

多重置换扩增——一种新的全基因组扩增技术

刘维瑜 金春莲

【摘要】 全基因组扩增技术(MDA)用于扩增大量的 DNA 以满足遗传检测的需要。在高通量的遗传分型中,处理有限的临床样本的基因组 DNA,一直是个瓶颈问题。一种新方法——多重置换扩增,能高度忠实的复制整个基因组 DNA,扩增出 10 ~ 100 kb 大小的片段,能提供大量均一完整的全基因组序列。MDA 是一种简单、有效的方法,非常适用于遗传研究、法医学和临床诊断的需要。

【关键词】 全基因组扩增; 多重置换扩增; phi29 DNA 聚合酶

Multiple Displacement Amplification (MDA)—A New Whole Genome Amplification (MGA) Method

LIU Wei-yu, JIN Chun-lian. (Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Corresponding author: JIN Chun-lian. E-mail: chunlianjin@126.com

【Abstract】 Whole genome amplification methods are used to generate the large amounts of DNA that are required for genetic testing. Preparation of genomic DNA from clinical samples is a bottleneck in high-throughput genotyping and is frequently limited by the amount of specimen available. A new method, called multiple displacement amplification, dramatically improves the high-fidelity amplification of genomic DNA, with 10-100 kb amplified DNA products large amount of genome sequence. MDA-based WGA is a simple and reliable method that may have significant implications for genetic studies, forensic medicine and clinical diagnostics.

【Key words】 Whole genome amplification; Multiple displacement amplification; phi29 DNA polymerase

全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)用于产生足量的 DNA 以满足多方面不同的需求,它的目的是以最小的扩增偏差,完整均一的扩增整个基因组序列。要达到完全意义上的全基因组扩增是一个挑战,因为它需要对 3 亿个碱基忠实的复制而不能有任何一个位点或等位基因的丢失。

近年来,扩增全基因组 DNA 的技术不断进步,有几种不同的策略可供选择。1992 年, Zhang 等^[1]使用一条 15N 的随机引物,通过反复的引物延伸成功地将一个单倍体细胞的基因组至少 78% 的序列扩增了 30 倍以上。这种将单个细胞的 DNA 序列体外扩增为多拷贝的技术称为引物延伸预扩增(primer

extension preamplification, PEP)。同年, Telenius 等^[2]使用部分序列变性的寡核苷酸在 PCR 较低的起始退火温度条件下变性的寡核苷酸作为引物结合在基因组均匀分散的多个位点上进行有效的全基因组扩增,这种技术就是变性寡核苷酸引物 PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR)。这些方法都能提供足量的全基因组序列,但这些基于 PCR 的技术可能产生非特异性的扩增产物,不完全的位点覆盖率,并且 DNA 片段长度一般小于 1 kb,在很多方面的应用受到限制^[3]。一种新的人类全基因组扩增技术——多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA),能够提供高度均一完整的全基因组序列,确保最低的位点扩增误差,使产物与模板的遗传序列信息保持一致,是一种真正意义的全基因组扩增方法^[4]。由于不依赖于 PCR 反应而使其区别于其他全基因组扩增方法。下面将

基金项目:“十五”国家科技攻关课题(2004BA720A04)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学基础医学院遗传教研室

通讯作者:金春莲(E-mail: chunlianjin@126.com)

详细介绍多重置换扩增的原理、特点及应用前景。

1 多重置换的原理

最近,在扩增大的环状 DNA 模板如质粒或噬菌体 DNA 时,人们发现了一种滚环扩增的方法^[5]。该法使用 phi29 DNA 聚合酶和耐核酸外切酶活性的随机引物,不需要经过 PCR 热循环过程,只在 30℃ 的条件下恒温即可反应。将上述反应中的模板换成人类基因组 DNA,发现线性的模板同样也可被扩增,其扩增的机制是一种链置换反应^[6]。首先随机 6 碱基寡核苷酸作为引物在多个位点与基因组模板 DNA 退火,接下来 phi 29 DNA 聚合酶在 DNA 的多个位点同时起始复制,它沿着 DNA 模板合成 DNA,同时取代模板的互补链。被置换的互补链又成为新的模板来进行扩增,成为一个级联分支的放大系统。因此最终我们可以获得大量高相对分子质量的 DNA。phi29 DNA 聚合酶对于模板有很强的模板结合能力,能连续扩增 100 kb 的 DNA 模板而不从模板上解离,平均片段长度 > 10 kb。而且 phi29 DNA 聚合酶具有高保真性能,其错配率仅为 1:106 ~ 1:107,相对于 Taq 酶的 3:104 至少低 100 倍^[7]。因此 MDA 扩增后的产物序列能保证与模板高度一致。

2 多重置换的特点

2.1 样本无需纯化:可用来进行基因组 DNA 扩增的样本种类有很多,包括新鲜或冰冻的全血、组织培养细胞、口腔拭子细胞、白膜层等。在多重置换扩增反应中,样本不需要经过纯化,可以直接作为起始模板进行全基因组扩增,并能获得高纯度的 DNA 产物^[8]。传统样本的处理往往要经过费时的步骤,很难实现自动化,限制了高通量的使用。而进行 MDA 反应的细胞或全血,只要经过简单的裂解步骤就可进行后续的扩增,DNA 抽提及各种纯化步骤都省略了,有效避免了处理过程中可能的污染,而且大大简化了操作,特别适用于临床样品的分析和检测。通过 MDA 扩增 10 000 倍甚至获得更多的 DNA,而且比通过传统抽提法得到的样本 DNA 纯度还要高。这是因为 phi29 DNA 聚合酶高效的活性能确保各种不同的模板有一致的产量。另一方面,如果将 0.05 μ L 的血液加入到 100 μ L 的 MDA 反应体系中,血液被稀释了 2 000 倍,一些抑制反应的因素如血液中的血红素或样品添加剂 EDTA 等,经过这样的稀释后所造成的影响就几乎可以忽略了^[9]。所以能确保

未经纯化后的样本经过 MDA 扩增后有较高的纯度,可以直接用于后续的遗传分析研究。

2.2 产量稳定:基因组 DNA 经过 30℃ 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。100 μ L 的反应体系中,无论起始模板量差别多大(100 fg ~ 10 ng),扩增后的 DNA 产量都一致保持在 20 ~ 30 μ g 左右,十分稳定^[10]。这种一致的产量在某些方面是很重要的。因为无需对 DNA 定量,所以允许使用不同起始浓度或数量的样品,并且对下游的遗传分析提供可重复的结果。而传统的方法所产生的基因组 DNA,在产量和纯度方面都有显著的不同,在进行基因检测前必须重新测量和调整浓度。而且相对于其他全基因组扩增如 PEP 法产生大小不一的短片段,MDA 能扩增出集中均一的长片段产物^[11]。这是因为来自于噬菌体 phi29 的 DNA 聚合酶能与 DNA 模板结合得非常紧密,每次能持续扩增约 70 000 个碱基而不解离,所以能在 MDA 反应中产生长片段的 DNA 产物,平均 12 kb,最长可达 100 kb。长片段的产物有利于多方面的应用,包括限制性片段长度多态分析,设计探针及 DNA 测序等方面。

