

• 论 著 •

亲子鉴定实验用于评估产前诊断中母体细胞污染的研究*

严爱贞, 林炎鸿, 李晓丽, 余秀蓉, 林娟, 兰风华[△]

(联勤保障部队第九〇〇医院临床遗传与实验医学科, 福建福州 350025)

摘要:目的 探讨亲子鉴定实验在产前诊断母体细胞污染(MCC)评估中的临床应用价值。方法 选取 2005—2019 年来该院行产前诊断的 134 个单基因遗传病高风险家系的 137 例孕妇。于超声监视下行羊膜穿刺术, 抽取羊水, 提取羊水细胞基因组 DNA。对羊水细胞基因组 DNA、胎儿父母亲基因组 DNA 作亲子鉴定实验。采用多重荧光 PCR 技术扩增基因组 DNA 的 15 个短串联重复序列(STR)位点。根据分型结果判断是否存在 MCC, 以及 MCC 的程度。结果 亲子鉴定实验结果显示, 男性胎儿 76 例, 女性胎儿 61 例, 均未发现 MCC; 其中证实先证者为新发突变 4 例, 占高风险家系的 3.0%。所检测的胎儿特定遗传病基因型异常的有 35 例, 占 25.6%(35/137); 回访 121 例, 出生(引产)后的检查结果与产前诊断结果完全一致。结论 基于多重荧光 PCR 技术的亲子鉴定实验可提示母体细胞对羊水细胞基因组 DNA 污染程度, 确定胎儿的独立个体身份和性别, 对提高产前诊断的准确性有重要意义。

关键词:亲子鉴定实验; 母体细胞污染; 产前诊断; 羊水

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.19.014

中图法分类号:R714.55

文章编号:1673-4130(2020)19-2355-04

文献标识码:A

Application of paternity test in prenatal diagnosis of maternal cell contamination assessment*

YAN Aizhen, LIN Yanhong, LI Xiaoli, YU Xiurong, LIN Juan, LAN Fenghua[△]

(Department of Clinical Genetics and Experimental Medicine, the 900th Hospital of the Joint Logistics Team, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: Objective To explore the clinical value of paternity test in prenatal diagnosis of maternal cell contamination (MCC) assessment. **Methods** From 2005 to 2019, 137 pregnant women from 134 families with high-risk specific monogenetic disease received prenatal diagnosis in the hospital were selected. Amniocentesis was performed under ultrasonic surveillance, amniotic fluid was extracted, and genomic DNA of amniotic fluid cells was isolated. Fifteen short tandem repeats (STR) loci of genomic DNA were amplified by multiple fluorescence PCR. The existence of MCC and the degree of MCC were determined according to the genotyping results. **Results** The paternity test results showed that there were 76 male fetuses and 61 female fetuses, and no MCC was found. Among them, 4 cases (3.0%) of new mutation were confirmed as proband. Thirty-five cases [25.6% (35/137)] of fetal specific genetic disease genotype abnormalities were detected. The results of the examination after birth (induced labor) were consistent with the results of prenatal diagnosis. **Conclusion** Paternity test based on multiple fluorescent PCR technology could evaluate the MCC of amniotic fluid genomic DNA, and determine the individual identity and gender of the fetus. Therefore, paternity testing plays an important role in determining the diagnostic accuracy during prenatal diagnosis.

Key words: paternity test; maternal cell contamination; prenatal diagnosis; amniotic fluid

产前分子诊断技术现已广泛应用于单基因遗传病的诊断。尽管应用母体外周血中游离的胎儿 DNA 进行非侵入性检测及植入前产前诊断已出现^[1-3], 但侵入性产前诊断仍然为产前发现异常胎儿的有效手

段。侵入性取样是通过在孕早期绒毛穿刺或孕中期羊水穿刺进行产前诊断, 这种操作增加了母体细胞污染(MCC)的风险。由于基因扩增的高度敏感性, 即使微量的母体污染都可能干扰基因诊断结果, 也增加了

* 基金项目:福建省科技厅科学计划引导性项目(2016Y0071)。

作者简介:严爱贞,女,主管技师,主要从事分子遗传方向研究。△ 通信作者,E-mail:fhlan@mail.fjmu.edu.cn。

本文引用格式:严爱贞,林炎鸿,李晓丽,等.亲子鉴定实验用于评估产前诊断中母体细胞污染的研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(19):2355-2358.

