

• 论 著 •

应用高分辨熔解曲线分析技术检测 β-地中海贫血基因突变*

王晶晶, 许朝旭, 彭红波

(广州市番禺区何贤纪念医院检验科, 广东广州 511400)

摘要:目的 探讨高分辨熔解曲线(HRM)分析技术检测 β-地中海贫血基因突变的可行性。方法 应用 HRM 法检测广东省常见的 5 种 β-地中海贫血突变(-28、CD17、CD41-42、CD71-72 及 IVS-2-654),对 60 例可疑 β-地中海贫血患者样本进行 HRM 分析,通过 DNA 测序对 HRM 结果进行验证。结果 60 例可疑 β-地中海贫血患者中,共检出杂合突变型基因 12 例,包括 2 例-28、2 例 CD17、4 例 CD41-42、2 例 CD71-72 及 2 例 IVS-2-654 基因突变类型;检出纯合突变型基因 2 例,包括 1 例-28 及 1 例 CD41-42 (均为羊水标本)。HRM 法检测结果与测序结果一致。结论 HRM 法能准确检测广东省 5 种常见的 β-地中海贫血突变,具有简便、快速、灵敏度高等优点,有望成为临床筛查 β-地中海贫血突变的新方法。

关键词:β-地中海贫血; 基因突变; 高分辨溶解曲线

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.032 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)05-0650-03

Application of high resolution melting curve analysis technique in detection of β-thalassemia gene mutations*

Wang Jingjing, Xu Zhaoxu, Peng Hongbo

(Department of Clinical Laboratory, Panyu District Hexian Memory Hospital, Guangzhou, Guangdong 511400, China)

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility of high resolution melting(HRM) curve analysis technique for detecting β-thalassemia gene mutations. **Methods** The HRM method was used to detect five kinds of common β-thalassemia mutations (-28, CD17, CD41-42, CD71-72 and IVS-2-654) in Guangdong province. Sixty specimens of the patients with suspected β-thalassemia were performed the HRM analysis. The results of HRM analysis were confirmed by the direct DNA sequencing. **Results** Among 60 specimens of the patients with suspected β-thalassemia, 12 cases of heterozygosis mutant gene were detected, including 3 cases of -28, 2 cases of CD17, 5 cases of CD41-42, 2 cases of CD71-72 and 2 cases of IVS-2-654 gene mutation; 2 cases of homozygosis mutant gene were detected, including 1 case of -28 and 1 case of CD41-42 homozygous mutation (both were amniotic fluid specimens). The results of HRM analysis were consistent with the DNA sequencing results. **Conclusion** The HRM method can accurately detect five kinds of common β-thalassemia mutations in Guangdong province, has the advantages of simpleness, rapidness and high sensitivity and is expected to be a new method for screening β-thalassemia mutation in clinic.

Key words:β-thalassemia; gene mutations; high-resolution melting curve

β-地中海贫血是中国南部地区发病率最高的单基因遗传病之一,广东省人群携带率约为 2.5%。现阶段,检测 β-地中海贫血基因突变的常用方法有等位基因特异性 PCR、反向斑点杂交技术等,这些方法均有各自的局限性,不能同时满足对 β 地贫基因突变快速灵敏而又特异准确的分析。最近兴起的高分辨熔解曲线分析技术(HRM),是一种检测基因突变与基因分型的最新遗传学分析技术,可实现真正的闭管操作,具有简便快捷、成本低廉、结果准确等特点^[1-2]。目前国内已有部分单位将 HRM 技术常规用于多种单基因病的突变筛查,如 α-地中海贫血、致死性软骨发育不良 I 型等。然而,应用高分辨熔解曲线分析技术对 β 地贫基因进行检测仍处于探索阶段,将其应用于临床检验尚需更多的研究证据支持^[3]。本研究通过 HRM 方法检测中国南方 5 种常见 β-地中海贫血基因突变(-28、CD17、CD41-42、CD71-72 及 IVS-2-654),应用于临床疑似 β-地中海贫血患者基因突变的分析,以初步探讨该技术的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2013 年 11 月至 2014 年 11 月在广东省

广州市番禺区何贤纪念医院就诊的临床疑似 β 地贫患者外周血标本 50 例及羊水标本 10 例,共 60 例标本,按照 DNA 提取试剂盒(深圳益生堂生物公司)说明书提取所有标本,将 DNA 终浓度调节至 20 ng/μL 备用。

