

• 论 著 •

应用探针熔解曲线分析技术快速检测非缺失型 α -地中海贫血

陈 兴¹, 肖奇志¹, 于 雯², 周玉球¹, 谢建红^{1△}
(珠海市妇幼保健院: 1. 检验科; 2. 产科, 广东珠海 519001)

摘 要:目的 应用探针熔解曲线法检测 3 种常见非缺失型 α -地中海贫血(α^T -地贫)并进行临床评价。方法 选取已经反向点杂交法(RDB)结合 DNA 测序方法确诊为 3 种常见 α^T -地贫标本 149 份(羊水标本 6 份), 其中血红蛋白(Hb)CS 63 例、Hb QS 22 例、Hb WS 43 例和 Hb CS/Hb WS 双重杂合子 1 例及 20 例正常 α -珠蛋白基因型, 通过盲法方式, 采用探针熔解曲线法进行检测其 α^T -地贫以评价该技术的特异性、准确度和可靠性。结果 盲法分析结果显示, 探针熔解曲线法对 α^T -地贫基因型经 RDB 结合 DNA 测序方法确诊的 DNA 标本的诊断准确度达到 100%。结论 探针熔解曲线法能快速准确检测 3 种常见 α^T -地贫, 可用于临床及产前诊断。

关键词:探针; 熔解曲线; 地中海贫血; 反向点杂交
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 14. 024 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)14-2009-03

Probe melting curve analysis-based PCR assay for the rapid detection of non-deletion α -thalassemia(α^T)
Chen Xing¹, Xiao Qizhi¹, Yu Wen², Zhou Yuqiu¹, Xie Jianhong^{1△}
(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neonatology, Zhuhai Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Zhuhai, Guangdong 519001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical value of the probe melting curve analysis-based PCR assay for the detection of three types of α^T . **Methods** A total of 149 blood and prenatal archival DNA samples (6 of which were amniotic fluid samples) with three known α^T genes, which included 63 carriers with Hb CS, 22 cases with Hb QS, 43 individuals with Hb WS and 1 double heterozygote with Hb CS and Hb WS) as well as 20 samples with normal α -globin gene sequence that had been confirmed by RBD combined with DNA sequencing were selected to test the specificity of probe melting curve analysis by blind analysis. **Results** The probe melting curve analysis accurately detected 100 of the DNA samples previously characterized by S RBD combined with DNA sequencing. **Conclusion** Probe melting curve analysis-based PCR assay for the detection of α^T is featured with rapidity and accuracy and can be applied to clinical and prenatal diagnosis.

Key words: probe; melting curve analysis; thalassemia; reverse dot blotting

α -地中海贫血(简称 α 地贫)是一组由于 α -珠蛋白基因缺陷引起 α -珠蛋白链合成减少或缺乏的遗传性溶血性疾病。其分子病理机制主要是 α -珠蛋白基因大片段的缺失(缺失型, $-\alpha$), 少部分为 α -珠蛋白基因的点突变(非缺失型, α^T)^[1]。 α -地贫突变谱存在明显的民族和地域的差异。虽然中国人群中已报道了 12 种 α^T , 但以血红蛋白(Hb)CS, Hb QS 和 Hb WS 最为常见^[2]。 α^T 杂合子在临床上一般表现为静止型(如 Hb WS)或轻型 α -地贫表型(如 Hb CS 和 Hb QS)。由于该类 α^T 突变主要发生在功能较强的 $\alpha 2$ 基因上。因此, 当杂合中国人常见东南亚缺失型($-\text{SEA}$)地贫时, 其临床表现可能比缺失型 Hb H 病更为严重。而有些 α^T 的纯合子或双重杂合子表现为 Hb H 病甚至 Bart's 胎儿水肿综合征^[3-4]。因 α^T 的筛查及基因诊断对于婚育指导及产前诊断显得尤为重要。虽然 PCR-RFLP、错配酶切法、突变特异性扩增系统(ARMS)法、反向点杂交法(RDB)及 dHPLC 法等均可用于 α^T 分子诊断, 但 RDB 法仍是目前临床上广泛应用的方法^[5]。该法操作较为繁琐、费时及存在潜在污染的弊端, 而采用灵敏、特异和无污染的 α^T 分子诊断技术是临床地贫基因诊断的方向。本研究以 RDB 结合 DNA 测序方法作为对照, 对探针熔解曲线法检测 3 种 α^T -地贫进行了临床评价, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本 选取珠海市妇幼保健院检验科/珠海市医学遗传

