doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.020
View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.020

多重连接依赖探针扩增技术筛查 Turner 综合征的可行性

李旗[1]，解淑钰[1]，司彩云[2]，陶月红[3]

（1. 大连医科大学研究生院，辽宁 大连 116000；2. 扬州大学医学院研究生院，江苏 扬州 225001；
3. 扬州大学临床医学院儿科，江苏省苏北人民医院，江苏 扬州 225001）

[摘　要]　**目的：**探究多重连接依赖探针扩增技术(multiple ligation-dependent probe amplification，MLPA)在筛查Turner综合征(Turner syndrome，TS)染色体异常的可行性。**方法：**收集88例临床诊断矮小症女童的外周血进行MLPA检测及外周血细胞核型分析，采用Fisher确切概率检验对2种方法诊断TS的结果进行差异性分析。**结果：**88例女童中14例确诊为TS，其中外周血核型分析异常14例(13例为TS，1例为常染色体异常)，检测TS灵敏度为92.8%；MLPA检出异常14例(13例TS，1例X染色体部位疑似男性，Y染色体重复)，检测灵敏度为100%。2种检测方法的特异度均为100%。采用Fisher确切概率对两种方法的检测灵敏度进行分析，二者无显著差异(P=0.5)。**结论：**与外周血细胞核型分析相比，MLPA具有更经济、高效、操作难度较低等优点，且对TS的检测灵敏度和特异度无统计学差异，可作为TS的筛查方法。

[关键词]　Turner综合征；多重连接依赖探针扩增技术；细胞核型分析；矮小；女童

Feasibility of multiplex ligation dependent probe amplification in screening for Turner syndrome

LI Qi[1], XIE Shuyu[1], SI Caiyun[2], TAO Yuehong[3]

(1. Graduate School, Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116000; 2. Graduate School, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225001; 3. Department of Pediatric, Clinical Medical College of Yangzhou University, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou Jiangsu 225001, China)

Abstract　**Objective:** To study the feasibility of MLPA in screening chromosomal abnormalities in Turner syndrome (TS). **Methods:** The peripheral blood of 88 children with clinically diagnosed dwarfism were collected for MLPA detection and the karyotype analysis of peripheral blood cells. The sensitivity differences of the two methods in the diagnosis of TS were analyzed using Fisher's exact test. **Results:** Of the 88 girls, 14 were diagnosed with TS, 14 were detected abnormal by peripheral blood karyotype analysis (13 of TS, 1

收稿日期 (Date of reception)：2018–08–06

通信作者 (Corresponding author)：陶月红，Email: ektyh520@163.com

基金项目 (Foundation item)：江苏省“六大人才高峰”项目 (2015-WSN-109)；扬州市英才培育对象课题 (yzycpyjH2013087)；金赛药业中青年内分泌医师科研基金 (JSYY2015023)。This work was supported by the Jiangsu Province “Six Talents Peak” Project Foundation (2015-WSN-109), Cultivating Talents Project in Yangzhou (yzycpyjH2013087) and Research Fund for Young Endocrinologists in Gensci Pharmaceutical Co. Ltd (JSYY2015023), China.

of autosomal abnormality), the sensitivity was 92.8%, and 14 were detected by MLPA (13 of TS, 1 of X chromosomes, Y chromosome duplication), and the sensitivity of the test was 100%. The specificity of the two detection methods was 100%. Fisher's exact probability was used to analyze the sensitivity of the two methods. The *P* value of unilateral test was 0.5, and there was no significant difference between the two methods. **Conclusion:** Compared with the karyotype analysis of peripheral blood cells, MLPA has the advantages of more economical and more efficient, and has lower difficulty in operation, and there is no significant difference in sensitivity and specificity for the detection of TS. It is suitable for the screening of TS.

