

• 论 著 •

外周血单个淋巴细胞遗传分析及其在遗传性疾病诊断中的应用*

李 丹,邱 萍,严爱贞,林炎鸿,曾 健,王志红,兰风华[△]
(厦门大学附属东方医院全军检验医学研究所临床遗传与实验医学科,福建福州 350025)

摘 要:**目的** 建立以外周血单个淋巴细胞遗传分析为基础的遗传病诊断方法,为基于单细胞遗传分析实现遗传病诊断的研究奠定基础。**方法** 健康者、遗传病基因携带者外周血经淋巴细胞分离液,连续稀释处理后在体视镜下采用自制装置分离单细胞,对分离细胞行全基因组扩增(WGA)并利用目的基因一代测序评估其对于遗传病的诊断价值。**结果** 该研究实现了β-珠蛋白生成障碍性贫血、法布里病、先天性肾病综合征的准确诊断。**结论** 本研究的单细胞分离技术可快速地分离出单个淋巴细胞,与单细胞 WGA 联合能够实现遗传性疾病的准确诊断,为开展单细胞水平的遗传研究提供了思路。

关键词:淋巴细胞; 手工显微分离; 全基因组扩增; 遗传分析; 遗传病诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.11.009 **中图法分类号:**R394-33

文章编号:1673-4130(2020)11-1318-04 **文献标识码:**A

Genetic analysis of peripheral blood single lymphocyte and its application
in the diagnosis of hereditary diseases*

LI Dan, QIU Ping, YAN Aizhen, LIN Yanhong, ZENG Jian, WANG Zhihong, LAN Fenghua[△]
(Department of Clinical Genetics and Experimental Medicine, Institute of Laboratory Medicine,
Dongfang Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: Objective To establish a genetic diagnosis method based on genetic analysis of single lymphocytes in peripheral blood, and to lay the foundation for the research of genetic disease diagnosis based on single cell genetic analysis. **Methods** The peripheral blood of healthy people and carriers of genetic diseases were treated with lymphocyte separation solution and continuous dilution, then the single cells were isolated by self-made device under stereoscope, and the whole genome amplification (WGA) was performed on the isolated cells, and the diagnostic value of WGA for genetic diseases was evaluated by the first generation sequencing of the target gene. **Results** β-thalassemia, Fabry disease, and congenital nephrotic syndrome were accurately diagnosed in the study. **Conclusion** The self-made device in this study can rapidly isolate single lymphocytes, and the combination of single-cell WGA can achieve accurate diagnosis of hereditary diseases, providing a way of thinking for genetic research at the single-cell level.

Key words: lymphocyte; manual micromanipulation; whole genome amplification; genetic analysis; diagnosis of hereditary diseases

单细胞研究于生物医学研究领域有着重要的意义,其被列为未来最值得关注的研究领域之一。单细胞分离是实现单细胞研究的基础,现有的分离技术有荧光激活细胞分选法、激光捕获显微切割、免疫磁珠法、微流控技术、连续稀释分离法、显微操作分离法等^[1-2]。荧光激活细胞分选法、激光捕获显微切割、微流控技术等需依赖特殊的仪器,分选费用高,难以普及;连续稀释分离法操作简单,但大量存在的空白孔和多细胞孔需要研究人员观察排除,费时费力。本研

究结合稀释法及体视镜下可视化显微操作,意在建立快速、简易、准确的单细胞分离技术,并采用基于多重退火环状循环扩增技术(MALBAC)^[3],旨在获得高覆盖度的单细胞全基因组扩增(WGA)产物,实现遗传性疾病的诊断。

1 材料与方法

1.1 材料 经厦门大学附属东方医院门诊收集 11 例体检健康者,β-珠蛋白生成障碍性贫血(β41-42M/βN 型杂合突变个体)、法布里病(GLA 基因第 601 位

* 基金项目:福建省科技引导性基金项目(2016Y0071)。

作者简介:李丹,女,在读硕士研究生,主要从事基因突变与人类遗传病研究。 [△] 通信作者, E-mail: fhlan@xmu.edu.cn。

本文引用格式:李丹,邱萍,严爱贞,等.外周血单个淋巴细胞遗传分析及其在遗传性疾病诊断中的应用[J].国际检验医学杂志,2020,41

碱基由 T 突变为 G, 杂合突变个体)、先天性肾病综合征(NPHS1 基因第 274 位碱基由 G 突变为 A, 杂合突变个体)携带者(各 1 例, 每例后续均进行 3 次单细胞 WGA)乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝新鲜外周血。