所库存的、已经 RDB 结合 DNA 测序方法确诊的 DNA 样品 149 例(包括羊水标本 6 例), 其中 α^T -地贫 DNA 标本 129 例和正常标本 20 例。在这 129 例 α^T -地贫 DNA 样品中, 来自男性占 55 例、女性有 68 例, 年龄 3 d 至 38 岁。其具体的基因型和样品数详见表 1。

表 1 129 例 α^T -地贫 DNA 样本的基因型

组别	基因型	<i>n</i>
Hb CS 携带者	$\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha\alpha$	46
	$\alpha^{\text{CS}}\alpha/-\text{SEA}$	12
	$\alpha^{\text{CS}}\alpha/-\alpha^{4,2}$	5
Hb QS 携带者	$\alpha^{\text{QS}}\alpha/\alpha\alpha$	17
	$\alpha^{\text{QS}}\alpha/-\text{SEA}$	2
	$\alpha^{\text{QS}}\alpha/-\alpha^{3,7}$	3
Hb WS 携带者	$\alpha^{\text{WS}}\alpha/\alpha\alpha$	33
	$\alpha^{\text{WS}}\alpha/-\text{SEA}$	5
	$\alpha^{\text{WS}}\alpha/-\alpha^{3,7}$	3
	$\alpha^{\text{WS}}\alpha/-\alpha^{4,2}$	2
Hb CS/Hb WS 双重杂合子	$\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha^{\text{WS}}\alpha$	1
合计	—	129

—: 无数据。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 DNA 的提取方法和质量鉴定 上述所有 DNA 标本

均是采用经典酚-氯仿法提取的。在进行探针熔解曲线方法分析 α^T 之前,用 Biophotometer (德国 Eppendorf 产品)测定 DNA 纯度和浓度。 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 在 1.6 ~ 2.0 之间、 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}} \geq 2.0$ 的 DNA 样品,质量才符合要求。然后再将 DNA 浓度调整至大于或等于 1 ng/ μL 。

1.2.2 探针熔解曲线法检测 α^T -地贫基因诊断试剂盒由厦门致善生物科技有限公司提供。检测 α^T -地贫基因法,以盲法方式并严格按照试剂盒操作说明书进行 PCR 反应和熔解曲线分析以及结果判定。PCR 反应和熔解曲线分析在实时荧光 PCR 仪(CFX96,美国 Bio-Rad 产品)上完成。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计学软件对该方法检测

的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、诊断符合率进行统计学分析。

2 结果

盲法分析结果显示:探针熔解曲线法和 RDB 结合 DNA 测序方法结果完全一致。在 129 例 α^T -地贫 DNA 样品中,除上述 3 种 α^T -地贫复合--SEA 或- $\alpha^{4.2}$ 型 α -地贫时,只出现特异性的突变型峰而无野生型峰,余均出现特异性的突变峰和野生型峰,而 20 例正常 α -珠蛋白基因型只有野生型峰而无突变型峰(图 1)。因此,探针熔解曲线法的特异度、灵敏度、阴性预测值、阳性预测值和诊断符合率均为 100%。