Keywords Turner syndrome; multiplex ligation dependent probe amplification; cell karyotype analysis; dwarfism; girl

Turner综合征(Turner syndrome，TS)，又被称为性腺发育不良综合征，1条X染色体部分或完全缺失，是1组以第二性征不发育或发育不全、原发性闭经、矮小、特殊面容、先天性心血管异常[1]、肾脏畸形、骨骼畸形、糖耐量异常、甲状腺疾病以及执行力障碍[2]等为主要表现的临床综合征，人群患病率为(25~50)/100 000[3]。TS患者在生活、学习以及社会交流中均受到严重影响[4]。但如果能够得到及时干预，TS患者完全有机会改善预后，如拥有青春期发育及生育能力，提高成年身高，防范心血管意外等[5-7]。因此，早期、准确的诊断成为TS管理的至关重要的一个环节。

目前最常用的TS遗传信息检测方法是外周血细胞核型分析，但由于外周血细胞核型分析需要进行细胞培养扩增，将分裂期染色体按照形态结构特征，人为地对其进行配对、编号和分组等，耗时长，操作较复杂，对检验人员的技术要求高，对于小的染色体片段缺失、重复或者易位的辨别力低，并且对杂合性丢失和单亲二倍体无法诊断。而多重连接依赖探针扩增技术(multiple ligation-dependent probe amplification，MLPA)因其不需要细胞培养，可直接提取DNA，操作简便，分析周期短，且主要使用仪器分析，自动化程度高，特异性强，在遗传信息的检测方面崭露头角。本研究通过比较MLPA与外周血细胞核型分析在TS遗传信息检测辅助诊断的结果，评价MLPA作为TS筛查方法的可行性。

1 对象与方法

1.1 对象

纳入2016至2018年在江苏省苏北人民医院儿科就诊的临床诊断矮小症女童。入选标准：身高低于同年龄同性别平均身高−2个标准差，知情并同意参与实验的女性患儿。排除标准：拒绝参与实验的患儿。选取健康体检的正常男童及女童各8例的外周血作为阴性对照。本研究经江苏省苏北人民医院伦理委员会审批通过，患儿及其家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 收集临床资料

收集临床资料(体征、实验室检查、影像学检查等)，使用EDTA抗凝管抽取2份3 mL静脉血，按照入组时间进行编号，1份置于4 ℃冰箱保存用于外周血细胞核型分析，另1份用于MLPA检测，于8 h内置于−20 ℃冰箱保存。

1.2.2 外周血细胞核型分析

外周血细胞核型分析(由江苏省苏北人民医院生殖医学中心完成)：分离血样中淋巴细胞进行培养，然后制备中期染色体标本并G显带。计数30个分裂中期相细胞，分析其核型。剩余肝素抗凝血置于−20 ℃冷冻保存，中期染色体制备液置于4 ℃冰箱冷藏备用。

1.2.3 MLPA检测

按照QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN 51106)试剂盒(德国QIAGEN公司)使用说明进行全血DNA的提取，并于2 h内置于−20 ℃冰箱长期保存。使用PCR仪按照MLPA试剂盒操作说明(MRC-Holland)分别对提取的矮小女童88份及阴性对照的16份DNA样本进行以下操作。

1.2.3.1 DNA变性(第1天)

1)标记0.2 mL EP管，每个管内加入5 μL DNA；2)将EP管放入PCR仪，开始MLPA程序：DNA变性，98 ℃，5 min；在打开PCR仪之前冷却样本至25 ℃。

1.2.3.2 杂交反应(第1天)

