

• 论 著 •

干血斑标本珠蛋白生成障碍性贫血基因检测方法的建立*

骆明勇, 胡听听, 王继成, 袁腾龙, 张艳霞, 王奕霞, 杜 丽, 梁驹卿, 尹爱华[△]

(广东省妇幼保健院医学遗传中心/广东省妇幼代谢与遗传病重点实验室, 广东广州 511442)

摘 要:目的 建立并优化干血斑标本基因组 DNA 提取方法和流程, 以适用于临床进行珠蛋白生成障碍性贫血(又称地中海贫血, 以下简称“地贫”)基因诊断, 并对干血斑打孔标本间可能的交叉污染和保存的稳定性进行分析。方法 收集 150 份血液标本制备干血斑后, 采用打孔仪打孔, 用洗脱裂解液对血斑进行洗脱, 并对洗脱方法进行优化, 采用磁珠法提取血斑 DNA, 再进行地贫基因检测, 判断干血斑和全血的地贫基因检测结果是否相符。干血斑采用 2 种地贫基因检测方法进行检测, 以验证其是否适用于多种方法。地贫阳性标本间打空白孔, 对空白孔进行地贫基因检测确定打孔是否存在交叉污染。将干血斑常温干燥保存 6、9 个月后进行地贫基因检测, 以判断其稳定性。结果 采用 5 个 3 mm 直径的干血斑在 55 ℃ 振荡洗脱 1 h, 可以获得 DNA 浓度 10~20 ng/ μ L(50 μ L DNA 溶解液), DNA 质量好。干血斑和全血的地贫基因检测结果完全一致, 干血斑的 2 种地贫基因检测方法的结果也完全一致。打孔仪连续对干血斑打孔, 地贫基因未检测出交叉污染。干血斑标本存放 6、9 个月 after 依然能够稳定地进行地贫基因检测。结论 干血斑标本可以准确、方便、稳定地进行地贫基因检测, 是地贫基因检测标本转诊的理想方式。

关键词: 珠蛋白生成障碍性贫血; 基因诊断; 干血斑; 基因组 DNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2784-03

Development of a thalassemia gene diagnosis method for dried blood spots*

Luo Mingyong, Hu Tingting, Wang Jicheng, Yuan Tenglong, Zhang Yanxia, Wang Yixia, Du Li, Liang Juqing, Yin Aihua[△]

(Center of Medical Genetics, Guangdong Women and Children Hospital/Maternal and Children

Metabolic-Genetic Key Laboratory of Guangdong, Guangzhou, Guangdong 511442, China)

Abstract: Objective To develop a method for extracting DNA from dried blood spots (DBS) and optimizing the operating procedure, which could be applied to clinical gene diagnosis of thalassemia. And the cross contamination of DBS punching and the storage stability of DBS were studied. **Methods** A total of 150 blood specimens were collected, and DBS were prepared. Circles (3 mm in diameter) were punched in the DBS, and eluted with lysis buffer. The eluting method and operating procedure were optimized. Genomic DNA extracted from the elution solution by magnetic beads, and were performed thalassemia gene test. Finally judging whether the results of DBS and whole blood were consistent. Two methods of thalassemia gene test were used in DBS and the compatibility of DBS processing method was verified. Judging whether there was cross contamination of DBS punching by the thalassemia gene test results of blank hole which were punched in the blank filter paper between thalassemia positive DBS. The DBS storage stability in thalassemia gene test was verified by detecting the DBS which were dry stored at room temperature for 6 and 9 months. **Results** 5 circles (3 mm in diameter) DBS were vibrating eluted at 55 ℃ for 1 hour, the DNA concentration extracted from the elution solution was 10–20 ng/ μ L, which was dissolved in 50 μ L solution, and the DNA quality was good. The thalassemia gene test results of DBS and whole blood were the same, and the DBS results of two thalassemia gene test methods were the same too. The cross contamination of DBS punching was not detected in thalassemia gene test. The DBS which were dry stored at room temperature for 6 and 9 months could be stably performed thalassemia gene test. **Conclusion** DBS could be used to perform thalassemia gene test, which is accurate, convenient and stable. It is an ideal way for specimen referral of thalassemia gene test.

