

荧光原位杂交技术在快速产前诊断应用的研究进展

莫耀禧, 莫伟英(综述), 谭毅(审校)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 莫耀禧(1977-), 男, 医学硕士, 研究实习员, 研究方向: 细胞遗传学。E-mail: moson1_ok@yahoo.com.cn

[摘要] 随着分子生物学技术和医学遗传学的发展, 产前诊断技术向早期、快速、准确、无创伤发展, 越来越多的出生缺陷能够在胚胎发育的较早期诊断出来。荧光原位杂交技术(FISH)是一种为遗传病诊断提供更直观、快速诊断的分子细胞遗传技术, 随着DNA技术的发展与染色体特异性探针的出现, FISH技术越来越多应用于生殖医学领域的临床诊断。该文对FISH技术在快速产前诊断中的研究进展作一综述。

[关键词] 荧光原位杂交; 快速产前诊断; 植入前遗传学诊断

[中图分类号] R 714 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)04-0374-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.04.36

Progress in the rapid prenatal diagnosis by using of fluorescence in situ hybridization MO Yao-xi, MO Wei-ying, TAN Yi. Reproductive Medical and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] With fast development in molecular biology and medical genetics, prenatal diagnosis is becoming rapid, sensitive and non-invasive techniques, more and more birth defects has been diagnosed in early stage of embryonic development. With the advent of chromosome-specific probe and development of DNA technique, fluorescence in situ hybridization (FISH) has widely been used in clinical as a molecular diagnostic technology by providing intuitionistic and rapid diagnosis. In the paper, the research progresses of FISH in the rapid prenatal diagnosis are discussed.

[Key words] Fluorescence in situ hybridization(FISH); Rapid prenatal diagnosis; Preimplantation genetic diagnosis

染色体病目前尚无有效治疗方法, 产前诊断是防止染色体患儿出生的有效措施。随着分子生物学技术的发展, 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术已逐渐成为解决复杂染色体异常的一种重要方法。1992年Klinger等^[1]首次前瞻性研究报道使用荧光原位杂交技术对未培养的羊水中期细胞进行染色体非整倍体异常检测, 将产前诊断时间缩短到24~48 h。近年来, 随着DNA技术的发展与染色体特异性探针的出现, FISH技术越来越多应用于生殖医学领域的临床诊断。现对FISH技术在快速产前诊断中的研究进展作一综述。

1 FISH技术的原理与特点

FISH技术的基本原理是用特殊荧光标记的核苷酸分子的探针, 与被检测样本中的DNA或RNA杂交后, 在荧光显微镜下观察荧光信号来检测DNA序列在染色体或DNA纤维切片上的定性、定位和相

对定量分析。FISH技术是一种具有特殊用途的原位杂交技术, 可用于性别诊断、染色体非整倍体诊断、染色体结构异常诊断、基因定位、间期细胞遗传学及肿瘤遗传学方面的研究, 而且新鲜的、冰冻的或固定的组织及多种标本类型均可进行FISH分析。FISH技术具有以下几方面特点^[2]: (1)操作简易快速, 从收集标本到得出结果只要1~2 d时间; (2)采用生物素、荧光素等标记的探针, 比用放射性同位素标记探针更为安全; (3)探针标记后稳定, 一般可使用2年左右; (4)灵敏度高, 应用不同的探针可以显示出某一染色体、染色体片段和单拷贝序列; (5)可在染色体中期相和间期相上观察结果; (6)可以同时检测2种以上DNA的三维结构, 制备出染色体的光谱核型, 使全染色体的自动化分析得以实现; (7)可用多种显色; (8)特别适用于易位、微小缺失和插入等染色体畸变的分析。