2.3 对基因组均匀扩增:在许多情况下,全基因组扩增应以最低的位点扩增误差提供尽可能完全的基因组覆盖率,使产物保持模板的遗传序列信息。任何一种扩增方法都会导致一定的序列偏差,导致的因素很多如引物效率、模板的结合力、GC 含量、与端粒和着丝粒的远近等^[12]。对 8 个基因位点,包括接近着丝粒的 1 号染色体 (connexin 40) 和与端粒相邻的 6 号染色体 [chemokine (C-C motif) receptor 6],进行 TaqMan 定量 PCR 反应以检测全基因组扩增偏差。使用 MDA、DOP-PCR 和 PEP 3 种方法来分别扩增相同模板量的基因组 DNA,然后对 8 个不同的位点的扩增效率来进行检测。MDA 分布在基因组中不同位置的各个位点都能实现相似的扩增效率,扩增偏差平均为 2.5。而 DOP-PCR 的偏差范围为 $10^3 \sim 10^6$,PEP 为 $10^2 \sim 10^4$ ^[13]。一种全基因组扩增方法是否有效,取决于能否以最小的扩增偏差代表整个基因组的能力。这些基于 PCR 用于 WGA 的方法如 DOP 和 PEP,因为在不同位点间存在大范围的偏差,从而限制了这些方法的使用。扩增偏差改变了 DNA 序列组成的信息,使它在诊断性的检测中成为不可靠的模板。有些情况下,基因组的某些区域完全缺失,导致等位基因丢失和误诊的发生^[14]。

MDA 能使基因组 DNA 得到均匀的扩增,从而使各个位点达到较完全的覆盖,确保后续遗传分析的准确性。

2.4 操作简单,不依赖 PCR 反应: 操作比较简单,原始样本(全血、血浆、细胞等)无需纯化,经细胞裂解提取 DNA 后,加入到 Eppendorf 管的反应液中,包括 dNTP、六核苷酸随机引物、phi29 DNA 聚合酶以及酶缓冲液,然后置于 30℃ 水浴下孵育 4~6 h 进行多重置换扩增反应^[15],最后 65℃ 8 min 灭活酶的活性。反应结束后即可产生大量长片段均一、完整的全基因组 DNA 序列。因为反应在水浴中进行,而不是在热循环仪中,从而避免了 PCR 反应所带来的非特异性扩增产物,反应体系可以根据需要按比例任意配制^[16]。该方法高效、简单,非常适合于临床的遗传分析检测。

3 多重置换的应用

3.1 STR 和 SNP 分型: 微卫星滑脱是单细胞进行全基因组扩增后容易出现的问题。主要是由聚合酶从模板脱落所导致,尤其是那些没有链置换活性的耐热型聚合酶如 *Taq* DNA 聚合酶等更容易从模板丢失^[17]。而从 phi29 中克隆出的嗜温型聚合酶,除了具有 3'→5' 外切酶校读功能,还具有特殊的链置换活性和连续合成特性(>70 kb),同时不受模板二级结构的影响,能防止酶从模板丢失,因此理论上能减少滑脱率。Hellani 等^[18]研究 40 例单个淋巴细胞 MDA 产物在 16 个位点均没有发现微卫星滑脱,因此,MDA 产物适合于进行 STR 分型分析。

同样,MDA 产物也可应用于 SNP 分型分析中。Barker 等^[19]选择了 13q32 的一个 SNP 位点用限制性片段长度多态的方法进行分型,样本分别来自于 24 名个体经 MDA 扩增与未扩增的基因组 DNA。扩增组的 DNA 样本都给出了正确的分型,对于基因组的其他 10 个位点 SNP,MDA 也提供了完全的覆盖率。

3.2 比较基因组杂交和微阵列研究: MDA 可以检测比较基因组杂交中染色体覆盖的一致性。将等量生物素标记的 MDA 扩增 DNA 和地高辛标记的未扩增 DNA,在 *CotI* DNA 存在或缺失的情况下共杂交,同时抑制重复的 DNA 交叉杂交^[20]。用这种方法制备的 DNA 探针,有很大的价值,尤其是从有限的患者 DNA 样本如针刺活组织或羊水样本中进行比较基因组杂交。在构建微阵列时,MDA 也有重要作

用,因为它能产生大量的捕获探针。MDA 能扩增细菌人工染色体文库中的 22 条染色体,从而在玻片阵列上用作捕获探针^[21]。每 10 ng 克隆能扩增 5 000 倍,这样就避免从 P-1 源性人工染色体(PACs 和 BACs)中获取所需大量的 DNA。

3.3 肿瘤研究及临床应用: 肿瘤是一种遗传性疾病,随着人类基因组草图的完成,已经建立了高通量技术来检测正常细胞与肿瘤细胞间、以及肿瘤的不同亚群间的遗传学差异。对于肿瘤分子水平分类的表达谱研究,更加肯定了对遗传异质性进行全基因组筛查的前景^[22]。通过激光捕获显微分离技术可以将肿瘤细胞从正常细胞中分离出来,进行全基因组扩增时必须保证各位点及等位基因的平衡,MDA 对各个位点高度均一的扩增特点,使其成为首选的扩增方法。

该方法还可以直接从临床样本中获得高纯度的 DNA。有限的 DNA 模板是基因检测的瓶颈所在,而 MDA 能从非常微量的血或细胞中产生大量的模板,也就是说,从一滴血中获得的 DNA 就足够在单管内进行全基因组扫描^[23]。而且不论起始样本的量是多少,都能保证一致的 DNA 产量,因此在进行遗传检测前无需再测定和调整浓度。MDA 对微量的 DNA 进行扩增能获得大量高质量的产物,往往被用于扩增单个细胞,尤其是应用于植入前诊断和无创性产前诊断时需要单个细胞进行扩增^[24]。

4 总结

一种好的全基因组方法需要具备如下特征:①对整个基因组非常均匀的扩增;②最大倍数的扩增产量;③扩增产物有足够的片段长度,使之能应用于 RFLP 分析, DNA 测序和克隆;④DNA 聚合酶的高保真性,会影响到后续的诊断、精确分型及 DNA 测序和克隆等;⑤扩增微量起始模板包括单个细胞的能力。多重置换扩增因为具备上述所有特点,可以称得上是一种真正意义的全基因组扩增方法。

参考文献

- 1 Zhang L, Cui X, Schmitt K. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 5847-5851.
- 2 Telenius H, Carter NP, Bebb CE, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 1992, 13: 718-725.
- 3 Cheung VG, Nelson SF. Whole genome amplification using a

- degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93:14676-14679.
- 4 Dean FB, Hosono S, Fang L. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99:5261-5266.
 - 5 Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, *et al.* Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res*, 2001, 11:1095-1099.
 - 6 Dettler JC. Isothermal strand-displacement amplification applications for high-throughput genomics. *Genomics*, 2002, 80:691-698.
 - 7 Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, *et al.* Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*, 1998, 19: 225-232.
 - 8 Wang G, Brennan C, Rook M, *et al.* Balanced-PCR amplification allows unbiased identification of genomic copy changes in minute cell and tissue samples. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32:76.
 - 9 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. *Hum Mutat*, 2005, 26:262-270.
 - 10 Hosono S, Faruqi AF, Dean FB. Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Res*, 2003, 13:954-964.
 - 11 Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ, *et al.* Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: anew era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10:767-772.
 - 12 Lovmar L, Fredriksson M, Liljedahl K, *et al.* Quantitative evaluation by minisequencing and microarrays reveals accurate multiplexed SNP genotyping of whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 129.
 - 13 Hawkins TL. Whole genome amplification: applications and advances. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13:65-67.
 - 14 Laaken RS, Egholm M. Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol*, 2003, 21:531-535.
 - 15 Paul P, Apgar J. Single-molecule dilution and multiple displacement amplification for molecular haplotyping. *Biotechniques*, 2005, 38: 553-554.
 - 16 Hughesab S, Arnesona N, Done S, *et al.* The use of whole genome amplification in the study of human disease. *Prog Biophys Mol Biol*, 2005, 88:173-189.
 - 17 Tranah GJ, Lescault PJ, Hunter DJ, *et al.* Multiple displacement amplification prior to single nucleotide polymorphism genotyping in epidemiologic studies. *Biotechnol Lett*, 2003, 25: 1031-1036.
 - 18 Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, *et al.* Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10:847-852.
 - 19 Barker DL, Hansen MS, Faruqi AF, *et al.* Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res*, 2004, 14:901-907.
 - 20 Lage JM. Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. *Genome Res*, 2003, 13, 294-307.
 - 21 Buckley PG. A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum Mol Genet*, 2002, 11:3221-3229.
 - 22 Rook MS, Delach SM, Deyneko G, *et al.* Whole genome amplification of DNA from laser capture-microdissected tissue for high-throughput single nucleotide polymorphism and short tandem repeat genotyping. *Am J Pathol*, 2004, 164: 23-33.
 - 23 Hellani A, Coskun S, Tbakhi A, *et al.* Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10:376-380.
 - 24 Jiang Z, Zhang X, Deka R, *et al.* Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 91.

