

• 临床检验研究论著 •

高压毛细电泳技术检测 β -地中海贫血的结果分析

刘基铎[△], 肖明锋, 袁 晴, 刘光平, 吴芝兰

(广州中医药大学第一附属医院检验科, 广东广州 510405)

摘要:目的 应用高压毛细电泳技术准确、快速检测 β -地中海贫血, 分析基因确证 β -地中海贫血患者用 Sebia 公司的 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪检测情况。方法 选择经反向斑点杂交方法证实为 β -地中海贫血的患者 131 例(患病组)及非 β -地中海贫血人群 50 例(对照组)用高压毛细电泳技术测定 Hb A2 和 Hb F。结果 β -地中海贫血 131 例, 其中杂合子 118 例(90.07%), 双重杂合子 11 例(8.40%), 纯合子 2 例(1.53%); 以 CD41-42(35.88%)、IVS-II-654(19.85%)、CD17(17.28%)、-28(10.69%) 4 种为主。应用高压毛细电泳方法检测 HbA2 升高 121 例, 占 92.37%, 其中有 2 例合并异常 HbE, 1 例合并异常 HbS; 10 例正常 HbA2 中有 9 例 HbF 增高, 其中有 1 例合并异常 HbS; 高压毛细电泳法用于 β -地中海贫血诊断的灵敏度(Se)为 97.71%, 特异度(Sp)为 94.00%, 准确度(Ac)为 96.69%, 阳性预测值(PPV)为 97.71%, 阴性预测值(NPV)为 94.00%。结论 高压毛细电泳方法是一种用于检测 β -地中海贫血的理想实验工具, 能为 β -地中海贫血提供快速而又准确的诊断依据。

关键词: 血红蛋白; 高压毛细电泳; β -地中海贫血; 反向斑点杂交

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0427-03

Application of automatic capillary electrophoresis of hemoglobin system in measurement of β -thalassemia

Liu Jiduo[△], Xiao Mingfeng, Yuan Qing, Liu Guangping, Wu Zhilan

(the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: **Objective** To analyze the gene of β -thalassemia patients confirmed by CAPILLARYS 2 NEONAT FAST detection. **Methods** 131 patients with β -thalassemia, confirmed by reverse dot blot hybridization method, were enrolled as disease group and 50 non- β -thalassemia subjects were enrolled as control group, all of which were detected for Hb A2 and Hb F with capillary electrophoresis. **Results** in 131 cases of β -thalassemia, 118 cases were heterozygote(90.07%), 11 cases were double heterozygote(8.40%), 2 cases were homozygous(1.53%), mainly with CD41-42(35.88%), IVS-II-654(19.85%), CD17(17.28%) and -28(10.69%). Application of high pressure capillary electrophoretic method could detect the increasing of HbA2 in 121 cases, accounting for 92.37%, including 2 cases with abnormal HbE, 1 case with abnormal HbS. 9 cases were with increased HbF in 10 cases of normal HbA2, including 1 case with abnormal HbS. The high-pressure capillary electrophoresis method, for the diagnosis of β -thalassemia, was with sensitivity of 97.71%, specificity of 94%, accuracy of 96.69%, positive predictive value of 97.71% and negative predictive value of 94%. **Conclusion** High pressure capillary electrophoresis could be used for detecting β -thalassemia, providing quick and accurate diagnostic basis of β -thalassemia.