产前诊断误诊的风险。2006 年美国医学遗传学协会 (ACMG) 公布进行产前诊断的实验规范, 并确立了实验指南^[4]。2008 年, 英国临床分子遗传学协会 (CMGS) 要求所有单基因病的产前诊断都应该进行 MCC 鉴定, 且产前诊断报告中应包含 MCC 检测报告^[5]。因此, 检测所取胎儿标本是否存在 MCC 是产前诊断分子遗传实验室必须具备的鉴别技术。本研究对产前诊断孕妇孕中期羊水标本进行 MCC 检测, 将亲子鉴定实验应用于遗传病基因检测前, 以评估羊水标本受母体细胞污染的程度。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2005—2019 年因单基因遗传病高风险来本实验室行产前诊断的孕妇共 137 例, 孕期 18~24 周。抽取孕妇孕中期羊水标本, 均无肉眼可见母血污染。同时抽取孕妇及所有家系成员 EDTA 抗凝的外周血, 每人 2 mL。以上家系检测前均接受遗传咨询并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 羊水采集和羊水细胞培养 在 B 超引导下, 由本院产科医生按常规方法抽取入选孕妇羊水 (每人 20~40 mL) 置于无菌容器中, 并立即送检。每份羊水分成两部分: 一部分直接提取 DNA, 另一部分加入适量 AminMAX 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 湿润环境进行羊水细胞培养。

1.2.2 羊水细胞或外周血 DNA 提取 使用 QIAamp[®] DNA Kit (QIAGEN 公司, 德国) 或 Chelex-100 方法提取 DNA, 用紫外线分光光度计 NanoDrop-2000 仪 (Thermo 公司, 美国) 测定其浓度及吸光度 (A) 值 ($A_{260}/A_{280} \approx 1.8$)。

1.2.3 短串联重复序列位点分析 采用 Identifiler 系统 (ABI 公司, 美国), 对羊水及其父母外周血基因组 DNA 进行扩增分析。包含的 15 个常染色体 STR 基因座 (D3S1358、D13S317、D16S539、D18S51、D2S1338、CSF1PO、TH01、vWA、D21S11、D7S820、D5S818、TPOX、D8S1179、D19S433、FGA) 和 1 个性别牙釉质蛋白 Amelogenin 基因座进行基因分型。反应体系总体积为 12.5 μ L, 内含 PCR Reaction mix 5.25 μ L, Identifiler Primer Set 2.75 μ L, Golden Taq 0.25 μ L, DNA 5 μ L (约 0.5 ng)。扩增循环参数: 95 °C 预变性 11 min, 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 28 个循环, 60 °C 1 h, 4 °C 避光保存。

1.2.4 PCR 产物的检测及结果分析 取 2 μ L PCR 产物 (或 1 μ L Ladder), 加入 12 μ L 高度去离子甲酰胺 (Hi-Di) 及 0.5 μ L GS-500LIZ, 充分混匀, 于 95 °C 变性 2 min, 冰浴 4 min。将变性冷却后的产物置于 ABI3130 遗传分析仪行毛细管电泳及荧光检测, Data Collection 3.0 电泳数据, GeneMapperID 3.2 基因分

型, 识别 STR 基因型及峰高。

1.2.5 检测敏感性实验 对已知等位基因分型的 4 对亲生母子的 8 份血液标本分别提取纯 DNA, 并进行浓度及 A_{260}/A_{280} 值测定, 通过用母亲污染孩子 (胎儿) DNA 标本, 产生了混合基因组 DNA。混合标本模拟 2.5%、5.0%、10.0%、20.0%、30.0%、40.0% 的 MCC 水平, 稀释到 0.5 ng/ μ L, 用 Identifiler 体系扩增, 评估该方法检测 MCC 的敏感性。

2 结果

2.1 混合样品检测实验分析结果 参照法医个体识别和混合标本鉴别的方法, 以荧光吸收峰表示每一基因座的等位基因, 单一样品, 纯合子基因座仅有一个峰, 杂合子有 2 个峰。混合样品, 会出现复杂的 STR 图谱。不同比例混合的样品会出现峰高不平衡现象且组分比例越悬殊, 峰高差异越显著。对 24 个二组分混合样品进行分析, 结果显示, 在 6 个不同稀释比例的标本中, 4 组模型中 5.0% 以上稀释比例的标本均能检测到母源性峰 (图 1), 当混合比例为 5.0% 时, 其部分等位基因已消失, 其峰高已接近 “Stutter” 峰高, 鉴别时注意区分^[6]; 当混合比例为 2.5% 时, 已完全检测不到。可见该方法检测 MCC 的灵敏度为 5.0%。

