

• 论 著 •

单分子实时测序在 α 珠蛋白基因三联体及其复合变异等位基因鉴定中的临床应用*

张 宇^{1,2}, 方艳平¹, 朱碧青¹, 梁丽仪², 周万军³, 江凌晓^{1△}

1. 南方医科大学珠江医院检验医学部, 广东广州 510282; 2. 佛山市高明区人民医院检验科, 广东佛山 528500; 3. 南方医科大学医学遗传学教研室, 广东广州 510515

摘要:目的 探究单分子实时测序(SMRT)技术在 α 珠蛋白基因三联体(简称 α 三联体)及其复合变异等位基因鉴定中的临床应用效果。方法 收集 α 三联体阳性样本 36 例, 其中经 PCR-导流杂交技术确认 28 例、经高通量测序(NGS)技术确认 8 例。36 例样本包含 α 三联体复合变异顺式或反式排列未明样本 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 2 例, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $-\alpha^{3.7}$ 10 例, $\text{HK}\alpha\alpha/--^{\text{SEA}}$ 型待确证 2 例, 均采用 SMRT 技术进行地中海贫血(简称地贫)基因检测。另招募一个基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $-\alpha^{3.7}$ 变异病例的家系, 包含先证者(II-1)和其父亲(I-1)、母亲(I-2), 采用 PCR-导流杂交和 SMRT 技术进行地贫基因检测。结果 SMRT 技术检测结果显示, 36 例样本中共检出 35 例 α 三联体, 1 例 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 型 α 珠蛋白基因四联体(简称 α 四联体)。2 例 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 变异样本中 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 与 $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 均为反式排列, 基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/\alpha^{\text{CS}}\alpha$, 10 例 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $-\alpha^{3.7}$ 变异样本中 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 与 $-\alpha^{3.7}$ 为顺式排列样本 9 例, 基因型为 $\text{HK}\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 与 $-\alpha^{3.7}$ 为反式排列样本 1 例, 基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/-\alpha^{3.7}$ 。相较 PCR-导流杂交技术, SMRT 技术多检出 1 例大片段缺失型 β 珠蛋白基因变异和 2 例未知变异, 阳性检出率提高 10.71%(3/28)。家系分析表明, 先证者(II-1) $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 和 $-\alpha^{3.7}$ 变异均遗传自母亲(I-2), 其基因型为 $\text{HK}\alpha\alpha/\alpha\alpha$, 与 SMRT 技术检测结果一致。结论 SMRT 技术不仅能够准确检测 α 三联体、 α 四联体及其复合变异等位基因, 而且具有高准确性、一步到位识别 2 种变异顺式或反式排列、地贫基因变异覆盖全等优势, 具有良好的临床应用价值。

关键词: α 珠蛋白基因三联体; $\text{HK}\alpha\alpha$; 单分子实时测序; PCR-导流杂交技术; 高通量测序

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.01.008 **中图法分类号:** R556.6+1

文章编号: 1673-4130(2025)01-0032-07 **文献标志码:** A

Clinical application of the single-molecule real-time technology for identification of triplicated α -globin genes and compound variant alleles*

ZHANG Yu^{1,2}, FANG Yanping¹, ZHU Biqing¹, LIANG Liyi², ZHOU Wanjun³, JIANG Lingxiao^{1△}

1. Department of Laboratory Medicine, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Gaoming district, Foshan, Guangdong 528500, China; 3. Department of Medical Genetics, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

Abstract: **Objective** To assess the clinical utility of single-molecule real-time technology (SMRT) in identifying triplicated α -globin genes and compound variant alleles. **Methods** A total of 36 samples with triplicated α -globin genes were collected. Among them, 28 samples were confirmed by PCR flow-through hybridization and 8 samples were confirmed by Next Generation Sequencing (NGS). These 36 samples included triplicated α -globin genes compound variants with cis or trans arrangements unknown, such as $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ compound $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ (2 cases), $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ compound $-\alpha^{3.7}$ (10 cases), and $\text{HK}\alpha\alpha/--^{\text{SEA}}$ pending confirmation (2 cases), SMRT technology was employed to detect thalassemia gene variants. Additionally, a pedigree with the genotype of $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ compound $-\alpha^{3.7}$ variant was recruited, including the proband (II-1), its father (I-1), and mother (I-2).

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81972008)。

作者简介: 张宇, 男, 主任技师, 主要从事分子诊断方向研究。△ 通信作者, E-mail: jiang-lingxiao@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20241213.1551.003.html\(2024-12-16\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20241213.1551.003.html(2024-12-16))