Key words: hemoglobin; high-pressure capillary electrophoresis; beta-thalassemia; reverse dot blot hybridization

β -地中海贫血(以下简称 β -地贫)是由于 β -珠蛋白基因缺陷导致 β -珠蛋白链合成减少或缺如所引起的遗传性血液病。由于血红蛋白中 β 链减少使得多余的 α 链与 δ 链结合, 导致 Hb A2 增加, 因此 Hb A2 是一项用于检测 β -地贫的特征性指标。传统用于检测 Hb A2 方法有琼脂糖凝胶电泳和柱层析等, 但这些方法变异范围大、准确性低。近年发展起来的高压毛细电泳技术由于其快速、准确定量检测 HbA、Hb A2 和 Hb F 已广泛应用于临床检测 β -地贫, 同时可根据异常血红蛋白在毛细电泳中的滞留时间、在总血红蛋白中所占的比例及色谱图形的特征, 对异常血红蛋白作出准确的诊断。

本文以反向斑点杂交(RDB)方法为金标准, 使用 24 条探针, 同时检测中国人群中 β -地中海贫血最常见的 8 个位点和 9 个少见位点突变, 对已确诊的 128 例 β -地中海贫血携带者及 50 例健康对照, 回顾性分析其高压毛细电泳技术血红蛋白分析中的 HbA2 及 HbF 含量, 从而评价高压毛细电泳技术法在 β -地中海贫血中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 10 月~2012 年 5 月在本院产科门诊、血液科门诊住院部及体检中心患者, 选择经基因诊断证实为 β -地中海贫血的患者 131 例(患病组)及非 β -地中海贫血人群 50 例(对照组), 年龄 8~43 岁, 抽取其静脉血 2 毫升, EDTA-K₂ 抗凝。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 毛细管区带电泳 法国 Sebia 公司生产的 Cap2illarys 2 全自动毛细管电泳仪及其配套血红蛋白电泳试剂盒 CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)。

1.2.2 地贫基因检查 诊断试剂盒由深圳亚能公司提供, 扩增仪为美国 ABI 9700 扩增系统; 杂交仪为韩国 finePCR 公司 Combi-H12 杂交仪, 凝胶成像仪为 BIO-RAD 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 毛细管区带电泳 按照仪器操作说明书进行, 标本无须洗涤和溶血, 直接将抗凝标本离心沉淀, 取红细胞加入试管

中。把装有标本的试管按顺序放在仪器配套的检测架上(1 个检测架一次可检测 7 个标本, 7 个标本为一批, 可同时检测多批标本), 在检测架第 8 管位置加入大约 4.0 mL 的溶血试剂。把检测架送入 Capillary 2 全自动毛细管电泳仪进行血红蛋白电泳检测, 约 30 min 后全部检测程序完毕, 查看结果。

1.3.2 地贫基因诊断 枸橼酸钠抗凝外周血、基因提取、扩增反应、PCR 膜杂交及基因分析操作程序严格按照试剂盒操作使用说明书进行。 β 地中海基因检测应用 PCR+反向点杂交技术(RDB)进行检测, 对 17 个位点(8 个常见位点及 9 个少见位点)的 17 种突变进行检测, 检测中国人常见的 17 种 β 珠蛋白的基因突变: CD41-42(-TTCT), CD43(G→T), IVS-II-654(C→T), -28(A→G), -29(A→G), -30(T→C), -32(C→A), CD71-72(+A), β E(GAG→AAG), CD17(A→T), CD31(-C), CD14-15(+G), CD27-28(+C), IVS-I-1(G→A, G→T), IVS-I-5(G→C), CAPM(A→C, -AAAC), Int(ATG→AGG)。

1.3.3 试验评价指标 按下列几个参数对高压毛细电泳法在 β -地中海贫血中的诊断价值进行评价, 即灵敏度(Se) = $a/(a+c) \times 100\%$, 特异度(Sp) = $d/(b+d) \times 100\%$, 准确度(Ac) = $(a+d)/(a+b+c+d) \times 100\%$, 阳性预测值(PPV) = $a/(a+b) \times 100\%$, 阴性预测值(NPV) = $d/(c+d) \times 100\%$ 。其中 a 为高压毛细电泳法检测患病组中的阳性数, b 为该法检测对照组中的阳性数, c 为该法检测患病组中的阴性数, d 为该法检测对照组中的阴性数。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 12.0 软件完成数据的统计分析, 计数资料的比较采用 χ^2 检验, 计量资料 t 检验。

