

·技术研究·

SNP基因芯片结合多重置换扩增技术检测单细胞非整倍体的研究

凌家伟, 方 丛, 徐艳文, 庄广伦

(中山大学附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】建立并优化利用微阵列-比较基因组杂交技术检测单细胞非整倍体的实验方案。【方法】纤维母细胞系 GM02732(47, XY, +18)和 GM00343[46, XY, 4(del) (qter > p14)]被用于实验。阳性对照组为上述细胞系的基因组 DNA(gDNA)(A 组与 B 组, $n = 6$);实验组为单细胞模板的多重置换扩增(MDA)产物(C 组与 D 组, $n = 10$);阴性对照组为空白对照的 MDA 产物(E 组, $n = 6$)。以上样本与 10 k 2.0 基因分型芯片杂交并进行染色体拷贝数分析,比较利用非扩增的正常 gDNA 和同法扩增的 DNA(MDA-DNA)作为分析参照对 C 组和 D 组的结果准确度的影响。【结果】A→E 组的芯片杂交信号判读率分别为 98.7%、97.2%、86.7%、85.9%与 3.2%。利用单细胞 MDA-DNA 作为参照时, C 组与 D 组杂交信号的变异程度明显小于使用 gDNA 作为参照时($P < 0.05$)。利用 CNAT 分析软件,发现以 gDNA 作为参照时, C 组与 D 组部分染色体优势扩增明显,而使用 MDA-DNA 作为参照时则未观察到类似现象。【结论】结合 MDA 和基因芯片平台对单细胞进行非整倍体检测时应使用同法扩增的 DNA 作为分析参照。

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

中图分类号: R711.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)04-0468-05

Detection of Aneuploidy from Single Cells by Array-Comparative Genetic Hybridization

LING Jia-wei, FANG Cong, XU Yan-wen, ZHUANG Guang-lun

(Department of Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To set up an optimized protocol for aneuploidy detection from single cells through Array-Comparative Genetic Hybridization (CGH). 【Method】 Two cell lines, trisomy 18 (Tri-18; GM02732, 47,XY,+18) and chromosome 4 segment deletion [sDel-4; GM00343, 46,XY,4(del) (qter > p14)], were used in the study. In combination of 10 k 2.0 SNP mapping array platform and multiple displacement amplification (MDA), the diagnostic accurate rates of MDA product from single cells of the two cell lines using gDNA and single-cell MDA product as reference were compared. 【Result】 An extremely lower call rate (3.2 ± 1.2)% in the negative control group was observed compared to the experiment groups. When the single-cell MDA product was used as reference, the standard deviations of Log_2 (signal intensity ratio) were significantly decreased in both groups, compared with when the gDNA as reference ($P = 0.004$). Through CNAT analytic software, some specific chromosomes (16, 17, 19, and 22) presented obvious preferential amplification (PA) when the gDNA was used as reference, but this PA could be eliminated when single-cell MDA product was used as reference. 【Conclusion】 10 k 2.0 SNP mapping array in combination with MDA could be a quick, highly efficient and accurate method to detect aneuploidy in single cells.

Key words: SNP mapping array; multiple displacement amplification; aneuploidy screening; preimplantation genetic diagnosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4):468-472;476]

荧光原位杂交技术(fluorescent in situ hybridization, FISH)是目前对染色体数目和结构异常进

行种植前胚胎遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)的主要手段,但是 FISH 仍然存在

收稿日期: 2009-03-18

基金项目: 国家自然科学基金(30200301), 广东省自然科学基金(06021276), 广东省医学科学技术研究基金(B2006Q27)

