

· 综 述 ·

珠蛋白生成障碍性贫血基因检测技术的研究进展*

郭 华, 蓝慧娟 综述, 熊礼宽[△] 审校

(广东省深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室 518000)

关键词: 地中海贫血; 基因; 诊断; 研究

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)10-1090-03

珠蛋白生成障碍性贫血是 1 组溶血性贫血病, 呈现常染色体隐性遗传。可分为 α 和 β 珠蛋白生成障碍性贫血两类, 分别因位于 16 号染色体短臂末端的 α 珠蛋白基因或位于 11 号染色体短臂上的 β 珠蛋白基因缺失、突变等缺陷引起相应珠蛋白链合成受到抑制或功能丧失导致溶血性贫血。其多见于东南亚各国, 包括中国南方各省, 广东、广西为珠蛋白生成障碍性贫血高发区, 统计显示, 广东省中山市 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率 3.07%^[1]; 广西省桂林市 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率为 7.22%^[2]。高水平珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率大大提高了重型珠蛋白生成障碍性贫血患儿出生率, 给社会和家庭带来极大的经济和精神负担。因此, 对人群进行珠蛋白生成障碍性贫血筛查, 对珠蛋白生成障碍性贫血基因携带者进行基因诊断和遗传咨询, 对高危孕妇进行产前诊断, 防止重型珠蛋白生成障碍性贫血患儿出生是应对珠蛋白生成障碍性贫血积极、有效的方法。目前实验室珠蛋白生成障碍性贫血诊断分为筛查法和基因检测法两种, 筛查法用于初步鉴定珠蛋白生成障碍性贫血及珠蛋白生成障碍性贫血类型, 基因诊断用于确诊珠蛋白生成障碍性贫血及珠蛋白生成障碍性贫血基因分型。

1 筛查法

1.1 血常规 珠蛋白生成障碍性贫血重要特征之一是小细胞低色素性贫血, 如平均红细胞体积 (MCV) ≤ 80 fL, 平均红细胞血红蛋白量 (MCH) ≤ 25.0 pg, 则可疑为珠蛋白生成障碍性贫血患者或基因携带者, 可同时测定血清铁和铁蛋白, 以排除缺铁性贫血。

1.2 红细胞渗透脆性实验(一管法) 一管法是目前应用较为广泛的珠蛋白生成障碍性贫血筛查方法。脆性实验具有简单、易行、不需要配备特殊仪器的优点。其原理是珠蛋白生成障碍性贫血红细胞膜对渗透溶解的抗性增加, 在 0.32% (或 0.36%) NaCl 中溶解度降低(脆性降低小于 60%)。

1.3 血红蛋白(Hb)电泳 Hb 电泳是检测珠蛋白生成障碍性贫血、异常 Hb 最常用的方法, 可观察到 HbE、HbH 等异常 Hb 区带, 同时可定量检测 HbF、HbA₂ 含量并区分常见珠蛋白生成障碍性贫血类型。正常参考值: 成年人 HbA₂ 21.5% ~ 3.5%、HbA₁ > 95%、HbF < 2%, 没有异常 Hb 区带出现。Hb 电泳法优点在于操作简便、快速, 可检出高危患儿, 并进行轻、重分型, 利于临床治疗, 且电泳结果能全面检测患者 Hb 异常变化, 利于珠蛋白生成障碍性贫血 α 、 β 复合型及珠蛋白生成障碍性贫血合并异常血红蛋白病患者的病情分析。临床应用于珠蛋白生成障碍性贫血筛查电泳技术为琼脂糖电泳, 其缺点为

对 Hb 变化不明显的轻型患者易产生漏检^[3]。目前已有国内、外学者用毛细管电泳技术对珠蛋白生成障碍性贫血人群进行筛查, 结果显示毛细管电泳比琼脂糖电泳更准确区分各种 Hb 带, 有效降低轻型珠蛋白生成障碍性贫血漏检率^[4-5]。

1.4 高效液相色谱技术(HPLC) HPLC 采用微柱法离子交换层析和梯度洗脱技术, 全自动分析仪可分离血红蛋白的变异体与亚型, 容易发现重型和轻型 β 珠蛋白生成障碍性贫血。HPLC 只需将全血标本直接放入仪器, 通过电脑操作便能实现 HbA、HbA₂、HbF 等定量检测。因此, HPLC 的优点在于所需样本量少, 自动化程度高, 操作简单、快速, 能消除人为误差, 结果准确。目前已有国内、外学者用 HPLC 检测珠蛋白生成障碍性贫血基因, 但发现其应用于珠蛋白生成障碍性贫血检测还具有一定局限性^[6-7]。