1.2 引物设计 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计针对-28、CD17、CD41-42、CD71-72 及 IVS-2-654 这 5 个突变位点的 HRM 引物,序列参考文献[4-5]等的研究。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.3 PCR 反应 采用 96 孔板进行 PCR 扩增,扩增体系为 DNA 1 μL,反应混合液 10 μL, Mg²⁺ 2.5 mmol/L,引物各 2.5 mmol/L,并用去离子水补充至 20 μL。循环条件如下,第一步:95℃ 预变性 5 min,第二步:95℃ 10 s 变性,第三步:55℃ 30 s 退火,第四步:72℃ 10 s 延伸,45 个循环。

1.4 高分辨熔解曲线分析方法 PCR 步骤扩增结束后采用 Roche 公司的 LightCycler 480 高分辨熔解扩增试剂盒及 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪进行 HRM 分析,具体条件如下:95℃ 1 min,40℃ 1 min,熔解曲线数据收集从 65~85

* 基金项目:番禺区科技计划资助项目(2014-Z03-68)。 作者简介:王晶晶,女,主管技师,主要从事遗传病的产前筛查与产前诊断研究。

℃ 温度上升速率为 0.1 ℃/s

1.5 基因测序 所有标本送华大基因科技股份有限公司进行测序验证。

2 结 果

60 例临床疑似 β 地贫患者 DNA 样本(50 例外周血及 10 例羊水标本),经 HRM 检测共检出杂合突变型基因 12 例,包括 2 例-28、2 例 CD17、4 例 CD41-42、2 例 CD71-72 及 2 例 IVS-2-654 基因突变类型;检出纯合突变型基因 2 例,包括 1 例-28 及 1 例 CD41-42(均为羊水标本)。HRM 检测结果与双向基因测序所得基因型结果一致。HRM 具体分析结果详见图 1~5。

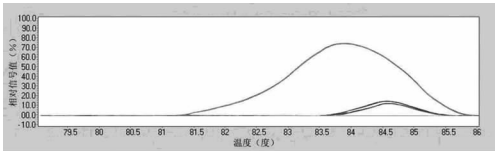


图 1 HRM 熔解曲线区分-28 纯合、杂合突变及野生型

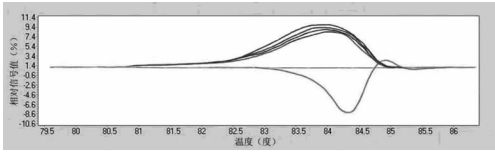


图 2 HRM 熔解曲线区分 CD41-42 纯合、杂合突变及野生型

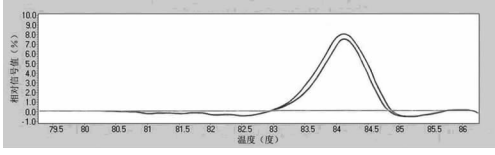


图 3 HRM 熔解曲线区分 CD71-72 杂合突变及野生型

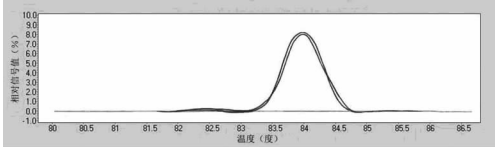


图 4 HRM 熔解曲线区分 IVS-2-654 杂合突变及野生型

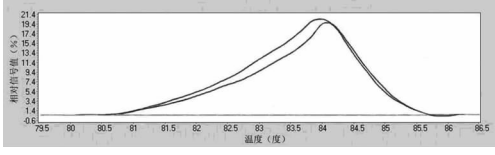


图 5 HRM 熔解曲线区分 CD17 杂合突变及野生型

3 讨 论

β 地中海贫血是 β 珠蛋白合成障碍导致的溶血性贫血,根本原因是调控 β 珠蛋白的基因发生点突变或小的插入/缺失突变。此病是当前世界上最常见的单基因遗传病之一,在我国主要以南部地区发病率为高,在广东、广西等高发病地区该基因的人群携带率高达 3%~9%^[6-7]。现阶段,在全世界报道的约 170 余种 β 地贫基因突变中,我国报道的约 28 种,其中最主要的 5 种分别是 CD17、CD41-42、-28、CD71-72 及 IVS-2-654,这 5 种突变类型占我国 β 地贫基因突变的 90% 以上。目前临床上对 β 地中海贫血尚无理想的治疗手段,该病的纯合子产生

的重型 β 地中海贫血仍为严重的致死性疾病,现阶段只能在妊娠早期对可能的中、重型 β 地中海贫血患儿应用基因分析技术进行产前诊断,通过对诊断出的中、重型地贫患儿及时终止妊娠,来避免中、重型 β 地中海贫血患儿出生^[8-9]。故采用方便准确基因诊断技术对大规模的人群实施筛查,在此基础上制订 β 地中海贫血的预防与控制计划,同时通过准确的产前诊断和及时终止妊娠等手段降低中、重型 β 地贫患儿的出生,具有重要的临床意义。