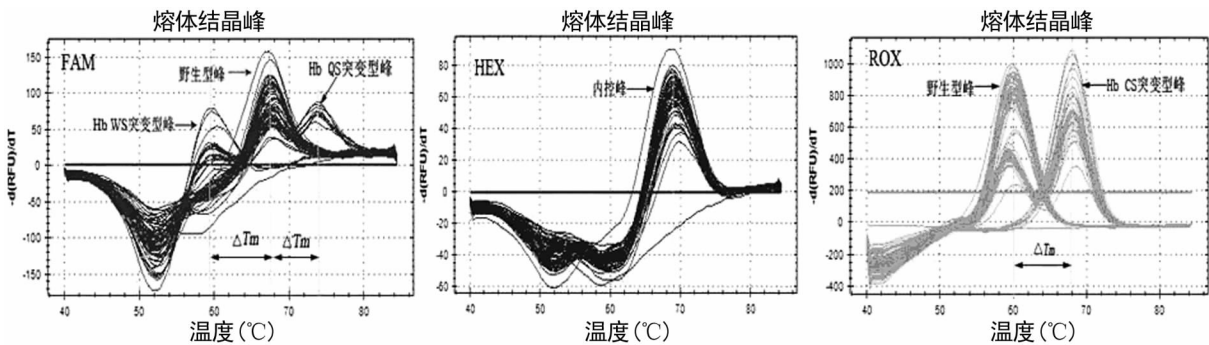


图 1 探针熔解曲线峰图

3 讨论

探针熔解曲线法是基于 PCR 结合靶序列与探针杂交后熔点发生变化而对突变基因进行快速检测的方法,该法具有操作省时、高通量、避免污染、结果分析直观,易于判断等优点,已用于 β -地贫、G6PD 缺乏症等遗传病的突变基因及结核分枝杆菌耐药基因型的检测^[6-10]。

本研究以盲法方式对探针熔解曲线法检测中国人常见的 3 种 α^T 进行了临床应用价值的评估。与 RDB 结合 DNA 测序方法比较,其特异度、灵敏度、阴性预测值、阳性预测值和诊断符合率均达到了 100%。这说明该方法能对 Hb WS、Hb CS 和 Hb QS 的杂合子、纯合子、复合缺失型 α -地贫(包括--SEA, - $\alpha^{4.2}$ 和 - $\alpha^{3.7}$)以及双重杂合子等 α^T -地贫基因型均能准确检出,因此,可作为 RDB 检测 α^T -地贫基因的替代或验证技术。此外,与 RDB 法相比较,探针熔解曲线有如下优点:(1)操作简便快速,无需对 PCR 产物进行鉴定及分子杂交,整个过程在 2h 内完成。(2)闭管操作避免了潜在的 PCR 产物的污染,探针熔解曲线法经 PCR 扩增后直接进行熔解曲线分析,无需对 PCR 产物进行后处理,因而避免了 PCR 产物开盖操作可能造成的实验室污染。(3)结果判断直观、客观,探针熔解曲线法可根据突变型的 T_m 值及与野生型的 T_m 差值即 ΔT_m ($\Delta T_m = T_m$ (野生) - T_m (突变))即能对突变类型进行准确判断,更为直观和客观。而 RDB 法则是通过最后膜条上的杂交斑点显色的有无来进行结果判断,具有一定的主观性。且出现非特异性显色或颜色较浅时,可造成结果难于判断。

但该法也存在以下不足:(1)需要特殊的具有熔解曲线分析功能的 PCR 仪如 Bio-Rad CFX96, Roche LC480 等,设备昂贵,因而难以在一些基层医疗机构广泛使用。(2)对 DNA 的质量要求高,因此,在进行 PCR 反应前,必须对待检 DNA 样品进行质量鉴定和浓度调整。(3)由于该法可检测探针覆盖区域的序列,故可能检测到 3 种突变以外的突变类型,但无法确认是何种突变,需进一步通过 DNA 测序得以鉴定。由于基因多

态性或存在同义突变的情况,因此也可能误判为这 3 种突变中的一种。此外在结果判断时还应注意的是当 Hb WS、Hb CS 和 Hb QS 复合--SEA 和- $\alpha^{4.2}$ 缺失型 α -地贫时,只有突变型峰而无野生型峰。这是因为中国人群常见的 3 种 α^T 突变发生在一条染色体上的 α_2 基因上,而--SEA 和- $\alpha^{4.2}$ 缺失型 α -地贫是缺失了一对染色体中的另一条染色体上的一个 α_2 等位基因,故该情况下检测的只有一个 α_2 等位基因上的突变,因此常被误判为纯合突变型。有鉴于此,在判读结果时一定要结合缺失型 α -地贫的基因型,最好还要综合地贫血液学表型检测结果,才能得出准确可靠的结论。