2 珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断技术

2.1 跨越断裂位点 PCR 法 跨越断裂位点 PCR 法又称 GAP PCR 法或缺口 PCR 法、裂口 PCR 法, 是针对缺失基因在其断裂点附近上游和下游分别设计正向引物和反向引物, 通过扩增出的 PCR 产物直接确定被检测 DNA 基因型。由于缺失基因片段较长, 因此, 正常无缺失的等位基因片段无法进行基因扩增, 当基因缺失时, 等位基因位置由于缺失靠近, 因而能扩增出中国人常见缺失基因——SEA、- α 4.2、- α 3.7。内对照基因位于常见 3 种缺失基因公共区域, 用以扩增正常 α 珠蛋白等位基因作为正常对照带, 从而能很好地区分正常子、杂合子和纯合子, 故在 1 个反应管中能同时检测中国人群常见 3 种缺失引起的珠蛋白生成障碍性贫血类型。

GAP PCR 法优势在于在单管中进行多重 PCR, 简化了操作步骤, 减少加样次数, 降低污染可能性, 节约样品和试剂, 降低费用。此外, 由于正常基因和缺失基因在同一体系中扩增, 利于 PCR 质量控制, 提高反应体系可靠性, 目前, GAP PCR 是临床应用中检测缺失型 α 贫血主要基因检测方法, 也可用于少见 α 、 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因缺失型研究^[8-9]。

2.2 突变扩增系统 (ARMS) 法 ARMS 法是 PCR 法通过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物扩增带的有无判断突变是否存在, 其关键在于引物设计和 PCR 扩增条件的严谨性。ARMS 法是检测已知突变的简易方法, 已在多种遗传病及多态检测中得到广泛应用, 也被一些国家或地区推广应用于 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因型诊断和产前基因诊断。ARMS 法优点在于省时、经济、简便, 1 次 PCR 电泳后即可观察结果。其缺点是不能一次性检测过多突变位点, Salehi 等^[10] 已用 ARMS 法一次性检测出 14 种常见 β 珠蛋白生成障碍性贫血突变位点, 尽

* 基金项目: 广东省深圳市科技计划项目 (20103340)。

[△] 通讯作者, E-mail: xionglk@yahoo.com.cn。

管如此, ARMS 法目前还不能代替反向斑点膜杂交法应用于临床珠蛋白生成障碍性贫血基因突变检测。

2.3 限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP) PCR-RFLP 标志是发展最早的 DNA 标志技术, 其方法为 PCR 扩增待检片段后, 再用 RFLP 来检测发生在酶切位点的突变。RFLP 可检测由多态性产生的突变类型包括: 碱基突变或倒位、基因缺失、插入。Rahimi 等^[11]应用 PCR-RFLP 联合 ARMS 和基因测序技术检测 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因获得了伊朗人群的 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因表达谱, RFLP 缺点在于操作比较繁琐, 需要进行 DNA 多种酶切、转膜以及探针的制备。

2.4 实时荧光 PCR 技术 实时荧光 PCR 技术可在全封闭状态下完成核酸扩增及产物分析, 既省时、省力又能极大地降低污染率。实时荧光定量 PCR 技术优点在于反应迅速, 信号重复性好, 灵敏度和特异性高, 因此, 其在核酸检测及基因诊断、产前诊断及分子流行病学中具有广阔应用前景。Hung 等^[12]已使用具有荧光共振能量转移杂交探针的实时荧光 PCR 系统进行着床前胚胎遗传学 β 珠蛋白生成障碍性贫血诊断研究。Liu 等^[13]研究 1 种新的 Q 引物实时荧光 PCR 技术检测 3 种 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因突变, 并与方向斑点膜杂交法进行对比, 显示两种方法结果一致。

