

• 论 著 •

单管多重 PCR 结合 RDB 技术在 α -地贫产前诊断中的应用*

肖奇志, 周玉球[△], 张永良, 谢建红, 郑 勤

(珠海市妇幼保健院检验科/珠海市医学遗传研究所 519001)

摘 要:目的 基因诊断结果在 α -地贫的产前诊断中具有决定意义。采取两种不同技术原理的方法验证产前诊断结果, 是保证产前诊断结果可靠性的基本要求。本文探讨检测常见非缺失型 α -地贫的 RDB 技术作为单管多重 PCR 技术产前诊断 α -地贫验证方法的可行性。**方法** 采用双盲法, 对 73 例 α -地贫产前诊断的标本分别采用针对中国人 3 种常见缺失型 α -地贫突变的单管多重 gap-PCR 技术和针对常见 3 种非缺失 α -地贫点突变的 RDB 法进行分析, 根据单管多重 PCR 技术扩增产物电泳图谱和 RDB 膜条上显色的斑点分别判断某一个标本缺失型和非缺失 α -地贫的突变类型, 且与引产或出生后胎儿脐带血中 Hb Bart's 定量结果进行比对。**结果** 单管多重 PCR 和 RDB 技术均能分别准确检出常见缺失型和非缺失型 α -地贫各种突变类型。如将两者结合分析, 还能提供相互佐证的重要信息: 对于 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$ 自身或相互组合的各种基因型标本, 其 RDB 膜条的杂交斑点均不显色; 而 $-\text{SEA}$ 与 $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 、 $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ 和 $\alpha^{\text{WS}}\alpha$ 组合的基因型标本该突变的正常对照点不显色。 α -地贫产前诊断结果与胎儿脐带血电泳结果完全吻合。**结论** 单管多重 PCR 结合 RDB 技术同时应用于 α -地贫的基因诊断, 可保证产前诊断的可靠性, 值得在临床遗传诊断实验室中推广应用。

关键词:地中海贫血; 酶联免疫吸附测定; 产前诊断; 反向点杂交

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0271-03

Application of single-tube multiplex PCR combined with reverse dot blot technology for the prenatal diagnosis of α -thalassemia *

Xiao Qizhi, Zhou Yuqiu[△], Zhang Yongliang, Xie Jinghong, Zheng Qin

(Department of Clinical Laboratory & Zhuhai Institute of Medical Genetics, Zhuhai Municipal

Maternity and Child Healthcare Hospital, Zhuhai Guangdong 519001, China)

Abstract: Objective To study the feasibility of reverse dot blot (RDB) technology, used for the detection of common non-deletion type α -thalassemia (α -Thal), in the validation of single-tube multiplex PCR (STMP) for the prenatal diagnosis of α -Thal. **Methods** 73 specimens of prenatal diagnosis for α -Thal were detected simultaneously by STMP for three common deletion type of α -Thal ($-\text{SEA}$, $-\alpha^{4.2}$ and $-\alpha^{3.7}$) and by RDB for three common non-deletion type of α -Thal ($\alpha^{\text{CS}}\alpha$, $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ and $\alpha^{\text{WS}}\alpha$) by double blind trial. The genotypes of α -globin gene were acquired by the agarose gel electrophoresis profiles of STMP products for determining deletion type α -Thal and the color of spots on the RDB membrane strip for detecting non-deletion type α -Thal. The results were confirmed further by quantificational levels of Hb Bart's in the umbilical cord blood of fetus, delivered by induced abortion or normal delivery. **Results** STMP and RDB could accurately genotyped deletion and non-deletion type α -Thal mutations respectively. Combination of the results of both STMP and RDB could provide important information of corroborative evidence for each other; for combination of the above mentioned deletion type α -Thal themselves or each other, the hybridization spots on RDB membrane strip were with no color, but for $-\text{SEA}$ combined with $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ and $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ combined with $\alpha^{\text{WS}}\alpha$, were colored only in the dot of non-deletion mutation probes. Both the results of prenatal diagnosis and the levels of Hb Bart's in the umbilical cord blood were perfectly matched. **Conclusion** Simultaneously application of STMP PCR and RDB for the prenatal diagnosis of α -Thal could guarantee the reliability of result and could be worthy of deploying with confidence popularly in the clinical genetic laboratory.

