·论　　著·

孕妇血浆游离胎儿 DNA 检测在无创产前诊断中的应用价值研究

张利军

（四川省攀枝花市妇幼保健院，四川攀枝花 617000）

摘　要：目的　探讨孕妇血浆游离胎儿 DNA 检测在无创产前诊断中的价值。**方法**　2011 年 1 月至 2013 年 12 月该院 46 例孕妇作为研究对象，通过柱分离法获得孕妇的血浆 DNA，并通过聚合酶链反应（PCR）技术对孕妇外周血浆中游离胎儿 DNA 的性别决定基因（SRY）进行检测，并通过 ATL1 基因鉴别胎儿的性别。**结果**　46 例孕妇中 28 例产男性婴儿，18 例产女性婴儿，其中男性胎儿中的 26 例能通过 PCR 技术扩增出 SRY 基因，而女性胎儿中有 17 例经过 PCR 技术扩增出 ATL1 基因，其特异度为 94.4%（17/18），而灵敏度为 92.9%（26/28），检测的总符合率为 93.5%（43/46）。**结论**　将孕妇血浆游离胎儿 DNA 检测应用到产前检查检测中，其灵敏度和特异度都较高，且检查过程中无创伤，能减少不良事件的发生概率，值得临床推广和应用。

关键词：巢式聚合酶链反应；　产前检查；　血浆游离胎儿 DNA

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.040　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2015)11-1572-02

Value of free fetal DNA in maternal plasma on non-invasive prenatal diagnosis

Zhang Lijun

（*Maternal and Child Care Service Centre of Panzhihua*，*Panzhihua*，*Sichuan* 617000，*China*）

Abstract：Objective　To explore the value of free fetal DNA in maternal plasma on non-invasive prenatal. **Methods**　A total of 46 pregnancy women were recruited in this study from January 2011 to December 2013. Column separation method was used to got plasma DNA，SRY gene was detected by polymerase chain reaction（PCR）technology and ATL1 specific sequence were used to judge the genders of fetuses. **Results**　In 46 cases of pregnant women，there was 28 cases with male fetuses，18 cases with female fetuses，26 male fetuses was amplified with SRY gene by PCR method，while there was 17 female fetuses was amplified with ATL1 gene. The specificity and sensitivity were 94.4%（17/18） and 92.9%（26/28） respectively，the overall accuracy was 93.5%（43/46）. **Conclusion**　The sensitivity and specificity of free fetal DNA detection are higher in antenatal examination，and there is no wound for pregnant women，could reduce occurrence of adverse events.

Key words：nested polymerase chain reaction；　prenatal care；　plasma free fetal DNA

随着国内医疗技术条件的提高和对遗传性疾病认识的加深，孕妇对产前检查的重视程度越来越高。以往国内主要是通过羊水穿刺、绒毛膜活检或脐静脉穿刺术等方法进行产前检查，由于检查方法都有一定的创伤性，给孕妇和胎儿都带来了感染、出血等风险，严重者甚至流产[1-2]。而进行血清标记物或超声波检测虽无创，但灵敏度较低。如何通过无创检查对胎儿进行产前基因诊断一直是临床医务工作者努力攻破的课题[3]。自国外第一次证实孕妇血浆中存在胎儿的游离 DNA 开始，一种新的非创伤性产前检测方法诞生了[4]。为进一步验证孕妇血浆游离胎儿 DNA 检测在非创伤性产前诊断中的价值，本院采用聚合酶链反应（PCR）技术对孕妇外周血浆中游离胎儿 DNA 的性别决定基因（SRY）进行检测，并通过 ATL1 基因鉴别胎儿的性别。现将研究结果报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　按照随机双盲对照原则选择 2011 年 1 月至 2013 年 12 月在本院妇产科就诊的 46 例孕妇作为研究对象，孕龄 13～40 周，平均（28.5±5.5）周，年龄 20～30 岁，平均（23.5±5.5）岁；首次怀孕孕妇 40 例，再次或多次怀孕孕妇 6 例。排除严重贫血孕妇。

1.2　检测方法　采用由上海生工生物公司提供的 dNTPs、TaqDNA 聚合酶、缓冲液、PCR 引物，相对分子质量标记物则由北京天为时代科技有限公司提供。DNA 检测采用德国 Qiagen 公司提供的 QIAamp 血浆 DNA 提取试剂盒。所有孕妇均于禁食、禁饮 12 h 后抽空腹静脉血 3 mL 于装有抗凝剂的试管中，2 000 r/min 离心 10 min，然后将获得的上层新鲜血浆置入 EP 管中，静置，严禁搅动或吸取。将获得的血浆再次按照 3 500 r/min 离心 10 min，再次将获得的上层血浆置入 EP 管中，放入－20 ℃冰箱保存。将获得的血浆通过柱分离的方法获取 DNA，具体的操作过程严格按照试剂盒的要求执行，将血浆 DNA 用 50 μL DNA 洗脱液进行溶解并放入 AE 管中，再次放入－20 ℃冰箱保存。根据血浆 DNA 水平比较低的特点，对获取的血浆 DNA 通过 PCR 技术进行扩增，并在设计一对扩增 SRY 基因引物的基础上再设计一对位于其内侧的引物，然后进行染色体基因扩增处理。所有的反应完成后，将获得的产物加入 2%琼脂糖凝胶并进行电泳试验和 EB 染色，通过紫外灯进行观察并记录试验结果。