Key words: thalassemia; gene diagnosis; dried blood spots; genomic DNA

珠蛋白生成障碍性贫血(又称地中海贫血, 以下简称“地贫”)是一组由于珠蛋白基因缺失或点突变, 导致血红蛋白珠蛋白肽链合成减少或不能合成所致的遗传性溶血性贫血。全球至少有 3.45 亿人携带地贫致病基因, 东南亚各国、印度次大陆、地中海沿岸、中东、北非和太平洋地区都是该病高发区^[1]。中国长江以南各省区多见, 尤以广西、广东和海南三省最为严重^[1-2]。目前, 地贫实验室诊断方法是在分析红细胞参数和血红蛋白组分的基础上, 对可疑人群进行基因诊断^[3]。地贫基因检测对实验室设备和技术人员要求较高, 在基层单位尚难普及, 只有省级、部分地市级医院和一些独立医学检验机构能开展该项目, 大量的基层单位只能采取标本转诊的方式进行。目前地贫基因诊断主要采用乙二胺四乙酸(EDTA)或复方枸橼

酸钠(ACD)溶液抗凝静脉全血, 采血管的转运存在低温转运不便及容易破损等诸多问题。干血斑是通过采集适量的血液标本滴在滤纸片上并干燥而成, 具有需要标本量少、便于运输等优点, 非常适合血液标本采集和转运, 目前已广泛应用于新生儿筛查项目^[4], 但在地贫基因检测方面还较少应用。本研究拟建立一种干血斑标本基因组 DNA 提取方法和流程以适用于临床进行地贫基因检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Whatman 903 滤纸片、广州美基磁珠法血液 DNA 提取试剂盒、厦门致善核酸分离试剂盒、地贫基因检测试剂盒(gap-PCR 法和 PCR-反向点杂交法)由深圳亚能生物有限公司提供, α 和 β 地贫基因检测试剂盒(PCR-杂交法, 液相

芯片法)由北京现代高达公司提供。Thergane DBS P201 打孔仪由广州蓝勃生物有限公司提供,恒温空气浴摇床由上海智域有限公司提供, NanoDrop 2000 分光光度计由美国 ThermoFisher 公司生产, 9700 PCR 仪由美国 ABI 公司提供, 杂交仪由美国 ThermoFisher 公司提供, 水浴箱由上海齐欣有限公司提供, PlexBio MA100 液相芯片工作站由台湾博臻有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 150 份血液标本来自广东省妇幼保健院医学遗传中心实验室,为进行地贫基因检测的 ACD 抗凝标本。每份标本先采用全血进行地贫基因检测确定基因型后,再选取各种基因型的地贫阳性标本和阴性标本分别制备干血斑。

1.2.2 干血斑的制备与保存 用移液器取上述血液标本自然下落滴在 Whatman 903 滤纸片上(大约 50 μL),每个血斑直径大于 8 mm,且滤纸两面充分渗透,无污染。室温下自然干燥,晾干后单张血纸片独立放入自封袋内,室温干燥保存。

1.2.3 基因组 DNA 的提取 全血标本的基因组 DNA 提取采用厦门致善核酸分离试剂盒,操作按照试剂盒说明进行。干血斑 DNA 提取采用广州美基磁珠法血液 DNA 提取试剂盒,每个干血斑标本分别打取 3 mm 直径的圆片于深孔板中,每份标本加入 200 μL ATL 缓冲液和 20 μL 蛋白酶 K,在恒温空气浴摇床 55 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱,然后加入 AL 缓冲液,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。将洗脱液转移到新的深孔板中进行后续的基因组 DNA 提取,最后用 50 μL DNA 溶解液溶解 DNA。采用 NanoDrop 2000 分光光度计进行核酸浓度和纯度分析,琼脂糖电泳观察基因组 DNA 的完整性。

1.2.4 测定不同数量干血斑提取 DNA 的量 对使用不同数量 3 mm 直径干血斑提取基因组 DNA 的量进行比较,确定干血斑标本进行地贫基因检测的最低血斑用量。每种数量的干血斑提取基因组试验重复 10 次。分别使用 1、3、5、8、10 个圆纸片进行试验。

1.2.5 地贫基因检测 全血标本地贫基因检测采用深圳亚能生物试剂盒进行,试验操作严格按照试剂盒说明书进行。干血斑标本地贫基因检测同样采用深圳亚能生物的试剂盒检测,另外还采用北京现代高达的液相芯片法试剂盒进行地贫基因检测,以确定是否干血斑标本处理方法适用于不同的地贫基因检测。试验操作严格按照仪器和试剂盒说明进行。

