

· 经验交流 ·

单亲二倍体对法医DNA检测的影响与分析

郭宏¹, 毛君², 刘英华², 向菁菁², 刘敏娟²

(1. 南京医科大学附属苏州医院司法鉴定所, 江苏 苏州 215002; 2. 南京医科大学附属苏州医院生殖与遗传中心, 江苏 苏州 215002)

关键词: 法医物证学; 单亲二倍体; 染色体缺失; 微阵列分析

中图分类号: DF795.2 文献标志码: B doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2020.03.017

文章编号: 1004-5619(2020)03-0389-03



单亲二倍体(uniparental disomy, UPD)是指在染色体核型中,某些同源染色体或染色体上的部分片段均来源于双亲中的一方,未检测到另一亲本来源的染色体或染色体的部分片段^[1]。单亲本来源在法医学检案中可以表现为短串联重复(short tandem repeat, STR),不符合孟德尔遗传定律。本研究通过2个家系不同染色体来源的单亲二倍体来展示这一现象对法医DNA检测产生的影响,希望给法医工作者提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象

胎儿确诊为UPD的2个家系(家系A和家系B)。每个家系的父母均采集外周静脉血10 mL,采用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝,4℃保存。孕妇羊水10 mL,3 044×g离心15 min,弃去上清液,4℃保存。

1.2 主要试剂及仪器

CytoScan 750K array 芯片、Chromosome Analysis Suite 3.1(ChAS 3.1)软件(美国Affymetrix公司), Microreader™ 21 ID System、Microreader™ 23sp ID System(苏州阅微基因技术有限公司),QIAamp DNA Investigator 试剂盒、QIAamp DNA Blood Mini 试剂盒(德国QIAGEN公司),3130xl 基因分析仪、GeneMapper 3.2 软件(美国Applied Biosystems公司),NanoDrop 2000c 分光光度计(美国Thermo Scientific公司)。

1.3 方法

1.3.1 染色体微阵列芯片检测

使用QIAamp DNA Blood Mini 试剂盒对胎儿羊水细胞进行基因组DNA的提取,NanoDrop 2000c 分光光度计检测DNA的浓度与纯度,确保DNA质量在合

格范围内($1.8 < D_{260}/D_{280} < 2.0$, $1.9 < D_{260}/D_{230} < 2.5$),然后将DNA稀释至30~60 ng/μL用于芯片实验。

对上述DNA采用全基因组CytoScan 750K array 芯片按推荐的标准操作程序进行SNP-array检测,主要操作步骤为:将基因组DNA消化、连接、扩增、纯化、片段化、标记、探针杂交、洗涤和扫描后,使用配套的ChAS 3.1软件进行数据分析。定义DNA拷贝数变异(copy number variation, CNV)均≥200 kb,杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)区域片段大于10 Mb,且可信度≥90%进行结果判读,同时参考美国医学遗传学会(American College of Medical Genetics, ACMG)^[2]、中国医师学会医学遗传学分会等专业学会制定的《染色体基因组芯片在儿科遗传病应用的指南和共识》^[3],并检索参考数据库DGV^[4]、ClinGen^[5]、Clinvar^[6]、DECIPHER^[7]、OMIM^[8],结合本实验室内部数据以及PubMed基因数据库^[9]等进一步完成综合分析。

1.3.2 STR基因座检测

采用QIAamp DNA Investigator 试剂盒按照标准化操作流程提取父母外周血和孕妇羊水的DNA。使用Microreader™ 21 ID System以及Microreader™ 23sp ID System检测包含Amelogenin基因在内的D19S433等39个基因座,使用3130xl 基因分析仪进行荧光检测,由GeneMapper 3.2软件进行STR分型。

2 结果

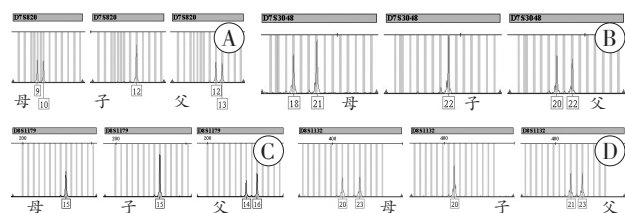
2.1 染色体微阵列芯片检测结果

将芯片扫描的原始数据导入ChAS 3.1软件进行分析,选取“LOH”选项,设定显示阈值为10 M(即大于10 M的LOH用紫色标注条显示),若整条染色体都有紫色标注条,则提示该染色体为UPD。

