



運用染色體晶片技術檢測染色體異常

基因晶片技術商業化已超過 15 年，除了應用於基礎醫學研究外，近年來已發展出最具臨床運用潛力的染色體晶片，又稱之為 aCGH 晶片。此晶片技術可便利地在一次性實驗中高解析地觀察全染色體的數目與拷貝數異常，成為胚胎著床前、產前和產後臨床研究的新利器。華聯生技與國內遺傳學家攜手開發，推出 *CytoOneArray*[®]，輔助臨床研究與檢測的發展。

傳統染色體核型分析法的極限

許多先天性的遺傳疾病常常都和染色體的異常有關，這些異常包括染色體數目上的異常，例如唐氏症、透納氏症 (Turner syndrome)；或是染色體結構上的異常，例如貓哭症 (Cri du Chat syndrome) 等。傳統上利用在 1970 年代發展的人類染色體核型分析法 (Karyotyping, Box 1) 進行染色體分析。此種方法解析度約在 5-10Mb 左右，且在染色體近端粒區 (subtelomere region) 無法正確分析。然而，臨床上已發現有一些變化小於 3 Mb 大

小的染色體缺失，如微缺失症候群 (Microdeletion syndrome)；與染色體端粒的異常的疾病如 Wolf-Hirschhorn 症候群、貓哭症和 Miller-Dieker 症候群等，尤其近染色體端粒區域因含有高密度的 CpG DNA 片段 (CpG island) 和基因，最近的研究發現，人類染色體末端的變異可能導致許多原因不明的疾病，如中重度智障或先天性異常。這些可能致病的染色體異常皆無法利用傳統的色帶分析法檢測。

1992 年 Kallioniemi¹ 等人提出 Comparative Genomic Hybridization (CGH) 技術，利用兩組基因體 (控制組與測試組) 以不同的螢光進行標定後，一起放在表面固定著中期 (metaphase) 染色體的載玻片上進行競爭式雜交，如有一段區域呈現某一螢光顏色較強，即代表有其中一組基因體的基因拷貝數有增加或減少的現象。2001 年 Kirchoff² 等人利用解析度達 3Mb 的 HR-CGH (high resolution CGH)，分析了 144 個核型正常，但外觀異常的智障兒童，偵測出約 7.6% 病童的染色體異常。但整體來說，CGH 技術的掃描解析度仍與染色體核型分析

相去不遠，且控制組的染色體模板材料不易製備，在應用上仍有極限。



Box 1 染色體核型分析 (Karyotyping)

染色體核型分析法中最常見的為 G 色帶分析法，利用 Giemsa 染劑將 A-T 序列富集區段染成深色，使整條染色體因 A-T 序列的多寡不同呈現深淺差異的灰階分佈。有經驗的細胞遺傳學家可藉由染色體上色待的分佈情況，進一步辨別有無異常區段或辨識有無特定染色體數目異常。此種方法受到染色體長度與人為觀察的影響，大部分的細胞遺傳實驗室可做到 500 條色帶以上，解析度約在 5-10Mb 左右，意即可檢測此範圍大小的變異。在染色體近端粒區 (subtelomere region) 因受限於解析度，無法正確分析。

分子技術介入、染色體晶片技術崛起

分子生物技術快速發展，利用已知的螢光標定 DNA 探針與染色體雜合，可直接觀察染色體上結構的異常變化。此技術稱之為 Fluorescence in situ hybridization (FISH) 為目前最常用來偵測特定區段的染色體微小變異，解析度視 DNA 探針長度而定，可偵測 100 kb 以下的異常。藉由不同螢光的差異，FISH 也可一次檢查多個染色體區域的異常，Knight 等人於 1999 年³ 首先利用多探針螢光原

位雜交法 (Multiprobe FISH, M-FISH) 篩檢 466 位不明原因智障學童的染色體端粒區的異常變化，發現約有 7.4% 中重度智障學童和 0.5% 輕度智障學童具有端粒區的異常變化，這些是傳統色帶分析無法做到的。