1.2 仪器与试剂 仪器: 自制单细胞分离装置; 体视镜(Leica); 细胞培养皿(BD Falcon); PCR 反应仪(珠海黑马); 凝胶电泳仪、凝胶成像分析仪(北京六一); 台式高速冷冻离心机(珠海黑马)。试剂: 淋巴细胞分离液(Axi-shield); 单细胞 WGA 试剂盒(江苏亿康); PCR-反向点杂交试剂盒(亚能生物); rTaq DNA 聚合酶(Takara)。

1.3 方法

1.3.1 外周血淋巴细胞分离 外周血、PBS 缓冲液等体积(均约 2 mL, 实验所涉及的 PBS 不含 Mg²⁺、Ca²⁺)混匀加入含 3 mL 淋巴细胞分离液于离心管内, 2 000 r/min 20 ℃水平离心 20 min, 吸取分离液与血浆间的白膜层; 吸取液内加入 5 mL PBS 缓冲液混匀, 1 500 r/min 20 ℃水平离心 10 min, 弃上清液; 加入 2 mL 红细胞裂解液孵育 5 min, 500×g 离心 5 min, 弃

裂解液; 加入 5 mL PBS 缓冲液, 1 200 r/min 20 ℃离心 10 min, 弃上清液, 重复操作 1 次; 加入 1 mL PBS 缓冲液重悬, 分离前后分别制备细胞涂片评估分离效果。

1.3.2 单个淋巴细胞分离 细胞培养皿上加 1 μL 细胞重悬液, 补 PBS 形成体积约 7 μL 的液滴。连于自制单细胞分离装置的移液器, 量程调至 60 μL, 在体视镜下自液滴吸取 100~200 个细胞打至培养板空白位置, 补 PBS 形成 7 μL 新液滴; 自新液滴吸取 10~50 个细胞, 打至新的位置并补加 PBS, 如此反复至每个体视镜 80 倍视野仅可见 2~3 个细胞; 将移液器量程调至 30 μL, 在镜下缓慢吸取单个细胞, 吸取到单个细胞后轻推可见单细胞从针口跳出, 将单细胞吸回直接打入灭菌 PCR 反应管。

1.3.3 单细胞 WGA 采用亿康 MALBAC 单细胞 WGA 试剂盒, 严格按照说明书步骤操作, 产物初定量及琼脂糖凝胶电泳后行后续扩增。

1.3.4 一代测序检测目的基因 比较 WGA 产物及对应外周血 DNA 目的基因一代测序结果, 探讨本研究对遗传疾病诊断的价值。所涉及的引物见表 1。

表 1 目的基因扩增所用引物序列

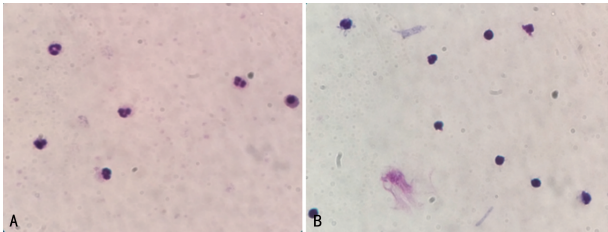
基因(扩增外显子)	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
HBB(Exon 2)	GGT TGG CCA ATC TAC TCC CA	AAG GTG CCC TTG AGG TTG TC
GLA(Exon 4)	CCC TGG ATG ACA GAC TGA AC	GGT GAA ATA AAG GGG AAG AC
NPHS1(Exon 2)	GGA GCT GCG TTG TGG GGT CAG	ATG GAG AGG ATC ACT CTG GGA GAC

PCR 体系如下: 10×缓冲液 2.5 μL, 2.5 μmol/L dNTP 0.8 μL, rTaq 酶 0.2 μL, 模板 1 μL, 纯水 19.5 μL。反应条件: (1) 变性 95 ℃ 3 min。(2) 扩增 95 ℃ 30 s, 相应的退火温度 30 s, 72 ℃ 1 min, 扩增重复 35 个循环(退火温度: HBB 56 ℃; GLA 55 ℃; NPHS1 60 ℃)。HBB、GLA、NPHS1 预计扩增片段长度分别为 519 bp、433 bp、318 bp, 琼脂糖凝胶电泳出现清晰目的条带的产物即送公司测序。

