

• 临床检验研究论著 •

变性高效液相色谱法快速诊断 21 三体综合征*

黄肖利,梅端容,黄毅,伍严安,陈豪
(福建省立医院检验科,福建福州 350001)

摘要:目的 用变性高效液相色谱法(DHPLC)分析三体综合征患者的双链 DNA,快速产前诊断 21 三体综合征。方法 根据所设计的引物对 21 号染色体 D21S11、D21S1411 和 D21S1412 共 3 个短串联重复序列(STR)位点进行 PCR 扩增,然后在 50 ℃柱温条件下用 DHPLC 对 PCR 扩增产物进行检测和分析。结果 健康对照者 D21S11、D21S1411 和 D21S1412 的 DHPLC 峰形呈现一个或两个高低相同的波峰,21 三体综合征患者的 DHPLC 峰形呈现两个高低不同的波峰,且其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍。结论 DHPLC 具有灵敏度高、特异性强、简便快捷等,适合广泛应用于 21 三体综合征的快速诊断。

关键词:21 三体综合征; 短串联重复序列; 变性高效液相色谱
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.21.006 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)21-2879-02

Rapid diagnosis of trisomy 21 syndrome by denaturing high-performance liquid chromatography*
Huang Xiaoli, Mei Duanrong, Huang Yi, Wu Yan'an, Chen Hao
(Department of Clinical Laboratory, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China)

Abstract: Objective To detect the double DNA of trisomy 21 syndrome patients by denaturing high-performance liquid chromatography(DHPLC) in order to rapidly diagnose trisomy 21 syndrome. **Methods** To amplify DNA fragments of three short tandem repeats of D21S11, D21S1411 and D21S1412 using corresponding primers. Then DHPLC was introduced to analyze the DNA fragments in the temperature of 50 ℃. **Results** DHPLC elution profiles of D21S11, D21S1411 and D21S1412 of normal control showed one peak or two peaks with the same altitude. However DHPLC elution profiles of 21 trisomy syndrome patients showed two peaks of different altitudes, which one's altitude was twice than another. **Conclusion** DHPLC is a sensitive, convenient, automatic and highly-efficient method to diagnose trisomy 21 syndrome and can be widely used in the clinic diagnosis.

Key words: trisomy 21 syndrome; short tandem repeat; denaturing high-performance liquid chromatography

21 三体综合征又称为唐氏综合征或者先天愚型,在新生儿中发病率为 1/800~1/600,是最常见的染色体病。患者常具有特殊面容(如鼻梁低平、眼裂小且向外上斜、眼距宽、常张口伸舌流涎等),智力低下,有的还伴有严重心血管疾病、肺部感染和先天性器官畸形等。染色体核型分析常作为诊断 21 三体综合征的方法之一,但其需细胞培养、耗时较长、难以进行大样本的筛查及快速诊断。近年来,国内外学者积极地探索快速、简便、快速诊断 21 三体综合征的新方法^[1-2],本研究用变性高效液相色谱法(DHPLC)对 21 号染色体 D21S11、D21S1411 和 D21S1412 的 3 个短串联重复序列(STR)位点的 PCR 扩增产物进行检测和分析,根据 DHPLC 的峰形特点达到快速诊断 21 三体综合征的目的。

1 资料与方法

1.1 一般资料 23 份病例来自 2006~2013 年期间因疑似 21 三体综合征而来本院就诊的患者,经外周血染色体核型分析确定为标准型的 21 三体综合征,其中男性 12 例,女性 11 例,年龄 1 d 至 8 岁。健康对照者为染色体核型正常者。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 取 21 三体综合征患者 EDTA 抗凝血 2 mL,全血 DNA 抽提试剂盒(泰京生物技术有限公司)抽提基因组 DNA。D21S11、D21S1411 和 D21S1412 的 PCR 扩增引物由博亚生物工程有限公司合成,引物设计在 STR 位点两侧(见