1)准备杂交主要混合物/反应：1.5 μL MLPA缓冲液+1.5 μL探针混合物(包括8个X染色体检测位点，4个Y染色体检测位点；图1)，用移液枪吸液

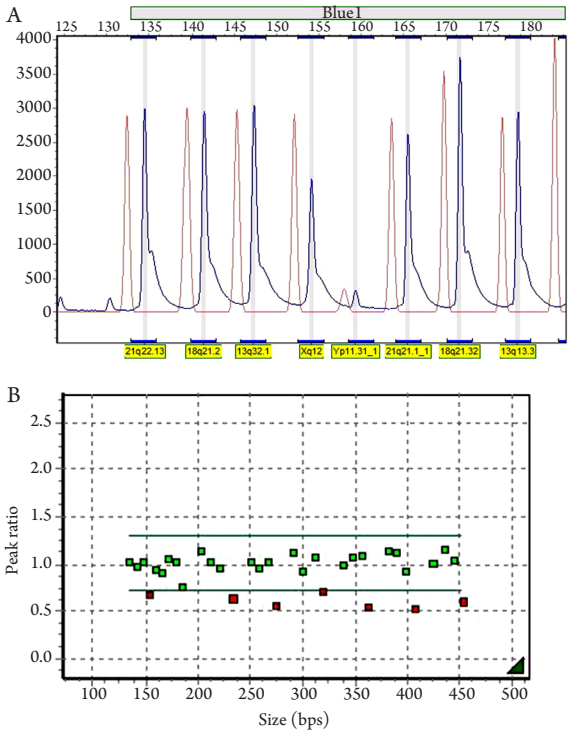
混匀；2)当PCR仪温度达到25 ℃，向每个管子加入3 μL杂交主要混合物，用移液枪上下吸液混匀；3)继续PCR仪反应程序：95 ℃孵育1 min，之后降温至60 ℃维持16~20 h。

1.2.3.3 连接反应(第2天)

1)准备连接酶主要混合物/反应：3 μL连接酶65 buffer A+3 μL连接酶65 buffer B+25 μL dH_2O，用移液枪或涡旋混匀；2)在连接酶主要混合物/反应中加入1 μL连接酶65，用枪上下吸液混匀。禁止用涡旋混匀；3)继续PCR仪反应程序，在54 ℃暂停。当样本温度达到54 ℃，加入32.0 μL连接酶主要混合物，用枪上下吸液混匀；4)继续PCR反应程序：54 ℃孵育15 min，加热至98 ℃使连接酶65失活，之后暂停15 min。

1.2.3.4 PCR反应

1)标记新EP管进行PCR反应；2)准备PCR缓冲液混合物/反应：4 μL SALSA PCR buffer+26 μL dH_2O，用涡旋简单混匀；3)向每个管子加入30 μL PCR缓冲液混合物；4)在室温下，向相应的PCR反应管子中加入10 μL连接产物；5)制备聚合酶主要混合物/反应：2 μL SALSA PCR一引物+2 μL SALSA酶稀释缓冲液+5.5 μL dH_2O+0.5 μL SALSA聚合酶，用移液枪混匀。禁止使用涡旋。在冰上保存；6)继续PCR仪反应程序：在60 ℃暂停，将PCR管放入；7)将管子置入60℃的PCR仪后，每个管子加入10 μL聚合酶混合物。用移液枪混匀。继续PcR仪反应：35个循环：95 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s；在72 ℃孵育20 min，之后在15 ℃暂停。



C

	Probe Name	Bin Size	14#
1	13q13.1	355.8	1.097
2	13q13.2	178.6	1.024
3	13q14.2	397.7	0.923
4	13q14.2_1	221.8	0.963
5	13q21.33	266.3	1.032
6	13q32.1	147.3	1.024
7	13q34	442.6	1.049
8	13q34.1	310.6	1.074
9	18p11.21	434.4	1.159
10	18p11.32	299.3	0.924
11	13q11.2	212.3	1.024
12	18q11.21	389.6	1.135
13	18q11.21	141.4	0.980
14	18q21.32	171.7	1.059
15	18q21.33	346.6	1.075
16	18q23	257.2	0.969
17	21q11.2	250.2	1.025
18	21q21.1	202.5	1.145
19	21q21.1_1	165.6	0.914
20	21q22.11	424.5	1.016
21	21q22.11_1	337.6	1.005
22	21q22.11_2	290.3	1.138
23	21q22..13	134.4	1.033
24	21q22.3	381.2	1.140
25	Xp11.4	274.2	0.568
26	Xp21.2	451.9	0.614
27	Xp21.2	232.5	0.637
28	Xp22.12	362.6	0.557
29	Xq12	154.1	0.672
30	Xq23	184.8	0.753
31	Xq26.1	406.9	0.534
32	xq28	318.3	0.707
33	Yp11.3	282.6	-1
34	Yp11.31	192.7	-1
35	Yp11.31_1	160.0	0.945
36	Yq11.221_1	242.7	-1