1.3.5 PCR-反向点杂交法验证 HBB 基因杂合突变个体单细胞 WGA 产物行 PCR-反向点杂交法探讨本研究对 β-珠蛋白生成障碍性贫血临床常规诊断的价值, 操作严格按照 PCR-反向点杂交试剂盒说明书进行。

2 结 果

2.1 外周血单个淋巴细胞的分离 淋巴细胞分离液处理前外周血白细胞以分叶核中性粒细胞为主, 平均占比 63%, 分离后淋巴细胞平均占比 94%, 如图 1 所示, 分离效果良好。经红细胞裂解液处理背景红细胞未完全消失, 但为了避免有核细胞的破坏, 无需进一步处理少量存在的背景红细胞。



注: A 为处理前, 以分叶核中性粒细胞为主; B 为处理后, 镜下主要为淋巴细胞。

图 1 淋巴细胞分离液处理前后高倍镜视野下细胞组成(×400 倍, 吉姆萨染色)

2.2 单细胞 WGA 产物 单细胞 WGA 产物的核酸浓度波动于 200~787 ng/μL, 每个反应体系约 67.9 μL, 总核酸量均大于 13 μg, 初步纯度测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 约为 1.4。琼脂糖凝胶电泳示所有样本均扩增成功, 产物的片段长度为 250~2 000 bp, 与说明书片段参考范围基本一致。见图 2。

2.3 目的基因的扩增成功率 以单细胞 WGA 产物为模板分别扩增目的基因 HBB、GLA、NPHS1, 琼脂糖凝胶电泳示扩增成功率为 100%, 但某些样本扩增时会出现非特异性条带、目的条带较浅的情况。见图 3、4。

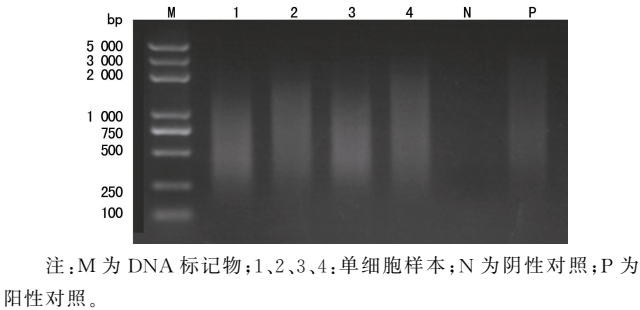


图 2 部分样本单细胞 WGA 电泳图

2.4 目的基因一代测序 健康者 WGA 产物目的基因测序结果与 genebank 登入的目的基因序列一致，

携带者 WGA 产物目的基因测序则能够准确显示发生突变的位点，但与外周血 DNA 目的基因测序相比，单细胞 WGA 产物目的基因测序干扰较大，易引入突变。

2.5 β -珠蛋白生成障碍性贫血 PCR-反向点杂交 HBB 基因发生 CD41/42 杂合突变的个体单细胞 WGA 产物除了利用一代测序进行珠蛋白生成障碍性贫血诊断准确性研究外，还利用 PCR-反向点杂交探讨了其对于 β -珠蛋白生成障碍性贫血临床常规诊断的价值，结果显示 WGA 产物可应用于含 CD41/42 突变的 β -珠蛋白生成障碍性贫血常规诊断。