2 FISH 应用于快速产前诊断

2.1 用于检测未培养羊水水中的染色体异常 产前诊断又称为宫内诊断,是通过直接或间接的方法对胎儿作出是否患有某种疾病的诊断,从而防止具有严重遗传病、智力障碍及先天畸形的患儿出生。目前对胎儿染色体疾病的产前诊断传统技术多采用孕中期行羊膜腔穿刺羊水细胞培养的方法,对染色体中期分裂相进行细胞遗传学分析,操作过程长而且技术复杂。FISH 作为一种成熟的技术,在国外的临床中已经应用多年。如 Van Opstal 等^[3]研究认为 FISH 检测未培养羊水间期细胞是一种快速区别真假胎儿嵌合体的可靠方法。13,21,18,X,Y 这些染色体出现非整倍体占活产胎儿染色体异常的 90% 以上,美国医学遗传学院^[4]用 13,18,21,X,Y 染色体特异性探针对 5 348 例妊娠妇女未培养的羊水间期细胞进行 FISH 检测,可在羊膜腔穿刺 24~48 h 内快速诊断出这些染色体的非整倍体。国外类似报道较多。在国内,FISH 也有许多的研究。如夏革清^[5]收集 547 例孕妇中唐氏综合征筛查阳性者 28 例及 3 例具有其他产前诊断指征的孕妇,共计 31 例患者的羊水,应用 13/21 号染色体特异性双色探针对羊水间期细胞进行 FISH 检测,以羊水培养细胞常规 G 显带核型分析作为 FISH 检测结果对照。结果发现 31 例标本中 1 例发生母血严重污染,其余 30 份标本均杂交成功(包括 1 例混浊羊水)。FISH 检测结果发现典型“21 三体”1 例,未发现“13 三体”。FISH 诊断结果与核型分析结果一致。汪广杰^[6]选用 X、Y、13、18、21 号特异性探针对 50 例有产前诊断指征的孕妇进行羊水间期细胞的 FISH 分析及染色体核型分析。结果被检 50 例羊水未培养细胞均获得诊断结果,检测出“21 三体”3 例,检测结果与染色体核型分析及随访相符。陈珊珊^[7]对 100 例孕 12~27 周末培养羊水细胞进行 FISH 快速产前诊断,对 5 条染色体(X、Y、13、21 和 18 号)进行检测,以细胞培养常规核型分析作为 FISH 检测结果的对照。结果发现被检 100 例羊水未培养细胞均获得诊断结果,检测出 7 例非整倍体,FISH 结果与核型分析结果一致。另外,干志峰^[8]用荧光原位杂交方法诊断 13、18、21、X、Y 染色体非整倍体。结果发现 100 例受检样本中,染色体数目异常 3 例,其中“21 三体”2 例,“45,X”1 例。FISH 方法与传统羊水细胞核型分析符合率 100%。其他研究者^[9-11]也进行了许多相关研究,结果均表明 FISH 产前诊断羊水间期细胞非整倍体准确率与核型分析一致。

2.2 用于绒毛样本的染色体分析 同样是早期产前诊断的一种安全有效的方法,其将诊断时间提前到妊娠早期更容易被妊娠妇女接受。无论是经腹壁还是经宫颈抽取绒毛最适宜时期为 10~13 周,而羊膜腔穿刺一般在 18 周,过早羊膜腔穿刺可引起流产。另外在一些羊水过少的疾病检查中,抽取绒毛做 FISH 比羊水细胞更可靠。陈黎明^[12]发现在绒毛细胞分裂中期,采用特定的染色体重复 DNA 探针和 FISH 的方法能够正确识别非整倍体。杜梅君等^[13]应用地高辛标记的探针 p Y3.4 以及生物素标记的探针 2 1q2 2.3,对 10 例流产绒毛进行 FISH,结果发现 FISH 杂交结果与绒毛染色体分析结果一致,诊断率达 95% 以上。谭凤钦^[14]对两例绒毛细胞作了产前性别诊断,都取得了良好的诊断效果。刘国川^[15]应用 FISH 快速检测胎血和绒毛中染色体非整倍体,发现在绒毛和胎血之间无论用哪一种探针杂交效率差异均无统计学意义。另外,有研究表明,FISH 技术包含的信息量大,可发现传统的细胞遗传学方法检测葡萄胎组织细胞核型时遗漏的低比例嵌和体,但尚需补充应用常染色体探针作进一步的研究^[16]。FISH 技术能快速、准确地诊断流产绒毛染色体非整倍体畸变,与常规染色体核型分析结合运用,可为临床流产病因的探讨提供更为准确的依据^[17]。