(收稿日期:2006-06-12)

(本文编辑:孙岩伟)

(上接 248 页)

- 20 Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, *et al.* Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 1996, 134:793-799.
- 21 Wei L, Yang Y, Zhang X, *et al.* Anchorage-independent phosphorylation of p130 (Cas) protects lung adenocarcinoma cells from anoikis. *J Cell Biochem*, 2002, 87:439-449.
- 22 Schlessinger J. New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell*, 2000, 100:293-296.
- 23 Orr AW, Pallero MA, Xiong WC, *et al.* Murphy-Ullrich. thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly. *J Biol Chem*, 2004, 279: 48983-48992.

(收稿日期:2007-03-05)

(本文编辑:高巍)

作者: 刘维瑜, 金春莲, [LIU Wei-yu](#), [JIN Chun-lian](#)
作者单位: [110001, 沈阳, 中国医科大学基础医学院遗传教研室](#)
刊名: [国际遗传学杂志](#) **ISTIC**
英文刊名: [INTERATIONAL JOURNAL OF GENETICS](#)
年, 卷(期): 2007, 30 (4)
引用次数: 0次

参考文献(24条)

1. [Zhang L, Cui X, Schmitt K Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis](#) 1992
2. [Telenius H, Carter NP, Bebb CE Degenerate oligonucleotideprimed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer](#) 1992
3. [Cheung VG, Nelson SF Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA](#) 1996
4. [Dean FB, Hosono S, Fang L Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification](#) 2002
5. [Dean FB, Nelson JR, Giesler TL Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiplyprimed rolling circle amplification](#) 2001
6. [Detter JC Isothermal strand-displacement amplification applications for high-throughput genomics](#) 2002
7. [Lizardi PM, Huang X, Zhu Z Mutation detection and singlemolecule counting using isothermal rolling-circle amplification](#) 1998
8. [Wang G, Brennan C, Rook M Balanced-PCR amplification allows unbiased identification of genomic copy changes in minute cell and tissue samples](#) 2004
9. [Bergen AW, Haque KA, Qi Y Comparison of yield and genotyping performance of multiple displacement amplification and omniplex whole genome amplified DNA generated from multiple DNA sources](#) 2005
10. [Hosono S, Faruqi AF, Dean FB Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples](#) 2003
11. [Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease](#) 2004
12. [Lovmar L, Fredriksson M, Liljedahl K Quantitative evaluation by minisequencing and microarrays reveals accurate multiplexed SNP genotyping of whole genome amplified DNA](#) 2003
13. [Hawkins TL Whole genome amplification: applications and advances](#) 2002
14. [Lasken RS, Egholm M Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens](#) 2003
15. [Paul P, Apgar J Single-molecule dilution and multiple displacement amplification for molecular haplotyping](#) 2005
16. [Hughesab S, Arnesona N, Done S The use of whole genome amplification in the study of human disease](#) 2005

17. [Tranah GJ, Lescault PJ, Hunter DJ Multiple displacement amplification prior to single nucleotide polymorphism genotyping in epidemiologic studies 2003](#)
18. [Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications 2004](#)
19. [Barker DL, Hansen MS, Faruqi AF Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel 2004](#)
20. [Lage JM Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH 2003](#)
21. [Buckley PG A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications 2002](#)
22. [Rook MS, Delach SM, Deyneko G Whole genome amplification of DNA from laser capture-microdissected tissue for high-throughput single nucleotide polymorphism and short tandem repeat genotyping 2004](#)
23. [Hellani A, Coskun S, Tbakhi A Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis 2005](#)
24. [Jiang Z, Zhang X, Deka R Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification 2005](#)

相似文献(10条)

1. 学位论文 吕志 胃癌1p35-pter的杂合性丢失研究 2005

癌基因的激活与抑癌基因的失活是癌症发生发展过程中两个重要的分子遗传学改变。抑癌基因失活最常见的模式为一对等位抑癌基因先后经历失活性突变及丢失而丧失功能。伴随抑癌基因丢失,该区域染色体内某些特定标记位点由正常状态下的杂合性变成了丢失后的纯合性。通过对肿瘤患者进行基因组扫描,对这种杂合性丢失进行分析,可以找到候选抑癌基因,进而揭示肿瘤致病的分子机理。

胃癌是源自胃粘膜上皮的恶性肿瘤,在我国发病率很高,死亡率占恶性肿瘤的第一位。它的发生分子机制十分复杂,通常涉及多基因、多阶段、多因素参与。有研究显示胃癌常于多个染色体区域发生丢失。然而以往研究在进行杂合性丢失(LOH)分析时直接采用肿瘤组织为模板,由于肿瘤细胞中混入了正常细胞,导致LOH检出率降低并影响结果可信度。而且,往往由于模板量的相对有限,难以对可疑模板的可疑位点继续进行高密度筛查。在本研究中,首先采用激光捕获显微切割(LCM)技术对肿瘤患者正常的胃粘膜细胞及相对应的肿瘤细胞进行特异性的捕获,去除组织异质因素。然后利用多重置换扩增技术(MDA)对LCM所获得的DNA进行高质量的全基因组扩增(WGA)。最终利用扩增产物对胃癌患者全基因组扫描进行LOH分析。本文主要介绍1p35-pter的LOH分析。

2. 期刊论文 周怡雯,赵晓明, ZHOU Yi-wen, ZHAO Xiao-ming 全基因组扩增技术在植入前遗传学诊断中的应用 -国际生殖健康/计划生育杂志2009, 28(2)

全基因组扩增技术是一种对微量DNA进行均衡扩增的方法,用于各类遗传检测,对于获取细胞数目及DNA量非常有限的植入前遗传学诊断是十分宝贵的。该项技术主要包括经热循环扩增和恒温扩增两类方法,其中恒温扩增的多重置换扩增法为近几年发展起来的技术,目前多重置换扩增法在植入前遗传学诊断中的应用正备受关注。对全基因组扩增技术的常用方法,尤其对多重置换扩增法及其在植入前遗传学诊断中的应用现状做综述。

