

# 应用胎儿特异性抗体 HbF ( $\gamma$ 链) 标记法无创性 产前基因诊断 DMD

刘丽英<sup>1</sup>, 金春莲<sup>1</sup>, 林长坤<sup>1</sup>, 武盈玉<sup>2</sup>, 孙开来<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学医学遗传学教研室, 沈阳 110001; 2. 中国医科大学附属二院儿保室, 沈阳 110001)

**摘要:**以孕 8~26 w 孕妇外周血为材料, 经过 Percoll 密度梯度离心初步富集, 胎儿细胞特异性抗体——HbF 标记、识别胎儿有核红细胞, 母体和胎儿有核红细胞的精确区分是以胎儿和成人血红蛋白的组成差异为基础的。胎儿细胞胞浆黄染, 而具有成人血红蛋白的母体细胞没有颜色。显微操作法获取全部阳性细胞后, 以其全基因组扩增 (PEP) 的产物为模板, 进行性别检测、DMD 基因的多重 PCR 检测和 STR 连锁分析。结果, 20 名孕妇外周血中均发现与 HbF 呈阳性反应的胎儿 NRBC。并完成 7 例 DMD 的产前基因诊断。HbF 抗体标记法能有效识别胎儿有核红细胞, 是无创性产前基因诊断中很有应用前景的标记方法。

**关键词:**有核红细胞; 免疫组化; Duchenne 型肌营养不良症 (DMD)

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)01-0049-04

## Use of Fetal Specific Antibody——HbF to Detect Fetal Erythroblasts for Non-invasive Prenatal Diagnosis of DMD

LIU Li-Ying<sup>1</sup>, JIN Chun-Lian<sup>1</sup>, LIN Chang-Kun<sup>1</sup>, WU Ying-Yu<sup>2</sup>, SUN Kai-Lai<sup>1</sup>

(1. Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China;

2. Affiliated 2nd hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract:** Maternal blood was obtained at 8~26 weeks of gestation. After discontinuous density gradient centrifugation with Percoll, HbF antibody was used to identify fetal NRBC. The precise differentiation between fetal and maternal NRBC is based on the constitutional difference between fetal and adult hemoglobin (Hb). Fetal cells appear yellow cytoplasmic staining, while adult cells colorless. NRBCs were collected by micromanipulation and whole genome amplification was performed. DMD was prenatally diagnosed by using the combination of sex determination, multiplex PCR and linkage analysis of several STR sites of dystrophin. NRBCs stained with HbF were found in all of 20 maternal blood samples with gestations, and seven fetuses with risk of DMD were diagnosed. We concluded that HbF antibody could identify fetal NRBC efficaciously, and this is a kind of more prospective application method.

**Key words:** erythroblasts; immunohistochemistry; Duchenne muscular dystrophy (DMD)

母体外周血中存在的胎儿细胞如滋养细胞、有核红细胞和白细胞是产前诊断中胎儿基因组的来源, 其中胎儿有核红细胞被认为是一种较理想的靶

细胞<sup>[1]</sup>。我室前期报道了应用不连续密度梯度离心和显微操作获取胎儿细胞的方法, 这种方法对于产前诊断极其有用, 因为污染问题可通过显微操作仪

收稿日期: 2004-01-13; 修回日期: 2004-06-12

基金项目: “十五”国家科技攻关课题 (2004BA720A04) [Supported by the 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2004BA720A04)]

作者简介: 刘丽英 (1976—), 女, 硕士研究生, 专业方向: 医学遗传学

通讯作者: 金春莲 (1945—), 女, 朝鲜族, 辽宁沈阳市人, 教授, 研究方向: 医学遗传学。E-mail: jlljcl@mail.sy.ln.cn

获取单一类型的细胞而解决。然而,传统的瑞氏-Giemsa 染色法并不能十分准确的识别胎儿有核红细胞,而经形态学识别的有核红细胞还需进一步鉴定其胎儿源性,这就给后续的工作带来了诸多不便。在孕 8~10 w HbF( $\alpha_2\gamma_2$ )成为胎儿有核红细胞的主要血红蛋白(Hb),而在成人血红蛋白的主要成分为 HbA( $\alpha_2\beta_2$ ),因此应用 HbF  $\gamma$  链的单克隆抗体选择胎儿细胞是可行的。

Duchenne 型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)<sup>[2]</sup>,是一种严重致死性 X 连锁隐性遗传病,发病率约为 1/3 500 活男婴。在产前诊断时发现并及时终止妊娠可杜绝患儿的出生。本实验中我们应用 HbF 特异性抗体标记的胎儿有核红细胞作为材料,全基因组扩增(PEP)的产物为模板,先后进行了性别检测、DMD 基因的多重 PCR 检测和 STR 连锁分析,完成了 7 例 DMD 高危患胎儿的产前诊断。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

