

• 检验技术与方法 •

快速检测 β 地中海贫血基因型的方法学研究^{*}

张彦, 曾玉坤, 刘舒, 陈汉彪, 尹爱华[△]

(广东省妇幼保健院产前诊断与遗传病诊疗中心, 广东广州 511442)

摘要: 目的 利用 PCR-HRM 技术对常见 β 地中海贫血 5 种突变类型进行检测, 对野生型、纯合以及杂合突变进行分析, 建立一种有效地突变筛查方法。方法 针对 5 种突变类型进行短片段扩增引物设计, 用已知基因型的 β 地中海贫血患者基因组 DNA 标本进行 PCR-HRM 分析, 并对于纯合子进行 PCR 产物测序验证。结果 常见 5 种基因型纯合子以及杂合子均可以利用 PCR-HRM 进行区分, 并得到测序验证。结论 利用 PCR-HRM 技术可以对常见 β 地中海贫血进行基因突变筛查, 并可以发现未知突变。

关键词: 地中海贫血; 基因诊断; 高分辨率熔解曲线

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.045

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2013)23-3202-02

地中海贫血在我国南方地区多见, 是我国长江以南各省发病率最高、影响最大的遗传病之一^[1], 尤以广西、广东和海南为甚。广西地中海贫血以 α 地中海贫血为主, 基因携带率约为 18%, 广东省地中海贫血的基因携带率约为 13%^[2], 海南省约为 7%, 四川、湖南以及江西等省份基因携带率约为 2% 左右。地中海贫血基因突变的类型有明显种族与地域差异性^[1-2]。中国人群中常见的 β 地中海贫血点突变类型为 5 种: CD41-42 del TCTT, IVS-II-654 C>T, -28 A>G, CD71-72 ins A, CD17 A>T。目前常规检测方法为 PCR-反相斑点杂交, 操作繁琐, 结果稳定性差。高分辨率熔解曲线(HRM)技术是近年来兴起的一种检测基因突变的灵敏的筛查手段。其原理是利用 DNA 变性时解链温度与 DNA 片段碱基构成密切相关的特点将突变型与野生型加以区分。经过数年的发展该技术已经较多的应用于单基因病的基因突变检测^[3-5]。本研究拟利用 PCR-HRM 技术对常见 β 地中海贫血 5 种突变类型进行检测, 对野生型、纯合以及杂合突变进行分析, 建立一种有效地突变筛查方法。

1 材料与方法

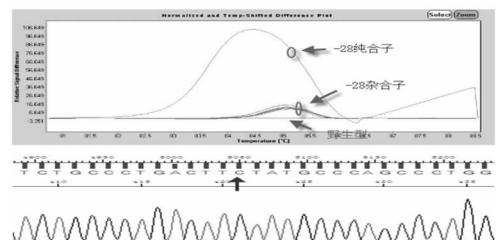
1.1 检测样本 选用已知基因型的地中海贫血 DNA 标本, 进行检测。

1.2 方法 设计五个突变位点的扩增引物, TaKaRa 公司合成。利用 Roche 公司高分辨率熔解曲线试剂盒(LightCycler 480 High Resolution Melting Master)进行 PCR 扩增以及 HRM 分析。反应体系为: DNA 2 μ L, 2 \times conc. Master Mix 10 μ L, 引物及镁离子浓度为 2.5 mmol/L, 并用去离子水补充至 20 μ L。PCR 反应条件为 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 56 °C 或 52 °C 15 s(检测-28 和 CD17 突变时引物退火温度为 56 °C, 检测 CD41-42、CD71-72、IVS-II-654 突变时引物退火温度为 52 °C), 72 °C 15 s, 45 个循环。PCR 扩增完后, 扩增产物直接应用 LightCycler 480 进行熔解曲线分析。HRM 分析条件: 95 °C 1 min, 40 °C 1 min, 然后以 0.1 °C/s 的速度从 60 °C 升温至 90 °C 收集熔解曲线数据, 应用软件 lightcycler 进行实时数据分析。对各种基因型的纯合突变标本进行 PCR 扩增后测序验证。