作者简介: 凌家伟, 博士, 讲师, 研究方向为胚胎种植前遗传学诊断, E-mail: lingjiawei@yahoo.com

一些固有的技术缺陷,如同时检测的染色体数目有限^[1];准确率随着检测染色体数目的增多而逐渐下降^[2];对技术和经验的依赖较大^[3]。而结合了微阵列芯片(microarray)和比较基因组杂交技术(comparative genetic hybridization, CGH)的微阵列-比较基因组杂交技术(Array-CGH)可以克服上述缺陷,快速、准确和高分辨地检测全部46条染色体上的多种异常^[4-5]。由于进行芯片杂交的起始DNA模板量为250 ng ~ 2 μg,全基因组扩增对于单细胞 Array-CGH 是必不可少的。多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)被公认为目前保真度最高的单细胞扩增技术^[6-7],虽然已有结合MDA与微阵列芯片对单细胞水平非整倍体进行检测的报道^[8-9],但数量有限,而且对选择非扩增正常基因组DNA(genomic DNA, gDNA)还是同法扩增的DNA(MDA-DNA)作为分析参照仍有争议^[8,10]。同时,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^[8,11-12],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^[13],但是如果利用这些产物进行Array-CGH分析,则需要进一步明确非特异性产物是否产生基因组杂交信号及其程度,以避免得出错误的结论,但目前国际上未见相关报道。本研究结合10 k 2.0单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)基因分型芯片平台与MDA技术,对单细胞MDA反应中非特异性产物的信号判读率进行检测和评估,并比较了使用不同参照对分析结果的影响,为利用Array-CGH技术诊断单细胞水平非整倍体提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料及分组

本研究同时选用纤维母细胞系GM02732(47, XY, +18)和GM00343[46, XY, 4(del)(qter > p14)(Coriell, USA)作为模板,共分5组:A、B两组为阳性对照组,分别使用提纯自GM02732和GM00343细胞系的足量DNA(gDNA)进行芯片杂交(各组 $n = 6$);C组以单个GM02732细胞为模板进行MDA扩增,产物与芯片杂交($n = 10$);D组使用单个GM00343细胞作为模板的MDA扩增产物($n = 10$);E组为阴性对照组,使用空白对照的MDA扩增产物进行芯片杂交($n = 6$)。

1.2 实验方法

1.2.1 单细胞的全基因组扩增及细胞gDNA的提取 在倒置显微镜下利用毛细吸管吸取单个细胞(GM02732或GM00343),在PBS中冲洗3次后移入含有5 μL裂解液(200 mmol/L KOH, 50 mmol/L dithiothreitol)的200 μLEP管中(E组不加入细胞),65℃加热10 min,然后加入中和液5 μL(Triscine, Sigma, USA)。细胞裂解产物(10 μL)中加入Repli-Midi试剂盒(Qiagen, Germany)的反应体系混合物共40 μL,30℃孵育8 h,然后65℃灭活酶10 min,置于-20℃保存(MDA-DNA)。另外,使用DNA抽提试剂盒(Qiagen, USA)提取两个细胞系的gDNA,具体步骤参照说明书执行。

1.2.2 SNP基因分型芯片的杂交 以ND-1000分光光度计(Nanodrop, Denmark)测量上述MDA-DNA和gDNA溶液的浓度,各取250 ng分别与10K2.0基因分型芯片(SNP Mapping Array, Affymetrix, USA)进行杂交分析,具体实验步骤参照说明书执行。

1.3 数据分析

本研究使用两组参照并比较其诊断结果,一组参照为正常基因组DNA(非扩增)数据组(gDNA),由Affymetrix公司提供,25个数据均来源于男性白人基因组DNA。另一组参照为单细胞MDA产物(在本研究,C组和D组的单细胞MDA产物互为参照),最后的结果结合使用GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE)和CNAT4.0进行样本的DNA拷贝数(Copy Number)分析。数据的差异性分析使用SPSS12.0软件作非参数分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MDA反应中非特异性产物对芯片判读率的影响

阳性对照(A和B组)与阴性对照组(E组)的判读率分别为 $(98.7 \pm 0.1)\%$ 、 $(97.2 \pm 0.2)\%$ 和 $(3.2 \pm 1.2)\%$,而单细胞MDA产物(C组和D组)的判读率则介乎两者之间,分别为 $(86.7 \pm 6.1)\%$ 和 $(85.9 \pm 7.7)\%$ (图1)。