2). PCR flow-through hybridization and SMRT were employed to detect thalassemia gene variants. **Results** SMRT detected 35 out of 36 samples with triplicated α -globin genes, and 1 sample with quadrupllicated α -globin genes ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$). Among the 2 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ compound $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ variant samples, both $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ and $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ were arranged in trans, with a genotype of $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/\alpha^{\text{CS}}\alpha$. Among the 10 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ compound $-\alpha^{3.7}$ variant samples, 9 samples had $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ and $-\alpha^{3.7}$ in a cis arrangement, with a genotype of $\text{HK}\alpha\alpha/\alpha\alpha$, and 1 sample had $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ and $-\alpha^{3.7}$ in a trans arrangement, with a genotype of $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/-\alpha^{3.7}$. Compared with PCR flow-through hybridization, SMRT detected one case of a large segment deletion in the β -globin gene and two unknown variants, which led to an increase in the positive detection rate of approximately 10.71% (3/28). The pedigree analysis showed that the proband (II-1) inherited $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ and $-\alpha^{3.7}$ variants from his mother (I-2), with a genotype of $\text{HK}\alpha\alpha/\alpha\alpha$, consistent with the SMRT detection results. **Conclusion** SMRT can accurately detect triplicated or quadrupllicated α -globin genes, and compound variant alleles. It offers high accuracy, enables one-step identification of cis or trans arrangements, and provides comprehensive coverage of thalassemia gene variations, demonstrating its significant clinical value.

Key words: triplicated α -globin genes; $\text{HK}\alpha\alpha$; single-molecule real-time technology; PCR flow-through hybridization; next generation sequencing

地中海贫血(简称地贫),又称珠蛋白生成障碍性贫血,是严重威胁人类健康的致死、致残的常染色体隐性遗传性血液病,其分子病理学机制是由于珠蛋白基因发生缺陷导致珠蛋白肽链合成比例失衡,临床表现为以无效造血和慢性溶血为主的贫血综合征^[1]。珠蛋白基因缺陷大部分为 α 珠蛋白基因缺失和 β 珠蛋白基因点突变,少数为 α 珠蛋白基因非缺失和 β 珠蛋白基因缺失。随着地贫防控的精准化,少见的 α 珠蛋白基因结构变异—— α 珠蛋白基因三联体(简称 α 三联体)及其复合变异也越来越受到临床重视。有研究报道,在广东地区 α 三联体的人群携带率高达 1.99%^[2]。 α 三联体是由于 α 珠蛋白基因簇发生错配和不等交叉互换而形成的结构变异^[3],主要有两种类型: $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}$ 、 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 。 α 三联体复合变异 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $-\alpha^{3.7}$ 由于两种变异顺式或反式排列不同可形成两种基因型:当 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 与 $-\alpha^{3.7}$ 顺式排列时,可在同一条 α 珠蛋白基因链上形成包含 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 和 $-\alpha^{3.7}$ 交叉结的特殊结构变异^[4],即 $\text{HK}\alpha\alpha$ 型等位基因;当 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 与 $-\alpha^{3.7}$ 反式排列时,则形成基因型 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/-\alpha^{3.7}$ 。目前常规地贫基因检测范围未覆盖 α 三联体,易导致 α 三联体漏检,有研究报道, β 地贫患者同时携带 α 三联体时,会加剧 α 与 β 珠蛋白肽链比例的不平衡,导致 β 地贫患者临床表型加重^[5-7],而且由于常规地贫基因检测技术的局限性, $\text{HK}\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 、 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/-\alpha^{3.7}$ 和 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ 会被检出为同一基因型 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$,容易形成误诊。此外,当该三种基因型的配偶为 $\alpha\alpha/--^{\text{SEA}}$ 时,有 1/4 的概率出生 $\text{HK}\alpha\alpha/--^{\text{SEA}}$ 型或 $-\alpha^{3.7}/--^{\text{SEA}}$ 型胎儿,有研究显示 $\text{HK}\alpha\alpha/--^{\text{SEA}}$ 型个体为轻型 α 地贫^[8-9],而 $-\alpha^{3.7}/--^{\text{SEA}}$ 型个体为中间型 α 地贫(即血红蛋白 H 病),部分患者表现为中重度贫血^[10]。因此,常规地贫

基因检测方法容易导致临床医生做出错误的遗传咨询和产前诊断,当前亟须同时覆盖 α 三联体和鉴别两种变异顺式或反式排列的地贫基因检测方法,有效提高 α 三联体及其复合变异等位基因检测的正确率。

本研究收集了 36 例 α 三联体阳性样本并招募了 1 个基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $-\alpha^{3.7}$ 变异病例的家系,采用单分子实时测序(SMRT)技术进行地贫基因检测,探讨 SMRT 技术在 α 三联体及其复合变异等位基因检测中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 α 三联体阳性样本 36 例,其中来源于南方医科大学珠江医院 28 例,为 2023 年 5 月至 2023 年 7 月采用 PCR-导流杂交技术于 2 741 例门诊患者 α 、 β 地贫基因筛查中检出,这些门诊患者 40% 来自广州地区,60% 来自珠江三角洲地区,该 28 例 α 三联体阳性样本包含 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}/\alpha\alpha$ 7 例, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/\alpha\alpha$ 9 例, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}/--^{\text{SEA}}$ 1 例, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/\alpha\alpha$ 复合 β 杂合变异 3 例, α 三联体复合变异顺式或反式排列未明样本 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}$ 复合 $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 1 例, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $-\alpha^{3.7}$ 5 例、 $\text{HK}\alpha\alpha/--^{\text{SEA}}$ 型待确证 2 例;来源于佛山市高明区人民医院 8 例,为 2022 年 1 月至 2023 年 9 月采用高通量测序(NGS)技术于 563 例门诊患者 α 、 β 地贫基因筛查中检出,门诊患者均来源于佛山市高明区,该 8 例 α 三联体阳性样本包含 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}/\alpha\alpha$ 1 例, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}/\alpha\alpha$ 复合 β 杂合变异 1 例, α 三联体复合变异顺式或反式排列未明样本 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}$ 复合 $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 1 例, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $-\alpha^{3.7}$ 5 例。另招募了 1 个基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 复合 $-\alpha^{3.7}$ 变异病例的家系,包含先证者(II-1)和其父亲(I-1)、母亲(I-2)。采用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集所有受试者外周血 2 mL 备检。本研究经医院伦理委