2.3 用于胚胎植入前诊断 随着科学技术的发展,通过植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis,PGD)把疾病控制在胚胎发育的最早阶段,可尽量避免传统的产前诊断技术对异常胚胎进行治疗性流产给孕妇带来的身心痛苦,且在伦理上更易被接受^[18]。PGD 的取材极少,不易获得染色体中期分裂相,且为了保证准确性,诊断方法必须具有高度特异性,而 FISH 不仅可对染色体中期分裂相,更可以对间期细胞核进行分析,方法准确、特异,使之成为目前的研究热点^[19]。由于 PGD 技术才刚刚起步以及 FISH 技术自身的限制,使 FISH 技术在 PGD 的应用中还存在一些亟待解决的问题:(1)受 DNA 探针荧光素染料限制,每个卵裂球只能用 2~5 个探针分析染色体,限制了染色体数目的分析;(2)FISH 技术进行 PGD 时受时间和卵裂球数目的限制,用单卵裂球进行 FISH 时,3% 的卵裂球会没有信号及出现 5% 的错误结果;(3)FISH 技术的实验条件要求较高,操作过程中的任何一个小的失误均可导致严重的临床后果^[20]。

3 FISH 技术的应用前景

当前动播核型分析在产前诊断中地位的理由有:(1)传统的细胞遗传学分析羊水和绒毛时一般基因组片段须为 ≥ 5 Mb 的染色体结构异常才能检出。(2)无法判断小的额外标记染色体的来源,也无法发现染色体亚端粒区域微小重排和微缺失。因此传统核型分析已经到达了检测的极限。可以预测,随着 FISH 等分子遗传学技术的普及推广,快速产前诊断将成为潮流发展的趋势。同核型分析相比,FISH 技术的突出优势在于快速得到结果从而更早缓解产妇的焦虑情绪,联合超声检查,FISH 技术能在一站式快速产前诊断模式中发挥重要作用^[21]。

参考文献

- 1 Klinger K, Landes G, Shook D, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. Am J Hum Genet, 1992, 51 (1): 55 - 65.
- 2 胡恭华,李舒梅. 荧光原位杂交技术在毒理学研究中的应用进展 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22 (6): 759 - 761.
- 3 Van Opstal D, van den Berg C, Galjaard RJ, et al. Follow-up investigation in uncultured amniotic fluid cells after uncertain cytogenetic results [J]. Prenat Diagn, 2001, 21 (2): 75 - 80.
- 4 Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multicenter retrospective study and review of the literature [J]. Prenat Diagn, 2001, 21 (4): 293 - 301.
- 5 夏革清,张丽萍,谢宝国,等. 荧光原位杂交产前诊断羊水间期细胞非整倍体的临床应用价值 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2009, 38 (2): 254 - 257.
- 6 汪广杰,张晓莉,罗 阳,等. 应用荧光原位杂交技术对 50 例羊水标本产前诊断的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31 (8): 729 - 732.
- 7 陈珊珊,袁 静,叶四云,等. 荧光原位杂交技术在产前遗传学诊