2.2 不同细胞系gDNA与芯片杂交后染色体拷贝数的分析结果

使用Affymetrix公司提供的正常gDNA数据

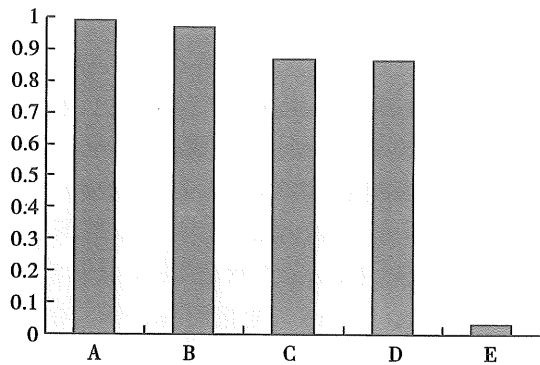


图 1 不同实验组芯片杂交的信号判读率

Fig.1 The SNP call rate of different groups

A: non-amplified gDNA from GM02732; B: non-amplified gDNA from GM00343; C: MDA product from single cell of GM02732; D: MDA product from single cell of GM00343; E: MDA product from negative control

组作为参照, A 组和 B 组样本与芯片杂交后所得数据可清楚观察到 18 号染色体呈明显三倍体改变与部分 4 号染色体呈单体改变(图 2), 提示该正常 gDNA 数据组可作为有效参照物, 无需另外使用正常 gDNA 与芯片杂交作为分析参照。



图 2 GM02732 细胞系(A)与 GM00343 细胞系(B)gDNA 的光强比对数值图

Fig.2 The Log_2 (intensity ratio) of non-amplified gDNA of GM02732 (A) and GM00343 (B) cell lines (normal gDNA data set as reference)

When the normal DNA data set from Affymetrix was used as reference, both the trisomy 18 (hollow arrow) and segmental chromosome 4 deletion (black arrow) could be distinguished clearly through the Log_2 (intensity ratio) profiles (Affymetrix CNAT4.0).

2.3 不同的参照对光强比对数值的影响

比较各组使用 gDNA 数据组或单细胞 MDA 产物作为参照时所得光强比对数值的标准差, 发现前者均大于后者, 在两组中的差异均有统计学

意义(非参数分析, P 值均为 0.004, 图 3), 提示利用单细胞 MDA 产物作为参照进行染色体拷贝数检测时, 信号的变异程度小于使用以 gDNA 作为参照时的分析结果, 差异有统计学意义。通过 CNAT 软件分析, 发现使用 gDNA 作为参照时, 信号变异大, 无法从背景中得出染色体拷贝数的正确判断; 但以单细胞 MDA 产物作为参照时, 信号变异明显减少, 可非常容易地从背景中观察到 18 三体与 4 号部分单体的改变(图 4)。

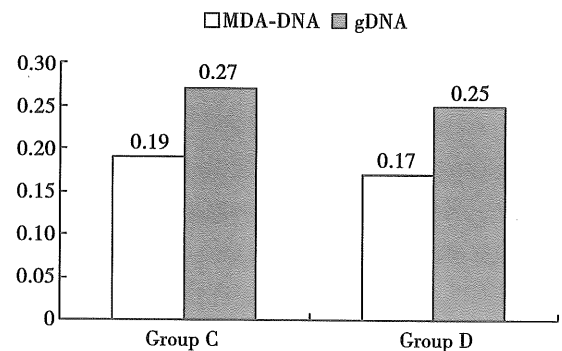


图 3 使用不同参照的杂交信号光强比对数值的标准差

Fig.3 The standard deviations of Log_2 (intensity ratio) with different references

Both in group C and D, the variations of Log_2 (intensity ratio) were smaller when MDA-DNA was used as reference than gDNA data as reference ($P = 0.004$, respectively).