高分辨熔解曲线法检测常见 3 种 α^T ^[11],具有快速、防污染、高通量、低成本的优点。但由于 Hb QS、Hb CS 和 Hb WS 复合不同的缺失型 α -地贫时,其 T_m 值发生变化,从而引起熔解曲线的改变,导致结果难以判读。该法还由于引物设计、产物长度、突变位置等因素的影响,也会降低其分辨能力,而造成不同的基因型无法区分。而探针溶解曲线使用了与靶序列互补的探针,提高了该方法的特异性,结果直观,判读简便。

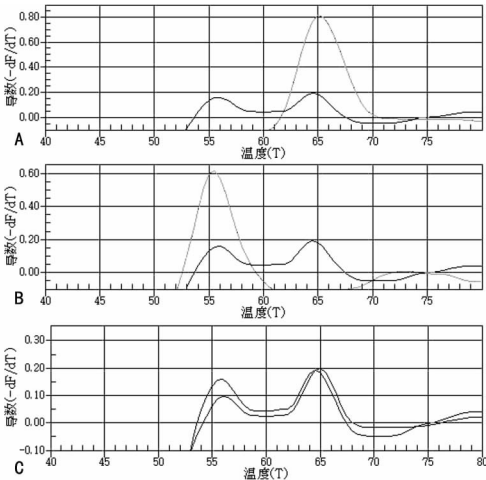
从流行病学角度分析 α^T -地贫携带率并不低,由于一些 α^T 杂合子--SEA 携带者婚育时可产生致死或致残的疾病。因此,应用简便快速、准确可靠的方法筛出 α^T -地贫具有重要的临床意义。此外,对于产前诊断来说,需要采用 2 种不同技术原理的方法相互验证检测结果以防止出现技术风险^[12],那么探针熔解曲线法也是一种理想的选择。

参考文献

[1] 肖维威,徐湘民,徐铃. 中国人缺失型 α 地贫的分子基础及产前基因诊断[J]. 第一军医大学学报,1998,18(1):68-72.
[2] 陈萍,朱春江,徐湘民. 基因突变与地中海贫血//徐湘民主编. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 1 版. 北京:人民军医出版社,2011:16-18.
[3] Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassemia[J]. (下转第 2012 页)

续表 1 高凝组 and 对照组 MTHFR 基因多态性分布情况[n(%)]

MTHFR	高凝组(n=50)	对照组(n=44)
C	49(49.0)	61(69.3)
T	51(51.0)	27(30.4)



A: C/C 型; B: T/T 型; C: C/T 型。
图 1 PCR-溶解曲线法检测 MTHFR C677T 基因多态性结果

3 讨 论

正常妊娠期血液的高凝状态是维持和保护正常妊娠的重要因素之一,但异常高凝状态是引发各种产科并发症的潜在危险,特别是孕期中如合并妊娠高血压综合征、胎盘早剥、羊水栓塞、产后出血等病理因素则因血液的高凝状态更趋于严重,凝血与纤溶系统间的动态平衡受到破坏,凝血功能障碍,而易导致弥散性血管内凝血(DIC)等严重并发症,危急生命。

MTHFR 基因是最常见导致凝血增强的基因。MTHFR 基因 C677T 位点突变已被证实与动静脉血栓形成、神经管畸形、胎盘早剥、先兆子痫以及复发性流产等有关。本研究发现孕妇异常高凝状态与 MTHFR 基因 C677T 位点多态性有关,异常高凝组野生纯合型 CC 基因型表达频率显著降低($P>0.05$),T 等位基因表达频率显著增大($P>0.05$)。MTHFR 基因产物主要是调节半胱氨酸和四氢叶酸的代谢关键酶,通过转硫途径和再甲基化途径降低半胱氨酸血浓度。MTHFR 基因 C677T 突变位于 MTHFR 的催化区域,其多态性碱基变化