2 结 果

2.1 β -地中海贫血的基因分型 经常规基因检测明确诊断的 131 例 β -地中海贫血患者中, 结果见表 1。

表 1 131 例 β -地中海贫血患者的基因类型分布			
类别	基因型	<i>n</i>	百分率(%)
杂合子	CD41-42	39	29.77
	IVS-II-654	21	16.03
	-28	12	9.16
	CD17	14	10.69
	β E	6	4.58
	CD71-72	9	6.87
	CD43	2	1.53
	-29	5	3.82
	IVS-I-1	4	3.05
	CD27-28	5	3.82
	CD32	1	0.76
	CD41-42/-28	2	1.53
	CD41-42/IVS-II-654	3	2.29
	CD41-42/CD17	1	0.76
	CD41-42/ β E	1	0.76
	CD71-72/CD17	1	0.76
	IVS-II-654/CD17	2	1.53
纯合子	β E/CD17	1	0.76
	CD17/CD17	1	0.76
总计	CD41-42/CD41-42	1	0.76
		131	100.00

2.2 高压毛细电泳法诊断 β -地中海贫血情况 对 131 例经基因确诊为 β -地中海贫血患者的血样进行高压毛细电泳法检测,

其中 HbA2 阳性 128 例, 阴性 3 例; 而对照组 50 例血样中, HbA2 阴性 47 例, 阳性 3 例。以基因诊断为金标准, 高压毛细电泳法用于 β -地中海贫血诊断的灵敏度(Se)为 97.71%, 特异度(Sp)为 94.00%, 准确度(Ac)为 96.69%, 阳性预测值(PPV)为 97.71%, 阴性预测值(NPV)为 94.00%。

2.3 β -地中海贫血血红蛋白组分 其中 HbA2 升高 121 例, 占 92.37%, 其中有例 2 合并异常 HbE, 1 例合并异常 HbS; 10 例正常 HbA2 中有 9 例 HbF 增高, 其中有 1 例合并异常 HbS。

表 2 β -地中海贫血血红蛋白组分分析(<i>n</i>)				
HbA2(%)	<i>n</i>	HbF 增高	HbS	HbE
2.4~3.2	10	9	1	0
3.2~4.0	5	1	0	2
4.1~5.0	22	13	0	0
5.1~6.0	83	33	1	0
>6.0	11	7	0	0
总计	131	63	2	2

3 讨 论

β -地中海贫血是世界上最常见和发病率最高的遗传性溶血性贫血, 也是危害最严重的血红蛋白病之一^[2]。由于该病至今尚无有效的治疗方法, 预防是最为有效的应对措施, 且有相当一部分轻型或静止型的 β -地中海贫血患者未表现出临床症状, 但却携带致病基因, 并可能将异常基因遗传给下一代。如夫妻双方均为同一类型基因杂合子时, 后代有四分之一的可能出现重型 β -地中海贫血患儿, 此类患儿常在出生后几个月就开始贫血, 临床症状严重, 必须依靠长期输血以维持生命。对社会和家庭都将带来沉重的经济和精神上的负担, 故提倡婚前进行 β -地中海贫血筛查及对未进行婚检的孕妇进行产前 β -地中海贫血筛查显得尤其重要。对筛查出的高风险人群进行基因诊断, 必要时对孕妇抽取羊水或脐血进行胎儿产前 β -地中海贫血基因诊断。