2.4 不同参照所得的染色体拷贝数分析结果

芯片扫描所得信号与参照的光强比是一个非平稳的随机过程, 而这些光强比所代表的染色体倍体数是一个相对稳定的数值, 即每个 SNP 的光强比虽然各不相同, 但是代表的 DNA 拷贝数却是一个连续的整数列(0、1、2、3、4 等)。CNAT(Copy Number Analysis Tool) 软件整合了隐马尔科夫统计模型(hidden markov model, HMM), 将拷贝数检测结果分为 5 种: 0, 代表 SNP 位点片段的纯合性缺失; 1, 代表 SNP 位点片段的杂合性缺失; 2, 代表 SNP 位点片段为正常二倍体; 3, 代表 SNP 位点片段为三倍体; ≥ 4 , 代表 SNP 位点片段出现多倍体(> 3)。CNAT 输出发现, 无论使用正常 gDNA 数据或者单细胞 MDA 产物作为参照, 均可在 10M 平滑化的水平检测出 18 号染色体三倍体和部分 4 号染色体单体改变, 但前者同时伴随有多条染色体的优势扩增, 以 16、17、19 和 22 号染色体为明显, 与此相对应, 使用单细胞 MDA 产物作为对照时, 未观察到类似的优势扩增(图 5)。

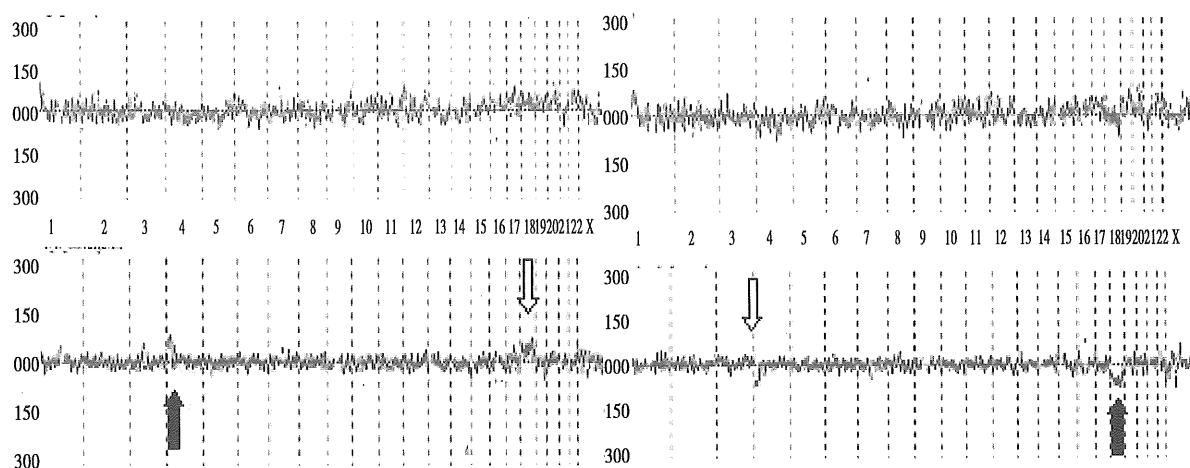


图4 使用不同参照时单细胞MDA产物的光强比数值图

Fig.4 The Log_2 (intensity ratio) profiles of MDA products from single cells when different references were used

When normal DNA data was used as reference (the upper two figures), trisomy 18 or chromosome 4 segment deletion could not be diagnosed because of the great variation of the background. While a clear diagnosis could be made when MDA-DNA was used as reference (the lower two figures, the hollow arrows). In this research the single-cell MDA products of trisomy 18 and chromosome 4 segment deletion acted as reference to each other, so the copy number profile showed a fake segmental trisomy 4 in group C and a fake monosomy 18 in group D (black arrows).

