

# 基于性染色体定量检测的伴性遗传病无创性产前筛查方法的研究\*

揣征然, 黄庆, 黄君富, 陈栋, 苗杰, 杨昭, 赵娜, 王云云, 史大川, 王欢, 府伟灵<sup>△</sup> (第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

**【摘要】目的** 利用孕妇血浆游离 DNA 对产前胎儿性别进行识别, 为伴性遗传性疾病的无创性产前筛查提供参考。**方法** 利用 X、Y 染色体的特异性引物和探针构建识别胎儿性别的实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测技术, 并对灵敏度、准确性等方法学指标进行评价, 然后将构建好的方法用于 24 例未孕健康女性及临床上 50 例 16~20 孕周的孕妇血浆 DNA 的检测。**结果** 在母体 DNA 胎儿 Y 染色体定性检测方法的灵敏度检测中, 当胎儿 DNA 丰度为 3%~6% 时, 母体 DNA 模板量下限是 50 pg。当母体 DNA 模板量在 0.5~50 ng 时, Y 染色体最低检测丰度为 1%, 相当于胎儿 DNA 丰度为 2%; 当母体 DNA 模板量在 0.05~0.5 ng 时, Y 染色体最低检测丰度为 2%~4%, 相当于胎儿 DNA 丰度为 4%~8%; 当无母体 DNA 时, Y 染色体模板量下限为 0.5 pg。标本定量检测中妊娠女性的血浆 DNA 浓度明显高于未孕健康女性 ( $P < 0.05$ )。50 例孕妇静脉血标本中, 除 1 例标本因提取失败未作检测外, 其余 49 例标本初次试验在未考虑母体血浆 DNA 模板起始用量时, 检测结果为 17 例男性, 32 例女性, 与胎儿出生后性别不完全一致; 但是当加大母体血浆 DNA 模板起始用量 ( $> 50$  pg) 后, 结果为 23 例男性, 26 例女性, 准确率为 100%。**结论** 该试验所构建的利用母体血浆游离 DNA 进行的早期无创性产前筛查方法具有较高的准确性, 可以为伴性遗传出生缺陷性疾病的早期筛查和预防提供重要的参考价值。

**【关键词】** 母体血浆游离 DNA; 无创性产前诊断; 性染色体定量检测; 妊娠

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.10.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)10-1297-04

## Quantitative detection of sex chromosomal for non-invasive prenatal screening of sex-linked inheritable disease\*

CHUAI Zheng-ran, HUANG Qing, HUANG Jun-fu, CHEN Dong, MIAO Jie, YANG Zhao, ZHAO Na, WANG Yun-yun, SHI Da-chuan, WANG Huan, FU Wei-ling<sup>△</sup> (Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**【Abstract】Objective** To identify the fetal sex for the non-invasive prenatal screening of sex-linked inheritable diseases using free DNA in maternal plasma. **Methods** A method to identify fetal sex, using the X and Y chromosome specific primers and TaqMan probes, was developed and evaluated for the sensitivity. Then, 24 cases of healthy women and 50 cases of pregnant women with gestational age for 16—20 weeks were detected and analyzed. **Results** The results of sensitivity analysis for fetal Y chromosome detection in maternal DNA indicated that when the fetal DNA abundance was 3%—6%, the required amount of plasma DNA from pregnant women was at least 50 pg. When the template amount of plasma DNA from pregnant women was 0.5—50 ng, the limit of detection for fetal Y-chromosome was 1%, indicating that the fetal DNA abundance should be 2% for detecting. When the template amount of plasma DNA from pregnant women was 0.05—0.5 ng, the limit of detection for fetal Y-chromosome was 2%—4%, indicating that the fetal DNA abundance should be 4%—8%. When there were no maternal DNA as template, the limit of detection for Y-chromosome could reach as low as 5 pg. The plasma DNA levels of pregnant women were significantly higher than that of healthy females in the quantitative detection ( $P < 0.05$ ). One in the 50 cases of pregnant women samples could not be detected for the failure of DNA extraction. The result of the first detection showed 17 males and 32 females in the remaining 49 cases, which was not highly consistent with clinical results. Then, the detection was performed again by increasing the quantity of initial DNA ( $> 50$  pg). The results showed an accuracy of 100% compared with the clinical results, including 23 males and 26 females. **Conclusion** The accuracy of this method for early non-invasive prenatal screening using free DNA in maternal plasma could be high enough for early diagnosis and prevention of sex-linked genetic diseases.