Key words: thalassemia; enzyme-linked immunosorbent assay; prenatal diagnosis; reverse dot blot

α -地中海贫血 (α -地贫) 是一组由于 α -珠蛋白基因的缺失或功能障碍导致 α -珠蛋白链完全缺如或合成不足所引起的遗传性血液病, 该病高发于中国南方各省区, 尤以广东和广西两省 (区) 为甚^[1]。 α -地贫主要是因 α -珠蛋白基因大片段的缺失为主 (缺失型, 如 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 、 $-\alpha^{3.7}$), 少数类型以碱基替代或几个核苷酸的缺失或插入 (非缺失型, 如 α^{CS} 、 α^{QS} 和 α^{WS})^[2]。 α -地贫最大的危害是严重影响生命质量的 HbH 病和致死性 Hb Bart's 水肿胎。对严重类型 α -地贫目前尚无根本有效的治疗方法, 通过遗传筛查、遗传咨询和产前诊断选择性淘汰重症 α -地贫胎儿是现实条件下惟一可行的手段。

在地贫产前诊断的临床实践中, 产前诊断技术规范要求应

用两种不同技术原理的方法相互验证检测结果, 以保证产前诊断的可靠性^[3]。然而, 由于临床遗传诊断实验室受到实验条件、技术水平和经济因素等影响, 许多实验室客观上难以满足上述要求, 故存在较大的技术风险。笔者在采用反向点杂交 (reverse dot blot, RDB) 检测非缺失型 α -地贫过程中, 发现该技术既可准确检出常见非缺失型 α -地贫突变类型, 还可以验证单管多重 PCR (single-tube multiplex PCR, STMP) 检测严重类型 α -地贫基因型的可靠性, 在目前条件下不失为临床一种有效的替代方法, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008~2010 年在珠海市妇幼保健院进

* 基金项目: 广东省科技计划项目 (2009A030301002)、广东省自然科学基金 (04101691)。[△] 通讯作者, E-mail: zhzhouyq@126.com。

行地贫产前诊断的孕妇的羊水或脐带血,脐带血采用乙二胺四乙酸三钾(EDTA-K₃)抗凝。73 例病例中年龄最大的 41 岁,最小的 20 岁,中位数为 28 岁;其中羊水 58 例,脐带血 15 例。孕期从孕 17 周加 3 天至 30 周加 2 天。上述标本均采用经典的酚-氯仿法抽提人类白细胞基因组 DNA,TE 溶解,采用紫外分光仪测定其质量与浓度,以保证所抽提的 DNA 质量符合要求,在使用时稀释至 20 μg/μL。严格按照产前诊断的要求进行独立的平行试验。引产后或出生后留取的脐带血也采用 EDTA-K₃ 抗凝。

1.2 常见缺失型 α-地贫突变的检测 采用 STMP 法^[4]检测上述中国人 3 种常见的缺失型 α-地贫突变,检测试剂盒由亚能生物技术(深圳)有限公司生产(注册号:国食药监械(准)字 2008 第 3401251 号),依其提供的使用说明书进行操作。PCR 在 PE2400 扩增仪(Gene Amp 2400,Perk inElm er)上进行。扩增后,取 3 μL PCR 产物和 0.8 μL GeneRuler(深圳晶美生物工程公司产品)在 1×TEB 缓冲液、5~6 V/cm 条件下,1.0%琼脂糖凝胶电泳 1 h,溴化乙锭染色于 UVP 凝胶成像仪(UVP Inc.,美国)下观察并记录结果。

1.3 常见非缺失型 α-地贫突变的检测 针对上述中国人常见的 3 种非缺失型 α-地贫基因突变则采用 RDB 法^[5]检测,试剂盒由亚能生物技术(深圳)有限公司提供,分子杂交仪则为美国 Robbin Scientific 公司产品。由于上述 3 种中国人常见的非缺失型 α-地贫突变均发生在 α₂-珠蛋白基因上,故在进行 RDB 之

前,必须设计一对引物特异扩增 α₂-珠蛋白基因片段。但部分标本会出现无 α₂-基因特异扩增带的现象。为了防止 PCR 扩增失败的情况发生,确证 PCR 扩增体系运行正常,遇到此情况,需再取 2 支扩增管重新操作。一管加原始 DNA 标本,另一管则加 1/2 的原始 DNA 标本和 1/2 的正常 DNA 标本再进行 PCR 扩增,若第一管仍然无特异扩增产物,而另一扩增管则有特异扩增产物出现,说明 PCR 扩增体系运转正常,无特异性的扩增带则是 DNA 标本本身基因缺失所导致。