1.2.6 干血斑打孔交叉污染分析 为确定用打孔仪连续对干血斑标本打孔是否存在标本间交叉污染,采用在每份地贫阳性干血斑标本(包括各种地贫基因型)间打空白滤纸作为空白孔,最后将每个空白孔分别进行地贫基因检测,根据结果判断标本间连续打孔是否存在交叉污染。分别在不同日期重复 3 次试验。另外采用连续对 5 个同一基因型的地贫阳性标本打孔后,再对一个阴性标本打孔,将阴性标本进行地贫基因检测,根据地贫基因检测结果确定阳性标本多次重复打孔是否对阴性标本产生交叉污染。分别进行 5 种基因型地贫阳性标本的重复试验。

1.2.7 干血斑标本地贫基因检测稳定性试验 将 20 份地贫阳性和 10 份地贫阴性干血斑标本放置于室温干燥器中,分别在 6 个月和 9 个月进行打孔、DNA 提取和地贫基因检测,评价采用干血斑标本进行地贫基因检测时其保存的稳定性。

1.3 统计学处理 采用 Excel2007 对数据进行记录、处理、分析。

2 结果

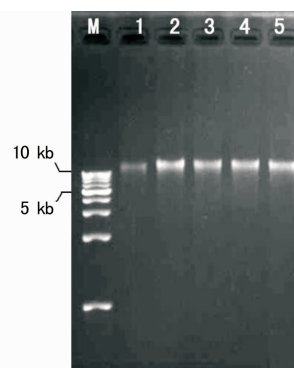
2.1 地贫基因检测结果 150 份标本中地贫基因检测阴性标本 50 份,地贫基因阳性标本 100 份,共覆盖 20 种常见突变基

因型,每种基因型 5 份标本。地贫阳性标本基因型包括:东南亚型、3.7 和 4.2 3 种缺失型 α -地贫,CS、QS 和 WS 3 种非缺失型 α -地贫,CD41-42(-TCTT)、IVS-II-654(C $\rightarrow$ T)、-28(A $\rightarrow$ G)、CD71-72(+A)、CD17(A $\rightarrow$ T)、-29(A $\rightarrow$ G)、CD43(G $\rightarrow$ T)、 βE (GAG $\rightarrow$ T)、CD14-15(+G)、CD27-28(+C)、IVS-I-1(G $\rightarrow$ T, G $\rightarrow$ A)、IVS-I-5(G $\rightarrow$ C)、Cap + 1(A $\rightarrow$ C)和 Initiation codon(ATG $\rightarrow$ AGG)等 14 种 β -地贫。

2.2 不同数量干血斑提取基因组 DNA 的量 干血斑标本提取基因组 DNA 浓度:同一标本,用 5、8 和 10 个 3 mm 直径圆纸片洗脱后提取 DNA 浓度都在 10~20 ng/ μL (50 μL DNA 溶解液)范围内;用 3 个圆纸片洗脱后提取 DNA 浓度在 10 ng/ μL 以下;用 1 个圆纸片的浓度采用 NanoDrop 2000 分光光度计法测出吸光度(OD)值。后续的 150 份不同地贫基因型的干血斑标本的 DNA 提取都使用 5 个 3 mm 直径圆纸片进行试验。

2.3 干血斑不同洗脱处理方式对提取基因组 DNA 的影响 同样的干血斑洗脱体系采用不同的洗脱方式,包括有 55 $^{\circ}\text{C}$ 静置洗脱和振荡洗脱,洗脱的时间包括 30、60、90、120 min 和过夜。在 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上振荡洗脱的干血斑标本提取的基因组 DNA 的量远大于静置洗脱。振荡洗脱时间 30 min 的干血斑标本提取的基因组 DNA 浓度大部分在 10 ng/ μL 以下,洗脱 60、90、120 min 提取得到的浓度都在 10~20 ng/ μL 范围内,洗脱过夜的部分干血斑样品出现提取的 DNA 质量差或试验失败的现象。

2.4 干血斑标本提取的基因组 DNA 的质量 150 份干血斑标本提取基因组 DNA 后,测得的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 都在 1.8~2.0 范围内,浓度在 10 ng/ μL 以上(50 μL DNA 溶解液),琼脂糖电泳显示 DNA 的完整性也较好,见图 1。