**【Key words】** free DNA in maternal plasma; non-invasive prenatal diagnosis; quantitative detection of sex chromosomal; pregnancy

遗传性疾病, 是指因受精卵中的遗传物质异常或生殖细胞所携带的遗传信息异常所引起的子代的性状异常<sup>[1]</sup>。其中, 伴

性遗传病在整个遗传病中占有较大比例, 如血友病、色盲和肾性糖尿病<sup>[2]</sup>。因此, 胎儿性别的早期识别对于伴性遗传病的预

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81071429, 81071430)。

作者简介: 揣征然, 女, 硕士, 初级技师, 主要从事临床分子诊断工作。△ 通讯作者, E-mail: weilingfu@yahoo.com。

防及出生人口整体素质的提高具有重要意义。然而,目前现存的一些胎儿性别识别技术存在诸多不足之处,如有创性操作可能致胎儿流产等<sup>[3]</sup>。鉴于此,本文拟构建一种基于 X、Y 染色体用于胎儿性别早期识别的技术,并对 50 例孕妇妊娠期胎儿的无创性产前性别进行筛查,以期伴性遗传性疾病的早期诊断提供参考。

**1 材料与方 法**

**1.1 标本来源** 选择 2012~2013 年第三军医大学西南医院产科住院的孕妇静脉血。孕妇年龄 20~35 岁,平均 27 岁;孕周 16~20 周,平均 18 周。胎儿性别以出生性别为标准。同时随机选取本院体检中心进行体检的 24 例未孕健康女性静脉血标本作为对照。研究内容均得到了研究对象知情同意。

**1.2 血浆 DNA 的提取** 取孕妇外周肘静脉血 2 mL 为 1 个标本,4 ℃,1 600×g,离心 10 min。收集上层血浆(约 900 mL 至 1 L)转移至 1 支新的 1.5 mL 无菌 Ep 管中。再将所得血浆于 4 ℃,18 000×g 离心 10 min,吸取上层血浆(约 800 L)转移至新的无菌 Ep 管中。之后,采用 Qiagene 公司的 QIAamp DNA Blood 试剂盒提取基因组 DNA,50 μL 洗脱液溶解,置于 -20 ℃ 低温冰箱保存备用。

**1.3 Real-time 荧光定量聚合酶链反应(PCR)反应条件的优化** 引物和探针序列参照文献<sup>[4]</sup>,分别由上海生工和上海基康合成,其中 FAM 荧光探针主要针对 X 染色体, VIC 荧光主要针对 Y 染色体。利用 X、Y 染色体特异性引物和探针构建 20 μL 的实时荧光定量 PCR 反应体系,体系包括尿嘧啶 DNA 糖苷酶(UDG)10 μL, X、Y 染色体引物各 1 μL, 探针各 1 μL, 基因组模板 2 μL, 将其置于 BIO-RAD CFX96™ Real-Time System 设备进行分析。利用上述反应体系,分别对引物浓度、探针浓度和 PCR 的退火温度等反应条件进行优化。引物浓度分别设置为 0.2、0.4、0.6 mol/L; 探针浓度分别设置为 0.1、0.2、0.3 mol/L, 排列组合后共 12 组试验,退火温度均设置为 60 ℃。然后利用 1 例女性及 1 例男性标本最佳的反应条件进

行验证,并将其用于后续的临床孕妇标本的检测中,每个标本设置一个重复管,整体试验设置两个空白管。

**1.4 判断方法** 重复管中有 2 管均为阳性者为男性,2 管均为阴性者为女性。如 2 管中仅有 1 管为阳性结果,则对此标本进行重复检测,重复结果如仍为阴性结果,则为女性,若有阳性结果,则为男性。此外,如空白对照中出现阳性条带,表明 PCR 受污染,则该次试验结果应从整个试验中剔除。反之,则试验结果可信。

