

• 检验技术与方法 •

醋酸纤维素电泳和毛细管电泳在 HbE 病筛查中的价值比较

徐咏梅¹, 段国庆¹, 龚翠芹¹, 姚莉琴², 忽丽莎², 董再翠², 李娟², 邹团标^{2Δ}

(1. 德宏州妇幼保健院, 云南路西 678499; 2. 云南省妇幼保健院, 云南昆明 650051)

摘要:目的 探讨醋酸纤维素电泳和毛细管电泳在血红蛋白(Hb)E病筛查中的价值差异。方法 采用 pH8.6 醋酸纤维素电泳及 SEBIA capillary2 全自动毛细管电泳仪对基因诊断确诊为 HbE 阳性的 17 例地中海贫血患者的血红蛋白组分进行检测。结果 17 例 HbE 阳性患者醋酸纤维素电泳 HbA2+HbE 吸光度最高值为 86.43, 最低值为 16.95, 相应的毛细管电泳 HbE+HbA2 吸光度最高值为 91.3(6.8+84.5), 最低值为 19.8(3.2+16.6); 2 种方法对 HbE 病的诊断结果高度一致, 与基因诊断的相符率均为 100%。结论 醋酸纤维素电泳和毛细管电泳在 HbE 的筛查中结果一致。

关键词:电泳; 醋酸纤维素; 电泳, 毛细管; 血红蛋白 E; 地中海贫血; 筛查

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)09-1166-02

Value comparison of cellulose acetate electrophoresis and capillary electrophoresis in screening for HbE disease

Xu Yongmei¹, Duan Guoqing¹, Gong Cuiqin¹, Yao Liqin², Hu Lisha², Dong Zaicui², Li Juan², Zou Tuanbiao^{2Δ}

(1. Dehong Maternal & Child Health Hospital, Luxi, Yunnan 678499, China;

2. Yunnan Maternal & Child Health Hospital, Kunming, Yunnan 650051, China)

Abstract: Objective To study the value difference of cellulose acetate electrophoresis and capillary electrophoresis in screening for hemoglobin E(HbE) disease. Methods Cellulose acetate electrophoresis and SEBIA capillary2 automated capillary electrophoresis instrument were employed to detect the hemoglobin components of 17 patients with thalassemia and positive HbE which were confirmed by genetic diagnosis. Results The highest and the lowest absorbance values of HbA2+HbE of 17 patients with positive HbE according to cellulose acetate electrophoresis were 86.43 and 16.95, respectively, while the corresponding absorbance values were 91.3(6.8+84.5) and 19.8(3.2+16.6) according to capillary electrophoresis, respectively. The diagnostic results of the two methods for HbE were highly consistent and they matched well with genetically diagnostic results with the match rate of 100%.

Conclusion Cellulose acetate electrophoresis and capillary electrophoresis have consistent screening results for HbE.

Key words: electrophoresis, cellulose acetate; electrophoresis, capillary; hemoglobin E; thalassemia; screening

血红蛋白(hemoglobin, Hb)E 是常见的异常血红蛋白之一,尤其是在东南亚和中国南方,柬埔寨、泰国、老挝人有很高的 HbE 携带率,而这 3 国交界的地区素有“HbE 三角”之称^[1]。HbE 是一种变异血红蛋白,由于 β 珠蛋白基因第 26 位密码子 GAG→AAG 突变,此种突变激活了邻近的隐蔽切接点,使正常切接的 βE mRNA 产量下降,β 珠蛋白链合成减少,从而产生 HbE,是 β 地中海贫血中的一种特殊类型^[2]。目前,实验室筛查 HbE 病主要通过醋酸纤维素电泳、琼脂糖凝胶电泳、高效液相色谱分析和毛细管电泳分析,以前用 Hb 肽链解离试验诊断^[3],现在确诊则需要通过基因诊断。本院利用醋酸纤维素电泳筛查了大量地中海贫血样本,此方法价格便宜,但 HbE 和 HbA2 重合在一起,当 HbA2 大于 8% 时,人们有 HbE 的存在,而毛细管电泳可以将 HbE 与 HbA2 分离^[4]。为验证醋酸纤维素电泳在 HbE 的筛查价值,笔者以基因诊断为金标准,将其与毛细管电泳进行比较研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院地中海贫血筛查样本 679 例,基因诊断确诊为 HbE 阳性者 17 例,其中,男 10 例,女 7 例;年龄 2 岁 4 个月至 55 岁。