20 例受试者,妊娠 8~26 w,其中 7 例来自中国医科大学附属二院基础儿科遗传病门诊,孕有杜氏肌营养不良(DMD)高风险患儿的孕妇(同时采其家系成员外周血进行综合分析),13 例来自医大二院节育病房,2 例胎儿脐血作为阳性对照。

### 1.2 外周血中胎儿有核红细胞(NRBC)的识别与分离

#### 1.2.1 不连续密度梯度离心法初步富集有核红细胞

取孕妇静脉血 10 mL,枸橼酸钠抗凝,经二倍体积 PBS(pH7.4)稀释后,轻轻加入到 1.085 g/mL 和 1.075 g/mL 的 Percoll 液上,400 g 室温离心 30 min。吸取 1.075 g/mL 和 1.085 g/mL 分离介质之间的细胞层,二倍体积 PBS 洗 3 次,将离心沉淀加入到细胞涂片离心机中制成玻片。

#### 1.2.2 胎儿血红蛋白(HbF)特异性抗体的免疫组化法和常规的瑞氏-Giemsa 染色标记

将载有待检细胞的玻片用预冷的纯丙酮 4 °C 固定 30 min,蒸馏水冲洗除去丙酮。将玻片置于 3% 的  $H_2O_2$  溶液中,室温孵育 20 min,目的在于封闭内源性过氧化物酶的活性。再用血清封闭非特异性结合位点,将 HbF  $\gamma$  链抗体(稀释倍数 1:100, Biode-

sign 公司产品)加入到载玻片的细胞上,4 °C 过夜,再经传统的 SABC 方法完成免疫组化反应。同时取少量玻片进行常规瑞氏-Giemsa 染色。

#### 1.2.3 显微操作法获取有核红细胞

将标记好的细胞涂片在倒置显微镜下观察,寻找胎儿有核红细胞,计数,定位,并获取所有的阳性细胞,依据细胞的多少加入 10~30  $\mu$ L LCM 裂解液(1% Tween 20、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris、40 mg Protein K)混匀、离心,37 °C 过夜后 95 °C 10 min 灭活蛋白酶 K 的活性,即可提取 NRBC 的 DNA。

### 1.3 有核红细胞的全基因组扩增

应用改良的引物延伸预扩增法(PEP)扩增 NRBC 的全基因组(我们同时应用 10 N 和 15 N 的随机引物进行 PEP 扩增),PEP 扩增的 PCR 反应体系和反应条件见文献[3]。

### 1.4 DMD 的无创性产前基因诊断

#### 1.4.1 性别检测

首先应用 ZFX/ZFY 和 Y 染色体上的 SRY 基因特异性引物,按照文献[4]的组成及条件进行 PCR 扩增,产物用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

#### 1.4.2 DMD 的直接基因诊断

按照我组常规,应用 DMD 基因缺失热点区的 12 对引物(外显子 8、12、17、19、34、43、45、48、50、51、52、53)进行多重 PCR 反应,检测 DMD 基因的缺失情况。

PCR 反应分成 3 组进行,每组 4 对引物,首先应用我室选出的 4 对外显子优化组合(48、51、45、8)进行筛选,如无缺失,再进行第二组(51、12、50、53)和第三组(48、17、8、52)多重 PCR 进行筛查,PCR 反应体系及条件见文献[5]。

#### 1.4.3 DMD 的间接基因诊断

对于未查出缺失的家系进一步应用 DMD 基因 5'端和缺失热点区内含子 44、45、49、50 以及 3'端 (CA)<sub>n</sub> 多态为遗传标记进行连锁分析,STR 反应体系及条件见文献[6]。

## 2 结果

### 2.1 有核红细胞的识别、分离及全基因组扩增

免疫组化法标记的有核红细胞胞浆染成黄色,胞核蓝色,而其他细胞胞浆不着色,瑞氏-Giemsa 染色识别的有核红细胞核高度浓缩,核浆比例较低,胞

浆微红染。应用显微操作法获取标本中的全部 NR-BC 后(两种方法获取的有核红细胞分别放置),进行全基因组扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物可达 kb 以上,可满足本研究的需要。

## 2.2 性别检测结果

扩增 ZFX/ZFY 特异性位点,男性的 PCR 产物为 198 bp 和 344 bp 两条带,女性的 PCR 产物为 344 bp 一条带。扩增 SRY 特异性位点,男性的 PCR 产物为 334 bp 一条带,女性因无 Y 染色体,故无扩增带。20 例孕妇中共检出 12 例男性胎儿,8 例女性胎儿,结果经孕妇引产及绒毛(羊水)对照准确率达 100%。