**1.5 PCR 方法的灵敏度检测** 将 20 μL 反应体系中母体 DNA 模板量分别设置为 50、10、5、0.5、0.05 ng,最终使 Y 染色体 DNA 丰度分别为 0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、50%,通过 Y 染色体及胎儿 DNA 丰度的分析对本检测方法的灵敏度进行检测。同时,将男性基因组 DNA 进行倍比稀释,依次为 50、5、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.000 5 ng/μL,对无母体 DNA 时 Y 染色体的灵敏度进行检测。

**1.6 临床标本血浆游离 DNA 的检测** 根据上述建立及优化好的反应体系和条件,对临床 50 例妊娠女性标本进行了胎儿性别的检测。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。将健康未孕与育有男性胎儿女性的血浆 DNA 含量作为数值变量,妊娠与否作为状态变量进行 ROC 曲线的绘制与分析。

**2 结 果**

**2.1 Real-time 荧光定量 PCR 反应条件的确定** 通过对引物、探针浓度及退火温度等条件的优化,综合 X、Y 染色体扩增的 CT 值与 X、Y 染色体 CT 值差值的绝对值这两项指标,最终确定第 11 组为最佳条件,即引物浓度为 0.4 mol/L,探针浓度为 0.1 mol/L,PCR 反应参数:50 ℃ 2 min,95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,50 个循环。见表 1。将此条件确定为 X、Y 染色体检测方法的最佳反应条件,并且用于后续的临床标本检测中。

**表 1 引物和探针浓度优化试验结果**

组别	引物与探针的组合(mol/L)				不同组合结果		
	上游引物	下游引物	X 染色体探针	Y 染色体探针	X 平均 CT 值	Y 平均 CT 值	ΔCT 平均值
Exp1	0.2	0.2	0.1	0.1	28.33	28.36	0.03
Exp2	0.2	0.4	0.2	0.2	28.11	28.12	0.00
Exp3	0.2	0.6	0.3	0.3	28.34	28.35	0.01
Exp4	0.4	0.2	0.2	0.3	28.54	28.65	0.12
Exp5	0.4	0.4	0.3	0.1	28.22	28.23	0.01
Exp6	0.4	0.6	0.1	0.2	28.11	28.11	0.00
Exp7	0.6	0.2	0.3	0.2	28.72	28.55	0.17
Exp8	0.6	0.4	0.1	0.3	28.13	28.17	0.04
Exp9	0.6	0.6	0.2	0.1	28.29	28.24	0.05
Exp10	0.2	0.4	0.1	0.1	27.09	26.94	0.15
Exp11	0.4	0.4	0.1	0.1	27.11	27.03	0.08
Exp12	0.2	0.2	0.2	0.2	27.09	27.24	0.15

注:ΔCT 值为 Y 染色体与 X 染色体 CT 值差值的绝对值。

**2.2 X、Y 染色体检测方法的验证** 两重复管中,女性标本只有 FAM 荧光通道检测到扩增产物,见图 1(A)。男性标本中

FAM 与 VIC 荧光通道均检测到扩增产物,见图 1(B)。空白对照管均未检测到扩增产物。

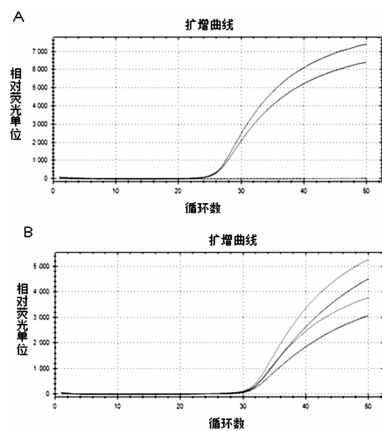


图 1 检测方法准确性的验证结果

2.3 PCR 方法的灵敏度检测

2.3.1 母体 DNA 量和胎儿 DNA 丰度对检测结果的影响  
 给定胎儿 DNA 丰度 3%~6% 时,将母体 DNA 模板量设为 50、10、5、0.5 ng,此时,Y 染色体检测方法的灵敏度检测结果显示:Y 染色体的丰度小于 1% 时,CT 值大于 45 个循环,超出检测范围;而丰度为 1% 时,以上不同母体 DNA 模板量的 CT