1.2 标本的采集 采用乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)-K₂ 抗凝管,抽取 2 mL 静脉血 2 管,将采集标本反复颠倒混匀。一管用作血细胞分析和电泳分析,另一

管用作基因检测分析。

1.3 检测方法 采用 SYSMEX KX-21 型血细胞分析仪(日本 SYSMEX 公司)检测平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV),正常参考值为 80~92 fL,取 MCV<80 fL 为截断值。采用 DY-600 基础型电泳仪(北京六一仪器厂)及快速扫描分析系统(美国 Helena 公司)进行 pH8.6 醋酸纤维素电泳,严格按说明进行操作。采用法国 SEBIA Capillary2 全自动毛细管电泳仪(法国 SEBIA 公司)及其配套试剂、质控品进行毛细管电泳血红蛋白分析。基因检测采用反向斑点杂交法(reverse dot blot, RDB),仪器为 DA7600 型全自动荧光定量 PCR 仪(中山大学达安基因股份有限公司),试剂由亚能生物技术(深圳)有限公司提供, DNA 提取试剂盒由天根生化科技(北京)科技有限公司提供。

2 结果

毛细管电泳显示 HbE 与 HbA2 为分开的 2 个条带, HbE 为 24.7%, HbA2 为 3.8%; 而在醋酸纤维素电泳上则为一个条带, 29.23%。

17 例 HbE 阳性患者醋酸纤维素电泳 HbA2+HbE 吸光度最高值为 86.43, 最低值为 16.95, 相应的毛细管电泳 HbE+HbA2 吸光度最高值为 91.3(6.8+84.5), 最低值为 19.8(3.2+16.6); 2 种方法对 HbE 病的诊断结果高度一致, 与基因诊断的相符率均为 100%, 见表 1。

表 1 醋酸纤维素电泳及毛细管电泳检测结果的比较

序号	醋酸纤维素电泳 (HbE+HbA2)	毛细管电泳			基因诊断结果
		HbE	HbA2	HbE+HbA2	
1	86.43	84.5	6.8	91.3	β CD17/ β E, $\alpha\alpha$ /-SEA
2	71.50	68.1	5.1	73.2	β CD17/ β E, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
3	31.31	28.7	4.2	32.9	β E/ β N, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
4	30.76	25.2	4.3	29.5	β E/ β N, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
5	27.35	25.1	3.5	28.6	β E/ β N, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
6	27.12	26.3	3.9	30.2	β E/ β N, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
7	24.78	22.8	3.5	26.3	β CD17/ β E, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
8	23.04	20.7	3.8	24.5	β E/ β N, $\alpha\alpha$ /-SEA
9	16.95	16.6	3.2	19.8	β E/ β N, $\alpha\alpha$ /-SEA
10	75.22	67.8	5.4	73.2	β CD41-42/ β E, $\alpha\alpha$ /-SEA
11	69.95	63.9	5.0	68.9	β CD17/ β E, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
12	64.72	60.6	5.2	65.8	β CD41-42/ β E, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
13	40.62	27.0	4.2	31.2	β E/ β N, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
14	35.61	26.0	4.1	30.1	β E/ β N, $\alpha\alpha$ /-SEA
15	29.23	24.7	3.8	28.5	β E/ β N, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
16	27.29	22.7	4.1	26.8	β E/ β N, $\alpha\alpha$ /-SEA
17	21.53	19.5	3.6	23.1	β E/ β N, $\alpha\alpha$ /-SEA