员会审批通过,所有受试者均知情同意。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 全自动核酸提取仪,型号 NP968-C,购自西安天隆科技有限公司;全自动核酸扩增仪,型号 ABI7500,购自美国 ABI 公司;医用核酸分子杂交仪,型号 HB-2012A,购自广州凯普医药科技有限公司;SMRT 测序仪,型号 PacBio Sequel II e,购自美国太平洋生物科技公司;全自动血细胞分析仪 XN-9600 购自日本希森美康株式会社;血红蛋白电泳仪 SEBIA CAPILLARYS 2 购自法国赛比亚公司。

1.2.2 主要试剂 核酸提取或纯化试剂(Ex-DNA 全血基因组)购自西安天隆科技有限公司, α 地贫基因检测试剂盒(PCR-导流杂交法)购自广州凯普医药科技有限公司, β 地贫基因检测试剂盒(PCR-导流杂交法)购自广州凯普医药科技有限公司,核酸提取试剂盒 QIAamp DNA blood mini kit 购自德国 Qiagen 公司,地贫基因检测试剂盒(单分子测序法)购自北京贝瑞和康生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 SMRT 技术地贫基因分析 使用德国 Qia-gen 公司生产的提取试剂盒 QIAamp DNA blood mini kit 进行样本 DNA 提取。将提取的样本 DNA 进行多重长分子 PCR 扩增、长片段扩增文库构建,制备上机文库。然后将 DNA-聚合酶复合物加载到 SMRT 芯片上,在 PacBio Sequel II e 平台上启动测序。数据分析:对 PacBio Sequel II e 测序平台输出的 BAM 文件中原始子读长(subreads)采用 CCS 软件生成循环一致序列 CCS reads。对 CCS reads 进行拆分,并使用 Lima 软件对 barcode 序列进行识别和剪切。之后使用 Split 软件拆分出各个样本并生成单独的 BAM 文件。随后用 pbmm2 软件将剪切 barcode 并过滤后的 CCS reads 与人类参考基因组 hg38 进行比对,以明确获得目标基因片段。以上分析软件均为美国太平洋生物科学公司(Pacific Biosciences)所有。再通过流程的生物信息学算法对结构变异类型进行区分,找出潜在的缺失或重复类型的单体型。针对每一个单体型使用 FreeBayes1.3.4 软件识别单个核苷酸变异及插入缺失变异,利用 reads 长度信息结合

HbVar,Ithamet 和 LOVD 数据库分析大于 50 bp 的变异。样本代表性的 CCS reads 可以在整合基因组学查看器(IGV)中展示并确认致病性变异位点。详细测序和数据分析过程参照文献[11]。

1.3.2 PCR-导流杂交技术地贫基因分析 采用广州凯普医药科技有限公司 PCR-导流杂交地贫基因检测试剂盒,检测 10 种 α 地贫基因和 17 种常见 β 地贫基因,10 种 α 地贫基因包含 5 种缺失型 α 地贫基因($--^{SEA}$ 、 $-\alpha^{3,7}$ 、 $-\alpha^{4,2}$ 、 $--^{FIL}$ 、 $--^{THAI}$)、3 种点突变型 α 地贫基因(α^{CS} 、 α^{QS} 、 α^{WS})和 2 种三联体型 α 地贫基因($\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}$ 、 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$),严格按照说明书进行操作。

1.3.3 血液学表型分析 使用全自动血细胞分析仪 XN-9600 及血红蛋白电泳仪 SEBIA CAPILLARYS 2 进行红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(Hb)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCH)及血红蛋白成分分析。

1.4 统计学处理 使用 Excel 软件进行数据录入、整理,采用描述性方法分析地贫基因检测结果。

2 结 果

2.1 SMRT 技术地贫基因检测结果分析 36 例 α 三联体阳性样本 α 、 β 地贫基因型及 SMRT 技术 α 、 β 地贫基因检测结果见表 1。

2.1.1 36 例样本 α 三联体变异 SMRT 技术检出结果分析 36 例样本包含 $\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}$ 型 α 三联体变异 11 例、 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$ 型 α 三联体变异 25 例。经 SMRT 技术检测显示:11 例 $\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}$ 型 α 三联体变异检测结果一致,25 例 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$ 型 α 三联体检出 24 例 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$ 型 α 三联体、1 例 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$ 型 α 四联体(图 1),其基因型为 $\alpha\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}/\alpha\alpha$ 。