图1 X染色体杂合缺失结果

Figure 1 Loss of heterozygosity on chromosome X

(A，B)A中蓝色为标本的峰图，红色为将所有样本峰值求均值后的峰图。程序将标本各点峰值与平均峰值相比，根据所得比值画出散点图B，其中红色标记为内参探针，即不位于X染色体上；上下两条绿线分别代表了0.73及1.30两个比值，位于两者之间为二倍体，以绿点表示，<0.73认为存在位点缺失，>1.30认为存在位点扩增；(C)MLPA试剂盒的探针列表及患者的检测结果，其中深色底纹项目为异常值，该患者结果显示为X染色体杂合缺失。

(A, B) The peaks of the results in Figure 1A. Blue line is the peak of the sample and the red is the peak of the sample after averaging the peaks of all samples. Comparing the peak value of each point with the average peak value, the program draws a scatter plot (Figure 1B) according to the ratio, in which the red marker is an internal reference probe, that is not located on the X chromosome; the upper and lower green lines represent the ratios of 0.73 and 1.30, respectively, and are diploid between the two, represented by a green dot, <0.73 is considered to exist site deletion, and >1.30 suggests site amplification exists; (C) List of probes in the MLPA kit and the results of the patient's test. The dark background items are abnormal values. This patient's result shows a loss of heterozygosity on the X chromosome.

1.2.4 毛细管电泳及软件分析

对MLPA反应产物进行毛细管电泳，然后使用Gene Marker V1.95对毛细管电泳结果进行分析。计算样本各位点峰面积与总样品各位点平均峰面积的比值，若比值<0.73认为探针连接位点缺失，若>1.30则认为位点倍增。

1.3 统计学处理

运用SPSS 21.0统计软件对外周血细胞核型分析及MLPA分析诊断TS的灵敏度及特异度进行统计，并应用Fisher确切概率检验方法进行差异性分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

对所有88例及阴性对照的16例儿童临床诊断矮小症的女童分别进行外周血细胞核型分析及MLPA分析。外周血细胞核型分析结果显示：矮小女童中染色体异常者有14例，其中5例核型为45，X，6例核型为45X/46，X，i(Xq)，2例核型为45X/46，X，+Mar，1例核型为46，XX，inv(9)(p11q13)，具体标本编号见表1。通过核型分析，共诊断TS 13例。MLPA检测结果中有4份标本(编号21，22，55，67)DNA提取质量差，无法进行分析，剩余84份中有14份提示染色体异常(表2)，其中X染色体部位杂合缺失13例，1例为Y染色体重复，X染色体位置疑似男性(图1)。

结合临床资料(表3)进行分析：1号标本外周血细胞核型分析为9号染色体短臂1区1带与长臂1区3带的倒位突变，而MLPA结果为正常，而1号女童的性腺发育正常，无特殊面容及躯体畸形，不支持TS的诊断；42号标本外周血细胞核型分析结果显示正常，而MLPA结果显示X杂合缺失，临床资料显示患儿子宫、卵巢发育不良，合并宽眼距，低发际等畸形，支持TS诊断；34号标本的外周血细胞核型分析结果显示为45，X与46，X，+Mar的嵌合型，而MLPA结果提示Y染色体重复，X染色体位置疑似男性，但该女童外阴发育均为正常女童式，妇科超声提示双侧附件显示不清，子宫体积小，未见睾丸等男性生殖器官，无明显躯体畸形，临床上支持TS诊断。综合以上分析结果，88名矮小症女童中，编号为14，20，23，32，34，35，42，45，46，56，61，65，77，82共14例被最终确定诊断为TS，外周血核型分析检测灵敏度为92.8%(13/14)，MLPA检测灵敏度为100%(14/14)，两种检测方法的特异度均为100%。由于总例数n=28(<40)，采用Fisher确切概率检验，提示MLPA与外周血细胞核型分析在诊断TS的灵敏度较高，但差异无统计学意义(单侧检验P=0.5，表4)。