- 断中的应用 [J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43 (4): 462 - 463.
- 8 干志峰,方小武,吴日然,等. 荧光原位杂交技术在染色体非整倍体产前诊断中的应用研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17 (6): 34 - 35, 封三.
- 9 许争峰,王讯美,潘淑娟,等. 应用荧光原位杂交技术进行产前诊断的可行性探讨 [J]. 江苏医药, 2000, 26 (11): 861 - 863.
- 10 朱姗姗,凌 奕,许 琳,等. 国产荧光原位杂交探针在产前染色体异常诊断中的应用研究 [J]. 海南医学院学报, 2009, 15 (9): 1035 - 1038.
- 11 贺方华,李华锋,李 琳. 评价荧光原位杂交技术用于临床快速产前诊断唐氏综合征的可行性 [J]. 山东医学高等专科学校学报, 2008, 30 (6): 449 - 451.
- 12 陈黎明. 采用荧光原位杂交方法对未培养的绒毛细胞快速检测非整倍体 [J]. 国外医学妇产科学分册, 1994, 21 (2): 108.
- 13 杜梅君,曾 瑄. 荧光原位杂交技术在绒毛膜间期细胞诊断中的应用 [J]. 山西医药杂志, 2001, 30 (3): 207 - 208.
- 14 谭凤钦,刘 杰,张香改,等. 应用荧光原位杂交诊断性染色体异常和绒毛细胞的产前诊断 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2000, 8 (6): 41 - 42.
- 15 刘国川. 荧光原位杂交快速检测胎血和绒毛中染色体非整倍体 [J]. 国外医学妇产科学分册, 1995, 22 (3): 175 - 176.
- 16 邵 雨,伍俊萍. 用荧光原位杂交技术检测难免流产绒毛组织及葡萄胎组织性染色体数目异常 [J]. 上海医学, 2004, 27 (9): 636 - 638.
- 17 戚庆炜,向 阳,赫 娜,等. 双胎之一完全性葡萄胎的产前诊断及处理 [J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38 (10): 595 - 598.
- 18 颜军昊,李 媛,胡京美,等. 用 X、Y 双色探针行人胚分裂球植入前诊断 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2004, 42 (3): 322 - 324.
- 19 张静引,孙丽洲,肖云山,等. 改良荧光原位杂交技术在产前诊断中的应用 [J]. 现代妇产科进展, 2009, 18 (6): 442 - 445.
- 20 韩哲辉,岳天孚,张 颖. 荧光原位杂交技术在产前诊断中的应用 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2009, 28 (1): 34 - 36, 40.
- 21 徐爱群,边旭明. 荧光原位杂交技术用于快速产前诊断临床评价 [J]. 国际妇产科学杂志, 2009, 36 (3): 172 - 177.

[收稿日期 2011 - 10 - 13] [本文编辑 谭 毅 韦 颖]

本刊严正声明

根据有关读者举报并经本刊初步查证,近一段时间来有人冒充本刊名义和盗用本刊的合法刊号 (ISSN1674 - 3806/CN45 - 1365/R) 进行非法出版活动 (该非法出版物的编辑部地址为:北京市 100036 信箱 27 分箱;邮政编号:100036;联系电话:010 - 87013678;网址: <http://www.zglcxyx010.com>; E-mail: zglcxyx010@126.com, zglcxyx@163.com), 严重地侵犯本刊的合法权益,损害了本刊的名义,在社会上造成了极坏的影响。为此,本刊特严正声明如下:

(一) 冒充本刊名义和盗用本刊合法刊号的违法者必须立即停止一切侵权行为和非法出版活动,并对已发生的侵权行为和非法出版活动承担法律和经济责任。

(二) 本刊已委托律师通过法律手段追诉侵权和非法出版者的法律责任和经济赔偿责任。

(三) 本刊一贯严格遵守和执行新闻出版的有关法律、法规和管理规定,从未在全国任何地方设立过分支机构、分部和代办点;从未委托本编辑部以外的任何人进行组稿、征稿业务活动。

(四) CN45 - 1365/R 的标准刊号为出版物和编辑部设在广西的特定登记号,凡在广西以外出现的 CN45 - 1365/R 刊号的出版物和编辑出版机构都是非法的。

(五) 本刊合法的编辑部地址为:广西南宁市桃源路 6 号广西壮族自治区人民医院内。邮政编码为:530021。电话号码为:0771 - 2186013。网址为: <http://www.zglcxyxzz.com>。E-mail: zglcxyxzz@163.com。

(六) 敬请广大作者、读者务必认准本刊的标准刊号和编辑部地址,谨防上当受骗。

• 本刊编辑部 •