2.1.2 12 例 α 三联体复合变异顺式或反式排列未明样本 SMRT 技术检出结果分析 12 例样本包含: $\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}$ 复合 $\alpha^{CS}\alpha$ 2 例、 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$ 复合 $-\alpha^{3,7}$ 10 例,经 SMRT 技术检测显示:2 例 $\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}$ 复合 $\alpha^{CS}\alpha$ 样本中, $\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}$ 与 $\alpha^{CS}\alpha$ 均为反式排列(图 2),基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}/\alpha^{CS}\alpha$;10 例 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$ 复合 $-\alpha^{3,7}$ 样本中,9 例样本 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$ 与 $-\alpha^{3,7}$ 为顺式排列(图 3),基因型为 $HK\alpha\alpha/\alpha\alpha$,1 例样本 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}$ 与 $-\alpha^{3,7}$ 为反式排列(图 4),基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{anti4,2}/-\alpha^{3,7}$ 。

表 1 36 例样本 SMRT 技术 α 、 β 地贫基因检测结果

序号	PCR-导流杂交/NGS		SMRT		n
	α 基因型	β 基因型	α 基因型	β 基因型	
1	$\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}/\alpha\alpha$	β^N/β^N	$\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}/\alpha\alpha$	β^N/β^N	7
2	$\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}$ 复合 $\alpha^{CS}\alpha^\#$	β^N/β^N	$\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}/\alpha^{CS}\alpha$	β^N/β^N	1
3	$\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}/--^{SEA}$	β^N/β^N	$\alpha\alpha\alpha^{anti3,7}/--^{SEA}$	β^N/β^N	1

续表 136 例样本 SMRT 技术 α、β 地贫基因检测结果

序号	PCR-导流杂交/NGS		SMRT		n
	α 基因型	β 基因型	α 基因型	β 基因型	
4	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^N /β ^N	ααα ^{anti4.2} /HBA2:c.*98T>C	β ^N /β ^N	1
5	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^N /β ^N	ααα ^{anti4.2} /αα	Chinese ^G γ ⁺ (^A γδβ) ⁰	1
6	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^N /β ^N	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^N /β ^N	7
7	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^{CDI7(A>T)} /β ^N	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^{CDI7(A>T)} /β ^N	1
8	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^{IVS II-654(C>T)} /β ^N	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^{IVS II-654(C>T)} /β ^N	1
9	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^{IVS II-654(C>T)} /β ^N	αααα ^{anti4.2} /αα□	β ^{IVS II-654(C>T)} /β ^N	1
10	ααα ^{anti4.2} 复合-α ^{3.7#}	β ^N /β ^N	HKαα/αα	β ^N /β ^N	4
11	ααα ^{anti4.2} 复合-α ^{3.7#}	β ^N /β ^N	HKαα/αα	HBB:c.246C>A	1
12	HKαα/--SEA△	β ^N /β ^N	HKαα/--SEA	β ^N /β ^N	2
13	ααα ^{anti3.7} /αα	β ^N /β ^N	ααα ^{anti3.7} /αα	β ^N /β ^N	1
14	ααα ^{anti3.7} 复合 α ^{CS} α [#]	β ^N /β ^N	ααα ^{anti3.7} /α ^{CS} α	β ^N /β ^N	1
15	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^{28(A>G)} /β ^N	ααα ^{anti4.2} /αα	β ^{28(A>G)} /β ^N	1
16	ααα ^{anti4.2} 复合-α ^{3.7#}	β ^N /β ^N	HKαα/αα	β ^N /β ^N	4
17	ααα ^{anti4.2} 复合-α ^{3.7#}	β ^N /β ^N	ααα ^{anti4.2} /-α ^{3.7}	β ^N /β ^N	1

注：1~12 号为 PCR-导流杂交技术确认样本，13~17 号为 NGS 技术确认样本；[#]表示 α 三联体复合变异顺式或反式排列未明，共 12 例；△表示结果怀疑为 HKαα 杂合，待确证；□表示结果为 α 珠蛋白基因四联体（简称 α 四联体）。