M: DNA 标记物;1~5:干血斑标本。

图 1 干血斑标本提取基因组 DNA 电泳图

2.5 干血斑标本地贫基因检测结果 100 份地贫阳性标本和 50 份地贫阴性标本制备干血斑进行地贫基因检测,与全血的检测结果完全一致。另外干血斑采用了 PCR-RDB 加 gap-PCR 和液相芯片 2 种方法进行检测,结果也完全一致,说明干血斑提取的 DNA 适用于多种地贫基因检测方法。

2.6 干血斑打孔交叉污染分析结果 所有的地贫阳性干血斑标本间打孔的空白孔提取 DNA 后进行了地贫基因检测,所有的空白孔结果均为空白。对 5 个同一种基因型的地贫阳性标本连续打孔后再对一份地贫阴性标本打孔,最后打孔的地贫阴性标本地贫基因结果仍然为阴性,未污染阳性结果。

2.7 干血斑保存稳定性试验 室温干燥条件下,20 份地贫阳性和 10 份地贫阴性干血斑标本放置 6 个月和 9 个月后,打孔提取基因组 DNA 的浓度和质量基本与新鲜标本一致,地贫基因检测结果也全部一致。

3 讨 论

本研究建立了一种采用干血斑进行地贫基因检测的方法,并对干血斑洗脱条件和基因组 DNA 提取方法做了优化。采用此方法可以准确、方便、快捷地进行干血斑标本的地贫基因检测,适用于临床使用的多种地贫基因检测方法。干血斑标本在常温下可以稳定保存,保存 9 个月后依然可以稳定地进行地贫基因检测。该方法为地贫基因检测提供了一种方便的标本采集方式,特别适用于标本采集困难的检测对象,如新生儿,也是基层医院和边远山区的地贫基因标本转诊的理想方式。

干血斑采集血液标本具有很多优点:需要标本量少;便于采集,末梢血即可;占用空间小,无需低温保存,便于运输,快递邮寄即可;血斑干燥后,生物危害性减低。所以干血斑标本采集方式已广泛应用于苯丙酮尿症(PKU),先天性甲状腺功能减低症(CH)等新生儿筛查项目^[4],另外在新生儿 HIV 抗体和核酸^[5-7]、巨细胞病毒(CMV)DNA 等检测中也发挥了重要作用^[8-9]。

一种分子诊断方法是否适用于干血斑标本取决于该方法对核酸浓度(总量)和质量的要求。目前,临床地贫基因检测试剂盒由于其检测体系较为复杂,对核酸的浓度和质量要求较高,生产厂家基本上都没提供干血斑标本的检测方式。保证干血斑提取 DNA 的浓度和质量的关键步骤是干血斑打孔后的洗脱,本研究结果显示,55 ℃振荡洗脱 1 h 可以达到较好的洗脱效果;而洗脱时间太长则容易导致提取的 DNA 质量差或试验失败,这可能与本研究采用磁珠法提取 DNA 有关,由于制备干血斑的滤纸片含有大量纤维素,干血斑浸泡时间长会导致滤纸纤维大量脱落在洗脱液中,对后续磁珠吸附 DNA 的过程造成严重影响,可能导致 DNA 质量差或试验失败。另外,本研究将提取 DNA 用的血斑数量增多,但得到 DNA 的量并没有明显提高,究其原因血纸片洗脱时,在同样体积的洗脱缓冲液中圆纸片越多,洗脱的效率越差;另外滤纸片具有很强的吸水性,圆纸片越多将造成洗脱后上清液的损失量增大。所以,在对干血斑进行基因组 DNA 提取时,一定要结合选取的 DNA 提取方法对干血斑的洗脱方法进行优化。

目前,临床实验室主要采用的都是商品化的 DNA 提取试剂盒,各种不同的试剂盒的 DNA 提取质量和效率有差别。要从干血斑中获得高质量和高浓度的基因组 DNA,试剂盒的选择也非常关键。本研究也采用了多种磁珠法的试剂盒,提取的 DNA 质量差别很大,本研究选用的这种磁珠可以得到高质量的 DNA,并且这种基于磁珠的方法可以应用在自动核酸提取工作站上,大大地提高了干血斑标本提取 DNA 的效率,特别适合大样本批量检测。