检测结果显示,家系A胎儿7号染色体为UPD,家系B胎儿8号染色体为UPD。未检测到其他染色体拷贝数异常及UPD的情况。

2.2 基因型检测结果

2个家系的父母外周血及孕妇羊水采用Microreader™ 21 ID System和Microreader™ 23sp ID System检测39个STR基因座,均检测到不符合孟德尔遗传定律的STR基因座(图1),其中,家系A的位于7号染色体,基因座为D7S820和D7S3048,前者基因型为母(9,10)、子(12,12)、父(12,13),后者基因型为母(18,21)、子(22,22)、父(20,22)。家系B的位于8号染色体,基因座为D8S1179和D8S1132,前者基因型为母(15,15)、子(15,15)、父(14,16),后者基因型为母(20,23)、子(20,20)、父(21,23)。



A: D7S820基因座分型结果(家系A); B: D7S3048基因座分型结果(家系A); C: D8S1179基因座分型结果(家系B); D: D8S1132基因座分型结果(家系B)。

图1 2个家系不符合孟德尔遗传定律的基因型分型结果

Fig. 1 Genotyping results of two families not consistent with Mendel's laws of inheritance

3 讨论

根据孟德尔遗传定律,正常个体的23对同源染色体分别来自父母双方,而UPD个体的同源染色体只来源于一方亲本。1988年,SPENCE等^[10]首次报道了1例囊性纤维化病变并且身材矮小的患者,检测到囊性纤维化穿膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)基因纯合突变是UPD导致的。由于种种原因,针对UPD的筛查并未列入常规产前诊断项目,除了某些严重影响胚胎生长发育而导致早期流产的UPD,有些无任何异常临床表型的UPD患者和UPD继发性单基因纯合突变导致的隐性遗传病患者是可以正常出生的^[10]。因此,在法医学研究领域,由于UPD的单亲本来源,可能导致亲子关系的假性排除。BEIN等^[11]报道了1例假性排除父权的亲子鉴定案例,孩子与父亲在16号染色体上出现了多个不符合孟德尔遗传定律的遗传标记,遗传学根据为孩子16号染色体表现为母源性UPD。本研究中的2个家系,放在日常亲子鉴定检案中,如果按标准三联体,要求鉴定可疑父与孩子的关系,在使用

Microreader™ 21 ID System时,家系A与家系B均检测到不符合孟德尔遗传定律的STR基因座,我们可视作突变,家系A突变来源于母亲,家系B突变来源于父亲,不过,突变对鉴定意见不会产生影响,累积父权指数(combined paternity index, CPI)均能达到“支持被检父与孩子之间存在亲生血缘关系”的标准。但是,领养、公证、入户等越来越多的委托要求为鉴定父亲(或母亲)与孩子之间的关系,此时,家系A在D19S433等20个基因座的母子CPI为5 346.247 9,家系B在D19S433等20个基因座的父子CPI为1 613.506 9,按照《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223—2018),无法进行亲权关系的认定或排除。两家系样本补充检测Microreader™ 23sp ID System后,家系A在D19S433等39个基因的母子CPI为528 184.995 8,家系B在D19S433等39个基因座的父子CPI为479 930 196.329 7,此时,两家系中母子及父子关系的CPI值均大于10 000,可达到认定亲权关系的标准。与此同时,我们发现两家系均存在两个STR基因座不符合遗传定律,且位于同一条染色体,结合本研究芯片结果,确证两家系胎儿均为UPD患者。

UPD的形成机制包括配子互补、三体自救、单体复制、有丝分裂异常等,其发生的易感因素包含高龄孕产以及药物促排卵等^[12]。

依据检测结果,按照涉及染色体数目以及形态,UPD的类别可为片段化UPD(非整条染色体)、整条染色体UPD、复杂型UPD(伴有等臂染色体、易位染色体等)、全基因组UPD。UPD的致病机制主要包含嵌合体致发育异常、单基因纯合突变(隐性遗传病)、基因印迹障碍等,而且这些因素往往不是单一存在,从而致使患者的临床表型多样化^[10]。在法医学领域,在STR分析时,如果UPD涉及整条染色体,相对容易判断。片段化或复杂型UPD情况就要复杂得多,容易造成错判漏判^[13]。

对于UPD的诊断,目前常用的诊断技术有微卫星标记(又称STR)分析、特异性甲基化检测、染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)、全外显子测序以及全基因组测序等^[14]。如果患者符合某已知UPD类型致病表型,可使用STR或者特异性甲基化检测进行针对性检测;测序或者CMA,主要用于难以判断的UPD或者查找隐性基因的具体突变基因座。结合产前超声检查,如若发现胎儿结构异常,CMA则是目前最有效的遗传学诊断方法^[15-17]。通过固定在基质上的高密度DNA探针与经荧光标记的样本DNA特异性杂交,最后根据荧光强度,测出样本DNA的碱基类别,发现染色体变异。本研究所使用