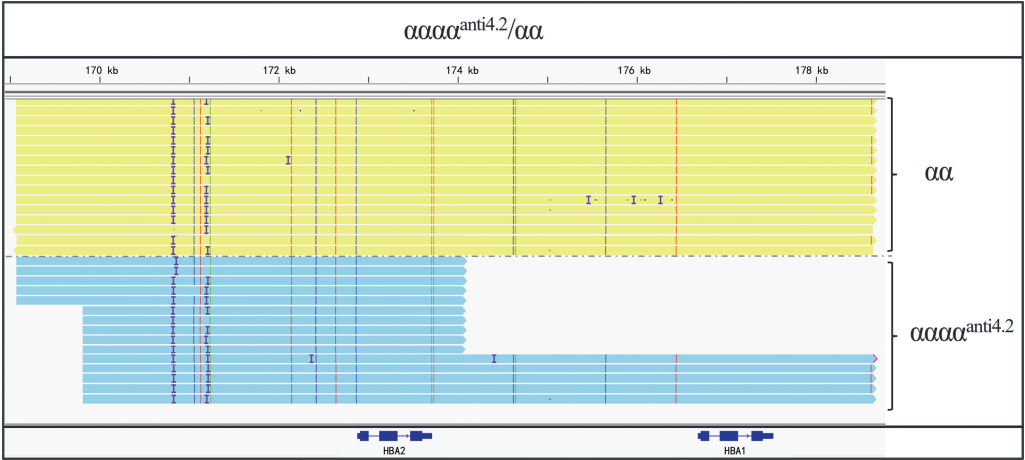


图 1SMRT 技术地贫基因检测结果 IGV 图，基因型为 ααα^{anti4.2}/αα

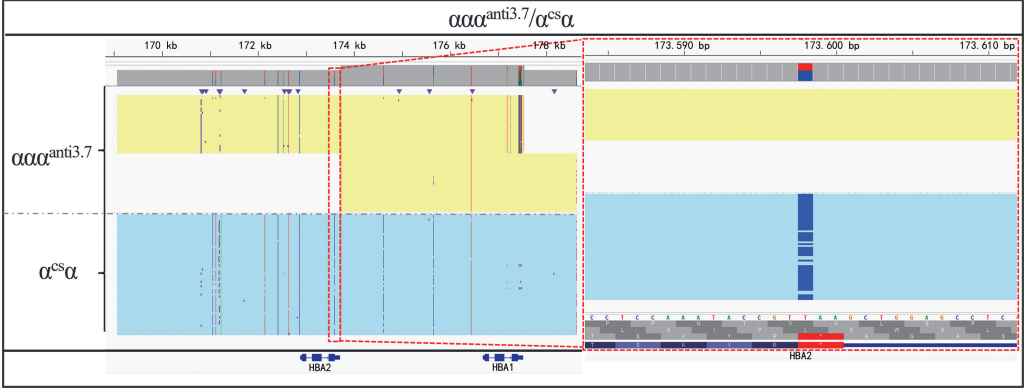


图 2SMRT 技术地贫基因检测结果 IGV 图，ααα^{anti3.7}与 α^{CS}α 为反式排列，基因型为 ααα^{anti3.7}/α^{CS}α

2.1.3 其他变异 SMRT 技术检出结果分析 相较 PCR-导流杂交技术，SMRT 技术多检出 1 例大片段

缺失型 β 珠蛋白基因变异 Chinese^G $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 、2 例未知变异 HBA2:c. * 98T>C 和 HBB:c. 246C>A, 阳性检出率提高 10.71%(3/28)。

2.2 先证者为 $\alpha\alpha^{anti4.2}$ 复合- $\alpha^{3.7}$ 变异的家系分析

2.2.1 家系成员血液学和地贫基因检测结果 家系成员父亲(I-1)、母亲(I-2)和先证者(II-1)血液学指标检测结果均正常。经 PCR-导流杂交技术检测显示:父亲(I-1)基因型为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^N/\beta^N$, 母亲(I-2)基因型为 $\alpha\alpha^{anti4.2}$ 复合- $\alpha^{3.7}, \beta^N/\beta^N$; 经 SMRT 技术检测显示, 父亲(I-1)基因型为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^N/\beta^N$, 母亲(I-2)

基因型为 $HK\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^N/\beta^N$, 先证者(II-1)基因型为 $HK\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^N/\beta^N$ 。血液学指标和地贫基因检测结果见表 2。

2.2.2 地贫基因家系图谱 根据 PCR-导流杂交技术地贫基因检测结果汇总, 绘制该家系的遗传家系图谱(图 5), 图中斜向阴影表示 $\alpha\alpha^{anti4.2}$ 变异, 横向阴影表示- $\alpha^{3.7}$ 变异。由家系图谱可知, 先证者(II-1) $\alpha\alpha^{anti4.2}$ 和- $\alpha^{3.7}$ 变异均遗传自母亲。因此, 先证者(II-1) $\alpha\alpha^{anti4.2}$ 和- $\alpha^{3.7}$ 变异为顺式排列的 $HK\alpha\alpha$ 型, 与 SMRT 技术检测结果一致。