然而，FISH 方法只針對特定區域的變異，並不適用於患者臨床特徵不明的情況。科學家們不斷思考如何在一次性實驗高解析地觀察全部染色體的異常，Sчена⁴ 等人於 1995 年提出結合基因晶片與 CGH 的想法，將原本在 CGH 反應中的控制組染色體模版，以排成陣列方式的 DNA 片段來取代，此為染色體晶片的原始概念，因為以晶片的方式來進行 CGH 分析，故又稱為 array CGH (aCGH) 分析。使用染色體晶片可省去製備模版的麻煩又可依 DNA 片段 (亦即探針) 的長短與染色體上探針的間隔調整觀察的解析度，可達 10 kb。荷蘭學者 Joris⁵ 等人於 2002 年設計端粒區的染色體晶片，測試後發現利用染色體晶片進行 aCGH 分析具有高準確度和靈敏度，對已知的端粒變異皆能準確偵測出來。

特定的拷貝數異常造成疾病

近年來利用染色體晶片進行實驗研究 (Box 2) 取得豐厚的成果。在 2007 年 Qiao⁶ 等人發現一種新型態的基因體變異—DNA 拷貝數變異 (copy number variation, CNV)。CNV 是一種牽涉數十 kb 或是上百 kb 以上的 DNA 片段缺失或重複的變異。發生 CNV 的區域可能包含數個基因或是沒有任何基因，任何一位正常人身上都帶有數量不等的 CNV 變異。

CNV 變異也被發現在許多特定的疾病族群中有較正常人更多的 CNV，例如自閉症和精神分裂症患者；且病患中某些染色體特定區域的變化會在部分患者中重複出現，例如：16p11.2 的區域約可在 1% 左右的自閉症患者發現有微缺失的現象。這些新發現的特定染色體區域的變異，在過去無法利用傳統染色體色帶分析法、CGH 或是

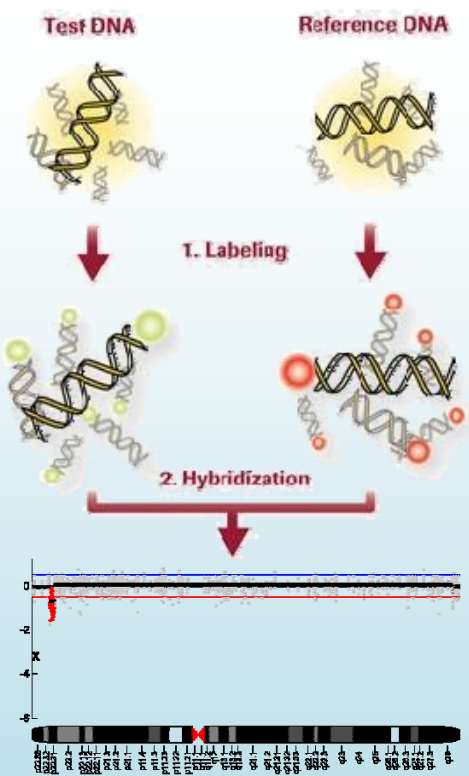
M-FISH 等方法找出。隨著染色體晶片技術的成熟與研究累積，具有多重先天異常、智能障礙或是發展遲緩的患者，利用染色體晶片進行染色體檢測，可發現染色體異常變化，並找到某些特定症候群的致病基因。

染色體晶片技術可運用在胚胎著床前、產前和產後檢查

由於染色體晶片的強大功能，基礎醫學的研究和臨床醫學上的運用也越來越廣，許多新發現也促進了醫學的進步。目前主要的臨床應用在於遺傳疾病之檢測，檢測時機又可分為胚胎著床前、產前和產後檢查。

胚胎著床前的染色體檢查主要針對習慣流產之婦女或不孕症的夫妻，胚胎無法順利著床與生長通常都具有先天的染色體異常，藉由胚胎切片微量細胞中的 DNA 進行染色體晶片實驗，可有效率篩檢染色體數目與拷貝數異常，降低流產率並提高試管嬰兒的成功率！