3. 学位论文 陈玲 改良扩增前引物延伸方法的法医学应用研究 2007

研究背景与目的

在法医学检案实践中,常遇到样本DNA含量极其有限,以致DNA分型无法完成或不能满足重复检测的需要。因此,对微量模板DNA分析便成为法医学DNA检验的一个难题。以PCR-STR为代表的遗传标记分析技术虽然一定程度上解决了法医学微量检材的难题,但一些检材仍因DNA含量极其有限而无法检测成功,或仅检出少数基因座而无法使累计鉴别能力达到认定水平。这类检材被称为痕量DNA,也称低拷贝模板(Low copy number, LCN),Gill等将其定义为低于100pg的模板DNA。为解决这一难题,有研究用增加PCR循环数,但模板DNA量太低时易产生等位基因丢失或非特异带,且循环数增加到一定程度后再增加循环数也不会显著增加灵敏度;另外,有人试图用巢式PCR,但巢式PCR技术仅限于单一位点分析,无法提高目前法医学中常规DNA检测所用的多位点复合扩增所需的模板数量。全基因组扩增(Whole Genome Amplification, WGA)是一种能从有限的DNA样品获得充足的DNA量供后续分析的技术,其基本思路是通过微量组织甚至单个细胞的整个基因组DNA扩增,大幅度增加DNA的总量。因此被认为是目前可以解决上述难题的一种有效方法。

WGA技术经10余年探索,在方法上已逐步发展和不断完善起来,已被广泛用于疾病基因研究等领域,并取得了良好的效果。但在法医学方面的应用很少。在目前常用的几种WGA方法中,改良扩增前引物延伸方法(Improved primer extension preamplification, IPEP)和多重置换扩增方法(multiplex displacement amplification, MDA)对STR基因座分型显示出较好的效果。故本研究探讨了这两种方法用于法医学微量检材的效果,包括对其灵敏度、扩增忠实性、能否用于法医学常用STR基因座及常用检材等进行系统性研究,从而对其用于法医学实践的可行性进行评价,并建立稳定可行的技术方案。

方法: 1. 对30例口腔拭子样品,采用酚-氯仿法提取DNA,实时荧光定量PCR技术定量,并分别稀释成1ng、0.5ng、0.1ng、0.05ng、0.025ng、0.01ng六种模板量DNA,然后进行MDA反应和IPEP反应。采用实时荧光定量PCR技术检测MDA方法和IPEP方法的产物浓度,比较两种方法的扩增效率。分别以MDA产物和IPEP产物为模板DNA,用AmpFLSTR Identifier 试剂盒扩增,ABI3100基因分型仪检测基因型,比较MDA产物和IPEP产物用于STR分型的效果。

2. 对IPEP方法反应体系的成分和终浓度进一步优化,建立改良IPEP方法,并检测其扩增效率和STR分型效果。将改良IPEP方法用于30例血液、30例血纱、30例精液等三类法医学常见生物检材进行检测,观察改良IPEP方法的可重复性和对法医学常见生物性检材的适用性。

3. 将改良IPEP方法用于20例汗潜指印、20例一次性牙刷、20例自然脱落头发等三种法医学常见疑难微量检材的模拟案例,观察改良IPEP方法对上述检材的STR分型效果;用于现场果核10例、矿泉水瓶10例、烟蒂10例、衣领10例等实际案例样品,观察改良IPEP方法对实际案件中微量DNA样品的检验效果。

结果

1. MDA法产量为 $5.15\mu\text{g}\sim 19.75\mu\text{g}$ ，可对模板DNA增加 $5.15\times 10^3\sim 1.98\times 10^6$ 倍；IPEP法产量为 $0.5\text{ng}\sim 66\text{ng}$ ，可对模板DNA增加25～310倍。MDA法产物浓度高于IPEP法，差异有显著性意义($F=3643.433, P<0.001$)。
2. 常规检测法、MDA法、IPEP法的基因座检出数有显著性差异($F=1033.297, P<0.001$)。当DNA模板量为1ng时，常规检测方法和MDA方法、IPEP方法均可获得复合扩增系统所有基因座的准确分型结果；当DNA模板量为0.5ng时，常规检测方法和IPEP方法均获得所有基因座的准确分型结果，MDA法获得10个以上基因座的准确分型结果；当DNA模板量为 $0.1\text{ng}\sim 0.01\text{ng}$ 时，MDA法基因座检出数高于常规检测法，IPEP法基因座检出数高于MDA法。3. DNA模板量 $\geq 1\text{ng}$ ，其MDA产物杂合子基因座的等位基因扩增均衡；DNA模板量 $\leq 0.5\text{ng}$ ，其MDA产物的STR分型图谱可见等位基因不平衡或丢失现象，且模板DNA量越低，等位基因不平衡或丢失现象越明显。DNA模板量 $\geq 0.05\text{ng}$ ，其IPEP产物杂合子基因座的等位基因扩增均衡；DNA模板量 $\leq 0.025\text{ng}$ ，其IPEP产物的STR分型图谱可见等位基因不平衡或丢失。MDA产物和IPEP产物用于STR分型时均未观察到非特异产物峰。
4. 采用保真性更好的DNA聚合酶和增加随机引物用量，建立了改良IPEP方法。0.1ng、0.05ng、0.025ng、0.01ng四组模板量DNA经改良IPEP法扩增所得产物浓度均高于IPEP法，差异有显著性($F=289.899, P<0.001$)。改良IPEP法对上述模板DNA扩增获得 $3\text{ng}\sim 84\text{ng}$ 产物，可使模板DNA增加160～1220倍。DNA模板量为0.025ng时，改良IPEP方法可获得完整准确的分型结果。DNA模板量为0.01ng时，改良IPEP法的平均基因座检出数高于IPEP法，部分基因座仍未检出，以D7S820、D18S51、FGA等常见位。改良IPEP方法的产物用于STR分型时，未见非特异产物峰及等位基因不平衡或丢失。
5. 改良IPEP方法对0.025ng血液DNA、血纱DNA、精液DNA检测均获得所有基因座的准确分型结果。
6. 改良IPEP方法可显著提高汗潜指印DNA($t=5.423, P<0.001$)、一次性牙刷DNA($t=6.835, P<0.001$)的基因座检出数，但对自然脱落毛发DNA的基因座检出数低于常规检测法($t=3.249, P<0.001$)。改良IPEP方法对实际案件中果核、杯口、烟蒂、衣领等检材的的检测成功率和平均基因座检出数均高于常规检测方法，且检出STR基因座数均不少于9个。

结论

1. MDA法产量高，但灵敏度低，当模板量低于1ng时，产物序列保真性差，影响后续STR分型的准确性。因此，MDA法可能不适用于痕量DNA检测。
2. IPEP法灵敏度高，产物序列保真性好，对0.05ng的基因组DNA可获得良好的STR分型效果，但产量低。
3. DNA聚合酶和随机引物用量对IPEP方法有重要影响。采用保真性更好的DNA聚合酶和增加随机引物至一定终浓度，提高了扩增效率。在此基础上建立的改良IPEP方法的产物序列保真性好，且产量和灵敏度都进一步提高，改善了痕量DNA的STR分型效果。
4. 改良IPEP方法对于口腔拭子、血液、血纱、精液等不同生物性检材、不同状态的同种检材均获得准确可靠的结果，表明了改良IPEP方法的稳定性好，适用于上述法医学常见生物性检材。
5. 改良IPEP方法可显著提高微量皮肤脱落细胞、微量口腔粘膜脱落细胞的检测成功率和平均基因座检出数，以满足法医学个体识别要求。但改良IPEP方法对自然脱落毛发这类降解的短片段DNA样品效果不佳。

4. 期刊论文 [周怀谷, 张晨. ZHOU Huai-gu, ZHANG Chen 全基因组扩增法应用于低拷贝数DNA检测 -法医学杂志](#)

2006, 22 (1)

目的建立基于多重置换扩增(MDA)技术的全基因组扩增(WGA)方法,实现对低拷贝数(LCN)DNA样品进行分析.方法采用REPLI-g试剂盒对样本进行等温全基因组扩增,扩增产物采用ProfilerPlus试剂盒确定样本的十个STR基因座的等位基因型.结果10pg DNA模板经全基因组扩增后,能够进行DNA分型.结论全基因组扩增可以用于LCN的DNA分析,帮助提高微量物证的检出成功率.