3 讨 论

HbE 病首先发现于泰国^[5],1979 年梁植权等^[6]首次经化学结构分析证明中国有 HbE 的存在,在中国广东、广西和云南等地相继有 HbE 病的报道^[7]。HbE 由 CD26 于 β 珠蛋白基因的外显子 1 与内含子 1 交界处附近突变所致,故影响到 mRNA 前体剪切加工的效率,从而导致 β 珠蛋白基因 mRNA 的表达减少^[8]。HbE 一般采用 Hb 电泳进行筛查和诊断,常用的电泳检测方法从醋酸纤维素电泳/琼脂糖凝胶电泳到高效液相色谱法和毛细管电泳法,3 种方法各有千秋,因后两者设备非常昂贵,不易在基层医院普及,所以笔者把醋酸纤维素电泳和高效毛细管电泳法放在一起比较研究。电泳是溶液中带电荷的粒子在外加电场作用下,因受吸引或排斥而引起的以不同速度向电荷相反的两极移动的现象。醋酸纤维素电泳缓冲液的 pH 为 8.6,电压为 350 V 20 min,在这样的条件下 HbE 和 HbA2 电泳迁移率相同^[9],所以 2 个区带是重合在一起的。发生地中海贫血时,HbA2 在 8% 以下;若该值超过 10%,则复合有 HbE 存在。这一点在毛细管电泳 HbE 的定量上已得到验证,本院最高的测定值为 6.8。毛细管电泳缓冲液 pH 为 9.4,电压为 10 000 V,利用氖灯来检测 Hb 的不同组分,分辨率更高,全自动操作,效率更高,重复性更好,可将 HbE 和 HbA2 清楚地分开,利于区分 HbE 是否合并 β 地中海贫血。根据 2 种方法的判断标准,同时检测出 HbE 的阳性样本进行基因分析,符合率为 100%,同时醋酸纤维素电泳和毛细管电泳的测定值总体上呈正相关,高度一致,只是在量上有微小的区别,但不影响醋酸纤维素电泳对 HbE 存在的判断。

2 种电泳方法在 HbE 筛查中结果是一致的,醋酸纤维素电泳操作比较繁杂,不容易掌握,但成本低,适合于基层医疗机构;毛细管电泳操作简单,效率高,能清楚分辨 HbE 带,但成本

昂贵,适合于大样本的筛查。由于本研究中 2 种电泳方法和基因分析的 HbE 样本量较少,在今后的工作中还需积累更多的数据开展进一步深入。

参考文献

- [1] 张俊武,龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2003.
- [2] Vichinsky E. Hemoglobin e syndromes[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program,2007;79-83.
- [3] 刘俊凡,黄培宇,柳兴其,等. 经一级结构证实的两例血红蛋白 E 复合 β 地中海贫血病[J]. 湖南医学院学报,1984,9(3):243-249.
- [4] 王明月,赖永榕. 血红蛋白 E 复合 β 地中海贫血[J]. 医学综述,2009,15(6):860-864.
- [5] Gorakshakar AC,Phanasgaonkar SP,Nadkarni AH, et al. Detection of rare beta-thalassemia mutations by denaturing gradient gel electrophoresis among Indians[J]. Hemoglobin,2004,28(1):15-24.
- [6] 梁植汉,陈松森,贾佩臣,等. 我国异常血红蛋白的研究 III[J]. 中国医学科学院学报,1983,2(5):314-315.
- [7] 李菊香,谭润平,黄健仪,等. 血红蛋白 E 病复合 β 地中海贫血的家系分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2006,14(4):111-112.
- [8] Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, et al. Abnormal RNA processing due to the exon mutation of beta E-globin gene [J]. Nature,1982,300(5894):768-769.
- [9] 曾溢滔,梁徐,黄淑帆,等. 血红蛋白 E 纯合子生化遗传学研究 [J]. 遗传学报,1980(4):319-320.