目前,国内实验室最常用的基因诊断方法是反向斑点杂交技术,该技术主要是利用生物素等标记的探针和特异性扩增 PCR 产物(靶 DNA 序列)杂交,对基因分型、基因突变检测,病原体的检测等方面有其一定的优势。然而,该法仍存在很多不足之处:一是干扰检测结果的因素较多,如缓冲液、DNA 纯度、PCR 反应条件等均可对检测结果产生影响,从而出现漏诊或误诊。另外,操作步骤繁琐,耗时长,检测成本高也限制了该法的进一步推广应用。直接测序法作为基因突变检测的金标准,存在成本高昂、工作量大、检测周期长、设备购置昂贵等缺点,亦限制了其在临床工作和人群筛查中的广泛应用。检验诊断领域迫切需要一种快速简便而又准确灵敏的检测 β 地中海贫血基因突变的新方法。

HRM 是 2002 年由犹他大学和爱德华科技公司合作开发的应用于 SNP 检测分析的一项新技术。该技术因具有操作简便、快速,使用成本低,结果准确等优点因而受到普遍的关注。其基本原理是实时监测升温过程中双链 DNA 荧光染料与 PCR 扩增产物的结合情况,单核苷酸多态性(SNP)位点不匹配会使双链 DNA 在升温过程中先解开,导致荧光染料从局部解链 DNA 分子上释放,此时,从荧光强度与时间曲线上可判断是否存在 SNP。不同 SNP 位点、杂合子与纯合子等均会影响熔解曲线的峰形,因此 HRM 分析能够有效区分不同 SNP 位点与不同基因型^[10]。

HRM 技术的优点包括以下。(1)操作简便:在 PCR 反应前加入饱和荧光染料,PCR 产物直接分析,无需任何后处理。(2)灵敏度高、特异度好。(3)快速、高通量:标准 96/384 孔板,5 min 即可完成整版样品的检测。(4)重复性好,检测片段范围广,可从 50 bp~1 000 bp 不等。(5)低成本:比普通 PCR 反应仅多加一种饱和荧光染料,每个样品成本约 2 元。(6)全程闭管操作,可明显减少污染机会^[11]。

本研究将 HRM 技术应用于广东省常见的 5 种 β 地中海贫血突变(-28、CD17、CD41-42、CD71-72 及 IVS-2-654),在 60 例可疑 β 地中海贫血样本中成功检出杂合突变型基因 12 例,包括 2 例-28、2 例 CD17、4 例 CD41-42、2 例 CD71-72 及 2 例 IVS-2-654 基因突变类型;检出纯合突变型基因 2 例,包括 1 例-28 及 1 例 CD41-42(均为羊水标本)。研究结果表明,HRM 技术能有效检测出 β 地中海贫血的杂合型和纯合型突变,且与基因双向测序的结果相一致,提示本研究所建立的 HRM 法对 β 地中海贫血的检测是准确可靠的。由 HRM 的技术原理及 β 地贫的发病机制可知,HRM 特别适合 β 地贫常见基因突变的检测,除在临床诊断与产前诊断领域使用之外,还可推广进行 β 地贫大规模的人群筛查,并对降低重型 β 地贫患儿的出生产生积极意义^[12]。

(下转第 654 页)

并对其进行临床分析,发现使用高频超声对甲状腺结节的检测有很高的准确度;竺王玉等^[7]通过对舟山海岛地区甲状腺结节影响因素病例对照研究,结果发现甲状腺结节的发病率和岛上的居民饮食生活习惯有很大的关系;冯尚勇等^[10]对居民甲状腺结节患病情况和危险因素进行调查,结果显示女性甲状腺结节的检出率要比男性高一些,而且随着年龄的增长,甲状腺结节的发病率有增高的趋势。本文通过利用高频超声检查某地区的居民甲状腺结节的发病情况,并对可能影响甲状腺结节的因素进行分析总结^[11],结果显示,有甲状腺结节的患者和性别、年龄有一定的关系,女性的发病率比男性要高,随着年龄的增长,甲状腺结节的发生率也随之增高,这和冯尚勇等^[10]的研究结果有一致性。选择高频超声对研究对象进行甲状腺检查,以是否患甲状腺结节作为因变量,以 8 个可能的影响因素作为自变量进行单因素分析。结果显示观察组和对照组中高血压病史、糖尿病史^[12]、吸烟史、尿碘、饮酒史和心肌梗死病史和甲状腺结节都有相关性;对高血压病史、糖尿病史、吸烟史、尿碘、饮酒史和心肌梗死病史和甲状腺结节都有相关性的单因素进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示吸烟、高血压病史和糖尿病史是甲状腺结节发生的主要危险因素。

总的来说,高频超声对检测甲状腺结节的诊断有很大的价值,对于一些常规手段难以检测出的微小结节,对比不同的单因素进行分析,有助于分析甲状腺结节发生的相关因素,在一定程度上有利于预防甲状腺结节的发生。

参考文献

[1] 倪圣霞. 超声诊断甲状腺结节的临床价值[J]. 南通大学学报:医学版,2012,32(5):429-430.