5. 学位论文 [刘维瑜 无创性产前基因诊断技术的改进与应用 2006](#)

传统的有创性产前诊断对孕妇的损害是不言而喻的。虽然诊断的准确率较高，但有损伤胎儿或导致孕妇流产、感染的可能。1969年，Walknowska等在孕妇外周血中发现了胎儿核型的细胞(46，XY)。这使得人们可以通过获取孕妇外周血中的胎儿细胞，进行无创性的产前基因诊断。这种方法对孕妇和胎儿无损伤，具有取材方便、风险小，不受孕妇年龄和病史等影响的优点，是目前产前诊断发展的方向。有多种富集和分离胎儿有核红细胞的方法可供选择：如利用有核红细胞物理特性的密度梯度离心法，或利用有核红细胞表面相对特异性抗原的MACS、FACS法，还有利用有核红细胞内的血红蛋白 γ 链、 ϵ 链、 ξ 链的单克隆抗体免疫标记法。本课题组前期利用胎儿有核红细胞抗血红蛋白 γ 链抗体标记，获得特异的胎儿细胞，成功地进行了遗传病的产前基因诊断。血红蛋白 ϵ 链、 ξ 链是出现在孕早期的胚胎血红蛋白链，具有更高的特异性。我们尝试应用抗血红蛋白 ϵ 链抗体标记胎儿细胞，在孕早期进行诊断，以期获得更准确的结果。选择抗体标记的方法特异性较高，但成本也较高，同时操作较繁琐。所以我们建立了利用胎儿和成人血红蛋白间生化差异的Kleihauer抗酸染色法。这是一种简单、快速、有效的胎儿细胞标记方法，适合于临床推广应用。

标记后的胎儿细胞通过显微操作方法挑取出来后，必须进行全基因组扩增获得完整的胎儿基因组序列，以满足后续基因诊断的需要。现行的PEP法和DOP-PCR法都是基于PCR的全基因组扩增方法，这避免会产生非特异性的扩增产物，不完全的位点覆盖率甚至位点或等位片段的缺失，这些都会对基因诊断的结果造成严重的影响。最近一种新的全基因组扩增技术：多重置换扩增(MultipleDisplacementAmplification, MDA)，能够提供高度均一完整的全基因组序列，确保最低的位点扩增误差，是一种真正意义的全基因组扩增方法。我们用此方法进行胎儿有核红细胞的全基因组扩增，以探讨其在无创性产前基因诊断中应用的可行性。

实验材料与方法20例受试者，其中12例为孕有杜氏肌营养不良(DMD)高风险患儿的孕妇，5例为孕有苯丙酮尿症(PKU)高风险患儿的孕妇(均来自于本遗传诊断室的咨询者)，孕7-25周。1例胎儿脐血作为阳性对照；2例正常未孕女性作为阴性对照。

本实验以不连续密度梯度离心法初步富集孕妇外周血中的胎儿有核红细胞，细胞涂片离心机制片，然后用抗血红蛋白 γ 链、 ϵ 链抗体和Kleihauer抗酸染色法分别标记胎儿有核红细胞。计数、定位后在倒置显微镜下显微操作获取阳性胎儿细胞，对其进行MDA全基因组扩增。然后进行性别鉴定及STR连锁分析检测。验证有核红细胞的来源，同时完成遗传病的无创性产前基因诊断。

实验结果经抗血红蛋白 ϵ 链抗体免疫组化标记，检测到胎儿有核红细胞最早期为孕7周，最迟孕周为孕7-15周。经Kleihauer染色检测到胎儿有核红细胞的最早期为孕8周，最迟孕周为孕10-22周。检测数量从4个/10ml到19个/10ml不等，平均为9.5个/10ml。MDA扩增后的DNA与PEP扩增后的DNA进行琼脂糖电泳，显示MDA片段长度 $>15\text{kb}$ ，而PEP扩增片段平均1kb左右。完成12例DMD的产前基因诊断，检测出4名男性患儿，4例诊断为正常男性胎儿，1例诊断为女性携带者，3例为正常女性和胎儿。完成5例PKU的产前基因诊断，检测出2例患者，2例正常胎儿，还有1例因STR不提供信息而无法诊断。

结论1、选择更特异的抗血红蛋白 ϵ 链抗体标记胎儿有核红细胞，在孕早期即可进行产前基因诊断。

2、建立一种简单、快速的Kleihauer抗酸染色法标记胎儿有核红细胞。

3、国内首次建立一种新的全基因组扩增技术：多重置换扩增，能提供高度均一完整的胎儿基因组序列。

4、将上述改进的方法应用到遗传病(DMD和PKU)的无创性产前基因诊断中，大大简化了操作，降低了成本并提高了结果的准确性，适合于临床推广应用。

6. 期刊论文 [陈玲, 刘超, 王慧君, 邱平明 多重置换扩增技术用于法医学微量DNA检测效果 -证据科学2008, 16 \(6\)](#)

目的探讨多重置换扩增(MDA)技术对法医学微量DNA样品STR检测分型的效果.方法用MDA技术对不同模板量DNA进行全基因组扩增(WGA),扩增产物用实时荧光定量PCR技术定量、用Profiler Plus试剂盒检测基因型.结果该方法可对模板DNA增加104-106倍.1 ng样品DNA的MDA产物可获得9个STR基因座和Amelogenin性别基因座的准确分型结果;低于0.1 ng的样品DNA经MDA扩增后,基因座检出数增加,但可见等位基因不平衡或丢失现象.结论MDA技术可有效增加DNA模板量和提高微量DNA分型效果.但样品DNA量低于0.1 ng时,MDA产物的STR分型结果判读须慎重.

7. 学位论文 [凌家炜 SNP基因分型芯片结合多重置换扩增技术在单细胞遗传学诊断的应用研究 2008](#)

植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)是指对配子和种植前胚胎的遗传学诊断，把筛选遗传缺陷提早到早早期胚胎阶段。通过去除有遗传缺陷的胚胎，可以有效地避免传统的产前诊断发现异常胚胎后的治疗性流产或引产的要求，因而受到生殖界的广泛关注。这项技术从90年代开展以来，据统计目前世界上已进行了6000多个PGD周期，至少1000个左右的经PGD诊断后的正常孩子出生，为许多因为遗传疾患而不能正常生育的夫妇带来了希望。

尽管PGD技术在近二十年取得了长足的进展，但是该技术仍面临很大的挑战。目前，PCR仍然是PGD领域检测特异性突变的唯一工具，由于只有一个DNA拷贝，单细胞PCR对外源性污染非常敏感，容易发生扩增失败、等位基因优势扩增(Preferential Amplification, PA)或者等位基因脱扣(Allelic Drop-out, ADO)。另外，随着PGD适应症范围的扩大，很多时候需要对基因组上的多个位点进行分析诊断，例如扩增紧密连锁的多态性位点、短串联序列分析(Short Tandem Repeats, STRs)和人组织相容性抗原的单体配型等。虽然多重PCR技术可以同时多个基因组位点进行扩增，但是在优化实验条件和选择

引物上的困难使得该技术目前最多只能同时检测12条区带，而且多重PCR亦可能导致ADO发生率的升高。由于上述问题，对单细胞DNA进行全基因组扩增以提供足量的模板作后续遗传分析已越来越引起PGD研究者的重视。