值依次为 28.46、28.44、29.64、32.55,表明 Y 染色体 DNA 丰度的最低检测限为 1%,低于此丰度则难以检测到,相当于胎儿 DNA 丰度最低为 2%(表 2)。

2.3.2 给定丰度时 DNA 模板量的检测下限 给定胎儿 DNA 丰度在 3%~6% 时,将母体 DNA 模板量设为 0.05、0.005 ng。此时,当 DNA 量为 0.05 ng 时,3 次重复 Y 染色体检测方法的灵敏度检测结果显示:Y 染色体的丰度小于 2% 时,CT 值均大于 45 个循环,超出检测范围;而丰度为 2% 时,CT 值为 36.46;丰度为 3% 时,CT 值为 34.27;丰度为 4% 时,CT 值为 34.18。由于检测下限存在概率问题,3 次试验并不是每次都能检测出结果,故表明 Y 染色体 DNA 丰度的最低检测限为 2%~4%,低于此丰度则难以检测到,相当于胎儿 DNA 丰度最低为 4%~8%。根据文献报道胎儿 DNA 丰度在 3%~6%,因此,可以确定母体 DNA 模板量的下限为 0.05 ng。当 DNA 量为 0.005 ng 时,Y 染色体检测方法的灵敏度检测结果显示:Y 染色体的丰度小于 4% 时,CT 值大于 45 个循环,超出检测范围。故此试验可作为阴性对照,进一步说明该检测方法所需要的最低母体 DNA 模板量为 0.05 ng(表 3)。

表 2 Y 染色体 DNA 丰度的检测结果

50 ng 中 Y 染色体所占含量(ng)	总 DNA 中 Y 染色体所占比例(%)	CT 值	10 ng 中 Y 染色体所占含量(ng)	总 DNA 中 Y 染色体所占比例(%)	CT 值
0.005	0.01	>45	0.001	0.01	>45
0.050	0.10	>45	0.010	0.10	>45
0.500	1.00	28.46	0.100	1.00	28.44
1.000	2.00	26.30	0.200	2.00	28.39
2.500	5.00	25.73	0.500	5.00	27.85
5.000	10.00	25.22	1.000	10.00	27.16
25.000	50.00	24.65	5.000	50.00	26.68

续表 2 Y 染色体 DNA 丰度的检测结果

5 ng 中 Y 染色体所占含量(ng)	总 DNA 中 Y 染色体所占比例(%)	CT 值	0.5 ng 中 Y 染色体所占含量(ng)	总 DNA 中 Y 染色体所占比例(%)	CT 值
0.000 5	0.01	>45	0.000 05	0.01	>45
0.005 0	0.10	>45	0.000 50	0.10	>45
0.050 0	1.00	29.64	0.005 00	1.00	32.55
0.100 0	2.00	28.86	0.010 00	2.00	31.96
0.250 0	5.00	28.50	0.025 00	5.00	31.16
0.500 0	10.00	28.40	0.050 00	10.00	30.89
2.500 0	50.00	27.75	0.250 00	50.00	30.29

表 3 0.05、0.005 ng Y 染色体 DNA 丰度的检测结果

0.05 ng 中 Y 染色体所占含量(ng)	总 DNA 中 Y 染色体所占比例(%)	CT <sub>1</sub> 值	CT <sub>2</sub> 值	CT <sub>3</sub> 值	0.005 ng 中 Y 染色体所占含量(ng)	总 DNA 中 Y 染色体所占比例(%)	CT <sub>1</sub> 值	CT <sub>2</sub> 值	CT <sub>3</sub> 值
0.000 5	1	>45	>45	>45	0.000 050	1	>45	>45	>45
0.001 0	2	36.46	>45	>45	0.000 100	2	>45	>45	>45
0.001 5	3	34.27	34.37	>45	0.000 150	3	>45	>45	>45
0.002 0	4	>45	34.18	>45	0.000 200	4	>45	>45	>45