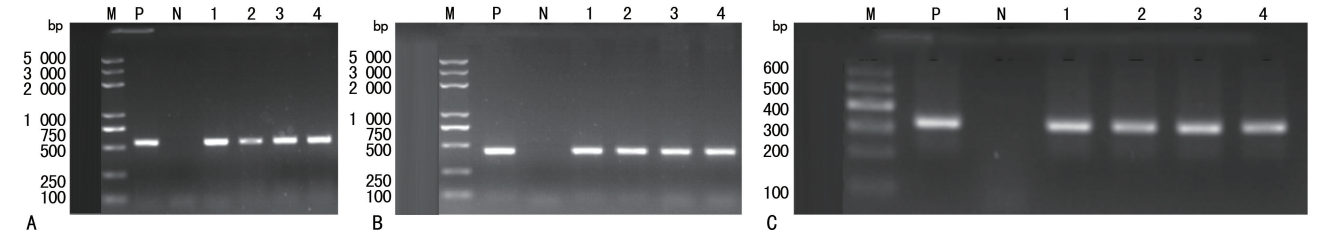


图 3 部分健康对照人群单细胞 WGA 产物目的基因扩增情况

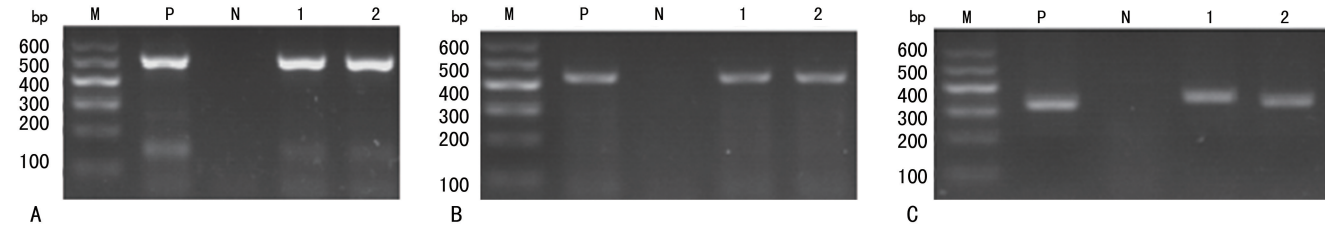


图 4 部分携带者单细胞 WGA 产物目的基因扩增情况

3 讨论

单细胞为生物体最基本的结构和功能单位，单细胞分析可以研究生物体的生长、发育、成熟过程^[4-5]；打破传统细胞生物学的局限，使细胞研究从群体水平向个体水平发展，揭示各组织细胞间异质性的存在^[4,6-7]；单细胞 WGA 及高通量分析技术的发展则突显了微量细胞如宫颈脱落滋养层细胞、母体循环胎儿细胞或者循环肿瘤细胞的临床价值^[8-11]；另外，单细胞分析在微生物研究中也发挥着重要作用^[12]。

本研究利用单细胞分析实现了 β -珠蛋白生成障碍性贫血、法布里病、先天性肾病综合征的诊断。研究采用手工显微操作分离单个淋巴细胞，该分离方法结合了连续稀释法及显微操作法，取材简单，操作简便、直观可行，较连续稀释法更能准确地分离出单个核细胞，且不需要特殊的仪器，易于普及。分离的单个淋巴细胞采用改良的 WGA 方法 MALBAC 进行扩增，该法扩增偏倚较传统方法显著降低，覆盖度可达 93% 以上^[3,13-14]。WGA 产物目的基因的扩增成功率为 100%，经测序鉴定可正确诊断疾病，还可用于 β -珠蛋白生成障碍性贫血临床常规诊断。

值得注意的是，某些 WGA 产物目的基因扩增中会引入非特异性条带，猜想与样本间 WGA 扩增质量的差别、模板纯度低、无法准确统一模板量相关。另外，对目的基因测序中 WGA 产物的干扰要大于外周血 DNA，且易于引入无关突变，可能与 MALBAC 所用的 Taq 聚合酶保真性不高相关^[15]。为了提高对遗传性疾病诊断的可靠性，研究中需进行以下改进：建立相应的方法评估单细胞 WGA 产物扩增质量，纯化扩增产物保证模板质与量，多个单细胞 WGA 结合分析克服扩增方法固有缺陷，正反向测序分析相结合排除假突变。

4 结论

本研究采用单细胞简易手工显微操作分离技术与单细胞 WGA 技术对外周血单个淋巴细胞行遗传分析实现了 3 种遗传病的准确诊断，为更多学者开展单细胞水平的遗传研究如采用单个胎儿体细胞实现产前遗传病诊断提供了思路，但研究还需改进以保证诊断的准确性。

参考文献

[1] YU X, WU N, CHEN F, et al. Engineering(下转第 1325 页)