1.4 产后追踪或随访 对实施 α-地贫产前诊断而引产或生下的胎儿,要求留下 EDTA-K₃ 抗凝的脐带血用于血红蛋白电泳和 Bart's 水平定量或随访,以确认产前诊断结果的可靠性^[6]。脐带血血红蛋白电泳和 Bart's 定量采用 SPIFE 快速自动电泳分析系统(美国 Helena Laboratories 公司)。

2 结 果

2.1 单管多重 PCR 检测常见缺失型 α-地贫的结果 健康人或非缺失型 α 地贫只有 1 条 1.8 kb 的 α₂-珠蛋白基因的特异性扩增带(泳道 1、5),若出现 2.0 kb(泳道 3、6、7、9)或 1.6 kb(泳道 4、7、10)或 1.3 kb(泳道 2、8、9、10、11 和 12),则分别指示存在 -α^{3,7}、-α^{4,2} 和 -SEA 缺失型 α-地贫基因的存在。

2.2 RDB 检测常见非缺失型 α-地贫结果 将 STMP 的凝胶电泳特征图谱结合 RDB 技术产前诊断 α-地贫的结果进行分析,见表 1。

表 1 STMP 结合 RDB 技术产前诊断 α-地贫的结果分析

编号	STMP 电泳图谱(kb)				RDB 结果		组合示意图		α-地贫产前诊断的结果
	1.8	2.0	1.6	1.3	野生型对照点	突变型检测点	图 1	图 2	
1	+	-	-	-	+	-	泳道 1	A-I	排除常见的 3 种缺失和 3 种非缺失型突变
2	+	-	-	+	+	-	泳道 2/8	A-I	—SEA/αα 并排除 3 种非缺失型突变
3	+	+	-	-	+	-	泳道 3	A-I	-α ^{3,7} /αα 并排除 3 种非缺失型突变
4	+	-	+	-	+	-	泳道 4	A-I	-α ^{4,2} /αα 并排除 3 种非缺失型突变
5	+	-	-	-	-	+	泳道 5	A-II/III/IV	α ^{QS} 或 α ^{CS} 或 α ^{WS} 杂合子并排除 3 种缺失型突变
6	-	+	-	-	-	-	泳道 6	B-I	-α ^{3,7} /—α ^{3,7}
7	-	+	+	-	-	-	泳道 7	B-I	-α ^{3,7} /—α ^{4,2}
8	-	+	-	+	-	-	泳道 9	B-I	—SEA/—α ^{3,7}
9	-	-	+	+	-	-	泳道 10	B-I	—SEA/—α ^{4,2}
10	+	-	-	+	-	+	泳道 11	B-II/III/IV	α ^{QS} α/—SEA、α ^{CS} α/—SEA 或 α ^{WS} α/—SEA
11	-	-	-	+	-	-	泳道 12	B-I	—SEA/—SEA

+:表示可见该长度片段的扩增带或 RDB 杂交斑点。

2.3 产后追踪或随访 在 73 例 α-地贫产前诊断的胎儿中,共留取了 39 例脐血,其他的病例则进行了胎儿出生 1 周岁后血液学验证或电话追踪随访,结果显示脐带血血红蛋白电泳所得 Bart's 水平以及随访结果与产前诊断结果完全吻合。

3 讨 论

α-地贫是中国长江以南地区、特别是广东、广西最常见、危害最为严重的遗传性血液病之一。广东和广西人群中 α-地贫基因携带率分别高达 8.53%^[2]和 17.55%^[7]。据此算出,广东和广西分别每 137 个和 33 个妊娠者就有 1 个生育严重类型 α-地贫胎儿(巴氏水肿胎和 HbH 病)的风险。两省围产儿出生缺陷监测数据显示:广东和广西 Bart's 水肿胎发生率分别为 2.4‰和 3.5‰,各居围产儿出生缺陷第二(2003 年)和第一。Bart's 水肿胎是致死性的疾病,几乎所有的患病胎儿均夭折于