β -地贫是最主要的地贫类型之一, β -地贫的分子基础是由于位于人类 11 号染色体中的两个 β -珠蛋白基因发生碱基置换、缺失或插入, 导致 β -珠蛋白合成减少或缺如所引起的一种遗传性溶血性贫血。是我国南方十分常见的遗传性血液病^[3]。由于该病具有高度的遗传异质性, 致使其突变类型和突变频率随地域和人种变化而呈现明显的地域和种族差异。目前世界上已发现多种 170 β -地贫突变基因^[4], 导致中国人 β -地贫发生的突变基因有 29 种^[5], 且中国人群最常见的 种突变依次为 6 CDs41-42(-TCTT)(41.6%)、IVS-II-654(C→T)(21.8%)、CD17(A→T)(18.0%)、-28(A→G)(8.0%)、CD71-72(+A)(3.9%)和 -29(A→G)(1.2%)^[6]。本文 β -地中海贫血 131 例, 其中杂合子 118 例(90.07%), 双重杂合子 11 例(8.40%), 纯合子 2 例(1.53%); 以 CD41-42(35.88%)、IVS-II-654(19.85%)、CD17(17.28%)、-28(10.69%)4 种为主, 与 Xiao 等^[6]报道接近。

β -地中海贫血是由于 β 珠蛋白基因突变使 β 珠蛋白链合成受阻所致, 此时机体为代偿 β 珠蛋白链的减少, 而使 δ 珠蛋白基因的转录升高, 合成增加的 δ 珠蛋白易与相对过剩的 α -珠蛋白链结合生成过多的 HbA2。故通过检测血红蛋白中的

HbA2 含量,可以达到筛查 β -地中海贫血的目的,若此值高于诊断标准,高度怀疑 β -地中海贫血,建议做基因检测以进一步明确诊断。目前, β -地中海贫血非基因检测技术很多,如血常规、红细胞渗透脆性试验等^[7],此类方法操作要求低,费用低廉,但敏感性差,特异性不高,且部分患者 MCV 及红细胞渗透脆性试验可以正常,是造成 β -地中海贫血基因携带者漏诊的主要原因,漏诊率达到 13.23%^[8]。而近来广泛应用的琼脂糖血红蛋白电泳法也存在着准确性和重复性不佳的缺点^[9-10]。全自动毛细管电泳法是在充满电泳液的石英管中进行电泳的技术^[11],在溶血试剂中进行稀释的红细胞样品,会被注射到毛细管的负极端,在高压电的作用下竞相电泳分离,在阴极端 415 nm 波长下直接检测血红蛋白各组分的百分含量。全自动毛细管电泳法不需要进行标本预处理,省却了洗涤红细胞和标本溶血的过程,且电泳分离和在 415 nm 波长定量检测过程一次完成,自动化程度高,操作过程最大程度地减少了人为误差。

本次研究 131 例基因阳性 β -地中海贫血患者样本中,共检出 HbA2 增高 121 例,HbF 增高 63 例,HbE 带 2 例,HbS 带 2 例。Sebia Capillarys 2 全自动毛细管电泳系统对 HbA2 具有非常好的聚焦性,可自动鉴别和定量该区带,可准确地将 HbE 和 HbA2 区分开。通过存储过的 HbAFSC 参比图谱重叠比较,可以轻易地区分移动速度只具有轻微差别的两种异常血红蛋白 HbS 和 HbD,Sebia Capillarys 2 全自动毛细管电泳系统还可以较好区分和聚焦 HbA 与 HbS 之间的 HbF,并可对其进行精确定量。

本次研究证实了 Sebia Capillarys 2 全自动毛细管电泳系统的确为 β -地中海贫血介于筛查与诊断之间的一个比较理想的方法,且受人为因素影响小,实验方便快捷,检测通量大,完全可以取代其他筛查方法用于临床中 β -地中海贫血的辅助诊断,尤其适用于大规模的人群筛查。

参考文献

[1] 郑美琴,李伟,吕建新.温州地区汉族人群 β -地中海贫血患者 β 珠

(上接第 426 页)