干血斑提取 DNA 的第一步是采用打孔设备打下血斑圆纸片,由于打孔设备不是采用一次性刀头,所以需要注意标本间的交叉污染。本研究结果显示,打孔仪在正常使用情况下,

在对不同的干血斑进行连续打孔不会造成标本间的地贫基因检测的交叉污染,这也可能与地贫基因检测灵敏度有关,即使刀头上有少许的滤纸纤维残留,提取 DNA 后也无法检测出来。要防止标本间交叉污染,打孔设备的清洁尤为重要,所以为避免干血斑间的交叉污染,必须对打孔设备经常清洁,并定期维护保证其能正常稳定工作。

近年来,地贫防控工作得到了各级政府的高度重视,在广东、广西和海南等省正在实施政府为主导的地贫防控项目^[10]。由于地贫基因检测在基层单位尚难普及,所以地贫防控中的一项重要工作就是建立地贫基因标本转诊网络。干血斑由于标本采集和运输方便,将是地贫基因标本转诊的首选方式。另外,现在不少单位已在新生儿中采用干血斑进行血红蛋白地贫筛查,对于筛查阳性的标本可以直接采用干血斑进行地贫基因诊断,不用再次采集标本。采用干血斑进行地贫基因检测的方法将在地贫标本转诊网络建设中发挥重要的作用。

参考文献

- [1] 徐湘民.地中海贫血预防控制操作指南[M].北京:人民军医出版社,2011.
- [2] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014, 9(2): 89855.
- [3] 李亚红,梁玉全,岑妙珍,等.地中海贫血基因携带者产前筛查及实验室指标的评价[J].国际检验医学杂志,2007,28(8):673-677.
- [4] 马燮琴,孙文英,李小雅,等.滤纸干血斑新生儿三种遗传代谢病筛查(广州地区初步报)[J].广州医药,1992,23(2):24-27.
- [5] Varnier OE, Lillo FB, Reina S, et al. Whole blood collection on filter paper is an effective means of obtaining samples for human immunodeficiency virus antibody assay[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1988, 4(2): 131-136.
- [6] Evengard B, Ehrnst A, von Sydow M, et al. Effect of heat on extracted HIV viral infectivity and antibody activity using the filter paper technique of blood sampling[J]. AIDS, 1989, 3(9): 591-595.
- [7] Cassol S, Gill MJ, Pilon R, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from dried plasma spots collected on filter paper[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(11): 2795-2801.
- [8] Shibata M, Takano H, Hironaka T, et al. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper[J]. J Virol Methods, 1994, 46(2): 279-285.
- [9] 孟璐璐,王琳琳,窦亚玲,等.巢式 PCR 检测滤纸血片 CMV DNA 方法的建立及评价[J].国际检验医学杂志,2012,33(16):1990-1992.
- [10] 张小庄,冯占春,叶宁.地中海贫血的预防控制[M].北京:人民卫生出版社,2014.

(收稿日期:2015-06-20)

(上接第 2783 页)

HDN 的报道较多,是否有必要同预防抗-D 一样采用 Rh(E) 相容输血有待研究。

参考文献

- [1] 杰夫·丹尼尔.人类血型[M].北京:科学出版社,2007:232.
- [2] 王培华.输血技术学[M].北京:人民卫生出版社,1998:160.
- [3] Marion ER, Ragnhild O, Marsh WL. The clinical significance of alloantibodies of blood group system[J]. Semin Hematol, 2000, 37(2): 197-203.
- [4] 张杰,方晓蕾,禹梅,等. Rh 血型系统在安全输血中的意义[J].河

北医学,2013,19(2):302-304.

- [5] 吴远军,刘兴玲,刘彦慧,等.孕妇 IgG 类红细胞血型不规则抗体对早期诊断 Non-ABO-HDN 的意义[J].中国生物制品学杂志,2007,20(6):406-408.
- [6] 方晓蕾.与丈夫血型不合 O 型和/或 RhD(-) 孕妇产前血型免疫学抗体与 HDN 的关系[J].中国输血杂志,2008,21(2):122-123.
- [7] 陈忠,张莉尼.溶血性输血反应与非 ABO 新生儿溶血病不规则抗体的综合分析[J].临床检验杂志,2001,19(6):377-378.

(收稿日期:2015-05-25)