表 4 Y 染色体检测方法的灵敏度检测结果

项目	男性基因组 DNA(ng/ $\mu$ L)									
	50.000	5.000	0.500	0.100	0.050	0.010	0.005	0.001	0.0005	0.00025
CT <sub>1</sub> 值	23.44	26.71	29.92	32.54	32.59	36.53	36.69	36.84	36.71	>45
CT <sub>2</sub> 值	23.71	26.71	29.80	32.33	32.86	35.58	36.69	36.88	>45	>45
CT <sub>3</sub> 值	23.25	26.74	29.88	32.07	33.09	34.74	35.51	>45	>45	>45
CT <sub>4</sub> 值	23.53	26.79	29.89	31.84	32.81	35.51	35.54	>45	>45	>45
CT <sub>5</sub> 值	23.62	26.76	29.66	32.49	32.93	35.07	35.41	36.96	38.70	>45
CT <sub>6</sub> 值	23.64	26.72	29.73	32.58	32.81	35.50	35.70	>45	>45	>45
$\Delta$ CT 值	23.53	26.74	29.81	32.31	32.85	35.66	35.93	—	—	>45
SD	0.17	0.03	0.10	0.30	0.16	0.75	0.60	—	—	>45

注：—表示无数据。

**2.3.3 无母体 DNA 时 Y 染色体的检测下限** 男性基因组 DNA 进行倍比稀释后其结果显示：Y 染色体模板量下限是 0.5 pg，而当 Y 染色体 DNA 浓度是 0.25 pg 时，其 CT>45 个循环，作者判断它为阴性，超出检测范围(表 4)。

**2.4 49 例妊娠女性胎儿性别的检测** 除 1 例不合格标本未纳入研究外，在进行定性检测的 49 例妊娠女性中，初次试验结果显示男性胎儿为 17 例，女性胎儿为 32 例。与出生后性别相比，有 6 例不符，均为如下情况：胎儿出生后性别为男性，本试验结果为女性。经分析，发现此 6 例标本的 DNA 模板起始用量均小于 50 pg，未达到胎儿性别检测所需要母体血浆 DNA 的量(50 pg)。为进一步检测此 6 例标本，作者将 DNA 模板的起始加入量增大(>50 pg)进行重复试验，经验证，发现检测结果均为男性，与出生后性别一致，准确性达到 100%。

**2.5 健康未孕女性与妊娠女性血浆游离 DNA 的定量检测** 在固定的阈值下，定量结果显示，健康未孕女性的血浆 DNA 浓度值最高为 1.75 ng/mL，最低为 0.50 ng/mL，平均值为 1.13 ng/mL；妊娠女性的血浆 DNA 浓度值最高为 6.50 ng/mL，最低为 0.25 ng/mL，平均值为 3.38 ng/mL。妊娠女性比健康未孕女性的浓度值高 2.25 ng/mL，差异有统计学意义(P<0.05)。ROC 曲线结果显示 AUC 值为 0.711(图 2)。DNA 浓度的截点值为 1.38 ng/mL，所以当浓度值大于 1.38 ng/mL 时，确定为孕妇，此时灵敏度为 0.551，特异性为 0.833。

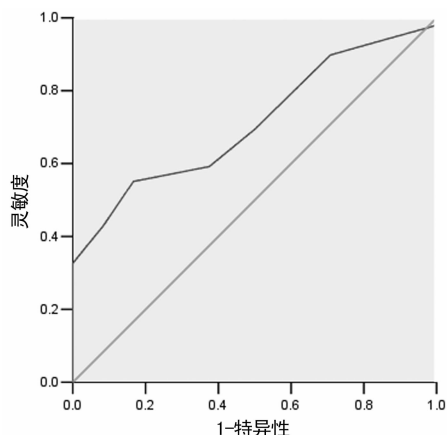


图 2 妊娠女性与健康未孕女性标本的 ROC 曲线示意图

3 讨论

伴性遗传性疾病是由位于性染色体上的致病基因所引起的疾病。此病分为 X 伴性遗传病和 Y 伴性遗传病两大类，发

病率均较高，且疾病的种类较多，如遗传性肾炎、血友病、假性肥大性肌营养不良症等<sup>[5-7]</sup>。伴性遗传性疾病给家庭及社会带来沉重的负担，严重影响社会人口素质的提高。因此，胎儿性别的产前诊断对这类遗传病的预防具有重要意义。