產前檢查的染色體檢查主要利用染色體晶片檢測胎兒羊水細胞中的 DNA，檢查胎兒染色體。染色體晶片因其解析度高可容易找出胎兒染色體拷貝數異常之區域，但目前對大部分的拷貝數變異所代表的真正意義仍有太多是不明確的，檢測到的拷貝數變化是否真的造成疾病或只是一個正常的變異，並不容易判定，只能依據過往發表拷貝數變異的資料來排除可能性，增加臨床醫師解釋病因的



Box 2 染色體晶片技術的操作方式

從生物樣品如血液、口腔黏膜或孕婦的羊水培養細胞，萃取出 DNA 後進行螢光樣品製備。螢光樣品製備 (step 1. Labeling) 可選擇先將 DNA 裂解再合成含有螢光 DNA 長鏈或先合成含有螢光 DNA 長鏈再裂解，兩種方式大同小異。合成含有螢光 DNA 長鏈的方式主要利用 Exo-Klenow Fragment 酵素的 5' → 3' polymerase 的活性，以 DNA 單股為往下展延的引子 (primer)，當酵素展延 DNA 時，會把反映溶液中含有螢光的 dCTP 編織到新合成的 DNA 長鏈上，控制組與測試組可加入不同的螢光的 dCTP 區別訊號。裂解可使用三種方法：加熱法 (如 95°C 加熱 30 分鐘)、限制酶 (如 Alu I 及 Rsa I)、及超音波震盪 (Sonication)。當螢光樣品製備後即可純化，準備進行染色體晶片雜合反應 (step 2. Hybridization)，為減少反應的非專一性結合，雜合液中會額外加入 Cot-1 DNA。Cot-1 DNA 為人類胎盤 DNA，含有豐富的重複性 DNA 序列，可於雜交過程中與 DNA 標定放大反應中所含之大量非專一的重複性序列互補，以降低這些重複性序列與探針反應形成非專一訊號。完成晶片實驗後進行清洗與掃描，訊號分析是將控制組與測試組的訊號強度互相比較，藉由鄰近探針訊號強度的連續差異來判定染色體區段是否有異常與該片段的大小。Box 2 的範例是 46,XY del(X)(p22.3p22.3) 的臨床樣品，可明顯觀察到 X 染色體在 p22.31 處有 1.5 Mb 左右的缺失，此區段的染色體缺失在臨床文獻中已知與 ichthyosis, X-linked 的疾病有關。

困難度，甚至無端增加患者或家屬的焦慮。因而，標的清楚與疾病明確的染色體晶片，在產前檢查上可排除含有不明 CNV 或是可能為正常變異 CNV 的 DNA 區域，可減少臨床應用的困擾。

產後檢測的主要對象為兒童或有發展遲緩與其他疾病表徵的患者，2011 年 Cooper⁷ 等人發現約有 14.2% 的發展遲緩兒童的致病與大於 400 kb 的特定染色體區段的異常有關，顯示染色體晶片可有效地在一次性檢測中協助醫生找尋導致表徵的致病原因。

華聯染色體晶片產品 CytoOneArray[®]

CytoOneArray[®] 產品是針對具有臨床證據支持之特定疾病染色體區域設計，這些疾病區域的染色體的缺失或重覆與疾病有高度的相關性。此產品主要針對 264 個疾病區域與 41 個次端粒區域設計，序列是參考國際公認之 UCSCChg19 基因體資料庫，設計長鏈 57-63 個鹼基寡核酸 (sense-strand) 的人類染色體探針，疾病區域探針的解析度達 10-30 Kb，可檢測染色體上的微缺失與擴增 (microdeletion/microduplication)；非特定區域則排除常見之拷貝數變異區段，設計 2Mb 解析度的探針，目的在於保留大片段變異偵測能力與減少無法釐清之資訊。

在特定疾病中，CytoOneArray[®] 產品對於發育遲緩症狀相關的微缺失與擴增特別關注，經過嚴密的臨床文獻檢視，CytoOneArray[®] 產品中與特定疾病相關的染色體區段皆有臨床文獻佐證，[詳細的疾病清單可參考公司網頁](#)。

表一為 60 個具染色體微缺失或擴增的臨床樣品測試結果，總共涵蓋 32 個疾病區域，檢測出染色體異常片段的大小範圍自 30 Kb 至 175 Mb。華聯持續與臨床遺傳學家進行合作，歡迎有興趣的學者專家與我們聯繫 cytoinfo@onearray.com !