2.5 DNA 序列测定法 PCR 产物经过克隆后测序或直接对 PCR 产物进行测序是所有进行基因突变检测方法中最灵敏、最直接、最全面的方法, 不仅可以确定突变部位, 还可以确定突变性质, 尤以循环测序法最具代表性, 该方法以 TaqDNA 聚合酶代替测序酶。测序反应通过多次变性、退火、延伸来完成, 具有快速、简便、灵敏等优点。故 DNA 序列测定法常用于突变检验中验证、确认以及新基因鉴定的标准方法。鉴于珠蛋白生成障碍性贫血遗传高度变异性, 世界各地不断有新的珠蛋白生成障碍性贫血基因型报道, 其鉴定方法均为 DNA 测序法^[14-15]。但是 DNA 序列测定法操作繁琐, 所需仪器设备昂贵, 极大地限制了其在临床诊断中的应用。

2.6 变性高效液相色谱技术(DHPLC) 近年来迅速发展的 DHPLC 是 1 种新型基因突变筛查和检测技术, 能自动化、高通量进行检测, 除 PCR 之外, 不需进行 PCR 引物修饰、购买特殊试剂、检测标志信号或其他的样品处理。DHPLC 已被证明是 1 种精确、高效、经济、高通量、自动化的检测已知点突变及筛查未知突变的方法, 其敏感性和特异性可达 96%~100%。另外, 若同时选多个温度条件进行分析还能进一步增加 DHPLC 变异检出率。Liu 等^[16]采用多重 PCR 扩增非缺失型珠蛋白生成障碍性贫血患者基因后, 用 DHPLC 检测其基因类型, 结果证明 HbCS、HbQS、HbWS 等突变均能准确检出, 因 DHPLC 高度自动化, 可自动取样, 检测每个样品只需要 8 min 左右, 故认为此法可用于突变检测的大范围普查。

2.7 高分辨溶解曲线分析系统(HRM 或 HRMA) HRM 或 HRMA 技术即高分辨溶解曲线分析技术, 是近年国外兴起的 1 种全新突变扫描和基因分型的遗传分析方法。HRMA 特点是高特异性和高灵敏度, 检测灵敏度可达到 0.1%~1.0%。在大样本、多突变位点筛查上, 比传统非均一性方法更方便、性价比更高, 相比定量探针法突变分析和其他类型快速突变分析法, 应用面更广, 成本更低, 因而成为近年来国外新兴的遗传学、方法学研究和应用热点。Li 等^[17]应用 HRMA 法检测分析中国人常见的 3 种非缺失型珠蛋白生成障碍性贫血 HbCS、HbQS、HbWS 突变, 结果证明 HRMA 具有较高灵敏度。Sirichotiyakul 等^[18]结合荧光实时 GAP PCR 法将 HRMA 应用于

珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断, 检测 33 份绒毛膜绒毛样本 DNA 正常等位基因和 -SEA 等位样本, 结果与常规 GAP PCR 法检测结果一致, 并发现具有母体污染样本与未污染杂合子样本峰图相似, 但两者在正常等位基因峰形上具有显著差别。因此认为, HRMA 法是检测 α 珠蛋白生成障碍性贫血的可行方法, 特别在产前诊断提示母血污染方面具有巨大潜力。

2.8 基因芯片法 基因芯片法应用于珠蛋白生成障碍性贫血检测的基本原理是通过 PCR 扩增珠蛋白生成障碍性贫血突变或缺失位点所在的 DNA 片段并标志上荧光探针, 带有荧光探针的 DNA 片段与芯片表面的野生型和突变型探针在一定温度下进行杂交。在野生型纯合子的情况下, 只有野生型探针显示荧光信号; 突变型和野生型杂合子情况下, 突变型和野生型探针显示相近的荧光信号; 突变型纯合子情况下, 只有突变型探针显示荧光信号。基因芯片诊断具备高效、敏感、平行化、自动化、高通量等特点, 能快速、准确地从分子水平诊断疾病, 特别是在珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断方面具有广阔应用前景。目前已有不少研究单位或企业在这方面进行了一些有益尝试, 取得了一定进展, 但是由于受各种因素的制约, 该技术目前广泛应用于临床还有一定困难。

2.9 反向斑点膜杂交法(RDB) RDB 法优点是在 1 次杂交反应中, 可同时检测样品中几种核酸。同一种样品经不同倍数稀释, 还可以得到半定量结果。因此, RDB 法是 1 种简便、快速、经济的分析 DNA 方法, 在基因分析和基因诊断中得到广泛应用。RDB 法能很好区分不同珠蛋白生成障碍性贫血点突变, 最初 RDB 法膜条制备时间长、杂交操作繁杂、需要巢式扩增, 随着科学法不断发展, 目前膜杂交技术很多问题都得到很好解决, 其在临床上的应用日益普及。