妊娠晚期或出生后立即死亡,并大大增加了母体罹患严重的先兆子痫、难产、产前(后)出血和羊水过多等致死性并发症的风险^[8]。HbH 病严重影响患儿的生长发育和生活质量,也不是一种良性疾病^[9]。目前该病尚无根本有效的治疗方法,通过遗传筛查、遗传咨询和产前基因诊断选择性地淘汰严重类型 α-地贫胎儿则是控制该病发生的首要途径,其中产前诊断则占有举足轻重的地位^[10]。

产前诊断的结果直接决定了胎儿的生命,故保证产前诊断结果的可靠性是临床遗传实验室一切工作的前提,否则其后果是灾难性的、毁灭性的和不可挽回的。产前诊断的误差主要来源于如下三方面,其一是操作人员因素(主要是责任心的问题);其二是样品因素,即样品有误,包括张冠李戴、母源污染和样品错位等;其三是技术因素,即所采用的技术、试剂(试剂盒)

的准确度、稳定性(重复性)如何。前二者可通过加强产前诊断实验室的科学管理和产前诊断专业技术人员责任心的培养,改进实验流程(如严格样品核收、实行移位法加液等)、设立独立平行分析、进行家系分析和多态性连锁分析以判断采集或送检的样品有无错误或否母血污染等来克服。对于技术因素则须通过常规应用两种不同原理的检测方法或技术进行地贫分子诊断以控制偶然误差。由于实验的环节很多,每个环节上的疏漏或者不可预测的差异,都会出现结果与事实不符的事件发生;同时由于个体差异,也不可避免出现某种不匹配的情况,如应用分子杂交、PCR 技术时,因 α_1 、 α_2 -珠蛋白基因序列的高度同源性和高(G+C)含量而导致等位基因脱落(dropout)^[10]或偏性扩增^[11]或非特异性杂交等问题。

对于 α -地贫的产前诊断,虽然报道的方法或技术很多,有孕早期测定胎儿的心/胸比例的物理方法^[12],包括经典的 Southern 印迹分析技术和无创性产前诊断技术^[13]等 DNA 诊断方法,但诊断缺失型地贫和检测地贫点突变国际上通用和国内比较成熟的分别还是 gap-PCR /多重连接依赖的探针扩增技术和 MLPA 和 RDB/变性高效液相色谱技术等^[3]。但在临床遗传实践工作中,因实验条件、技术水平和经济因素等限制,只有个别的地贫研究实验室同时采用 MLPA 和 DHPLC 或其他方法作为缺失型和非缺失型 α -地贫产前诊断的验证方法,故 α -地贫产前诊断存在不容忽视的风险,值得临床遗传实验室高度重视和采取必要的措施进行弥补。

根据国内地贫分子诊断实验室现有的实验条件、技术水平和经济发展的现状,在不增加任何实验的前提下,采用综合分析 STMP 和 RDB 检测的结果,就可有效地减少因未采用第二种不同原理的方法或技术验证所造成的 α -地贫产前诊断风险,且产前诊断的结果与胎儿引产或出生后脐血血红蛋白电泳和追踪随访结果完全一致,证明该方案具有可靠性和可行性。由于中国人常见的 α^{CS} 、 α^{QS} 和 α^{WS} 3 种非缺失型 α -地贫突变均发生在 α_2 -珠蛋白基因上,且扩增 α_2 -基因的引物中有一条设计在——SEA、— $\alpha^{3,7}$ 和 — $\alpha^{4,2}$ 3 种缺失型 α -地贫基因公共缺失的部分,运用 RDB 技术检测上述 3 种缺失型突变的纯合子或双重杂合子标本时,就无特异的 α_2 -基因扩增片段产生,故 RDB 膜条上所有的野生型和突变型检测点均无信号,但 STMP 则出现特异的 PCR 产物条带。而对于 α^{CS} 、 α^{QS} 和 α^{WS} 与——SEA 或 — $\alpha^{3,7}$ 或 — $\alpha^{4,2}$ 组合形成的各种基因型的标本,在 STMP 检测中,显示出与——SEA 或 — $\alpha^{3,7}$ 或 — $\alpha^{4,2}$ 杂合子一样的 PCR 产物电泳图谱,但在 RDB 结果中,呈现 α^{CS} 、 α^{QS} 或 α^{WS} 纯合子突变结果,此由——SEA 或 — $\alpha^{3,7}$ 或 — $\alpha^{4,2}$ 缺失了另一条同源染色体上部分或全部 α_2 -基因序列所致^[14]。因此,运用 STMP 和 RDB 技术同时检测同一标本,其结果具有相互验证的作用。临床遗传实验室可利用 STMP 和 RDB 结果的互补优势进行产前 α -地贫基因,对于尚无条件开展 MLPA、DHPLC 和其他 DNA 诊断方法的临床遗传实验室,目前仍不失为一种较为有效的变通方法,从而保证产前 α -地贫基因诊断的准确度和可靠性。