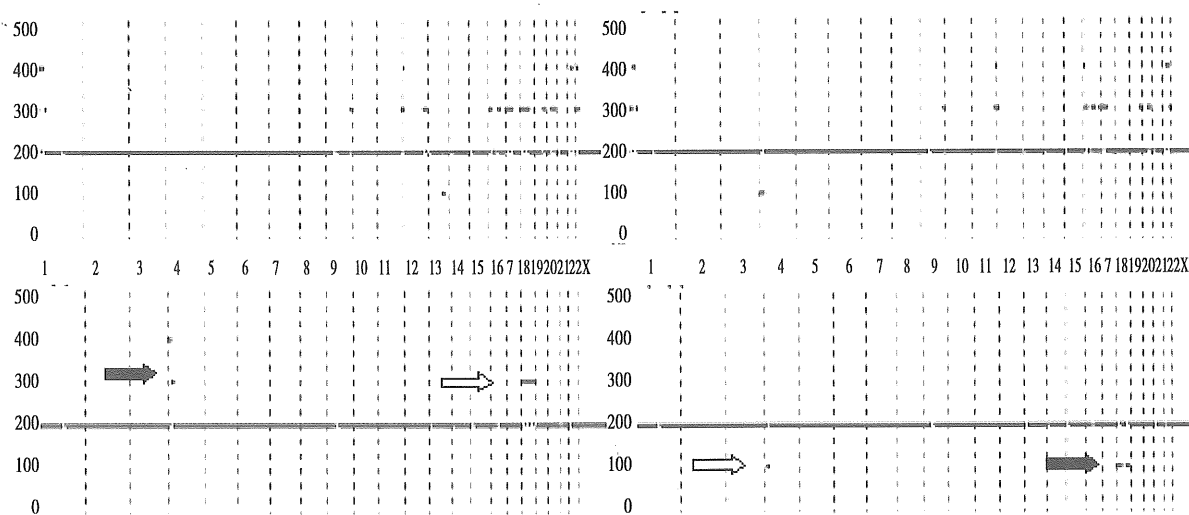


图5 使用不同参照时单细胞MDA产物的染色体拷贝数分析图

Fig.5 The copy number profiles of MDA products from single cells when different references were used (10M Gaussian Smoothing treatment)

When the gDNA data was used as reference (the upper two figures), some chromosomes (16, 17, 19, 20 and 22) presented obvious preferential amplification and made it difficult to draw a conclusion, but most preferential amplification disappeared when data from single-cell MDA product was used as reference (the lower two figures), which led to a clear diagnosis of trisomy 18 in group C and chromosome 4 segment deletion in group D (hollow arrows). In this research the single-cell MDA products of trisomy 18 and chromosome 4 segment deletion will act as reference to each other, so the copy number profile showed a fake trisomy 4 segment in group C and a fake monosomy 18 in group D (black arrows).

3 讨论

3.1 10 k 2.0 基因分型芯片可快速、准确地对非

扩增 gDNA 进行拷贝数分析

理论上芯片平台上的探针位点密度与芯片的分辨率呈正相关。但是芯片上过多的位点数会导致数据海量分析困难,对于小于 50 kb 的缺失性

或获得性改变,即使使用 500 k 的高密度寡核苷酸芯片,其检出率亦仅有 0.38 ~ 0.68^[14],而且,某些被检出的小片段异常,可能属于未知的基因组拷贝数变异(copy number variation, CNV)。目前,许多 CNV 与疾病的相关性仍无定论,上述发现反而会增加 PGD 诊断的困难。由于这些原因,本研究选用低密度芯片平台(10 k)进行单细胞染色体拷贝数分析。

Array-CGH 技术最后需要通过比较待测 DNA 与参照 DNA 的光强比,以获得待测 DNA 拷贝数的结果。作为单通道单色芯片, Affymetrix 的 SNP 芯片需要将待测与参照 DNA 标记后分别与两张芯片杂交,然后将得到的光强进行比较分析。在既往的研究中,尤其是在一些恶性肿瘤的回顾性研究中,不易获得来源于同一病人的正常 DNA 作为配对, Affymetrix 公司提供了一套正常 DNA 数据作为参照用途,其中包括不同种族超过 100 个个体的 DNA 数据。同样,本研究使用 Affymetrix 公司提供的这套正常 DNA 数据作为参照,亦可对非扩增的 18 三倍体和部分 4 号单倍体的 gDNA 作出正确判断。