Yang 和 Li^[19]采用缺口 PCR 法和 RDB 法检测并报道了 2 例产前诊断检查中发现的胎儿非缺失型 HbH 病。非缺失型 HbH 病往往比缺失型 Hb 病贫血症状更严重, 更具有代表性, 也更加需要频繁地输血。因此, 非缺失型 HbH 病的产前诊断具有重大的意义。Pichanun 等^[20]采用针对 Hb CS、Hb Paksé 的特异性探针进行 RDB 法检测 587 份泰国人血样, 检测结果显示 Hb CS 和 Hb Paksé 发生率分别为 5.80% 和 0.51%, 其结果准确、速度快、成本低。

3 珠蛋白生成障碍性贫血基因检测技术研究现状分析

珠蛋白生成障碍性贫血是 1 种影响极大的遗传性疾病, 虽然经过二三十年的努力, 已在中国南方几个珠蛋白生成障碍性贫血高发区建立了防治筛查体系, 但每年仍有不少重型珠蛋白生成障碍性贫血患儿出生, 需要靠不断输血和除铁治疗, 给社会和家庭带来极大负担。只有通过加强珠蛋白生成障碍性贫血筛查和监控, 才能防止重型珠蛋白生成障碍性贫血患儿出生。目前, 珠蛋白生成障碍性贫血检测仍存在漏检现象, 除医疗条件限制外主要有以下 3 个原因: (1) 轻型患者血液学检查无明显变化(即 MCV 无变化)导致漏诊, 2 个轻型珠蛋白生成障碍性贫血产出重型珠蛋白生成障碍性贫血患儿概率为 1/4。(2) 医师通常会根据 Hb 电泳 HbA₂ 值初步判断 α 、 β 珠蛋白生成障碍性贫血类型, 但由于 α 、 β 复合型珠蛋白生成障碍性贫血患者仅表现出 β 珠蛋白生成障碍性贫血特征, 除进行基因检测, 目前尚无其他实验方法发现是否合并 α 珠蛋白生成障碍性贫血, 因此很容易导致 α 、 β 复合型珠蛋白生成障碍性贫血基因携带者漏诊。(3) 罕见基因型珠蛋白生成障碍性贫血漏检。目前珠蛋白生成障碍性贫血基因检测方法为缺失型 α 珠蛋白生成障碍性贫血, 采用跨越断裂位点 PCR 法, 检测中国常见 3 种

缺失;东南亚缺失(--SEA)、右缺失(- α 3.7)、左缺失(- α 4.2); RDB 检测中国人常见非缺失型 α 珠蛋白生成障碍性贫血 3 个突变位点(WS、QS、CS)和 β 珠蛋白生成障碍性贫血 17 个突变位点。其缺点在于只能对有限的珠蛋白生成障碍性贫血基因型进行检测,罕见珠蛋白生成障碍性贫血基因型漏检,特别是中国人群因泰国缺失型或菲律宾缺失型漏检导致巴氏水肿胎儿出生^[21]。而在人口流动频繁的广东省,珠蛋白生成障碍性贫血基因表达谱更多元化,罕见珠蛋白生成障碍性贫血基因型报道也比其他省份多见^[22]。

综上所述,珠蛋白生成障碍性贫血检测目前还存在一些不足,基因检测技术将极大提高珠蛋白生成障碍性贫血基因检测水平,新方法应用于珠蛋白生成障碍性贫血基因检测,将在珠蛋白生成障碍性贫血筛查、确诊、遗传咨询、产前诊断等方面发挥重要作用。

参考文献

[1] Zhang CM, Wang Y, Gao LS. Molecular epidemiology Investigation of β -thalassemia in zhongshan city, Guangdong province, people's Republic of China[J]. Hemoglobin, 2010, 34(1): 55-60.

[2] 钟萍,朱春江. 桂林地区育龄妇女地中海贫血的流行病学调查研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(10): 108-109.

[3] Li DZ. Premarital screening for thalassemia in mainland China[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(6): 637-638.

[4] Liao C, Zhou JY, Xie XM, et al. Screening for Hb constant spring in the Guangdong province, south china, using the sebia capillary electrophoresis system[J]. Hemoglobin, 2011, 35(1): 87-90.