1.3　统计学处理　采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验，计数资料以例数或百分率表示，组间比较采用 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

琼胶电泳共进行 2 次 PCR 扩增，第一次经过 PCR 扩增虽生成了 PCR 引物，但由于条带不清楚，影响结果判读。进行第 2 次 PCR 扩增后，出现明显的条带。产男性婴儿的孕妇获得的 DNA 在进行 PCR 扩增处理后研究结果中出现了 X 染色体上的 ATL1 片段和 Y 染色体上的 SRY 片段，而产女性婴儿的孕妇获得的 DNA 在进行 PCR 扩增处理后研究结果中仅出现了 X 染色体上的 ATL1 片段。本研究纳入的 46 例孕妇共 28 例孕妇产男性婴儿和 18 例孕妇产女性婴儿。而 28 例产男性婴儿的孕妇血浆标本中有 26 例通过基因扩增技术发现了 SRY 基因（198 bp），其检测结果的灵敏度为 92.9%（26/28）。而 18 例产女性婴儿的孕妇血浆标本有 17 例通过基因扩增技

作者简介：张利军，男，副主任检验师，主要从事临床免疫学研究。

术发现了 ATL1 基因(261 bp),其检测结果的特异度为 94.4%(17/18),检测结果总的符合率为 93.5%(43/46)。

3 讨　　论

自人类史上第一次从肿瘤患者的血浆和血清中发现肿瘤 DNA 序列开始,血浆 DNA 检测就成为医学领域研究的热点[5]。有专家认为,从免疫学角度,肿瘤和机体的关系类似于胚胎和母体之间的关系,既然从肿瘤患者血浆中分离出的 DNA 可以作为肿瘤诊断的指标,那么从胚胎母体分离出的 DNA 可能有部分来自于胎儿[6-7]。1997 年国外专家通过 PCR 扩增技术应用于外周血中的 Y 染色体特异序列,并第一次证实母体外周血中确实存在胎儿的 DNA,可用于判断胎儿的性别[8]。进一步研究发现,自母体怀孕 7 周就可以检测到胎儿 DNA,且随着母体怀孕周数的增加,其水平逐渐上升,到怀孕 32 周时水平最高[9]。这些研究数据表明怀孕早期母体外周血浆中就可检测到胎儿 DNA,因此,孕妇血浆游离胎儿 DNA 检测可以作为非创伤性的产前检查。

胎儿 DNA 在母体外周血中以不同形式存在,一部分储存于进入母体血循环中的胎儿完整细胞内,另一部分储存于母体血浆。相关研究通过 PCR 扩增技术进行扩张基因片段,用于产前诊断各种遗传性疾病的检测,取得了一定研究成果[10]。本研究将孕妇血浆胎儿 DNA 检测用于胎儿性别的检测中,其灵敏度和特异度都较高,取得了满意的研究结果。

综上所述,通过孕妇血浆胎儿 DNA 检测,不仅有利于对胎儿性别、X 连锁遗传病、常染色体遗传病等疾病的早期筛查,也有利于对非整倍体染色体病的鉴别诊断,而且对孕妇及胎儿无创伤,安全可靠,值得临床应用[11-12]。

参考文献

[1] Schouten JP,Meeigunn CJ,Waaijer R,et al. Significance of detecting free DNA from maternal plasma for the diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies[J]. J Med Genet,2012,29(4):435-438.

[2] 李广华,荣卡彬,罗燕飞,等. 利用孕妇血浆中的胎儿 DNA 进行 β-地中海贫血的产前诊断[J]. 南方医科大学学报,2011,31(8):1437-1439.

[3] 陈晓蕾,李新伟,李杨,等. 孕妇血浆中游离胎儿 DNA 短串联重复序列检测[J]. 郑州大学学报:医学版,2010,45(4):589-591.

[4] 陈熙. 无创性产前诊断研究进展及甲基化技术的应用[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(9):1084-1086.

[5] 姚婷,向萍霞,胡雁婻,等. 孕妇血浆游离胎儿 DNA 检测在产前诊断中的应用[J]. 实用医学杂志,2014,30(8):1248-1250.

[6] 杨昕,廖灿,李东至,等. 无创性产前诊断技术在产前诊断中的应用前景预测[J]. 中国产前诊断杂志,2012,4(4):6-9.