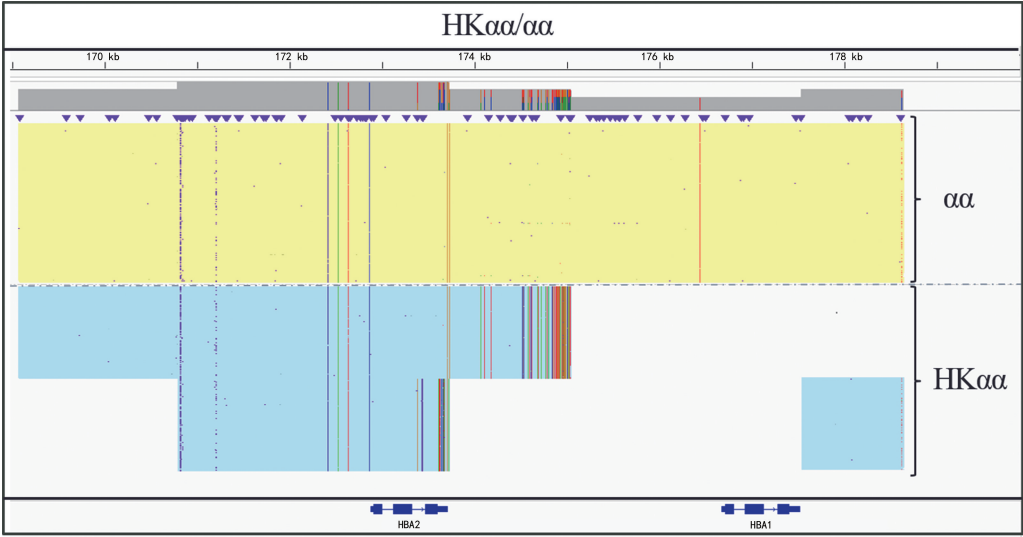


图 3 SMRT 技术地贫基因检测结果 IGV 图, $\alpha\alpha^{anti4.2}$ 与- $\alpha^{3.7}$ 为顺式排列, 基因型为 $HK\alpha\alpha/\alpha\alpha$

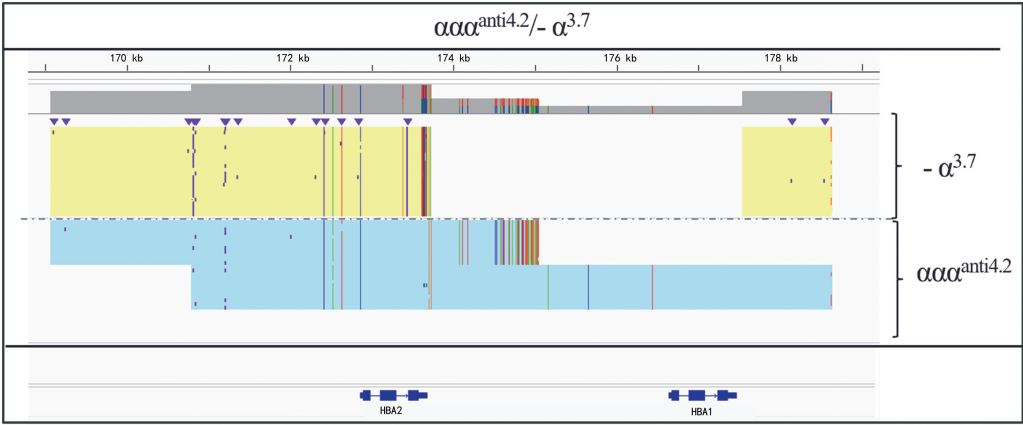


图 4 SMRT 技术地贫基因检测结果 IGV 图, $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ 与- $\alpha^{3.7}$ 为反式排列, 基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}/-\alpha^{3.7}$

表 2 3 例家系样本血液学指标及地贫基因检测结果

序号	性别/ 年龄(岁)	PCR-导流杂交		SMRT		RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA (%)	HbA2 (%)
		α 基因型	β 基因型	α 基因型	β 基因型						
I-1	男/50	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β^N/β^N	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β^N/β^N	5.10	148	89.5	29.7	97.6	2.4
I-2	女/47	$\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ 复合- $\alpha^{3.7\#}$	β^N/β^N	$HK\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β^N/β^N	4.77	149	94.2	31.2	97.3	2.7
II-1	女/22	$\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ 复合- $\alpha^{3.7\#}$	β^N/β^N	$HK\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β^N/β^N	4.40	128	90.9	29.1	97.3	2.7

注: # 表示 α 三合体复合变异顺式或反式排列未明。

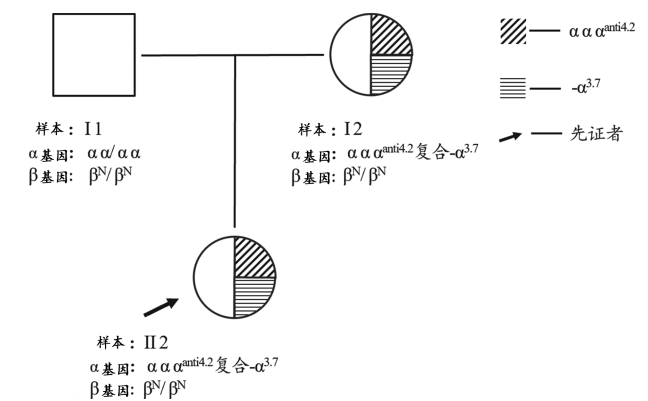


图 5 PCR-导流杂交技术地贫基因检测结果家系图谱

3 讨 论

地贫是全球流行的高发单基因隐性遗传性疾病,在我国主要分布于南方各省。目前地贫尚无理想的治疗方法,临床主要通过规范输血结合铁螯合剂祛铁治疗改善患者的临床症状^[12-13],而高昂的治疗和护理费用给患者本人和家庭及社会都带来了沉重的负担。在地贫防治中,世界各国公认的有效防治策略是在地贫高发地区进行育龄人群地贫携带者筛查和产前基因诊断,避免重度地贫患儿的出生^[14]。因此,准确、高效的地贫基因检测方法是地贫防控成效的关键环节。

