杂合度研究发现, PLAC4 上 5 个位点中 Rs8130833、Rs4818219 的杂合度最高, 其余位点 Rs9977003、Rs59066201、Rs3804026 在苏南地区人群中的杂合频率很低, 提示 Rs8130833、Rs4818219 较适于该人群作为无创性产前检测唐氏综合征的基因靶点。

SNaPshot 微测序技术是一种通量较高的基因分型方法, 目前较多应用在包括乳杆菌属^[13]在内的其他多种菌属诸如利斯特菌属、伯霍尔德杆菌属的物种鉴定^[14-16]等方面, 相较于其他遗传学研究方法如变性梯度凝胶电泳(DGGE)、限制性片段长度多态性分析(RFLP)等而言, SNaPshot 技术能精确判断

所需诊断位点的核苷酸种类, 从而使该方法显得更便捷有效^[13]。本研究显示多重 SNaPshot 技术可通过判断杂合型等位基因比率从而实现无创性产前筛查唐氏综合征, 检出的 17 例杂合型 SNP 样本, 结果均与其羊水染色体核型分析结果相一致。此外, 该技术还可同时对多个 SNP 位点在同一反应管内进行筛查, 通过减少总反应体系用量从而缩减 SNaPshot 试剂消耗, 与近年的质谱分析或 digital PCR 法相比^[5-6], 降低了设备及实验成本; 另外, SNaPshot 对微测序产物的毛细管电泳分析也相对便捷, 对微测序的电泳图谱分析较二代测序简单, 直观明了。然而, 本研究方法的局限性是无法对 5 个 SNP 位点均为纯合子的样本进行产前诊断, 需通过 digital RNA-SNP 方法^[6]或高通量测序技术^[7]得以区分, 这与 Zhang 等^[17]用 RFLP 及质谱分析法对 PLAC4 mRNA 上杂合型 SNP 位点的样本行产前诊断唐氏综合征的研究情形相符。鉴于目前数字化 PCR 及高通量测序方法的成本及技术要求相对较高, 本研究采用 SNaPshot 技术检测 PLAC4 mRNA 等位基因比率用于无创性产前检测唐氏综合征还是较有研究价值的。结合对苏南地区人群 PLAC4 基因上 5 个 SNP 位点的杂合度研究结果, 今后有望继续探讨 PLAC4 上其他杂合度高的 SNP 位点或胎盘源性的其他基因靶点, 将涉及 21 号染色体的多个基因多个 SNP 同时检测, 进而提高诊断效率。如何进一步提高 SNaPshot 技术用于无创性产前检测唐氏综合征或其他非整倍体疾病的诊断效率和应用范围, 有待继续深入研究。

综上所述, 对于 PLAC4 基因上为杂合型 SNP 的研究对象, SNaPshot 技术可作为快捷、准确、相对低成本的无创性产前筛查 DS 的方法, 对降低出生缺陷、提高人口素质具有十分重要的意义。

[参考文献]

- [1] Lau TK, Leung TY, Fun TY, et al. Outcome of 1355 consecutive transabdominal chorionic villus sampling in 1351 patients[J]. *Chin Med J*, 2005, 118(20): 1675-188
- [2] Kong CW, Leung TN, Leung TY, et al. Risk factors for procedure-related fetal losses after mid-trimester genetic amniocentesis[J]. *Prenat Diagn*, 2006, 26(10): 925-930
- [3] Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection[J]. *Nat Med*, 2007, 13(2): 218-223
- [4] Heung MM, Jin S, Tsui NB, et al. Placenta-derived fetal specific mRNA is more readily detectable in maternal

plasma than in whole blood [J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5858

[5] Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, et al. Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the non-invasive prenatal detection of trisomy 21 [J]. Clin Chem, 2010, 56(1): 73-81

[6] Lo YMD, Lun FMF, Chan KCA, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(32): 13116-13121

[7] Lau TK, Jiang FM, Chan MK, et al. Non-invasive prenatal screening of fetal Down syndrome by maternal plasma DNA sequencing in twin pregnancies [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, 26(4): 434-437

[8] Quintans B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, et al. Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing [J]. Forensic Sci Int, 2004, 140(2-3): 251-257

[9] Edelmann J, Schumann S, Nastainczyk M, et al. Long QT syndrome mutation detection by SNaPshot technique [J]. Int J Legal Med, 2012, 126(6): 969-973

[10] Wei W, Luo HB, Yan J, et al. Exploring of new Y- chromosome SNP loci using pyrosequencing and the SNaPshot methods [J]. Int J Legal Med, 2012, 126(6): 825-833

[11] Malone FD, Canick JA, Ball RH, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome [J]. N Engl J Med, 2005, 353(19): 2001-2011

[12] Wapner R, Thom E, Simpson JL, et al. First-trimester screening for trisomies 21 and 18 [J]. N Engl J Med, 2003, 349(15): 1405-1413

[13] Huang CH, Chang MT, Huang MC, et al. Application of the SNaPshot minisequencing assay to species identification in the Lactobacillus casei group [J]. Mol Cell Probes, 2011, 25(4): 153-157

[14] Dalmaso A, Rantsiou K, Cocolin L, et al. Development of a biomolecular assay for the identification of Listeria at species level [J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(5): 565-571

[15] Ferri L, Perrin E, Campana S, et al. Application of multiplex single nucleotide primer extension (mSNuPE) to the identification of bacteria: the Burkholderia cepacia complex case [J]. J Microbiol Meth, 2010, 80(3): 251-256

[16] Wang H, Yue J, Han M, et al. Rapid method for identification of six common species of Mycobacteria based on multiplex SNP analysis [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(1): 247-250

[17] Zhang Y, Liu H, Chen X, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome in samples from Southwest Chinese gravidas using pregnant plasma placental RNA allelic ratio [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2012, 16(9): 1051-1057

[收稿日期] 2013-07-17

《南京医科大学学报(自然科学版)》荣获首届 江苏省新闻出版政府奖

由中共江苏省委宣传部、江苏省新闻出版(版权)局、江苏省财政厅、江苏省人力资源和社会保障厅共同主办的首届江苏省新闻出版政府奖评选表彰结果公布,经评审委员会评审和评选工作领导小组审定,并经过严格的指标评定,《南京医科大学学报(自然科学版)》荣获江苏省新闻出版政府奖报刊提名奖。该奖项中报刊奖期刊类 20 种,报刊提名奖期刊类 14 种。江苏省共有 441 种期刊出版,此次仅有 34 种期刊获此殊荣。