

namic MR hysterosalpingography: a preliminary report[J]. Eur Radiol, 2001, 11(8): 1439 - 1444.

12 Richman TS, Viscomi GN, de Cherney A, et al. Fallopian tube patency assessed by ultrasound following fluid injection. Work in progress [J]. Radiology, 1984, 152(2): 507 - 510.

13 何冠南, 杨家翔, 袁桃, 等. 经阴道子宫输卵管四维超声造影在评价输卵管通畅性中的应用价值[J]. 中华医学超声杂志, 2014, 11(1): 32 - 37.

14 高文学, 王军燕, 汪龙霞, 等. 声诺维与双氧水子宫输卵管超声造影临床对照研究[J]. 中国超声医学杂志, 2008, 24(10): 929 - 931.

15 张新玲, 郑荣琴, 黄冬梅, 等. 双氧水声学造影评价输卵管的通畅性[J]. 中国超声诊断杂志, 2004, 5(4): 271 - 273.

16 伍文霞, 徐永莲, 熊德庆, 等. 经阴道三维输卵管超声造影在不孕症诊断中的应用[J]. 大理学院学报, 2011, 10(6): 54 - 56.

17 孟焱, 张丹, 张颖, 等. 全氟丙烷人血白蛋白微球注射液在实时三维子宫输卵管超声造影中的应用[J]. 肿瘤影像学, 2014, 23(2): 81 - 83.

18 程琦, 王莎莎, 朱贤胜, 等. 经阴道子宫输卵管四维超声造影评估输卵管的通畅性[J]. 中国医学影像技术, 2013, 29(3): 455 - 458.

19 Giugliano E, Cagnazzo E, Bazzan E, et al. Hysterosalpingo-contrast sonography: is possible to quantify the therapeutic effect of a diagnostic test? [J]. Clin Exp Reprod Med, 2012, 39(4): 161 - 165.

20 吕晓晖, 黎小虹. 输卵管远端梗阻腹腔镜术后妊娠率与输卵管伞端形态关系分析[J]. 中国临床新医学, 2012, 5(12): 1146 - 1148.

21 熊润青, 李善华, 王洪梅, 等. 经阴道超声造影诊断输卵管通畅性的假阳性及假阴性分析[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(22): 10371 - 10373.

22 张迎, 程琦, 王泓, 等. 经阴道二维超声和三维子宫输卵管超声造影评价输卵管通畅性的对比研究[J]. 临床超声医学杂志, 2012, 14(7): 440 - 443.

23 程琦, 朱贤胜, 王莎莎, 等. 经阴道子宫输卵管四维超声造影逆流征象及结果分析[J]. 临床超声医学杂志, 2013, 15(12): 817 - 821.

24 梁娜, 吴青青, 高风云, 等. 三维子宫输卵管超声造影评价输卵管通畅性[J]. 中国医学影像技术, 2013, 29(2): 256 - 259.

[收稿日期 2015 - 03 - 24][本文编辑 谭毅 刘京虹]

新进展综述

多重置换扩增在地中海贫血植入前遗传学诊断中的应用

王世凯, 黄莉(综述), 何冰(审校)

基金项目: 广西卫计委科研课题(编号: Z2013343); 广西自然科学基金资助项目(编号: 2011GXNSFA018302)

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: 王世凯(1981 -), 男, 医学硕士, 助理研究员, 研究方向: 生殖医学。E-mail: wskgxu@163.com

通讯作者: 黄莉(1959 -), 女, 研究生学历, 学士学位, 主任技师, 研究方向: 生殖医学与遗传。E-mail: hfireli@163.com

[摘要] 多重置换扩增(MDA)技术作为一种全新的全基因组扩增技术, 为单细胞的后续检测提供了足够和稳定的DNA, 在地中海贫血植入前遗传学诊断的实验研究和临床应用中取得了较大进展。该文就MDA的原理、技术特点及其在地中海贫血植入前遗传学诊断中的应用研究进展进行综述。