全基因组扩增(Whole Genome Amplification, WGA)是一项以有限的DNA为模板，非选择性扩增整个基因组以增加DNA数量的技术。该技术极大地改善了PGD仅有一个细胞可供分析所带来的困境，使模板量从皮克级(pg)升高到微克级(μg)。目前，使用较多的WGA方法主要包括引物延伸预扩增(Primer ExtensionPreimp)antation, PEP)、简并寡核苷酸引物PCR(Degenerate OligonucleotidePrimed PCR, DOP-PCR)、联结子-衔接子PCR(Linker-adaptor PCR, LA PCR)和多重置换扩增(Multiple Displacement Amplification, MDA)。DOP-PCR与PEP同样是以PCR为基础的全基因组扩增技术，其单细胞扩增产物的基因组覆盖率最高分别为89%和91%，但是两者都有难以克服的缺陷，包括扩增效率低、产量少(PEP)、产物片段短(PEP和DOP-PCR)、明显的ADO和扩增偏倚(PEP和DOP-PCR)等。这一切都限制了PEP和DOP-PCR在PGD领域的广泛应用。LA PCR被广泛应用于生产FISH探针，但是目前利用该技术作单细胞遗传分析的研究仍然较少。得益于所使用的φ29聚合酶的高持续合成能力和优秀的校读活性，MDA具有远优于PEP和DOP-PCR的准确率和扩增效率，已被越来越多地应用于PGD临床。

但是MDA本身仍有很多缺陷，在进行单细胞扩增时尤其明显。ADO是评价任何应用于PGD的新技术的重要指标，对于单细胞MDA，不同研究得出的ADO率相差较大，介乎0-60%，而且不同位点之间也有很大差异。这些研究主要是利用遗传标记物(STRs或者SNPs)对MDA产物的基因组覆盖率和保真度(ADO率)进行评估，由于每一个遗传标记都需要建立一套PCR反应，所以这些研究只能纳入数量有限的标记进行分析(最多为64个多态位点，分别位于7条不同的染色体上)，这导致我们无法测定单细胞MDA的一些重要指标:包括完整全面的基因组覆盖率和ADO位点在基因组上的分布规律，同时，研究发现MDA即使在没有模板的情况下也会产生大量的非特异性产物，虽然单细胞MDA中的非特异性产物对后续的单重PCR反应影响不大，但是如果利用这些产物作多个位点分析甚至是比较基因组杂交(CGH)时，则需要进一步明确非特异性产物与非扩增的基因组DNA之间是否有重合及其程度，以避免对实验结果造成误差。所有这些都是对单细胞MDA的保真度进行全面评估所必需的。最后，PGD亦有可能活检两个卵裂球或更多的细胞(囊胚活检)进行检测，起始模板量的增加对最后MDA产物保真度的影

响也是我们所关注的。目前，虽有学者进行过类似的研究，但是该实验仅纳入单个遗传标记，因此结果仅提供一个粗略的倾向。综上所述，目前亟需一种能够在基因组水平对单细胞MDA的保真度作出全面而深入评估的平台和方法。另外，虽然对单基因遗传缺陷进行PGD在近年获得了飞速的发展，PGD临床最常见的适应症仍然是各种染色体异常。荧光原位杂交(Fluorescent In SituHybridization, FISH)是目前对染色体数目和结构异常进行PGD的主要手段。由于FISH的一些缺陷，如不能对全部23对染色体同时进行分析、信号判读对个人经验依赖较大、重复检测的准确率逐步降低、不能提供与探针互补序列以外的染色体其他部分的信息等，一些能同时对单细胞全部23对染色体进行核型分析的技术如比较基因组杂交(CGH)技术逐渐引起了广大研究者的注意。近年，结合了微阵列芯片(Microarray)和CGH的Array-CGH技术由于大大缩短了杂交时间(16-32小时)，清除了该技术应用于PGD临床的最大一个弊端。该技术可以快速、有效和准确地分辨各种染色体异常，而且对个人的经验依赖较少。MDA被认为是目前对整个基因组覆盖最广，对各位点扩增偏倚最小的WGA方法，但结合微阵列芯片进行单细胞染色体组的非整倍体检测时应采用非扩增DNA还是同法扩增DNA作为参照仍存争议。另外，微阵列芯片的空间分辨率取决于玻片上各探针的长度(bp)及其在基因组上的相互距离，但这个仅是理论分辨率，实际分辨率还与芯片的质量、杂交的方案以及WGA的保真度密切相关，了解后者更有助于对检测结果做出正确的诊断，而既往未见相关的研究。Affymetrix公司的10K2.0SNP基因分型芯片已被证明可有效检出非扩增DNA和MDA扩增产物的DNA拷贝数(Copy Number)变化，结合其低廉的价格，还有可以同时进行SNP基因型分析的特点，故本研究选取该芯片作为检测单细胞MDA扩增产物DNA拷贝数的平台。

本研究的目的是利用10K 2.0 SNP基因分型芯片平台，探索不同数量细胞(1-10个)的MDA产物的保真度、可能相关因素以及MDA产物中非特异产物对后续实验的可能影响，为单细胞MDA应用于PGD领域做出全面而有效的评估。同时，利用同一芯片平台对不同数量细胞MDA产物的DNA拷贝数进行分析，了解使用不同参照对分析结果的影响，并确定进行MDA产物分析时的实际空间分辨率，建立利用Array-CGH技术诊断单细胞水平非整倍体的分析方法。

第一部分不同数量细胞MDA保真度的评估

目的:

本研究利用10K 2.0 SNP基因分型芯片平台，探索不同数量细胞(1-10个)的MDA产物的保真度(包括检测基因组覆盖率和ADO率)、可能相关因素以及MDA产物中非特异产物对后续实验的可能影响，为单细胞MDA应用于PGD领域做出全面而有效的评估。

材料:

纤维母细胞系GM02732(47, XY, +18)作为模板，共分7组进行实验，分别为A组(阳性对照，细胞gDNA，3例)、B组(阴性对照，无模板MDA，3例)、C组(单细胞MDA，6例)、D组(两个单细胞MDA产物的混合，6例)、E组(2细胞MDA，3例)、F组(5细胞MDA，3例)和G组(10细胞MDA，3例)。

方法:

1. 细胞富集与抽提gDNA
2. 不同数量起始细胞的MDA扩增
3. MDA产物的纯化与产量的测定
4. 细胞gDNA和MDA产物的切割、连接、选择性扩增与标记
5. 所得标记DNA片段与芯片杂交
6. 芯片的洗脱与扫描
7. 数据分析

结果:

1. 阴性对照组的MDA产物与gDNA序列可有5.3%的重叠。
2. 随着起始模板从单细胞提升至10细胞，MDA产物的基因组覆盖率从86.2%逐步上升至98.7%，而间接反映特异性产物比例的判读率/信号率也从0.88上升至0.97。
3. 单细胞组持续无判读信号的SNP位点所在片段的GC含量百分比为42.15%，显著高于芯片SNP位点的平均GC含量为39.86(P=0.019)，其他各组未发现持续无信号的SNP位点所在片段GC含量较芯片平均水平显著升高(P>0.05)，同样，各组中均未发现SNP位点的片段长度与无判读信号之间呈相关性(P>0.05)。
4. 随着起始模板从单细胞提升至10细胞，MDA产物的平均ADO率从17.88%逐渐下降至0.15%，各组之间比较均有统计学差异，P<0.05。此外，仅有4个SNP位点在同一实验组中出现一致性ADO现象(2个位于单细胞组，1+1细胞组和2细胞组各一个)。计算这些位点所在片段的GC含量百分比和长度分别为39.26±4.33%和604.25±67.69bp，与芯片上所有SNP位点的平均水平比较，差异无统计学意义(P值分别为0.84和1.00)。
5. MDA产物与阳性对照组SNP分析的符合率在单细胞组为78.4%，2细胞组的符合率(86%)略高于1+1细胞组(83.7%)，但两者之间没有统计学差异(P=0.13)。