目前，胎儿性别产前诊断的取材技术主要有羊水穿刺、绒毛膜活检和脐静脉穿刺术等，这些技术均对胎儿和孕妇健康具有较大影响。此外，胎儿性别鉴定的方法还有超声影像 B 超技术，这种技术较为安全，但要求胎儿发育程度较高，生殖器基本形成，妊娠达 4 个月以上，如果中晚孕早期终止妊娠会给孕妇身心健康影响较大。近年来，有研究发现，孕妇外周血中存在游离胎儿 DNA<sup>[8]</sup>，并有学者已经将其用于唐氏胎儿的无创性产前诊断<sup>[9]</sup>。因此，作者尝试利用 X、Y 染色体的特异性引物及探针构建一种基于母体血浆游离 DNA 的胎儿早期性别识别无创性产前筛查技术。

本试验结果显示，给定胎儿 DNA 丰度在 3%~6% 时，当母体 DNA 模板量为 0.5~50 ng 且要检测到胎儿 DNA 时，Y 染色体 DNA 丰度最低达到 1%，相当于胎儿 DNA 丰度最低达到 2%，即当母体 DNA>98% 时，将无法检测到胎儿 DNA。此时，检测下限不受胎儿 DNA 绝对值的影响，主要受母体背景 DNA 的干扰，故此灵敏度检测试验主要揭示了母体 DNA 对胎儿 DNA 检测的干扰程度。同时，文献[10]报道胎儿 DNA 占母体总 DNA 的 3%~6%，而本试验检测到胎儿 DNA 丰度下限为 2%，进一步说明该检测方法能够准确检测出母体血浆中的胎儿 DNA。

此外，当母体 DNA 在 0.05~0.5 ng 时，胎儿 DNA 丰度下限是 4%~8%，低于此丰度则难以检测到。而文献报道胎儿 DNA 丰度为 3%~6%，其丰度值不可能无限制升高，因此母体 DNA 低于 0.05 ng 的情况不值得继续探索，0.05 ng 即为母体 DNA 可以检测到胎儿 DNA 的下限值，此时说明检测下限主要受胎儿 DNA 绝对值的影响。此外，当母体 DNA 为 0.05 ng 时，胎儿 DNA 的丰度至少要达到 4%，即为 2 pg，仍高于无母体 DNA 干扰时 Y 染色体的检测下限 0.5 pg(胎儿 DNA 丰度下限为 1 pg)，说明此时胎儿 DNA 丰度不但受胎儿绝对值的影响，同时也受母体 DNA 的干扰。总之，Y 染色体灵敏度检测试验说明只要母体 DNA 模板量大于 50 pg，其检测灵敏度均可达到 1%，相当于胎儿为 2%；而当母体 DNA 模板量为 50 pg 时，则为检测胎儿 DNA 所需母体血浆 DNA 模板量的下限值。

成功构建本检测方法后，作者将其应用于临床标本的检测中。初次试验在未考虑母体血浆 DNA 模板(下转第 1303 页)

信息结合,可帮助医师及早发现术后感染,并采取相应措施降低其危害。

参考文献

[1] 赵伟. 万古霉素和液态庆大霉素复合骨水泥体外药物释放的研究[D]. 太原:山西医科大学,2010.  
 [2] 范卫民,陈曦,李翔. 抗生素骨水泥物理和力学性能及洗提特性的实验研究[J]. 中华骨科杂志,2003,23(6):361-364.  
 [3] Elson RA. Exchange arthroplasty for infection: Perspectives from the United Kingdom[J]. Orthop Clin North Am,1993,24(4):761-767.  
 [4] Guerin S. Evaluation of the detection of procalcitonin by an immunochromatography test: Brahms PCT-Q[J]. Ann Biol Clin,2000,58(5):613-614.

[5] 吕厚山,马迪,丁海明. 三种抗生素骨水泥抗菌作用和机械强度的研究[J]. 中华外科杂志,1998,36(S1):50-52.  
 [6] 夏睿,刘金华,董启榕. 两种骨水泥填充跟骨后关节面下压缩缺损模型的实验比较[J]. 江苏医药,2006,32(2):172-173.  
 [7] 石玉玲,廖扬,曾珠,等. 血清降钙素原在下呼吸道感染疾病中的诊断与应用[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(1):44-46.  
 [8] Ip M, Rainer TH, Lee N, et al. Value of serum procalcitonin, neopterin, and C-reactive protein in differentiating bacterial from viral etiologies in patients presenting with lower respiratory tract infections[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2007,59(2):131-136.