SMRT 作为第三代基因测序技术,其具有高通量、长读长、高准确度、无 GC 偏好和单分子分辨率的特点,可实现 DNA 或 RNA 的全长测序和全基因组覆盖,能精准检测各类基因变异,更适合用于遗传病的基因检测^[15]。本研究采用 SMRT 技术对 36 例 α 三联体及其复合变异样本进行测序分析,α 三联体检测结果符合率为 100%,并且纠正一例 ααα^{anti4.2} 型 α 三联体(PCR-导流杂交技术确认)为 αααα^{anti4.2} 型 α 四联体。相较于常规一线地贫基因检测技术如跨越断裂点 PCR(Gap-PCR)和反向点杂交法(PCR-RDB)仅覆盖我国常见的 23 种地贫基因^[16-17],SMRT 技术能准确检出 α 三联体,避免了临床地贫基因检测中 α 三联体的漏检。PCR-导流杂交技术能检出 α 三联体,其检测原理是针对 α 三联体交叉结设计引物,因此,其无法区分 α 三联体和 α 四联体,而 SMRT 技术具有长读长、单分子测序优势,能完整解析同一条 α 珠蛋白基因序列^[11,18],准确识别出 α 四联体。α 四联体是 α 珠蛋白基因特殊结构变异,过多的 α 珠蛋白基因表达会加重 α 与 β 珠蛋白肽链比例的不平衡,该例患者临床表现为中度贫血,与 JIANG 等^[19]报道 α 四联体病例临床表型相近。

在 α 三联体复合变异等位基因鉴定中,有研究报道两轮巢式 PCR 是一种经济有效鉴定 ααα^{anti4.2} 和 -α^{3.7} 顺式或反式排列的检测方法^[20],但是其不能识别其他基因型,且二次扩增时交叉污染的可能性大,实验操作复杂,不利于临床常规开展。此外,家系分析也是复合变异顺式或反式排列鉴定的有效方法,杜丽

等^[21]通过 5 个家系分析成功鉴定 33 例 HKαα 病例,但是家系成员招募较为困难,而且家系分析整体耗时较长。本研究中 12 例复合变异顺式或反式排列未明样本检测结果显示,SMRT 技术可准确鉴定其等位基因,分辨基因型 HKαα/αα、ααα^{anti4.2} / -α^{3.7} 及 ααα^{anti3.7} / α^{CS} α,并且可以直接显示在 IGV 图中。本研究中先证者为 ααα^{anti4.2} 复合 -α^{3.7} 变异的家系分析表明,SMRT 技术检测结果与家系分析结果一致。可见,SMRT 技术在 α 三联体复合变异等位基因鉴定中具有一步到位、便捷高效等优势。此外,SMRT 技术在覆盖常见地贫基因变异的同时还能检出未知变异,提高地贫基因变异检出率。本研究中检出 2 例未知变异 HBA2:c. * 98T>C 和 HBB:c. 246C>A, ClinVar 数据库显示这 2 例未知变异其临床意义不明确,有待更多病例进一步研究。

综上所述,本研究表明 SMRT 技术可一步到位准确鉴定 α 三联体及其复合变异等位基因,无需家系验证,并且同时覆盖其他地贫基因型,能为临床遗传咨询和产前诊断提供快速、准确的地贫基因检测结果。虽然目前 SMRT 技术检测成本相对较高,限制了其大规模应用,但是随着技术的进步和成本的降低,其具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] KATTAMIS A, KWIATKOWSKI J L, AYDINOK Y. Thalassaemia[J]. Lancet, 2022, 399(10343): 2310-2324.
- [2] 魏小凤, 徐湘民, 郭晓玲, 等. 广东人群中 α 珠蛋白基因多拷贝频率分布研究[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(10): 1376-1380.
- [3] GOOSSENS M, DOZY A M, EMBURY S H, et al. Triplicated alpha-globin loci in humans[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77(1): 518-521.
- [4] WANG W, CHAN A Y, CHAN L C, et al. Unusual rearrangement of the alpha-globin gene cluster containing both the alpha^{3.7} and alphaalalpha^{anti4.2} crossover junctions: clinical diagnostic implications and possible mechanisms[J]. Clin Chem, 2005, 51(11): 2167-2170.
- [5] 任振敏, 黄丽兰, 刘四喜, 等. β 地中海贫血合并 α 珠蛋白基因三联体 2 例临床分析[J]. 临床儿科杂志, 2021, 39(5): 338-340.
- [6] PANG D, SHANG X, CAI D, et al. Thalassaemia intermedia caused by coinheritance of a β-thalassaemia mutation and ade novo duplication of α-globin genes in the paternal allele[J]. Bri J Haematol, 2019, 186(4): 620-624.
- [7] MA S K, AU W Y, CHAN A Y, et al. Clinical phenotype of triplicated alpha-globin genes and heterozygosity for beta0-thalassemia in Chinese subjects[J]. Int J Mol Med, 2001, 8(2): 171-175.
- [8] SHANG X, LI Q, CAI R, et al. Molecular characterization and clinical presentation of HKαα and anti-HKαα alleles in southern Chinese subjects[J]. Clin Genetics, 2013, 83(5): 472-476.