[5] Srivorakun H, Fucharoen G, Changtrakul Y, et al. Thalassemia and hemoglobinopathies in southeast Asian newborns: diagnostic assessment using capillary electrophoresis system[J]. Clin Biochem, 2011, 44(5/6): 406-411.

[6] Merono F, Agouti I, Bonello-Palot N, et al. Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode[J]. Clin Biochem, 2011, 44(5/6): 441-443.

[7] 张力,区小冰,颜慕霞. 高效液相色谱技术检测 α 地中海贫血价值初探[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(2): 30-31.

[8] Philipsen M, Vogelaar IP, Schaap RA, et al. A new α 0-thalassemia deletion found in a Dutch family(-AW)[J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 45(2): 133-135.

[9] Alice E, Gallienne, Nicola M, et al. Characterization of a novel deletion causing β -thalassemia major in an afghan family[J]. Hemoglobin, 2010, 34(1): 110-114.

[10] Salehi R, Fisher CA, Bignell PA, et al. Identification of three novel mutations [-41 (A>C), codon 24 (-G), and IVS-I-109 (-T)], in a

study of beta-thalassemia alleles in the Isfahan region of Iran[J]. Hemoglobin, 2010, 34(1): 115-120.

[11] Rahimi Z, Muniz A, Parsian A. Detection of responsible mutations for beta thalassemia in the Kermanshah Province of Iran using PCR-based techniques[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37: 149-154.

[12] Hung CC, Chen SU, Lin SY, et al. Preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassemia using real-time polymerase chain reaction with fluorescence resonance energy transfer hybridization probes [J]. Anal Biochem, 2010, 400(1): 69-77.

[13] Liu X, Law HY, Tan YM, et al. High-throughput beta-thalassemia carrier screening by allele-specific Q-primer real-time polymerase chain reaction[J]. Anal Biochem, 2010, 404(1): 97-99.

[14] Li DZ, Liao C, Li J, et al. A novel β -globin gene deletion (codons 89-93) in a Chinese family[J]. Ann Hematol, 2010, 89(2): 323-325.

[15] Philipsen M, Vogelaar IP, Schaap RA, et al. A new alpha(0)-thalassemia deletion found in a Dutch family(-AW)[J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 45(2): 133-135.

[16] Liu J, Jia X, Tang N, et al. Novel technique for rapid detection of alpha-globin gene mutations and deletions[J]. Transl Res, 2010, 155(3): 148-155.

[17] Li R, Liao C, Li D, et al. High-resolution melting analysis of the three common nondeletional α -thalassemia mutations in the chinese population; HBs constant spring, quong sze and westmead [J]. Hemoglobin, 2010, 34(6): 587-593.

[18] Sirichotiyakul S, Wanapirak C, Saetung R, et al. High resolution DNA melting analysis: an application for prenatal control of thalassemia[J]. Prenat Diagn, 2010, 30(4): 348-351.

[19] Yang Y, Li DZ. Detection of uncommon deletions in alpha-thalassemia using the pcr-reverse dot-blot method for prenatal diagnosis of nondeletional hemoglobin H disease[J]. Acta Haematol, 2010, 124(1): 9-12.

[20] Pichanun D, Munkongdee T, Klamchuen S, et al. Molecular screening of the Hbs constant spring (codon 142, TAA>CAA, α 2) and pakse (codon 142, TAA>TAT, α 2) mutations in Thailand[J]. Hemoglobin, 2010, 34(6): 582-586.

[21] Li DZ, Li J, Liao C. Prenatal diagnosis of hemoglobin Bart's disease caused by co-inheritance of two different α 0-thalassemia defects in China[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(6): 632-633.

[22] Li DZ, Liao C, Li J, et al. A novel beta-globin gene deletion (codons 89-93) in a Chinese family[J]. Ann Hematol, 2010, 89(3): 323-325.

(收稿日期:2011-02-01)

降钙素原生化特点和临床应用现状

陈化禹 综述, 蔡钢强 审校

(天津中医药大学附属第一医院检验科 300193)

关键词:降钙素; 生物化学; 临床医学

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 10. 035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)10-1092-03

许多学者已经报道过降钙素原(PCT)水平是早期诊断新生儿脓毒败血症的 1 个重要标志物^[1], 诊断的灵敏度和特异性

可高达 90%。PCT 水平在感染较轻时不受影响,但在系统性细菌感染和败血症后水平开始升高。目前 PCT 水平被作为 1