(收稿日期:2013-10-18 修回日期:2014-02-13)

(上接第 1300 页)

起始用量时,有 6 例标本检测结果与胎儿出生后性别不一致,且均为女性。探索其原因,胎儿 DNA 含量占母体 DNA 含量的 3%~6%<sup>[11-12]</sup>,且单拷贝 DNA 所能检测出的量值为 3.63 pg,故检测胎儿性别所需要母体血浆 DNA 的量至少为 60 pg 左右,而本试验也进一步检测出母体血浆 DNA 量的检测下限为 50 pg。因此,上述不一致的结果可能是因为 PCR 的初始 DNA 未达到胎儿性别检测所需要的量所致。为进一步明确结果,作者加大了初始 DNA 的含量(均大于 50 pg),重复进行本试验,结果显示均为男性,与出生后性别完全一致,49 例妊娠女性标本的最终定性检测结果准确率为 100%。本试验结果提示进行 PCR 时所用的 DNA 模板量对于正确检测出胎儿性别非常关键。此外,有 1 例孕妇外周血中未检测到胎儿 X、Y 染色体,主要原因可能是 DNA 提取不当所致,其次也可能与孕妇外周血中胎儿 DNA 浓度波动幅度较大有关<sup>[13]</sup>。

本试验除对 49 例妊娠女性 DNA 进行定量检测之外,同时对 24 例健康未孕女性 DNA 进行了定量检测。两组数据比较发现妊娠女性比未孕健康女性的 DNA 值高 2.25 ng/mL ( $P < 0.05$ ),其高出的含量除部分为妊娠女性与未孕健康女性的生理差异外,其余可能主要为胎儿的 DNA。此外,统计学结果显示 ROC 曲线的 AUC 值为 0.711,表明本方法用于鉴别妊娠与非妊娠女性具有一定的准确性。

综上所述,本试验成功构建了基于性染色体定量检测的无创性产前筛查方法,其灵敏度及准确性均较高,可以用于临床孕妇产前筛查,对出生缺陷疾病的预防具有重要的意义。

参考文献

[1] 刘权章. 遗传性疾病的产前诊断与防治[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2002,18(9):514-517.  
 [2] 裴开颜. 性连锁遗传[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2010,29(4):309-311.  
 [3] 陈彩艳,陈汉平. 用孕妇血中胎儿细胞行无创性产前诊断的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2006,14(6):5-6.  
 [4] Tong YK, Jin S, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal de-

tection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach[J]. Clin Chem,2010,56(1):90-98.  
 [5] 刘玉玲,吕峻峰,潘晓芬,等. 遗传性肾炎一家系临床病理及候选基因突变分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,17(12):22-23.  
 [6] 周敏,徐鸣. 血友病的治疗进展[J]. 华西医学,2012,27(2):206-209.  
 [7] 郭雅洁,王咏红,佟月娟,等. 疑似假性肥大性肌营养不良患儿 Dystrophin 基因缺失突变分析[J]. 标记免疫分析与临床,2013,20(3):172-175.  
 [8] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet,1997,350(976):485-487.  
 [9] Chim SS, Jin S, Lee TY, et al. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21[J]. Clin Chem,2008,54(3):500-511.  
 [10] Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet,1998,62(4):768-775.  
 [11] Bustamante-Aragones A, Gonzalez-Gonzalez C, de Alba MR, et al. Noninvasive prenatal diagnosis using cfDNA in maternal blood: state of the art[J]. Expert Rev Mol Diagn,2010,10(2):197-205.  
 [12] Papageorgiou EA, Karagrignoriou A, Tsaliki E, et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21[J]. Nat Med,2011,17(4):510-513.  
 [13] Hahn S, Zhong XY, Bürk MR, et al. Both maternal and fetal cell-free DNA in plasma fluctuate[J]. Ann N Y Acad Sci,2001,945(1):141-144.

(收稿日期:2013-11-18 修回日期:2014-01-23)