(下转第 43 页)

• 论 著 •

第 19 天微小残留病与急性 B 淋巴细胞白血病患儿的预后关系分析

辛 聪, 密 鑫, 潘俞凤, 郭 雷, 王勇超, 高吉照[△]

徐州医科大学附属医院儿科血液与肿瘤病区, 江苏徐州 221006

摘要:目的 探究第 19 天(D19)微小残留病(MRD)与急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)患儿预后的关系及与相关生物学改变的联系。**方法** 统计 2016 年 4 月至 2020 年 4 月于该院初诊且符合入组条件的 88 例 B-ALL 患儿诱导治疗 D19 MRD、总生存(OS)率、无事件生存(EFS)率、染色体核型、融合基因和突变基因,以 MRD $\geq 0.01\%$ 为阳性,将入选儿童分为 MRD 阳性组和 MRD 阴性组,比较两组 3 年 OS 率、EFS 率、免疫表型和分子生物学/细胞遗传学特点。**结果** 88 例患儿 3 年 OS 率和 EFS 率分别为 92.0% 和 86.4%,MRD 阳性组 OS 率及 EFS 率均低于阴性组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MRD 阳性组 CD10 检出率低于 MRD 阴性组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。32 例(36.4%)患儿检出 8 种 35 个融合基因。MRD 阳性组中 BCR-ABL1、E2A-PBX1 检出率均高于 MRD 阴性组,差异有统计学意义($P < 0.05$);48 例(54.5%)患儿检出 41 种 91 个突变基因,余突变基因均 < 5 例;18 例(20.5%)患儿检出异常染色体核型,17 例无核分裂相,正常和异常核型 MRD 无区别。二分类 Logistic 回归分析显示,BCR-ABL1、E2A-PBX1 均是 B-ALL 患儿预后的影响因素($P < 0.05$)。**结论** D19 MRD 阳性是 B-ALL 患儿 OS 和 EFS 不良的影响因素,E2A-PBX1、BCR-ABL1 均对 B-ALL 患儿预后有不良影响。

关键词:急性 B 淋巴细胞白血病; 免疫表型; 微小残留病; 儿童**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2025.01.009**中图法分类号:**R725.5**文章编号:**1673-4130(2025)01-0038-06**文献标志码:**A

**Relationship between minimal residual disease on the 19th day and
prognosis of children with acute B-lymphoblastic leukemia**

XIN Cong, MI Xin, PAN Yusu, GUO Lei, WANG Yongchao, GAO Jizhao[△]

Department of Pediatric Hematology and Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou
Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221006, China

Abstract: **Objective** To explore the relationship between minimal residual disease (MRD) on the 19th day (D19) and prognosis of children with acute B-lymphoblastic leukemia (B-ALL), as well as the correlation with related biological changes. **Methods** A total of 88 children with B-ALL newly diagnosed in this hospital from April 2016 to April 2020 who met the enrollment conditions were analyzed for induction therapy D19 MRD, overall survival (OS) rate, event-free survival (EFS) rate, chromosome karyotype, fusion gene and mutation gene. MRD $\geq 0.01\%$ was considered positive, and they were divided into MRD positive group and MRD negative group. The characteristics of OS rate, EFS rate, immunophenotype and molecular biology/cytogenetics were compared between the two groups over a period of 3 years. **Results** The 3-year OS rate and EFS rate of 88 pediatric patients were 92.0% and 86.4%, respectively. The rates of OS rate and EFS rate in MRD positive group were lower than those in MRD negative group, with statistical significance ($P < 0.05$). The detection rate of CD10 in MRD positive group was lower than that in MRD negative group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Thirty-two patients (36.4%) detected 8 types of 35 fusion genes. The detection rates of BCR-ABL1 and E2A-PBX1 in MRD positive group were higher than those in MRD negative group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Among 48 cases (54.5%) of pediatric patients, 41 types of 91 mutated genes were detected, and the remaining mutated genes were less than 5 cases. Abnormal karyotype was detected in 18 cases (20.5%), and no mitotic phase was detected in 17 cases. There was no difference in MRD between normal and abnormal karyotype. Binary Logistic regression analysis showed that BCR-ABL1 and E2A-PBX1 were prognostic factors of children with B-ALL. **Conclusion** The

作者简介:辛聪,男,医师,主要从事儿童血液与肿瘤方面研究。 [△] 通信作者, E-mail: xz3765595@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20241203.1848.002.html\(2024-12-04\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20241203.1848.002.html(2024-12-04))