表 1)。PCR 反应体系:1×缓冲液,每种 dNTP 浓度 0.2 mmol/L, MgCl₂ 浓度 1.5 mmol/L,基因组 DNA 模板 200 ng, 1.25 U Ex-Taq 酶(Takara 生物有限公司提供),引物浓度 0.4 μmol/L,加去离子水至终体积 25 μL。PCR 反应条件:95 ℃预变性 8 min;95 ℃变性 30 s, 55~59 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30~50 s,共 30 个循环;72 ℃延伸 10 min^[3]。

表 1 3 个 STR 位点的 PCR 扩增引物

STR 位点	引物序列(5'~3')
D21S11	D21S11-F: GTT GTA TTA GTC AAT GTT CTC CAG
	D21S11-R: GTG AGT CAA TTC CCC AAG TG
D21S1411	D21S1411-F: TAA TGT GTG TCC TTC CAG G
	D21S1411-R: ATG ATG AAT GCA TAG ATG GAT G
D21S1412	D21S1412-F: CGG AGG TTG CAG TGA GTT G
	D21S1412-R: AGG GAA GGC TAT GGA GGA G

1.2.2 DHPLC 分析 在 50 ℃柱温条件下,将 8 μL PCR 产物上样于 Transgenomic 公司的 DNASep 分离柱,然后观察 DHPLC 峰形^[4]。

2 结果

2.1 PCR 扩增 D21S11、D21S1411 和 D21S1412 共 3 个 STR

* 基金项目:福建省卫生厅中青年课题资助项目(2006-1-39)。 作者简介:黄肖利,女,主管技师,主要从事细胞和分子遗传学研究。

位点的 PCR 扩增产物与 DNA 标记物一起在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳 20 min, 然后用凝胶成像系统拍照, 扩增片段大小分别为 221、299、430 bp。

2.2 DHPLC 图谱分析 DHPLC 图谱见图 1, 图 1 中从上至下仅列出 6 条 DHPLC 曲线。第一条为 21 三体综合征 D21S11 的 DHPLC 图, 第二条为健康对照者 D21S11 的 DHPLC 图; 第三条为健康对照者 D21S1411 的 DHPLC 图, 第四条为 21 三体综合征 D21S1411 的 DHPLC 图, 第五条为健康对照者 D21S1412 的 DHPLC 图, 第六条为 21 三体综合征 D21S1412 的 DHPLC 图。健康对照者 D21S11、D21S1411 和 D21S1412 的 DHPLC 峰形呈现一个波峰或两个相等的波峰。21 三体综合征患者的 DHPLC 峰形呈现两种形态, 一种峰形为单峰, 但其他的 STR 位点中至少有一个为两个高低不同的波峰, 此种情况的患者仅有两例; 另一种为两个高低不同的波峰, 且其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍; 未见三个波峰的峰形图。

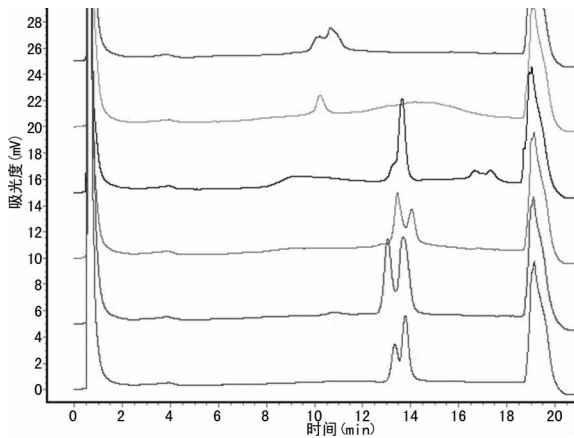


图 1 D21S11、D21S1411 和 D21S1412 的 DHPLC 图

3 讨论

21 三体综合征是最常见非整倍体异常之一, 18 三体综合征居第二。非整倍体异常多数是细胞分裂时期染色体不分离引起的, 在细胞分裂中后期, 某一对同源染色体或姐妹染色单体未分别向两极移动, 进入同一个子细胞中, 其中一个子细胞将多出一条染色体而形成三体型。染色体不分离可发生于配子形成的减数分裂期、受精卵的卵裂早期或体细胞的有丝分裂期^[5]。