第二部分结合MDA和sNP基因分型芯片对单细胞水平的非整倍体进行分析

目的:

本研究拟结合10K 2.0 SNP基因分型芯片平台与MDA技术，对不同数量细胞MDA产物的DNA拷贝数进行分析，了解使用不同参照对分析结果的影响，并确定进行MDA产物分析时的实际空间分辨率，建立利用Array-CGH技术诊断单细胞水平非整倍体的分析方法。

材料:

纤维母细胞系GM02732(47, XY+18)和GM00343(46, XY 4(del)(qter>p14))作为模板，共分7组进行实验，其中A-F组使用GM02732细胞，G组使用GM00343细胞，分别为A组(阳性对照，细胞gDNA，3例)、B组(单细胞MDA，6例)、C组(两个单细胞MDA产物的混合，6例)、D组(2细胞MDA，3例)、E组(5细胞MDA，3例)、F组(10细胞MDA，3例)和G组(单细胞，3例)。

方法:

同第一部分。

结果:

1. 分别使用非扩增的gDNA和经MDA扩增的单细胞DNA产物作为参照，单细胞组(B组)和1+1细胞组(C组)SNP位点的光强比对数值的标准差(SD)，差别有统计学意义，可能由于样本数较少，其他各组的SD值虽有差异，但是无统计学意义(P值均为0.05)。
 2. 利用CNAT分析软件，发现以非扩增gDNA作为参照模板时，部分染色体优势扩增明显(见下图)。
- B组使用不同参照的染色体拷贝数分析图，上图为使用正常gDNA作参照，下图为使用单细胞MDA产物作参照。由于使用18三体细胞和4号部分单体细胞的MDA产物互为参照，可观察到假性4号多倍体(红色箭头处)，同时可观察到明显的18三倍体改变。

3. 染色体优势扩增主要发生在16、17、19和22号染色体，对比18三体细胞(GM02732)和部分4号单体细胞(GM00343)的单细胞MDA产物(以gDNA为参照)上述四条染色体的SNP的拷贝数和光强比改变，发现虽然分属两个不同的细胞系，但是两者的单细胞MDA产物在以上四条染色体的SNP拷贝数改变有很重的重叠性。

4. 对比不同起始细胞数量的MDA产物在上述四条染色体上的拷贝数和光强比改变，发现优势扩增现象未能消除，而且出现优势扩增的SNP位点有明显的重合性。

5. 在0.5M的平滑化水平，单细胞MDA的芯片杂交数据平均需要16个连续位点出现多倍体改变才能对染色体拷贝数的获得性改变作出诊断(95%可信度)，对于缺失性改变则平均需要11个连续位点出现单倍体改变(95%可信度)。

结论：

1. 本研究首次利用SNP基因分型芯片平台，对不同数量细胞模板的MDA产物进行保真度分析，结果提示MDA是一种快速、高效和相对准确的全基因组扩增方法。

2. 单细胞MDA的非特异性产物可有部分与基因组特异性序列重合，但数量极少。

3. 单细胞MDA产物的ADO率最高可达29.5%，因此进行后续PCR时应至少纳入3个遗传标记作连锁分析以避免误诊。

4. 2细胞MDA的保真度略高于两个单细胞MDA产物的混合物，提示如果进行两个或多个细胞的MDA时，应将细胞至于同一反应体系中进行扩增。

5. MDA产物进行染色体拷贝数分析时有明显的位点特异性优势扩增现象，应使用同样以MDA方法扩增的基因组DNA而不是非扩增的gDNA作为参照。

6. MDA产物进行拷贝数分析时的实际分辨率与芯片位点密度和其他多种因素有关，而且对缺失性改变的分辨率高于获得性改变，即前者比后者更容易被检出。

关键词:SNP基因分型芯片，多重置换扩增，非整倍体筛查，植入前遗传学诊断

8. 期刊论文 [陈玲](#). [刘超](#). [王慧君](#). [邱平明](#). [杨电](#). [CHEN Ling](#). [LIU Chao](#). [WANG Hui-jun](#). [QIU Ping-ming](#). [YANG Dian](#) [两种全基因组扩增方法用于微量检材STR基因座分型比较](#) -国际遗传学杂志2008, 31 (3)

目的 应用多重置换扩增(MDA)技术和改进型扩增前引物延伸(IPEP)技术对法医微量DNA进行全基因组扩增,比较两种方法的STR分型效果及法医学应用价值.方法 用MDA、IPEP方法分别对不同模板量DNA进行扩增,扩增产物用实时荧光定量PCR技术定量、用AmpFLSTR Identifier(R)试剂盒检测基因型.结果 MDA方法可对模板DNA增加103~106倍,IPEP方法可增加25~310倍.为获得完整准确的分型结果,MDA最低需1 ng基因组DNA,IPEP最低需0.05 ng基因组DNA.当基因组DNA为0.01 ng~0.1 ng时,IPEP产物、MDA产物的平均基因座检出数均高于未经全基因组扩增的DNA,其中IPEP产物的平均基因座检出数高于MDA产物.结论 MDA方法、IPEP方法均可提高微量检材的STR分型效果.MDA方法的产量高于IPEP方法;IPEP方法的灵敏度高于MDA方法,且对微量DNA的STR分型效果优于MDA方法,因此更适于法医学痕量DNA检测.

9. 学位论文 [任姿](#) [杜氏肌营养不良症胚胎植入前遗传学诊断](#) 2007

杜氏肌营养不良症(简称DMD)是一种以X连锁隐性遗传为主要遗传方式的进行性肌无力和肌萎缩疾病,发病率为1/3500活产男婴,其中约1/3为新生儿变。

目前较一致的观点是该病由抗肌萎缩蛋白(Dystrophin)基因突变引起。抗肌萎缩蛋白基因全长约2600kb，定位于Xp21，是目前发现的最大的人类基因，约占X染色体的2%，全基因组的0.05%。含79个外显子，DMD cDNA的长度为14kb，编码分子量427kd的蛋白。如此庞大的基因非常容易发生基因重组和重组。目前发现的基因突变存在多种类型，其中基因缺失占65%，基因重复占5%，点突变、小缺失及插入占30%。且突变的发生在整个基因非均匀分布，存在两个突变热区，即基因的5'端及Exon44-53之间。目前对该病尚无有效的治疗方法。

DMD主要遵循X连锁隐性遗传方式，女性携带者有50%的机会遗传给后代，遗传该突变基因的男性后代则成为患者，女性后代则是携带者。胚胎植入前遗传学诊断(Preimplantation genetic diagnosis, PGD)技术为DMD女性携带者生育健康后代提供了新的选择，与既往常规的产前诊断不同，PGD技术可避免因患病胎儿而需终止妊娠。PGD是建立在体外受精与胚胎移植(In vitro fertilization andembryo transfer, IVF-ET)的基础之上，在6-8细胞阶段的胚胎活检1-2个细胞用于遗传学检测，移植基因经检测证实没有疾病的胚胎。但由于Dystrophin基因庞大、突变种类多、基因内重组和新生突变发生率高，该疾病的胚胎植入前遗传学诊断还面临一定的困难，到目前为止还没有一个统一的方案。采用全基因组扩增(Whole genome amplification, WGA)作为胚胎植入前遗传学诊断的第一步，增加起始模板量，然后再检测多个基因位点，可以大大增加单细胞分析的准确性和可靠性。