[关键词] 多重置换扩增; 植入前遗传学诊断; 地中海贫血

[中图分类号] R 394 [文献标识码] A [文章编号] 1674 - 3806(2015)10 - 1004 - 04

doi: 10.3969/j.issn.1674 - 3806.2015.10.35

Multiple displacement amplification and its application in preimplantation genetic diagnosis of thalassemia
WANG Shi-kai, HUANG Li, HE Bing. Reproductive and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China
[Abstract] As an entirely new genome amplification technology to provide sufficient and stable DNA for subsequent detection of single cell, multiple displacement amplification(MDA) has acquired a great progress in experi-

mental research and clinical application in preimplantation genetic diagnosis of thalassemia. In this review, we introduce the principles of MDA, technical characteristics and research progress in preimplantation genetic diagnosis of thalassemia.

[Key words] Multiple displacement amplification (MDA); Preimplantation genetic diagnosis (PGD); Thalassemia

地中海贫血(thalassemia)是一组先天遗传性溶血性疾病,是由珠蛋白肽链合成障碍导致的血红蛋白异常性疾病,也是世界上最常见的单基因遗传病之一。据统计,全世界上约有 4.83% 的人口携带地中海贫血基因^[1]。在我国以广西、广东、海南等省发病率较高, α 地中海贫血和 β 地中海贫血发病率分别为 10.3% 和 8.53%^[2],其中广西人群中地中海贫血基因携带率为 12.22% ~ 23.02%^[3-5]。为防止地中海贫血患儿出生,目前主要是对携带地中海贫血基因的夫妇在妊娠早期进行产前诊断,但往往使患者要面临流产或引产的难题,造成精神上的和生理上的创伤。随着辅助生殖技术的发展,将产前诊断提前至胚胎植入前进行诊断已经成为可能。植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis,PGD)是对着床前第 3 天或第 5 天的胚胎进行活检,通过分子生物学技术检测胚胎的遗传物质,选择正常的胚胎植入宫腔,摒弃携带地中海贫血基因的胚胎,避免了终止妊娠给患者所带来的痛苦,有效改善妊娠结局,降低地中海贫血患儿出生率,达到优生的目的。因 PGD 时可供检测的遗传物质极少,仅 1 ~ 2 个细胞,提供的 DNA 样本含量非常有限,又不能同时满足多位点多基因检测和重复试验的需要。为从少量细胞中最大限度地获取遗传信息,全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)技术应运而生。WGA 技术能够无选择偏移地扩增单个细胞的整个基因组 DNA,可提供足量 DNA 模板进行后续分析。多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)是一种扩增效率高、保真性好、能够提供高度均一完整的基因组序列的新兴 WGA 技术^[6]。

1 MDA 技术原理

MDA 技术是 Lizardi 等^[7]基于环状滚动扩增方法创建的一种链置换扩增技术。该技术利用 phi29 DNA 聚合酶和六聚体随机引物对基因组进行扩增,不需要经过聚合酶链反应(PCR)热循环过程,只需在 30 °C 条件下恒温即可反应。扩增时,phi29 DNA 聚合酶在多个位点同时起始复制,合成新的 DNA 链取代模板互补链,被置换出新的 DNA 链又成为模板来进行扩增,形成级联分支的放大系统。最终生成大量的高保真基因组 DNA,为单细胞多次分析提供