表1 外周血细胞核型分析结果

Table 1 Results of karyotype analysis of peripheral blood cells

异常核型	标本编号
46，XX，inv(9)(p11q13)	1
45，X	23，35，56，61，82
45X/46，X，i(Xq)	14，20，32，46，65，77
45X/46，X，+Mar	34，45

表2 MLPA分析异常结果

Table 2 Abnormal results of MLPA analysis

异常拷贝类型	标本编号
X染色体位置杂合缺失	14，20，23，32，35，42，46，56，61，65，77，82，45
Y染色体重复，X染色体位置疑似男性	34

表3 临床资料分析异常结果

Table 3 Abnormal results of clinical data analysis

异常结果类型	标本编号
性腺发育不良	14，20，23，32，34，35，42，45，46，56，61，65，77，82
躯体畸形	14，20，23，32，35，42，46，56，61，65，77，82

表4 2种方法诊断TS的阳性率比较

Table 4 Comparison of positive rate of the 2 methods for diagnosing TS

方法	阳性	阴性	合计	灵敏度/%
外周血细胞核型分析	13	1	14	92.8
MLPA分析	14	0	14	100.0
合计	27	1	28	96.4

3 讨论

TS自1938年被美国医师Turner发现并命名到如今被全球所认知的80年来，其诊断与治疗方式已经发生了巨大转变。越来越多的遗传信息检测技术被开发应用于TS的诊断，从外周血核型分析到高通量的DNA二代测序技术，疾病的诊断越来越向基因层面发展，但经济性、高效性和普及性成为了像荧光原位杂交技术在内的高新技术作为筛查方法的限制因素。

本研究结果提示外周血核型分析和MLPA的诊断阳性率均较高，而MLPA作为筛查方法的优势凸显出来：1)检测耗时仅需2 d；2)可同时进行多个样本检测；3)平均单个样本成本为外周血核型分析的1/6~1/3。

同时本研究注意到实验数据差异反应的一些问题，并结合具体数据进行了分析：MLPA对1号标本(常染色体染色体倒位突变)的异常未能检识别的原因，由于MLPA是运用特定的探针序列对待检DNA进行拷贝数检测的，当实验探针不包括突变染色体上对应区带的序列(此次使用的探针混合物不包含9号染色体位点)，或者染色体的倒位突变不影响探针结合序列拷贝数情况，使得探针无法配对或配对正常而造成假阴性结果。

34号女童外周血细胞核型分析结果提示为45，X与46，X，+Mar嵌合体，而MLPA则检测出Y染色体区带拷贝数增加，提示异常染色体存在Y染色体基因片段，较外周血细胞核型分析更加灵敏。而存在Y染色质的TS患者患生殖细胞肿瘤的概率增加，早期发现并切除异常性腺可避免肿瘤的发生[8]。

外周血细胞核型分析对42号标本检测假阴性结果的原因为：外周血细胞核型分析需要在检测过程先进行细胞培养扩增，然后选择部分细胞进行染色体镜检，如果患者为嵌合体并且镜检细胞中正常核型细胞比例较高，而观察细胞数较少即可出现假阴性结果，需增加镜检细胞数意义降低假阴性率。