目前已有多种WGA方法，如引物延伸预扩增(Primer extensionpreamplification, PEP)和简并寡核苷酸引物PCR(Degenerated oligonucleotideprimed PCR, DOP-PCR)。由于非特异性扩增产物、对整个基因组覆盖不全、DNA产物片段长度短等限制其在PGD中的应用。多重置换扩增(Multiple displacementamplification, MDA)是1998年由耶鲁大学Lizardi博士首次提出，该法不以PCR为基础。这种恒温扩增的方法依赖于链置换扩增原理，利用噬菌体Φ29DNA聚合酶，该酶强大的向前延伸活性和高保真度使得通过MDA可从极少量的DNA样本获取大量高质量的DNA，是到目前为止对整个基因组覆盖最广、各位点扩增偏差最小的WGA方法。本实验研究的目的是探索MDA在胚胎植入前遗传学诊断中的应用，通过使用全基因组扩增的方法，克服胚胎植入前遗传学诊断中单细胞DNA量极少的瓶颈，解决单细胞模板量有限限制全面准确诊断的问题，建立DMD的胚胎植入前遗传学诊断方案，使该方案适用于各种基因突变类型的DMD女性携带者。

第一部分单细胞MDA结合单重荧光PCR方案评估。

目的：本研究针对单细胞MDA产物应用单重荧光PCR检测常见Dystrophin基因的缺失位点，选用多个基因内部的多态性位点进行单体型分析，并同时行性别诊断，评估该方案在DMD胚胎植入前遗传学诊断中的可行性，建立适用于各种基因突变类型的DMD女性携带者的胚胎植入前遗传学诊断方案。

材料：

1. 2005年10月至2006年12月于我院生殖中心就诊拟行PGD治疗的4个家系，均有DMD家族史和明确的基因检测结果，为基因缺失型突变或重复型突变。

2. 本院生殖医学中心取卵后第三天正常受精的废弃胚胎。

方法：

1. 外周血DNA抽提2. 家系分析3. 单个细胞制备4. 单细胞MDA扩增5. MDA产物DNA总量测定6. MDA产物纯化7. 在MDA产物应用单重荧光PCR检测17个基因位点(包括6个常见的缺失外显子，10个DMD基因内部的多态性位点，1个性别位点)。

结果：

1. 家系来源的80个单个淋巴细胞(每例女性携带者各20个)及11个废胚来源的40个单个卵裂球进行MDA扩增，MDA扩增单个淋巴细胞的成功率为97.5% (468/480)，扩增单个卵裂球的成功率为94.1% (640/680)。

2. 将女性携带者来源的单个淋巴细胞MDA产物的PCR结果与其外周血结果比较，平均PCR扩增失败率为2.5% (12/480，变化范围0-5.0%)，平均ADO率为12.0% (56/468，变化范围5.0-20.5%)，两者各位点PCR扩增产物的片段大小一致。单个卵裂球MDA扩增产物进行17个位点的检测，其中6个外显子位点均有扩增信号，各位点平均扩增失败率为5.9% (40/680，变化范围0-15.0%)。同一个胚胎来源的不同卵裂球的扩增结果进行比较，确定杂合位点，计算平均ADO率为27.4% (37/135，变化范围0-37.5%)。

第二部分 DMD女性携带者胚胎植入前遗传学诊断。

目的：本研究部分基于前一部分研究结果，利用已建立的单细胞MDA结合单重荧光PCR的方案，对两例Dystrophin基因重复突变和缺失突变的女性携带者进行了PGD，以期获得Dystrophin基因正常的胚胎，使出生的婴儿真正健康。

材料：

两对夫妇均有DMD家族史，有将DMD遗传给后代的风险，前来我院生殖中心要求采用PGD技术生育健康后代，突变类型分别为外显子3-11重复和外显子47-50缺失。

方法：

1. 控制性超排卵2. 体外受精和胚胎培养3. 胚胎活检4. 单细胞MDA5. 单重荧光PCR检测6. 移植基因检测正常胚胎7. 再次分析未移植胚胎。

结果：

1. 病例1：超排后获取卵子19个，10个正常受精，取卵后第3天活检并分析6个胚胎。单细胞MDA产物进行位点STRMP、STR44、STR49及性别位点AMEL，的检测。结果显示2次ADO，分别在4号胚胎来源的卵裂球扩增位点STR49和6号胚胎来源的卵裂球扩增性别位点时发生。检测到两次扩增失败，位点STRMP和STR49各1次，且均发生在同一个卵裂球，该卵裂球取自6号胚胎。两个男胚遗传其母亲正常的Dystrophin单体，诊断为正常胚胎；两个男胚及两个女胚遗传其母亲基因重复的Dystrophin单体，分别诊断为患病胚胎及携带者胚胎。取卵后第4天向宫腔移植一个Dystrophin基因检测正常的胚胎，未孕。

2. 病例2: 超排后获取卵子14个, 其中7个MII卵子行单精子胞浆内显微注射, 7个正常受精, 取卵后第3天共活检并分析6个胚胎。位点STR2、STR4-9、STR79GT2、STR3+33、EXON48及性别位点. AMEL用于遗传分析。位点STR2和STR3+33分别发生1次ADO, STR49和性别位点分别发生2次ADO, 6次ADO中3次来源于取自3号胚胎的同一个卵裂球。直接检测突变区域内EXON48的结果与单体分析结果一致。两个男胚和两个女胚遗传其母亲正常的Dystrophin单体, 诊断为正常胚胎; 两个男胚携带有母亲基因缺失的Dystrophin单体, 诊断为患病的胚胎。取卵后第4天向宫腔移植3个基因检测正常的胚胎, 获得一例宫内单胎妊娠。于孕19' +>周取羊水细胞行产前诊断, 证实为。DMD非携带者女胎。现孕21' +>周, 胎儿发育良好。

两例临床病例的所有阴性对照PCR产物均未检测到阳性扩增信号。未移植胚胎均采用同种方法重新检测, 结果与单个卵裂球诊断结果一致。

结论:

1. 本研究在国内首次应用MDA于PGD技术中, 获得一例临床单胎妊娠, 该例妊娠亦是在单细胞水平通过全基因组扩增后对DMD携带者进行胚胎植入前遗传学诊断的首例成功妊娠报道。

2. 单细胞MDA结合基因突变检测、单体型分析及性别诊断的方法, 可以有效地应用于DMD的临床PGD, 适用于大多数DMD女携带者, 可以在鉴别正常男胚的同时分辨携带者和非携带者女胚, 降低因基因重组引起的误诊风险及有效监测外源性DNA污染。

10. 期刊论文 李鑫. 胡兰. 冯雪飞. 刘晓. LI Xin. HU Lan. Feng Xue-Fei. LIU Xiao 混合斑中精子细胞分离及其DNA制备方法 -法医学杂志2007, 23 (4)

目的 尝试建立一种检测混合斑中精子细胞的方法. 方法 使用显微操作法捕获精子细胞, 全基因组扩增(多重置换扩增)精子细胞DNA. 结果 对10管精斑检材的全基因组扩增, 获得了高产、保真的产物. 使用50 μ L体系对20个精子细胞直接进行全基因组扩增, 省去了对起始模板的纯化过程, DNA扩增倍数达30000倍以上, 片段长度大多在15 kb以上, 其STRs复合扩增分型结果有可参照性. 结论 显微操作法可以有效捕获精子细胞, 排除干扰, 多重置换扩增可以提供足够量的产物用于法医DNA分析, 该方法具有可行性.

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_gwyyx-ycxfc200704007.aspx

下载时间: 2010年6月4日