了可能^[8]。

2 MDA 技术特点

2.1 MDA 技术的优点 (1)扩增高效和高保真性。phi29 DNA 聚合酶兼具 3'-5' 核酸外切酶校读活性,对模板有很强的结合能力,能连续扩增 100 kb 的 DNA 模板而不从模板上解离,扩增的平均长度约 10 kb,而且 phi29 DNA 聚合酶具有高保真性能,其错配率仅为 $1:10^6 \sim 1:10^7$,比 Taq 酶的 $3:10^4$ 至少低 100 倍,可以确保扩增的保真性^[9]。Dean 等^[10]比较了 MDA 和另外两种以 PCR 为基础的 WGA 方法,变性寡核苷酸引物 PCR(degenerate oligonucleotide primer PCR, DOP-PCR)和引物延伸预扩增 PCR(primer extension preamplification PCR, PEP-PCR)对同样模板 DNA 的扩增偏倚情况,结果显示 3 种方法的扩增偏倚分别为 <3 倍, $10^3 \sim 10^6$ 倍和 $10^2 \sim 10^4$ 倍,与其他 WGA 技术相比,MDA 技术可均匀扩增线状或环状 DNA 而不出现明显的扩增偏差,扩增效率高和保真性好。(2)扩增长度和产量稳定。基因组 DNA 经过 30 °C 反应 4 ~ 6 h,MDA 扩增达到高峰后维持在一个稳定水平,使所有反应的 DNA 产量几乎相等。Dean 等^[10]在使用 MDA 扩增时发现,不管起始模板量是多少,每次反应的产量基本相同。扩增时,硫酸化的随机引物能够抑制聚合酶的核酸外切酶活性,使扩增产物大大增加^[11]。胚胎活检的单个卵裂球或 3 ~ 5 个滋养外胚层细胞仅有 pg 级的 DNA 模板,MDA 扩增后产量可达到 μg 级^[12],这种含量的模板可以满足一个基因多种突变或多位点基因突变的分析,从而克服了在单细胞水平上进行多次 PCR 或重复试验引起的模板量不足的问题^[13]。(3)样品不需纯化,应用方便、快捷。MDA 不需分离基因组 DNA,可直接对单个细胞样品作为起始模板进行扩增^[14],避免了分离过程中 DNA 的降解,减少人为失误。MDA 整个反应只需加入样品和反应试剂后在 30 °C 的条件下 4 ~ 6 h,65 °C 10 min 灭活酶的活性即可完成所有反应。现已有商业的试剂盒产品,使各项操作更规范和标准化,更易于推广应用。

2.2 MDA 技术存在的问题 (1)等位基因脱扣(allele drop out, ADO)是单细胞 PCR 过程中常见的问题,也是 PGD 误诊的关键。ADO 是指单细胞进行

PCR 扩增时,如为杂合子的单细胞,两个等位基因之一未被扩增,不同位点的 ADO 发生率大约在 10% ~ 38.9%^[15]。单细胞扩增时 ADO 的发生率较高,产生原因主要有模板的长度引起某些序列的选择性扩增,模板的 GC 含量或二级结构不同,导致与引物结合的扩增效率也不同^[6]。Ling 等^[16]发现随着起始模板从单细胞提升至 10 个细胞,MDA 产物的平均 ADO 发生率从 17.9% 逐渐下降至 0.1%。故应用于单基因病 PGD 时,可将胚胎尽量培养至囊胚阶段以活检更多的滋养外胚层细胞,这样可提高起始模板量,降低 ADO 的发生率和减少诊断误差。(2)易发生污染。由于 MDA 敏感性很高,模板量在极少的情况下,就能发生扩增,任何外源性 DNA 混入都会导致扩增体系污染,外源性 DNA 与模板竞争扩增,经 PCR 放大后将影响诊断的准确性。PGD 中外源性 DNA 主要来源于精子、颗粒细胞、实验环境和酶本身等。故 MDA 过程要在特定的实验室进行,各个步骤要严格在各自的分区内操作,严格各项操作步骤,防止交叉污染,以防诊断错误而引发不良后果。