参考文献

[1] 罗敏琪,尹小菁,宋志兴,等.联合检测血清胱抑素 C 与尿微量清蛋白/肌酐比值对早期受损害的诊断价值[J].广东医学,2010,31(3):358-360.
[2] 李静.血清胱抑素 C 对糖尿病早期肾损害的诊断价值评估[J].医学信息,2009,22(12):2751.
[3] 董怀平,李俊敏,张延强.胱抑素 C、血清肌酐清除率在糖尿病肾病早期诊断中的效能比较[J].国际检验医学杂志,2008,29(2):177-178.
[4] 孙倩倩,谈敏.胱抑素 C 在糖尿病肾病肾功能评估中的地位[J].国外医学:老年医学分册,2009,30(6):266-269.
[5] 王小青.胱抑素 C、超敏 C 反应蛋白和尿微量清蛋白在糖尿病早期肾损害监测中的应用[J].Chin J Lab Diagn,2010,14(11):1801-1802.
[6] 姚立腾,王锦驹.血清胱抑素 C 和视黄醇结合蛋白联合检测在糖尿病肾病临床诊断中的价值[J].国际检验医学杂志,2010,31

蛋白基因突变分析[J].中华检验医学杂志,2010,33(3):236.
[2] 郑琳,黄海龙,范向群,等.高效液相色谱技术检测 β -地中海贫血的临床价值探讨[J].中国妇幼保健,2011,26(11):1665-1666.
[3] 全国血红蛋白病研究协作组 120 省、市、自治区 60 万人血红蛋白病调查[J].中华医学杂志,1983,63(6):382-385.
[4] 孙大光,韩健,金孝华,等.悬浮点阵技术用于分析 β 地中海贫血基因突变类型[J].中华血液学杂志,2004,25(4):239-241.
[5] Tosto F,Salvatore M,Falbo V,et al. The Italian scheme of External Quality Assessment for beta-thalassemia:genotyping and reporting results and Testing strategies in a 52year survey[J].Genet Test MolBiomarkers,2009,13(1):31-36.
[6] Xiao W,Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography:A review[J].Hum Mutat,2001,17(6):439-474.
[7] 覃西,毛炜,吴洁,等.非基因法检测地中海贫血现状[J].中国优生与遗传杂志,2007,15(3):122.
[8] 朱学海,魏代奎.地中海贫血的基因诊断分析[J].中国实用医药,2008,3(13):126.
[9] 陈忠领,魏新燕,范美珍,等.血红蛋白电泳在地中海贫血筛查中的应用价值[J].现代预防医学,2007,34(6):1132.
[10] 张春荣,黄小明,马巧蓉.全自动电泳系统对 8 093 例产前孕妇和新生儿地中海贫血的检测分析[J].检验医学与临床,2009,7(14):1165-1166.
[11] 卢业成,郑师陵,肖艳华,等.全自动多通道毛细管区带电泳技术在血红蛋白分析中的临床应用[J].国际检验医学杂志,2009,7(30):675-679.
[12] 姚莉琴,邹团标,杨发斌,等.用 ROC 曲线评价血液学指标在儿童地中海贫血中的筛查价值[J].国际检验医学杂志,2011,4(32):435-436.

(收稿日期:2012-10-06)

(5):440-441.
[7] 张关亭,李志毅.血清胱抑素、视黄醇结合蛋白、尿微量蛋白检测对原发性高血压肾病的早期诊断价值[J].慢性病杂志,2010,12(12):1656-1662.
[8] 刘义明,黄日安,莫伟.糖尿病肾病患者尿微量清蛋白、免疫球蛋白 G、转铁蛋白和视黄醇结合蛋白的检测及意义[J].广东医学院学报,2009,27(1):35-36.
[9] 欧阳涓,姜悦.肾脏的损伤性诊断[J].中华检验医学杂志,2006,28(8):877-879.
[10] 刘光中.尿微量蛋白检测在肝源性肾损害中的应用[J].中西医结合肝病杂志,2005,15(4):231-232.
[11] 孙培荣,之佣兵.尿清蛋白/肌酐比值对诊断早期糖尿病肾病的价值[J].国际泌尿系统杂志,2006,26(5):573-575.
[12] 邓晓初.尿清蛋白/肌酐比值检测法在早期 2 型糖尿病肾病中的应用[J].重庆医学,2005,34(1):46-48.

(收稿日期:2012-10-12)