由于严重缺失类型的 α -地贫(如——SEA、— $\alpha^{3,7}$ 或 — $\alpha^{4,2}$ 自身或相互组合形成的纯合子或双重杂合子)标本,采用 PCR 结合 RDB 技术进行检测时,PCR 扩增无特异性扩增带产生,故分子杂交后,RDB 膜条无杂交信号出现。遇到这种情况,首先要检查室内质量控制是否在控,然后可将待检标本和正常对照各一半组合成混合的标本,再进行扩增,如有特异的 1.8 kb 扩增带出现,说明 PCR 扩增体系运转正常。出现此种情况是因待测标本本身 α -珠蛋白基因大片段缺失所致,而非操作不当或

PCR 扩增体系的问题。由于检测中国人 3 种常见的非缺失型 α -地贫突变的 RDB 试剂盒中,均未设立内对照,故可采用上述方法对 DNA 质量、PCR 反应体系和操作过程等进行确认,以防假阴性结果的发生。

综上所述,从 α -地贫产前诊断的安全角度出发,要求临床遗传实验室采用两种不同技术原理的方法或技术对检测结果进行相互验证^[3],但绝大多数临床遗传实验室受限于实验室条件、技术水平和经济考虑等因素等,故难以在产前诊断实践中推行。为此,本文采取变通的办法,将 STMP 和 RDB 技术结合起来,同样可达到保证 α -地贫产前诊断准确度和可靠性的要求,简便易行且经济,值得各临床遗传诊断实验室借鉴。

参考文献

- [1] 周玉球,莫秋华,卢金汉,等.基于社区水平的珠海市大人群地中海贫血的遗传筛查和产前诊断[J].中华医学遗传学杂志,2008,25(2):256-261.
- [2] Xu XM,Zhou YQ,Luo GX,et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province; implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol,2004,57(3):517-522.
- [3] 徐湘民.地中海贫血预防控制计划操作指南[M].北京:人民军医出版社,2010,12:34-35.
- [4] 周玉球,张永良,李莉艳,等.单管多重 PCR 快速检测中国人三种常见缺失型 α -地中海贫血基因[J].中华医学遗传学杂志,2005,22(2):180-184.
- [5] 李莉艳,莫秋华,徐湘民.反向点杂交快速诊断非缺失型 α -地中海贫血[J].中华医学遗传学杂志,2003,20(2):345-347.
- [6] 周玉球,李文典. α -地中海贫血的表型筛查和基因诊断[J].中国优生优育杂志,2001,12(1):143-145.
- [7] Xiong F,Sun M,Zhang X,et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet,2010,78(2):139-148.
- [8] Chui DH,Waye JS. Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia; an emerging health care problem[J]. Blood,1998,91(19):2213-2222.
- [9] Chui DH,Fucharoen S,Chan V. Hemoglobin H disease; not necessarily a benign disorder[J]. Blood,2003,101(6):791-800.
- [10] Old J,Traeger-Synodinos J,Galanello R,et al. Prevention of thalassemias and other haemoglobin disorder[M]. 1st eds. Nicosia:Thalassemia International Federation,2005,8:85-86.
- [11] Warnecke PM,Stirzaker C,Melki JR,et al. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA[J]. Nucleic Acids Res,1997,25(23):4422-4426.
- [12] Lam YH,Tang MH,Lee CP,et al. Prenatal ultrasonographic prediction of homozygous type 1 alpha-thalassemia at 12 to 13 weeks of gestation[J]. Am J Obstet Gynecol,1999,180(1):148-150.
- [13] 严提珍,徐湘民.母体血浆胎儿核酸分析应用于地中海贫血的无创性产前诊断[J].国际输血及血液学杂志,2009,32(3):501-508.
- [14] Foglietta E,Bianco I,Maggio A,et al. Rapid detection of six common Mediterranean and three non-Mediterranean alpha-thalassemia point mutations by reverse dot blot analysis[J]. Am J Hematol,2003,74(1):191-195.