(上接第 651 页)

参考文献

[1] 何超,廖灿. 高分辨熔解曲线分析技术及其在遗传学中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,20(4):1-3.

[2] 陈汉彪,尹爱华,张彦,等. 高分辨率熔解曲线法检测中国 5 种常见 β 地中海贫血突变[J]. 热带医学杂志,2013,13(5):602-605.

[3] 陆林苑,唐海深,李东至. 高分辨率熔解曲线分析技术在非缺失型 α 地中海贫血新生儿筛查中的前瞻性应用[J]. 中国妇幼保健,2013,28(1):156-159.

[4] 张银汉,李建新,喻晶,等. 多重等位基因特异性 PCR-熔解曲线分析快速定型 β 珠蛋白基因突变[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(12):17-18.

[5] Shih HC, Er TK, Chang TJ, et al. Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis[J]. Clin Biochem,2009,42(16/17):1667-1676.

[6] 李茹,廖灿,李东至. 高分辨熔解曲线分析技术检测中国人常见 β 地中海贫血基因突变[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(7):19-21.

[7] 魏明,廖灿,李茹,等. 高分辨熔解曲线分析技术检测 α -地中海贫血常见三种点突变[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(5):463-465.

[2] 王深明,李梓伦. 重视甲状腺结节的正确评估和随访[J]. 中国实用外科杂志,2010,30(S1):1-4.

[3] 徐上妍,詹维伟,周建桥,等. 超声评估甲状腺结节内钙化的初步探讨[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(9):789-792.

[4] 詹维伟,王文涵. 甲状腺结节的超声诊断价值[J]. 中国普外基础与临床杂志,2014,21(9):15-19.

[5] 吴毅. 关于甲状腺结节诊断和治疗的若干思考[J]. 中国实用外科杂志,2010,30(10):821-823.

[6] 程桦. 重视甲状腺结节的诊断和治疗[J]. 广东医学,2008,29(1):22-23.

[7] 竺王玉,刘晓光,周世权,等. 舟山海岛地区甲状腺结节影响因素病例对照研究[J]. 中国公共卫生,2010,26(7):942-943.

[8] 于晓会,单忠艳. 甲状腺结节的病因与流行病学趋势[J]. 中国普外基础与临床杂志,2011,18(8):800-802.

[9] 莫哲,丁钢强,楼晓明,等. 浙江省不同地区居民甲状腺结节状况及相关因素分析[J]. 中华预防医学杂志,2011,45(5):474-476.

[10] 冯尚勇,朱妍,张真稳,等. 江苏社区人群甲状腺结节的流行病学研究[J]. 中华内分泌代谢杂志,2011,27(6):492-494.

[11] 胡凤楠,滕晓春,滕卫平,等. 不同碘摄入量地区居民甲状腺肿和甲状腺结节的流行病学对比研究[J]. 中国地方病学杂志,2002,21(6):464-467.

[12] Karger S, Schotz S, Stumvoll M, et al. Impact of pregnancy on prevalence of soil-re and nodular thyroid disease in women living in a region of borderline sufficient Iodine supply[J]. Horm Metab Res,2010,42(2):137-142.

(收稿日期:2014-10-25)

[8] Lin M, Jiao JW, Zhan XH, et al. High resolution melting analysis: a rapid screening and typing tool for common β -thalassemia mutation in Chinese population[J]. PLoS One,2014,9(8):102243.

[9] Seeratanachot T, Sanguanserm Sri T, Shimbhu D. Detection of Hb H disease genotypes common in northern Thailand by quantitative real-time polymerase chain reaction and high resolution melting analyses[J]. Hemoglobin,2013,37(6):574-583.

[10] Ouragini H, Haddad F, Darragi I, et al. Rapid and inexpensive detection of common HBB gene mutations in Tunisian population by high-resolution melting analysis: implication for molecular diagnosis[J]. Hematology,2014,19(2):80-84.

[11] He X, Sheng M, Xu M, et al. Rapid identification of common β -thalassemia mutations in the Chinese population using duplex or triplex amplicon genotyping by high-resolution melting analysis[J]. Genet Test Mol Biomarkers,2010,14(6):851-856.

[12] Prathomtanapong P, Pornprasert S, Phusua A, et al. Detection and identification of beta-thalassemia 3.5 kb deletion by SYBR Green1 and high resolution melting analysis[J]. Eur J Haematol,2009,82(2):159-160.

(收稿日期:2014-10-03)