的 Affymetrix CytoScan® 750K array 芯片, 包含 20 万个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 探针标记 (对于 >400 kb 的拷贝数变化, 灵敏度和特异性高于 99%) 和 55 万个 CNV 寡核苷酸探针标记, 针对遗传疾病相关基因和癌症相关基因增加探针覆盖, 可以精确检测 UPD、LOH、CNV 和血缘一致性 (identity by descent, IBD), 甚至低水平的嵌合体以及样品异质性都能有效检测。需要注意的是, 无论采取哪种检测方法, 都应同步检测父母双方, 目的是核对验证以及后续生育指导。

在法医学亲子鉴定中, 常规使用的荧光检测试剂盒比较难以发现 UPD, 当疑似突变发生, 在亲权指数不足 10 000 进而增加补充基因座时, 如若再次出现不符合孟德尔遗传定律的 STR 基因座, 且位置在与疑似突变基因座相同的染色体上, 疑似等位基因 LOH 的突变, 此时, 需高度怀疑 UPD 的发生, 应对方法为增加检测基因座、使用单条染色体 STR 检测试剂盒或者基因芯片等技术进行进一步检测^[13]。

参考文献:

- [1] ENGEL E. A new genetic concept: Uniparental disomy and its potential effect, isodisomy[J]. *Am J Med Genet*, 1980, 6(2): 137-143. doi: 10.1002/ajmg.1320060207.
- [2] SOUTH S T, LEE C, LAMB A N, et al. ACMG standards and guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: Revision 2013[J]. *Genet Med*, 2013, 15(11): 901-909. doi: 10.1038/gim.2013.129.
- [3] 中国医师协会医学遗传学分会, 中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组, 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 染色体基因组芯片在儿科遗传病的临床应用专家共识[J]. *中华儿科杂志*, 2016(6): 410-413. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.06.004.
Medical Genetics Branch of Chinese Medical Doctor Association, Clinical Genetics Group, Adolescent Medicine Committee, Chinese Medical Doctor Association, Department of Endocrine Genetics and Metabolism, Chinese Academy of Pediatrics. Expert consensus on the clinical application of chromosome microarray analysis in pediatric genetic diseases[J]. *Zhonghua Erke Zazhi*, 2016(6): 410-413.
- [4] Database of Genomic Variants[EB/OL]. [2019-04-28]. <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>.
- [5] Clinical Genome Resource[EB/OL]. [2019-04-28]. <https://www.clinicalgenome.org>.
- [6] ClinVar[EB/OL]. [2019-04-28]. <https://www.clinicalgenome.org/data-sharing/clinvar/>.
- [7] DECIPHER[EB/OL]. [2019-04-28]. <https://decipher.sanger.ac.uk/>.
- [8] Online Mendelian inheritance in man[EB/OL]. [2019-04-28]. <https://omim.org/>.
- [9] UCSC Genome Browser[EB/OL]. [2019-04-28]. <http://genome.ucsc.edu/>.
- [10] SPENCE J E, PERCIACCANTE R G, GREIG G M, et al. Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease[J]. *Am J Hum Genet*, 1988, 42(2): 217-226.
- [11] BEIN G, DRILLER B, SCHÜRMANN M, et al. Pseudo-exclusion from paternity due to maternal uniparental disomy 16[J]. *Int J Legal Med*, 1998, 111(6): 328-330. doi: 10.1007/s004140050181.
- [12] HILLMAN S C, MCMULLAN D J, HALL G, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: Prospective cohort study and systematic review and meta-analysis[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2013, 41(6): 610-620. doi: 10.1002/uog.12464.
- [13] 马晓燕. 法医 DNA 鉴定中的染色体异常现象[J]. *复旦学报 (医学版)*, 2017, 44(S1): 33-36. doi: 10.3969/j.issn.1672-8467.2017.suppl.006.
MA X Y. The chromosome abnormality in forensic DNA test[J]. *Fudan Xuebao (Medical sciences)*, 2017, 44(S1): 33-36.
- [14] SHAFFER L G, DABELL M P, FISHER A J, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5 000 pregnancies[J]. *Prenatal Diag*, 2012, 32(10): 976-985. doi: 10.1002/pd.3945.
- [15] SHAFFER L G, ROSENFELD J A, DABELL M P, et al. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound[J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(10): 986-995. doi: 10.1002/pd.3943.
- [16] WAPNER R J, MARTIN C L, LEVY B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(23): 2175-2184. doi: 10.1056/NEJMoa1203382.
- [17] ZHOU S, WANG H, WANG Q K, et al. Loss of heterozygosity detected at three short tandem repeat locus commonly used for human DNA identification in a case of paternity testing[J]. *Legal Med (Tokyo)*, 2017, 24: 7-11. doi: 10.1016/j.legalmed.2016.11.001.

(收稿日期: 2019-05-08)

(本文编辑: 张素华)