3 MDA 在地中海贫血植入前遗传学诊断 (PGD) 中的应用

对植入前单个卵裂球或 3 ~ 5 个滋养外胚层细胞进行 MDA 扩增后,应用 PCR、比较基因组杂交 (Array-CGH) 和测序技术对所获产物 DNA 的致病基因、突变位点、遗传标记进行检测,就可以确定胚胎是否携带致病基因^[17]。目前该技术广泛应用于各种单基因病 (如囊性纤维化病、脆性 X 综合征、杜氏肌营养不良和地中海贫血等) 和染色体病 (如染色体的缺失、重复和非整倍等) 的 PGD。2003 年焦泽旭等^[18]应用 PEP-PCR 进行 WGA,对 99 个卵裂球进行 WGA 及巢式 PCR 进行基因检测,95 个卵裂球扩增成功,扩增效率为 96%,1 例阴性对照出现扩增产物,污染发生率为 1.42%,但该技术的扩增效率和保真性方面略差。随着 WGA 技术的发展,2004 年 Hellani 等^[19]首次报道将 MDA 联合 PCR 技术成功地应用于 β 地中海贫血的 PGD 中。2005 年国内邓捷等^[20]应用多重巢式及荧光聚合酶链反应技术对 β 地中海贫血进行 PGD,该方法的扩增效率为 95%,ADO 发生率为 21%,移植后获得临床妊娠,但该方法受样本量的限制仅可以进行单次检测,无法进行重复试验。2011 年 Shen 等^[21]用 MDA-PCR 的方法对单细胞进行 α 和 β 地中海贫血基因检测,共检测 6 枚胚胎,移植 3 枚,但未获妊娠。为降低 ADO 的发生率,联合植入前遗传学单体型分析,2013 年

沈晓婷等^[22]对 5 类 12 种类型 PGD 进行临床研究,其中单基因病包括地中海贫血。共进行了 44 个周期的 PGD,MDA 的扩增成功率为 96.4%,后续 PCR 扩增效率为 97.1%,ADO 发生率为 12.6%,共移植 47 个周期,周期妊娠率为 47.7%,共分娩了 20 个健康婴儿。还显示 ADO 发生率可能与胚胎质量相关,多数 ADO 发生率较高的胚胎在进行继续培养过程中发生退化。通过 MDA 后不再受样本量的限制,可以进行重复试验或进行多位点突变检测或多种单基因病同时检测。2014 年王静等^[23]回顾性分析双方均是 β 地中海贫血携带者而行 PGD 治疗的周期资料,比较采用 MDA 预处理和直接采用多重巢式 PCR 两种技术对单细胞的诊断结果,显示 MDA 组的扩增失败率为 9.79%,低于巢式 PCR 组的 15.24%,但两种方法在诊断结果上差异并无统计学意义,说明 MDA 技术进行全基因组的预扩增可以有效增加检测模板含量,实现多位点或多种单基因病同时诊断。

4 结语

综上所述,MDA 技术因其操作简单、基因组扩增均匀、产物片段长、产量大、扩增偏差小等优点,同时其缺点也在不断的完善,越来越多应用到 PGD 临床实践中。MDA 为后续的 PCR、Array-CGH、短串联重复序列 (short tandem repeats,STR)、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism,SNP) 和第二代测序技术提供足够模板,可以应用到不同类型的单基因病和染色体病的临床诊断中,MDA 和后续技术的联合使用实现了多个位点和多种单基因病的同步诊断,提高了扩增效率,降低 ADO 的发生率,为临床提供准确的实验结果。

参考文献

- 1 Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia[J]. N Engl J Med, 2005, 353(11): 1135 - 1146.
- 2 何梓静, 韦 萍, 林琼文, 等. 广西婚检人群地中海贫血筛查对出生缺陷发生的影响[J]. 应用预防医学, 2014, 20(4): 234 - 235.
- 3 邓俊耀, 龙安翼, 李 慧. 桂林市城镇育龄人群地中海贫血现况调查[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(2): 156 - 158.
- 4 吕福通, 谢丹尼, 陈一君, 等. 广西区计划生育服务网络开展地中海贫血干预经验[J]. 中国计划生育学杂志, 2009, 17(4): 241 - 242.
- 5 吕 静, 江钰霞, 何才通. 地中海贫血筛查指标的分析[J]. 广西医学, 2009, 31(8): 1107 - 1109.
- 6 Corneveaux JJ, Kruer MC, Hu-Lince D, et al. SNP-based chromosomal copy number ascertainment following multiple displacement whole-genome amplification[J]. Biotechniques, 2007, 42(1): 77 - 83.
- 7 Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification[J].