- 杂志, 2019, 34(1): 114-119.
- [7] SIK K J, BHUMSUK K, SEOG H D, et al. The Prognostic value of albumin-to-alkaline phosphatase ratio before radical radiotherapy in patients with non-metastatic nasopharyngeal carcinoma: a propensity score matching analysis[J]. *Cancer Res Treat*, 2019, 51(4): 1313-1323.
 - [8] 肖艳虹, 伊晟, 李曼, 等. 肺癌相关肿瘤标志物检测的应用进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(6): 776-779.
 - [9] 李云峰, 刘贵林, 徐宝静, 等. CT 影像学检查联合肿瘤标志物检测在肺结核合并肺癌中的诊断效能分析[J]. *中国临床医生杂志*, 2019, 47(7): 789-791.
 - [10] 薛肖雷, 王小梅. 胸腔镜下肺癌根治术对患者血清肿瘤标志物和肺功能的影响[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2019, 26(6): 731-734.
 - [11] 雷宇, 赵洪文. 肺癌相关肿瘤标志物的临床价值及研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2017, 37(2): 166-169.
 - [12] 代雷阳. 常见肿瘤标志物的生物学变异的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2017.
 - [13] 席燕, 王月香. 老年人血清肿瘤标志物表达及影响因素[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(16): 3883-3884.
 - [14] 杨颖, 夏曙, 何肇晴, 等. 血清 CA125、Cyfra21-1 和 VEGF 水平在非小细胞肺癌患者放化疗敏感性和预后评估中的应用价值[J]. *实用癌症杂志*, 2019, 34(6): 940-943.
 - [15] 杨颖, 何肇晴, 李婧, 等. 血清肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值研究[J]. *癌症进展*, 2019, 17(11): 1324-1327.
 - [16] YANG G, XIAO Z, TANG C, et al. Recent advances in biosensor for detection of lung cancer biomarkers[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111416.
 - [17] 牛安琳, 罗艳容, 刘功成, 等. 6 种肿瘤标志物联合检测在辅助肺癌诊断及分型中的应用价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(10): 1235-1237.
 - [18] 何华, 胡诚, 钟田雨, 等. CEA、NSE、CYFRA21-1、ProGRP 联合检测在肺癌诊断中的临床价值[J]. *实验与检验医学*, 2019, 37(3): 435-437.
 - [19] 何焕松, 石红, 邵红, 等. CEA 和 CYFRA21-1 双倍界值在肺癌诊断中的应用价值[J]. *中国医学创新*, 2019, 16(12): 14-18.
 - [20] 田莹莹, 张银铃, 李新, 等. CEA、CYFRA21-1、NSE 联合检测对于肺癌早期诊断的临床价值[J]. *癌症进展*, 2017, 15(10): 1206-1208.
 - [21] 刘钊, 侯吉学, 石永奎, 等. 血清 CA153、CA125、CEA 和 LMR 联合检测在乳腺癌筛查和诊断中的价值[J]. *实用医药杂志*, 2019, 36(6): 490-492.

(收稿日期: 2019-07-10 修回日期: 2019-12-25)

(上接第 1320 页)

- microfluidic chip for circulating tumor cells: from enrichment, release to single cell analysis[J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 117(1): 27-38.
- [2] 李丹, 兰风华. 脱落滋养层细胞在产前诊断中的应用研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(5): 597-600.
 - [3] ZONG C, LU S, CHAPMAN A R, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell[J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1622-1626.
 - [4] CROSET V, TREIBER C D, WADDELL S. Cellular diversity in the Drosophila midbrain revealed by single-cell transcriptomics[J]. *Elife*, 2018, 7(1): 19.
 - [5] TANAY A, REGEV A. Scaling single-cell genomics from phenomenology to mechanism [J]. *Nature*, 2017, 541(7637): 331-338.
 - [6] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1202-1214.
 - [7] TRAPNELL C. Defining cell types and states with single-cell genomics[J]. *Genome Research*, 2015, 25(10): 1491-1498.
 - [8] PAOLILLO C, MU Z, ROSSI G, et al. Detection of activating estrogen receptor gene (esr1) mutations in single circulating tumor cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(20): 6086-6093.
 - [9] JAIN C V, KADAM L, VAN DIJK M, et al. Fetal genome profiling at 5 weeks of gestation after noninvasive isolation of trophoblast cells from the endocervical canal[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(363): 363.
 - [10] HUANG L, MA F, CHAPMAN A, et al. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2015, 16(1): 79-102.
 - [11] BAILEY-HYTHOLT C M, SAYEED S, KRAUS M, et al. A Rapid method for label-free enrichment of rare trophoblast cells from cervical samples [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12115.
 - [12] LABONTE J M, PACHIADAKI M, FERGUSSON E, et al. Single cell genomics-based analysis of gene content and expression of prophages in a diffuse-flow deep-sea hydrothermal system[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1262.
 - [13] LU S, ZONG C, FAN W, et al. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing [J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1627-1630.
 - [14] LOVETT M. The applications of single-cell genomics [J]. *Human Molr Genet*, 2013, 22: 22-26.
 - [15] LASKEN R S. Single-cell sequencing in its prime[J]. *Nature Biotechnol*, 2013, 31(3): 211-212.

(收稿日期: 2019-08-03 修回日期: 2020-01-08)