Phenotype	Number Tested	Range of Size (Mb)
DiGeorge Syndrome (CATCH 22)	8	0.68~2.14
Cri-du-Chat syndrome	5	6.37~175.22
Williams-Beuren syndrome (WBS)	6	0.92
Prader –Willi syndrome (PWS)	3	2.58~2.68
X-linked mental retardation	3	0.35~1.08
Charcot-Marie-Tooth disease type 1A(CMT1A)	2	1.25
Chromosome 18p deletion syndrome	2	11.04
Gonadal dysgenesis	2	13.84
Duchenne muscular dystrophy (DMD)	2	2.58~2.68
Retinoblastoma (RB1)	2	23.15
Schizophrenia & epilepsy	2	13.26
Wilms tumor aniridia genitourinary anomalies mental retardation syndrome (WAGR)	2	1.16
16p11.2 microdeletion	2	0.55
1q terminal_Del	1	0.81
5p terminal_Del	1	9.18
Autistic Features 15q11.2-q12	1	3.04
Chr22 aneuploidy chromosome number trisomy	1	33.73
Chronic granulomatous disease (X-related; CGD)	1	10.84
DiGeorge syndrome 2 (DGS2)	1	11.76
Down syndrome	1	15.53
Feingold syndrome	1	0.10
Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS)	1	2.57
Holoprosencephaly 4(HPE4)	1	4.30
X-linked ichthyosis	1	15.61
Mental retardation, hypercholesterolemia,	1	0.03
Multiple synostoses syndrome	1	5.50
Noonan syndrome (NS1)	1	10.20
Pelizaesus-Merzbacher disease (PMD)	1	0.72
Potocki-Shaffer syndrome	1	1.03
Split-hand/foot malformation 5	1	1.19
Trichorhinophalangeal syndrome I (TRPS1)	1	4.78
Xq deletion	1	62.17
Total (總疾病數: 32 個)	60	

表一、60 個臨床樣品檢測結果。疾病區域的判定皆與原先的臨床資料吻合

結論

華聯生技在基因晶片領域已深耕 10 年，除自行設計及製造的晶片產品，如人類及小鼠基因表現晶片、微小 RNA 晶片外，亦建置具產業標準服務流程的基因體實驗室，對外提供晶片代檢服務。隨著公司業務的拓展，逐步建立大量的國內外使用者基礎，使用華聯晶片已累計發表 120 篇以上的國內外知名期刊論文。

華聯以既有的晶片製造及檢測服務能力為基礎，加上與國內臨床遺傳專家的合作，於 2012 年 5 月推出可檢測臨床上常見的微小片段染色體缺失疾病之染色體晶片產品，以做為臨床遺傳醫師、細胞遺傳學分析員或是產科醫師的輔助檢測工具。

參考文獻

1. Kallioniemi, A., et al. **Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.** Science (1992) 258:818–821
2. Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. **High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics.** J Med Genet. (2001) 38:740-4.
3. Knight, S. J., R. Regan, A. Nicod, et al. **Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation.** Lancet 1999; 354: 1676-81.
4. Schena, M., et al. **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** Science (1995) 270:467–470.
5. Veltman JA, et al. **High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization.** Am J Hum Genet. (2002) 70:1269-76.
6. Ying Qiao, et al. **Large-scale copy number variants (CNVs): Distribution in normal subjects and FISH/real-time qPCR analysis.** BMC Genomics (2007) 8: 167-177.
7. Cooper GM et al. **A copy number variation morbidity map of developmental delay.** Nat Genet. 2011 Aug 14;43(9):838-46.



每個生命都值得期待

每個天使都快樂飛翔