## 2.3 DMD 产前基因诊断

7 例孕有 DMD 高危患儿的孕妇中共检出 5 例男性胎儿,2 例女性胎儿。应用多重 PCR 方法,对先证者及有核红细胞进行遗传学分析(绒毛/羊水作为对照),其中 2 例男性胎儿的标本的 DMD 基因经外显子检测,发现存在缺失,结果与绒毛/羊水对照一致,诊断为 DMD 男性患儿。另 5 例标本经外显子检测未发现缺失,进一步经 STR 连锁分析,其中 3 例诊断为正常男性胎儿,1 例诊断为女性携带者,1 例正常女性胎儿。图 1 示一例 DMD 男性胎儿 12 对外显子引物的多重 PCR 检测结果,由图 1 可见该胎儿外显子不缺,图 2 示进一步应用 STR 连锁分析检测情况,由图 2 可见该胎儿的(CA)<sub>n</sub> 多态片段与正

常 DMD 基因连锁,综合如上检测结果,该胎儿为正常男性胎儿。



图 2 DMD 内含子 49 的 PCR 扩增结果  
泳道顺序从左到右依次为:先证者、  
孕妇、丈夫、羊水、以及有核红细胞。

Fig.2 The detective results of dystrophin intron 49

Line sequence from left to right:proband、pregnant  
woman、husband、amniotic fluid、and NRBCs.

## 3 讨论

DMD 是一种严重致死性 X 连锁隐性遗传病,发病率约为 1/3 500 活男婴,其临床表现以肌肉的进行性萎缩和无力为特征。患者多在 20 岁前死亡。这种疾病的女性携带者怀孕后,男胎中将有 50% 的发育成患儿,女胎中将有 50% 发育成携带者。因此进行性别决定和 DMD 基因的产前诊断是非常必要的。

Dystrophin 基因定位于 Xp21.1~21.3,它是目前已知的人类最大的基因,DMD 基因突变中以缺失最为常见,约占 55%~65%。刘和平<sup>[7]</sup>等应用多重可扩增探针杂交技术同时检测了 10 个 DMD 外显子的扩增情况,取得了较好的效果。本研究中我们分析了 7 例 PEP 反应的 DMD 外显子,其性别均已被确定,我们采用 DMD 基因缺失热点区的 12 对引物,利用本室研究统计的优化组合——即首先进行第一组引物组合进行筛查,如无缺失,再进行第二组和第三组多重 PCR 筛查。PEP 产物的多重 PCR 具有如下特点①节省 DNA:由于孕妇外周血中胎儿细胞数目稀少,因此利用有限的胎儿细胞 DNA 同时进行性别检测及 DMD 基因检测是非常必要的,多重 PCR 是在一个反应体系中加入多对引物,扩增同一模板的几个区域,这样可节省 DNA。②多个细胞的 PEP 扩增弥补了单个细胞 PEP 扩增引起的假阳性即基因丢失的缺点,使结果更加准确。对于未检测到缺失的样品,我们选择 DMD 基因内及 5' 端和 3' 端非翻译区数个位点的(CA)<sub>n</sub> 二核苷酸重复多态进

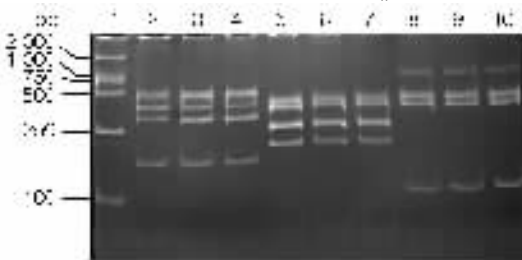


图 1 DMD 外显子检测结果

1: DL2 000 DNA marker; 2~4: 分别为先证者、  
有核红细胞、羊水对照的 19、43、45、34 外显子  
检测结果; 5~7: 分别为先证者、有核红细胞、羊水  
对照的 51、12、50、53 外显子检测结果;  
8~10: 分别为 48、17、8、52 外显子检测结果。

Fig.1 The detective results of dystrophin exons

1: DL 2 000 DNA marker; 2~4: exon 19、43、  
45、34 amplification fragments of proband、NRBCs、  
amniotic fluid control; 5~7: exon 51、12、50、53  
amplification fragments of proband、NRBCs、amniotic  
fluid control; 8~10: exon 48、17、8、52 amplification  
fragments of proband、NRBCs、amniotic fluid control.