随着分子生物学的高度发展，学者们也不断对TS表型与遗传物质差异的相关性进行探索：TS患者出现各种临床表现的原因可能不仅是基因丢失引起的遗传信息失衡[9-10]，还可能与丢失基因共同作用的基因网络障碍有关[11]，同时越来越多的TS相关的基因或其工作网络的作用机制正在被发掘，如与矮身材相关的SHOX基因[12-13]、X染色体差异性甲基化失活CpG位点[13]、XIST基因[14]等。相信在不久的将来，TS的诊断效率会有明显提高，能够让患者得到更好的临床管理，将疾病的影响降到更低。

参考文献

1. Yetman AT, Starr L, Sanmann J, et al. Clinical and echocardiographic prevalence and detection of congenital and acquired cardiac abnormalities in girls and women with the Turner syndrome[J]. Am J Cardiol, 2018 Jul 15;122(2):327-330. .
2. Mauger C, Lancelot C, Roy A, et al. Executive functions in children and adolescents with Turner syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. Neuropsychol Rev, 2018, 28(2): 188-215.
3. Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting[J]. Eur J Endocrinol, 2017, 177(3): G1-G70.
4. Reis CT, de Assumpção MS, Guerra-Junior G, et al. Systematic review of quality of life in Turner syndrome[J]. Qual Life Res, 2018, 27(8): 1985-2006.
5. Shankar RK, Backeljauw PF. Current best practice in the management of Turner syndrome[J]. Ther Adv Endocrinol Metab, 2018, 9(1): 33-40.
6. Klein KO, Rosenfield RL, Santen RJ, et al. Estrogen replacement in Turner syndrome: literature review and practical considerations[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, 103(5): 1790-1803.
7. Li P, Cheng F, Xiu L. Height outcome of the recombinant human growth hormone treatment in Turner syndrome: a meta-analysis[J]. Endocr Connect, 2018, 7(4): 573-583.
8. 刘楠, 佟彤, 陈悦, 等. 罕见核型Turner综合征患儿的sSMC来源及临床表型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(9): 51-53.
   LlU Nan, TONG Tong, CHEN Yue, et al. Analysis of the origin of the small supernumerary marker chromosome in Turner syndrome and the clinical manifestations characteristics of a patient with a rare karyotype[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2015, 23(9): 51-53.
9. Álvarez-Nava F, Lanes R. Epigenetics in Turner syndrome[J]. Clin Epigenetics, 2018, 10: 45.
10. Massingham LJ, Johnson KL, Scholl TM, et al. Amniotic fluid RNA gene expression profiling provides insights into the phenotype of Turner syndrome[J]. Hum Genet, 2014, 133(9): 1075-1082.
11. Marstrand-Joergensen MR, Jensen RB, Aksglaede L, et al. Prevalence of SHOX haploinsufficiency among short statured children[J]. Pediatr Res, 2017, 81(2): 335-341.
12. Binder G. Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy[J]. Horm Res Paediatr, 2011, 75(2): 81-89.

13. Zhang Q, Guo X, Tian T, et al. Detection of Turner syndrome using X-chromosome inactivation specific differentially methylated CpG sites: a pilot study[J]. Clin Chim Acta, 2017, 468: 174-179.
14. Peterson JF, Basel DG, Bick DP, et al. A rare combination of functional disomy Xp, deletion Xq13.2-q28 spanning the XIST gene, and duplication 3q25.33-q29 in a female with der(X)t(X;3)(q13.2;q25.33)[J]. J Pediatr Genet, 2018, 7(1): 23-28.

本文引用：李旗, 解淑钰, 司彩云, 陶月红. 多重连接依赖探针扩增技术筛查Turner综合征的可行性[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(12): 2643-2648. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.020
Cite this article as: LI Qi, XIE Shuyu, SI Caiyun, TAO Yuehong. Feasibility of multiplex ligation dependent probe amplification in screening for Turner syndrome[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(12): 2643-2648. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.020