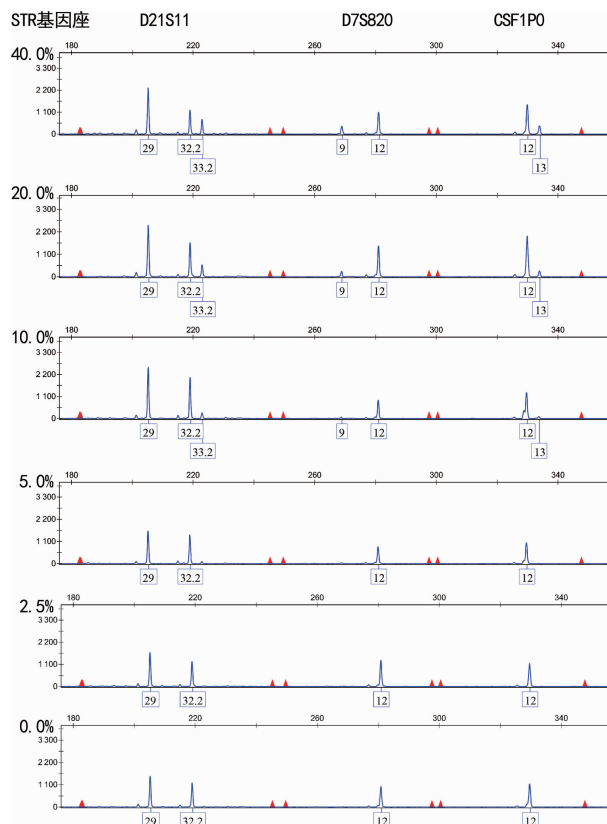
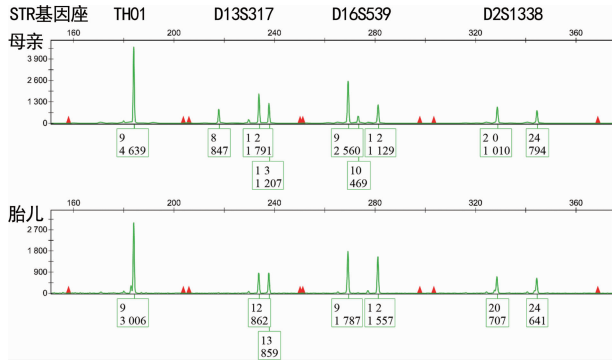


图 1 亲子鉴定实验检测不同梯度浓度 MCC

2.2 Identifiler 体系排除 MCC 结果判断 根据峰出现数目分析, 因胎儿有一个基因型来自母亲, 另一个来自父亲, 如果羊水中存在 MCC, 母亲和胎儿之间共有的等位基因对 MCC 判定来说是毫无意义的。当几

个基因座存在 3 个峰型,即母亲独有等位基因(污染等位基因)出现在羊水 DNA 中,即可判断为存在 MCC,根据母亲独有基因型峰高/胎儿独有基因型峰高 $\times 100\%$,可以估算 MCC 程度,见图 2。



注:TH01 和 D2S1338 基因座是无意义的,黑色箭头所示 P 为 Stutter 峰,S 为母亲、胎儿共有等位基因,C 为母亲独有等位基因,N 为胎儿独有等位基因。

图 2 亲子鉴定实验检测 40.0% MCC 的结果

2.3 羊水细胞 DNA 检测结果与随访结果 共实施 137 例单基因遗传病高风险家系的产前诊断,对羊水细胞基因组 DNA、胎儿父母亲基因组 DNA 作亲子鉴定实验,鉴定结果显示男性胎儿 76 例,女性胎儿 61 例;未发现存在 MCC 的羊水标本。诊断结果为异常胎儿基因型有 35 例,占 25.6%,建议终止妊娠,其中 11 例接受引产后留脐带血复查,结果与产前一一致;102 例为正常或隐性携带者,随访出生后未见疾病表现,其中 121 例取脐带血复查,结果也与产前一一致。另外,共发现先证者基因型不符合孟德尔遗传定律 4 例,均证实为亲生关系。

3 讨论

亲子鉴定技术是多重 PCR 技术和荧光标记技术的结合,能够实现在一个单管中同时扩增出多个人类短串联重复序列 (STR) 基因座 (又称微卫星 DNA),其突出特点是基因座多,片段短,多态性高,在法医学亲子鉴定和个体识别、人类起源和进化、遗传性疾病的诊断中具有广泛的应用价值^[7]。本实验室自 2004 年采用法医亲子鉴定 Identifiler 系统对产前诊断中 MCC 程度进行筛查,是国内较早将亲子鉴定实验应用到遗传病产前分子诊断中的医院^[8]。有研究数据表明,在产前羊水标本中 MCC 是普遍存在的,其中 0.3%~1.3% 的羊水标本污染比例可达 20% 以上^[9]。较高的 MCC 可能导致不确定的结果或严重的妊娠结局,需要进行额外的侵入性操作,而每一次操作都会增加流产的风险,因此通过 MCC 检测可为培养后标本的可用性提供机会^[10]。