行单倍型连锁分析诊断。应用这种连锁分析方法,我们在完成 DMD 间接基因诊断的同时可进一步验证细胞的胎儿源性。

对于确定所检测 NRBC 的胎儿源性, HbF  $\gamma$  链的免疫组织化学染色方法是一种值得信赖的方法。在胚胎发育过程中,依次出现 3 种胚胎血红蛋白: Hb Gower1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ )、Hb Gower2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ )、Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) 和胎儿血红蛋白 (HbF  $\alpha_2\gamma_2$ )。HbF 是胎儿时期的主要血红蛋白,  $\gamma$  链从孕 8 w 直至胎儿出生均有较高等度的表达, 对其进行特异性标记, 具有较高的敏感性, 母体虽然也产生少量的胎儿血红蛋白, 但其含量及低 ( $<1\%$ ), 经免疫组化标记后不着色, 而胎儿有核红细胞经免疫组化标记后胞浆黄染, 很容易与其他细胞区分开。且有研究表明, 大多数母源性有核红细胞有表面标记但无 HbF<sup>[8]</sup>。我们的实验结果表明 HbF 抗体标记的 NRBC 均为胎儿源性的, 而瑞氏-Giemsa 染色所识别的 NRBC 仅有部分为胎儿源性的, 因此我们这种方法具有较高的敏感性。

引物延伸预扩增法 (Primer extension Preimplification, PEP) 是一种通过随机引物对少量细胞进行全基因组扩增, 使模板 DNA 的含量达到足以被检测水平的较为有效的方法。我们在实验中同时采取了 10N 和 15N 的随机引物, 对几个细胞进行全基因组扩增。结果发现 10N 引物与 15N 引物相比具有如下优点: 10N 引物更易与基因组 DNA 结合, 明显提高了扩增效率, 虽然产量增加的同时, 也增加了非特异性扩增, 但我们对几个细胞进行 PEP 扩增, 几个细胞间的扩增产物相互补充, 可以避免基因缺失和假阳性扩增。

通过本研究, 我们认为 HbF 抗体标记法能有效识别母血中的胎儿有核红细胞, 以其为材料进行遗传病的基因诊断具有广阔的应用前景。

## 参考文献 (References):

[1] Wachtel S S, Sammons D, Twitty G, Utermohlen J, Tolley E, Phillips O, Shulman L P. Charge flow separation quantification

of nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy. *Prenat Diagn*, 1998, 18(5): 455~463.

- [2] DU Chuan-Shu. Fundamentals of Medical Genetics. 2nd ed. Beijing: People's Health Press, 1997. 71~72.  
杜传书. 医学遗传学基础 (第二版). 北京: 人民卫生出版社, 1997, 71~72.
- [3] WANG Min, JIN Chun-Lian, LIN Chang-Kun, WANG Yan, WU Ying-Yu, SUN Kai-Lai. Non-invasive prenatal diagnosis using improved PEP method. *Hereditas (Beijing)*, 2001, 23(3): 195~198.  
王敏, 金春莲, 林长坤, 王雁, 武盈玉, 孙开来. 改良的 PEP 方法在无创性产前基因诊断中的应用. 遗传, 2001, 23(3): 195~198.
- [4] Chong S S, Krist jansson K, Cota J, Handyside A H, Hughes M R. Preimplantation prevention of X-linked disease: reliable and rapid sex determination of single human cells by restriction analysis of simultaneously amplified ZFX and ZFY sequences. *Hum Mol Genet*, 1993, 2(8): 1187~1191.
- [5] LU Yang, JIN Chun-Lian, LIN Chang-Kun, WU Ying-Yu, LIU Li-Ying, SUN Kai-Lai. Studying Dystrophin gene deletion in the dortheast of China and applying. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(5): 449~453.  
鲁阳, 金春莲, 林长坤, 武盈玉, 刘丽英, 孙开来. 东北地区抗肌营养不良蛋白基因缺失的研究及应用. 遗传学报, 2004, 31(5): 449~453.
- [6] JIN Chun-Lian, LIN Chang-Kun, WU Ying-Yu, JIANG Li, QU Lu-Rong, SUN Kai-Lai. Investigation of prenatal diagnosis of DMD using dinucleotide repeat polymorphisms. *J Chin Med Univer*, 1999, 28(3): 186~188.  
金春莲, 林长坤, 武盈玉, 姜莉, 曲陆荣, 孙开来. 应用二核苷酸重复多态 DMD 产前基因诊断研究. 中国医科大学学报, 1999, 28(3): 186~188.
- [7] LIU He-Ping, WANG Hong, LU Zu-Hong, LIU Xiao-Ping, XIA Kun, XIA Jia-Hui. A novel oligonucleotide arrays-based multiplex amplifiable probe hybridization technology. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(2), 119~125.  
刘和平, 王宏, 陆祖宏, 刘小平, 夏昆, 夏家辉. 一种基于寡核苷酸微阵列芯片的多重可扩增探针杂交技术. 遗传学报, 2004, 31(2), 119~125.
- [8] Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T. The proportion of nucleated red blood cells in maternal blood: Estimation by FACS analysis. *Prenat Diagn*, 1997, 17(8): 743~752.