3.2 MDA 产生的非特异产物对 array-CGH 分析结果的影响

与以往的研究类似^[12],本研究发现在没有细胞模板的阴性对照中亦有较多的非特异性产物生成,行琼脂糖凝胶电泳非特异性产物与单细胞模板的 MDA 产物具有类似的片段组成,因此不能单凭产物的计量确定扩增是否成功。芯片杂交结果提示,阴性对照组中非特异性产物与人类基因组大约 3% 的序列存在重合。既往研究表明,对于不同的遗传标记,单细胞 MDA 产物中特异性 DNA 的比例约为 25% ~ 56%^[12],提示随着 DNA 模板的加入,非特异性产物的实际比例将明显小于空白对照时,其中与人类基因组重合序列的可能性亦将小于 3%,这明显低于 gDNA 和单细胞 MDA 产物与芯片杂交后的判读率,提示单细胞 MDA 产生的非特异性产物对 Array-CGH 的最终分析结果的影响相当有限。

3.3 选择不同参照对利用 array-CGH 技术检测单细胞非整倍体的影响

虽然已有结合不同的全基因组扩增方法与微阵列芯片对单细胞水平非整倍体进行检测的报道^[8-9],但数量有限。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全基因组扩增技术,但结合该技术与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 gDNA 还

是同法扩增的 DNA 作为参照仍存争议。Paez 等^[10]将不同肿瘤细胞 DNA 的 MDA 产物进行分析,发现使用同样方法扩增的正常 DNA 作参照时,非扩增的肿瘤 DNA 与其 MDA 产物的拷贝数符合率可达 87%。与此相反,Le 等^[8]认为非扩增的 gDNA 更适合作单细胞芯片检测时的参照。本研究对比了使用两种不同参照(gDNA 和 MDA-DNA)所得的染色体拷贝数,发现使用单细胞 MDA-DNA 作参照时拷贝数分析符合率明显高于使用 gDNA 时,后者作为参照时部分染色体(16、17、19 和 22 号染色体)出现明显的优势扩增。该现象说明 MDA 所引入的扩增偏倚多数具有位点特异性。因此,对单细胞 MDA 产物进行拷贝数分析时,应该使用同样方法扩增的正常 DNA 作为参照以平衡这种系统性偏倚。

针对 Le Caignec 的相反的研究结果,我们怀疑是多种实验条件不同所致。Le Caignec 使用的是细菌人工染色体芯片,由于探针片段较长(150 ~ 300 kb),其杂交信号的变异远小于使用寡核苷酸探针的 SNP 芯片(25 bp)。同时,该研究未采用 MDA 试剂盒推荐的反应时间 8 h,而是大大缩短至仅 2 h^[8],因此,MDA 产物所发生扩增偏倚的程度是否与时间呈相关性值得进一步探讨。

上述初步研究提示 10 k 2.0 SNP 基因分型芯片平台结合 MDA 有望成为检测单细胞水平的染色体非整倍体的又一选择,但是 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,使用同样以该方法扩增的 DNA 而不是非扩增的 gDNA 作为实验参照有助于保证检验结果的准确性。

参考文献:

- [1] Munne SJ, Fischer A, Warner F, et al. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(2):326-332.
- [2] Gosden R. Genetic test may lead to waste of healthy embryos [J]. *Nature*, 2007, 446(7134):372-382.
- [3] Mastenbroek SM, Twisk J, van Echten-Arends, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(1):9-17.
- [4] Simovich MJ, Yatsenko SA, Kang SH, et al. Prenatal diagnosis of a 9q34.3 microdeletion by array-CGH in a fetus with an apparently balanced translocation [J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(12):1112-1117.