侵入性产前诊断主要适应证有:(1)已知先证者突变,可直接检测胎儿是否遗传该特有突变;(2)胎儿超声检查结果提示有遗传性疾病风险,并要求进行基

因检测以确定诊断结果。不同病种采用的检测技术可能存在差异,MCC 对于产前诊断结果的影响程度,取决于疾病的分子遗传学特征及产前诊断所使用的技术方法。本研究的产前病例均为前一种情况,主要采用 Sanger 测序和多重连接依赖探针扩增 (MLPA)^[11] 的检测技术。研究数据显示,分子检测技术本身的灵敏度与 MCC 检测的灵敏度之间存在差异,Sanger 测序对 MCC 的灵敏度限制在 5%~30%,相较于 MLPA,当存在较高比例的 MCC ($\geq 40\%$) 时才会导致诊断的不确定性^[12]。侯巧芳等^[13] 也认为,对于基于 PCR 的基因分析,10% 及以上的 MCC 即可能对检测结果产生干扰,30% 的 MCC 容易导致错误的诊断结果。本研究所采用的 Identifiler 系统^[14-15] 是选用 16 个 STR 基因座的鉴定体系,是以检测灵敏度为 5.0% 以上的污染比例为基础的,明显高于 Sanger 测序和 MLPA 方法的报告敏感性,完全可以达到排除 MCC 干扰的目的。本研究以单基因遗传病高风险家系为研究对象,对 137 例均无可见母血污染的羊水标本,进行 MCC 筛查,均未发现存在 MCC 污染,与其他同类报道存在差异^[13,16]。这可能与本研究在收集羊水标本时丢弃最初 2 mL 羊水的做法有关,由此证明该方法可以极大降低 MCC 的风险^[16],但也可能与本研究的病例数较少有关。

实际上在产前分子诊断中,由于遗传方式不同、母亲是否为携带者或胎儿性别等情况,鉴定胎儿是否是患者还是携带者会出现多种复杂的可能情况。如常染色体隐性遗传病,父母双方均为无症状携带者,遗传给下一代就可能发病。MCC 对于正常或仅父源突变携带者的胎儿无明显影响,但是当检测到胎儿存在母源性突变时,却增加了正常胎儿被误判为携带者或异常胎儿的风险;尤其是在显性/X 连锁遗传病诊断中,当母亲为致病基因携带者时,则必须筛查母体污染,以排除母体基因型的干扰,以免影响基因诊断结果,造成严重后果。

本研究共检测 137 例产前诊断病例,其中常染色体隐性遗传病例 84 例,占大部分;其次为 X-连锁遗传和显性遗传病例分别为 37 例和 16 例。通过应用亲子鉴定技术检测产前诊断标本的 MCC 污染,所检测的异常胎儿基因型有 35 例,占 25.6%,受检夫妇均选择终止妊娠,其中仅 31 例接受引产后留脐带血做复查,结果与产前一一致;102 例为正常或隐性携带者,随访出生后未见疾病表现,其中 90 例取脐带血做复查,结果与产前一一致。此外,在对先证者及其父母进行家系筛查的过程中,发现 4 例先证者基因型不符合孟德尔遗传定律,通过亲子鉴定实验,证实均存在亲生血缘关系,考虑先证者为新发突变,而同样的新发变异可能在孕妇新的妊娠中复发并导致下一个孩子也受

到影响,二者具有很高的实际相关性。因此,需要针对这种复发性风险进行评估,并对孕妇及家属进行充分的告知。本实验室自 2005 年起将亲子鉴定实验应用于遗传病产前诊断中,并建立了基于该方法检测微量 MCC 的产前标本质量评估流程(图 3)。本研究结果显示,在进行侵入性操作时,经验丰富的产科医生及规范化操作是保证产前标本足够纯度的重要前提。同时,在常规进行 MCC 排除鉴定时,应同时对父、母体 DNA 进行检测并作为对照。此外,进行性别位点鉴定可以增加判断性连锁遗传病产前诊断结果的准确性,指导患某些代谢性遗传病(如 21-羟化酶缺陷症)的胎儿进行宫内干预治疗。