21 三体综合征是严重危害人类健康和影响人口素质提高的疾病, 也是儿童智力低下最常见的病因之一, 目前尚无有效的治疗方法, 实行的补救措施就是对孕妇进行大规模产前筛查, 并在孕 16~21⁺6 周对高危孕妇进行产前诊断, 避免 21 三体综合征患儿出生。染色体核型分析虽为诊断 21 三体综合征的常用的方法, 但因其需细胞培养、耗时较长、无法在临床进行大规模地推广。

STR 是由 2~6 个碱基重复串联排列而成的 DNA 序列, 具有高度的遗传多态性, 并符合孟德尔共显性遗传定律, 可以作为染色体数目检定的遗传标记^[6]。DHPLC 是近几年来发展起来的一项新技术。在柱温 50 °C 时, DNA 双链未被打开,

长 DNA 片段有较多的负电荷, 而短 DNA 片段有较少的负电荷, 因此其与 DNasep 柱结合的牢固存在差异。短 DNA 片段因与三乙基铵醋酸盐 (TEAA) 结合的分子数目少, 先被洗脱下来, 从而达到分离长短 DNA 片段的目的^[4]。因此应用 DHPLC 检测 21 号染色体 STR 位点的 PCR 产物, 通过观察 DHPLC 波峰数量及波峰高度可以快速诊断 21 三体综合征。

健康人染色体核型有两条 21 号染色体, 而 21 三体综合征患者染色体核型则有三条 21 号染色体。本研究选用的 D21S11、D21S1411 和 D21S1412 共 3 个 STR 位点, 均为四聚核苷酸重复序列多态性位点, 杂合度分别为 90.0%、93.3% 和 87.5%^[3]。健康人 21 号染色体 STR 的 DHPLC 峰形应为单峰 (纯合) 或双峰 (杂合), 而 21 三体综合征 STR 的 DHPLC 峰形应为单峰 (完全纯合)、双峰且其中一峰为另一峰的 2 倍 (部分杂合) 或三个峰 (完全杂合)。本研究中, 健康对照者 D21S11、D21S1411 和 D21S1412 的 DHPLC 峰形呈现一个波峰或两个相等的波峰, 而 21 三体综合征患者的 DHPLC 峰形呈现两种形态: 一种峰形为单峰, 但其他的 STR 位点中至少有一个为两个高低不同的波峰, 此种情况的患者仅有两例; 另一种为两个高低不同的波峰, 且其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍; 未见三个波峰的峰形图。由此推论, 21 三体的不分离多发生于配子形成的第二次减数分裂, 该结论与其他文献报道的不尽相同^[7-8]。

综上所述, DHPLC 具有高灵敏度和特异性、简便快捷和成本低廉等优点, 可快速诊断 21 三体综合征, 实现早诊断、早预防, 优生优育的目的。

参考文献

- [1] Pertl B, Yau SC, Sherlock J, et al. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome[J]. Lancet, 1994, 343(8907): 1197-1198.
- [2] Jin CL, Zhang L, Wang RM, et al. Rapid detection of trisomy 21 by quantitative polymerase chain reaction[J]. Chin J Med Genet, 1999, 16(4): 259-261.
- [3] Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(9): 855-860.
- [4] Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review[J]. Hum Mutat, 2001, 17(6): 439-474.
- [5] 李璞. 医学遗传学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000.
- [6] Adinolfi M, Sherlock J, Pertl B. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR[J]. Bioessays, 1995, 17(7): 661-664.
- [7] 杨琳琳, 欧阳鸿, 徐湘民. 应用短串联重复序列快速诊断 21 三体[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 21(5): 466-469.
- [8] 刘元华. 定量聚合酶链反应快速产前诊断 21 三体[J]. 国外医学: 计划生育分册, 1999, 18(2): 78-80.

(收稿日期: 2014-01-08)