导致酶活性和酶的耐热性下降,当该位点由野生纯合型(CC)转变为杂合型(CT)时,酶活仅剩 60%,转变为突变纯合型(TT)时,酶活仅剩 30%。酶活性降低后导致的高半胱氨酸血症易造成血管内皮细胞损伤,增加血栓形成。

产科出血和血栓形成与妊娠期的血栓前状态和凝血异常密切相关,通过筛查凝血基因多态性对于早期诊断、判别妊娠期和妊娠并发症患者的血栓前状态、凝血异常及微循环障碍,识别前 pre-DIC 状态,改善患者预后具有很大的临床意义,同时这也是该领域的重点和难点之一。有理由推测,具有 MTHFR 基因 C677T 突变的孕产妇,体内产生高半胱氨酸血症,损伤血管内皮细胞,影响胎盘部位的血管网路形成;而该时段体内多种凝血因子含量及活性增加、抗凝物质减少、纤溶活性降低导致的高凝状态与血管内皮损伤产生协同作用,更进一步促进血栓形成,增加产后出血风险。另外,由宫缩乏力等病因导致的产后出血控制不佳时,具有遗传性血凝的孕产妇更易发生继发性凝血功能障碍,易加重产后出血的发生。这方面的研究本课题组正着手深入探讨。

参考文献

[1] Patrick Thornton. Coagulation in pregnancy[J]. Clinical Obstetrics and Gynaecology, 2010, 24(3): 339-352.

[2] 龚波,章莉,戴云,等. 正常妊娠妇女血栓弹力图参考范围的建立[J]. 诊断学理论与实践, 2012, 5(4): 490-493.

[3] 汪希鹏,林其德,洪燕,等. 原因不明复发性流产遗传性凝血因素研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2006, 26(12): 1361-1364.

[4] Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2003, 16(14): 153-168.

[5] 丁虹,朱付凡. 妊娠期血液高凝状态与产科并发症[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(6): 643-645

[6] Li X, Luo YL, Zhang QH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T, A1298C polymorphisms and pre-eclampsia risk: a meta-analysis[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(53): 5435-5448.

[7] Gebhardt GS, Scholtz CL, Hillermann R, et al. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001, 97(2): 174-177.

(收稿日期: 2015-02-15)

(上接第 2010 页)

Orphanet J Rare Dis, 2010, 28(1): 13-15.

[4] Yin XL, Zhang XH, Zhou TH, et al. Hemoglobin H disease in Guangxi province, Southern China: Clinical review of 357 patients [J]. Acta Haematol, 2010, 124(1): 86-91.

[5] 毛江洪,霍晓春. α -地中海贫血的研究现状[J]. 实用临床医学, 2005, 6(3): 134-136.

[6] Xiong F, Huang QY, Chen XY, et al. A Melting curve analysis-based PCR Assay for one-step genotyping of β -thalassemia mutations[J]. JMD, 2011, 13(4): 427-435.

[7] 肖奇志,周玉球,谢建红,等. 基于实时荧光 PCR 的探针熔解曲线分析技术和反向点杂交技术应用于 β -地中海贫血基因诊断与产前诊断的对比研究[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 413-417.

[8] 严提珍,罗世强,唐宁,等. 实时荧光 PCR 熔解曲线法在 β -地中海贫血基因诊断和产前诊断中的临床应用评价[J]. 中华检验医学

杂志, 2012, 35(5): 407-412.

[9] 严提珍,钟青燕,唐宁,等. 多色探针荧光 PCR 熔解曲线法在 G6PD 基因突变检测中的临床应用评价[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(2): 156-162.

[10] 高旭,李静,柳清云,等. 异质性耐药对结核分枝杆菌表型和基因型耐药检测结果的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(4): 260-265.

[11] 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.

[12] 周玉球,李莉艳,肖鸽飞,等. 珠海市户籍人群中 α -地中海贫血的分子流行病学调查[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(4): 358-360.

(收稿日期: 2015-02-15)