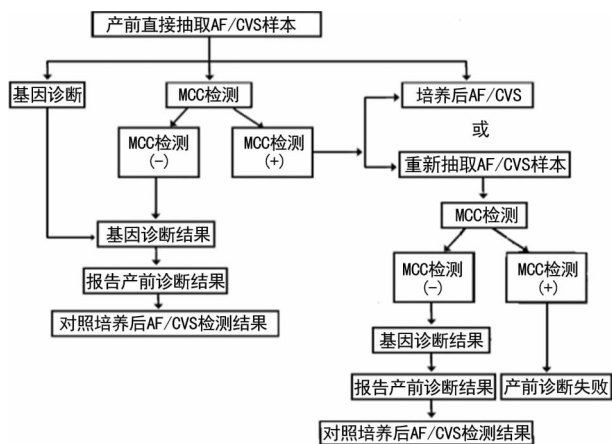


图 3 产前标本基因诊断质量评估流程

4 结 论

本研究采用亲子鉴定实验对有创标本的 MCC 进行鉴定,为多种单基因遗传病实现了准确的产前诊断,证实了亲子鉴定实验是一种快速确定胎儿身份和评估 MCC 的有效方法,对提高产前诊断的准确性和指导临床治疗具有重要意义。

参考文献

[1] MEDDEB R, DACHE Z A A, THEZENAS S, et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5220.

[2] ZHANG J, LI J, SAUCIER J B, et al. Noninvasive prenatal sequencing for multiple Mendelian monogenic disorders using circulating cell-free fetal DNA[J]. Nat Med, 2019, 25(3): 439-447.

[3] DOLAN S M, GOLDWASER T H, JINDAL S K. Preimplantation genetic diagnosis for Mendelian conditions[J]. JAMA, 2017, 318(9): 859-860.

[4] SCHRIJVER I, CHERNY S C, ZEHNDER J L, et al. Testing for maternal cell contamination in prenatal samples: a comprehensive survey of current diagnostic prac-

tices in 35 molecular diagnostic laboratories[J]. J Mol Diagn, 2007, 9(3): 394-400.

[5] ALLEN S, MOUNTFORD R, BUTLER A, et al. Practice guidelines for the testing for maternal cell contamination (MCC) in prenatal samples for molecular studies[S]. UK Clinical Molecular Genetics Society, 2008.

[6] NAGAN N, FAULKNER N E, CURTIS C, et al. Laboratory guidelines for detection, interpretation, and reporting of maternal cell contamination in prenatal analyses a report of the association for molecular pathology[J]. J Mol Diagn, 2011, 13(1): 7-11.

[7] CHIA W C, KHOO T S, ABDUL WAHID S F S, et al. Multiplex STR panel for assessment of chimerism following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)[J]. Ann Hematol, 2019, 98(5): 1279-1291.

[8] 兰风华, 曾健, 黄惠娟等. 5 个脊肌萎缩症高风险胎儿的产前诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(4): 373-377.

[9] LAMB A N, ROSENFELD J A, COPPINGER J, et al. Defining the impact of maternal cell contamination on the interpretation of prenatal microarray analysis[J]. Genet Med, 2012, 14(11): 914-921.

[10] AKOLEKAR R, BETA J, PICCIARELLI G, et al. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015, 45(1): 16-26.

[11] WANG D, GAO M, ZHANG K, et al. Molecular genetics analysis of 70 Chinese families with muscular dystrophy using multiplex ligation-dependent probe amplification and next-generation sequencing [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 814.

[12] KOCZOK K, GOMBOS É, MADAR L, et al. Interfering effect of maternal cell contamination on invasive prenatal molecular genetic testing[J]. Diagn, 2018, 38(9): 713-719.

[13] 侯巧芳, 廖世秀, 李涛, 等. 产前诊断标本的母体细胞污染及影响[J]. 中华妇产科杂志, 2013, 48(2): 86-91.

[14] HUANG Y, ZHANG Y, WANG W, et al. Genetic variation of 15 STR loci in Lisu ethnic minority in southwestern China[J]. Int J Legal Med, 2020, 134(2): 509-510.

[15] SHIN Y J, CHUNG J H, KIM D J, et al. Quantitative fluorescent polymerase chain reaction for rapid prenatal screening of fetal aneuploidies in chorionic villus sampling in a single institution[J]. Obstet Gynecol Sci, 2016, 59(6): 444-453.

[16] WEIDA J, PATIL A S, SCHUBERT F P, et al. Prevalence of maternal cell contamination in amniotic fluid samples[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2017, 30(17): 2133-2137.