[7] 邓璐莎,郭晓玲,钟进,等. 100 例非整倍体无创产前基因检测的研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2013,21(5):14-15.

[8] 冯穗华,王威,黄泳华,等. Illumina 测序技术在母血检测胎儿非整倍体中应用[J]. 中国实验诊断学,2012,16(7):1213-1215.

[9] 刘红彦,吴东,李慧,等. 孕妇血浆胎儿游离 DNA 检测对胎儿染色体拷贝数异常的诊断意义[J]. 中华医学遗传学杂志,2012,29(4):435-438.

[10] Chen EZ,Chiu RW,Sun H,et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing[J]. PLoS One,2011,6(7):21791.

[11] Chiu RW,Lo YM. Clinical applications of maternal plasma fetal DNA analysis:translating the fruits of 15 years of research[J]. Clin Chem Lab Med,2013,51(1):197-204.

[12] 陈熙,熊礼宽,曾婷,等. ERG 甲基化位点检测技术在无创性产前诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(19):2502-2504.

(收稿日期:2015-02-28)

(上接第 1571 页)

胞血尿主要见于肾小球以下部位和泌尿道毛细血管破裂出血,红细胞形态完整,呈双凹圆盘状,血红蛋白水平均一,细胞膜完整。非均一性红细胞血尿的红细胞在从肾小球毛细血管中通过病变的肾小球基底膜的狭窄裂隙处渗出,受到挤压和损伤后进入肾小管,又反复受到各阶段肾小管微环境中渗透压和 pH 的影响,外加介质的张力和各种代谢产物的反复作用,致使红细胞出现明显的改变,形成大小不一、形态不一、血红蛋白水平不一的异形改变[1-3]。

本研究结果显示,UF-1000i 尿沉渣分析仪检测诊断肾小球性血尿灵敏度高于相差显微镜,差异有统计学意义($P<0.05$);而相差显微镜对肾小球性血尿检测的特异度略高于 UF-1000i 尿沉渣分析仪,差异有统计学意义($P<0.05$)。UF-1000i 尿沉渣分析仪检测干扰因素较少,在血尿的诊断上具有较高的灵敏度。而相差显微镜有时会受到较多因素的干扰,如尿 pH 值、尿渗透压、离心速度、取尿时间等。如标本放置时间对结果影响会非常大,因此采集标本后 1 h 内完成检测。相差显微镜进行血尿分析时,对临床检验工作者的技术要求较高,经验不足将直接影响检测结果。若以畸形红细胞大于 80%作为诊断肾性血尿的标准,其灵敏度为 85%～100%,特异度为 88%～100%。若以 G1 形细胞大于 5%为肾性血尿的标准,应用相差显微镜观察鉴别,灵敏度为 73%,其中在酸性尿中的灵敏度为 99%,特异度均为 100%。采用普通光学显微镜法和染色法观察鉴别 G1 细胞,其灵敏度为 70%～100%,特异度为 96%～100%[2]。UF-1000i 尿沉渣分析仪对各有形成分的细胞膜、细胞核、细胞质进行特异度的核酸荧光染色。并通过对从各粒子产生的前向散射光、侧向散射光及侧向荧光信号转换成的光电信号进行分析,对尿液标本中各种信号进行分析,即可区分每个细胞并得出有关细胞的形态[4-6],UF-1000i 具有准确度高、方便、快速等优点,但仪器价格昂贵,且由于方法学局限,对红细胞形态的检测没有相差显微镜那么直观[5-6]。

综上所述,尿沉渣分析仪检测方法准确、简便、快速,不受主观因素干扰,灵敏度高,适合用于肾小球疾病的筛查,但由于尿液有形成分复杂且受仪器、试剂、温度,留取时间干扰,相差显微镜仍作为一种诊断手段,二者在血尿来源的筛查与鉴别上具有互补作用。

参考文献

[1] 熊立凡,刘成玉. 临床检验基础[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2007:174-176.

[2] 丛玉隆. 检验医学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009.

[3] 李克成,马晓茹,王永才. 红细胞形态在辨别血尿来源中的诊断价值[J]. 中国临床医生杂志,2008,36(2):70-71.

[4] Hyodo T,Kumano K,Haga M,et al. Detection of glomerular and non-glomerular red blood cells by automated urinary sediment analyzer[J]. Clin Lab Sci,1995,37(1):35-43.

[5] Kouri TT,Gant VA,Fogazzi GB,et al. Towards European urinalysis guidelines. Introduction of a project under European confederation of laboratory medicine[J]. Clin Chim Acta,2000,297(1/2):305-311.

[6] 陶庆春,安鹏,陈晓丹. 尿沉渣自动分析仪研究进展[J]. 检验诊断与实验室自动化,2005,3(9):145.

(收稿日期:2015-01-25)