Nat Genet,1998,19(3):225-232.

8 Detter JC, Jett JM, Lucas SM, et al. Isothermal strand-displacement amplification applications for high-throughput genomics[J]. Genomics,2002,80(6):691-698.

9 Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, et al. Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification[J]. Hum Mutat,2006,27(5):496-503.

10 Dean FB, Hosono S, Fang L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(8):5261-5266.

11 Jasmine F, Ahsan H, Andrusis IL, et al. Whole-genome amplification enables accurate genotyping for microarray-based high-density single nucleotide polymorphism array[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2008,17(12):3499-3508.

12 Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification[J]. Genome Res,2001,11(6):1095-1099.

13 焦泽旭,庄广伦,周灿权,等.应用全基因组扩增技术对β-地中海贫血进行胚胎植入前遗传学诊断[J].中华医学遗传学杂志,2003,20(5):447-448.

14 Bergen AW, Haque KA, Qi Y, et al. Comparison of yield and genotyping performance of multiple displacement amplification and OmniPlex whole genome amplified DNA generated from multiple DNA sources[J]. Hum Mutat,2005,26(3):262-270.

15 Ren Z, Zhou C, Xu Y, et al. Mutation and haplotype analysis for Duchenne muscular dystrophy by single cell multiple displacement amplification[J]. Mol Hum Reprod,2007,13(6):431-436.

16 Ling J, Zhuang G, Tazon-Vega B, et al. Evaluation of genome coverage and fidelity of multiple displacement amplification from single cells by SNP array[J]. Mol Hum Reprod,2009,15(11):739-747.

17 Renwick PJ, Lewis CM, Abbs S, et al. Determination of the genetic status of cleavage-stage human embryos by microsatellite marker analysis following multiple displacement amplification[J]. Prenat Diagn,2007,27(3):206-215.

18 焦泽旭,庄广伦,周灿权,等.应用引物延伸预扩增方法对地中海贫血进行植入前遗传学诊断的初步研究[J].中华血液学杂志,2003,24(10):546-548.

19 Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, et al. Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications[J]. Mol Hum Reprod,2004,10(11):847-852.

20 邓捷,彭文林,李洁,等.应用多重巢式及荧光聚合酶链反应技术对β地中海贫血进行植入前遗传学诊断[J].中华妇产科杂志,2005,40(11):780-781.

21 Shen X, Xu Y, Zhong Y, et al. Preimplantation genetic diagnosis for α-and β-double thalassemia[J]. J Assist Reprod Genet,2011,28(10):957-964.

22 沈晓婷,徐艳文,钟依平,等.多重转换扩增结合短串联重复序列在植入前遗传学诊断中的应用[J].北京大学学报(医学版),2013,45(6):852-858.

23 王静,徐艳文,曾艳红,等.在β地中海贫血着床前遗传学诊断中应用多重置换扩增进行预处理的临床分析[J].生殖医学杂志,2014,23(8):653-657.

[收稿日期 2015-03-05][本文编辑 谭毅 吕文娟]

新进展综述

阿奇霉素在小儿支原体肺炎治疗中应用方法的研究进展

谢圣全(综述), 谭毅(审校)

作者单位: 537321 广西,平南县思旺镇中心卫生院
作者简介: 谢圣全(1972-),男,中专,主治医师,研究方向:小儿疾病的诊治。E-mail:1335299084@qq.com

[摘要] 阿奇霉素是一种具有独特药物动力学特性的大环内酯类抗生素,已广泛用于小儿支原体肺炎的治疗,并取得较好的疗效。该文从阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的依据及其常规疗法、序贯疗法、联合疗法等方面进行综述。

[关键词] 阿奇霉素; 小儿支原体肺炎; 治疗

[中图分类号] R 725.6 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2015)10-1007-04
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.10.36