2 结果

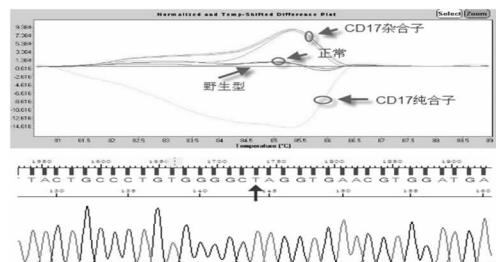
利用 PCR-HRM 成功建立了常见五种 β 地中海贫血基因型的筛查方法, 结合 PCR 产物测序可以清晰的分析纯合以及

杂合突变与野生型基因型。见图 1~4。在 IVS-II-654 位点下游发现一个中国人群常见的 SNP 位点, 见图 4。



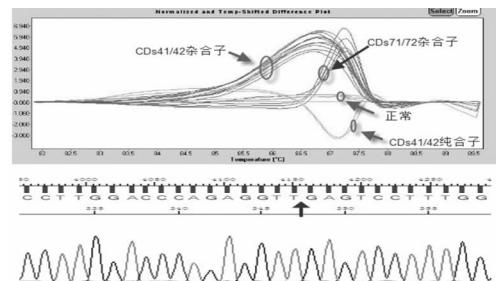
下图箭头:突变碱基所在位置以及突变类型。

图 1 g. -28(c.-78)A>G 熔解曲线以及纯合突变 PCR 产物反向测序结果



下图箭头:突变碱基所在位置以及突变类型。

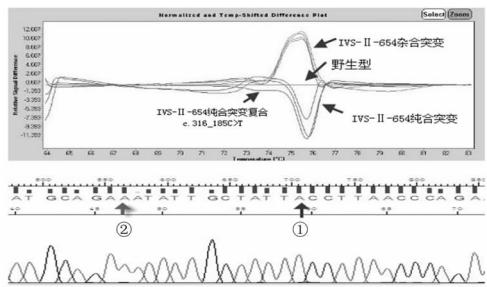
图 2 CD17A>T 熔解曲线以及纯合突变 PCR 产物正向测序结果



下图箭头:发生缺失的位置。

图 3 CD41-42 以及 CD71-72 熔解曲线以及 PCR 产物正向测序验证 CD41-42 纯合突变结果(c. 126-129delCTTT)

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(B2010032); 广州市科技计划项目(2010B031600120)。 △ 通讯作者, E-mail: yinaihua@vip.126.com



下图箭头①:IVS-II-654 纯合子(c. 316-197C>T);下图箭头②:SNP 位点(c. 316-185C>T)。

图 4 IVS-II-654 位点的熔解曲线以及纯合突变 PCR 产物测序结果

3 讨 论

准确、快速的实验室基因诊断方法对于防止重型 β 地中海贫血患儿出生具有重要意义。珠蛋白基因测序虽然是诊断地中海贫血的金标准,也是国外普遍应用于地中海贫血基因诊断的方法,但因 DNA 测序设备、试剂昂贵,以及对实验室人员技术要求都较高,无法在临床广泛开展,因此,国内外关于地中海贫血基因诊断的研究报道不少。例如,多重等位基因特异性 PCR(MASPCR)进行 β 地中海贫血的基因诊断^[6],该方法克服了 RDB 操作繁杂的缺点,但是只能诊断少数几种常见 β 地中海贫血,无法诊断较少见的突变类型,不适合临床应用。将荧光定量 PCR 用于 β 地中海贫血基因检测的方法^[7]与常规 PCR 不同之处在于它能精准地判断是否具有某种点突变,因此可以用来检测以点突变为主的 β 地中海贫血,但是与 MASPCR 类似的是该方法同样不能检测未知突变,而且如果针对已知两百多种突变都设计探针的话,成本又太高,因此该方法也无法普遍用于临床作为独立的基因诊断方法。基因芯片也可以用于诊断 β 地中海贫血基因诊断,虽然解决了通量和精确性问题,可以一次性检测多种突变类型,但由于目前没有国产的芯片,成本明显高于现有诊断方法,难以普遍推广。

HRM 技术以其灵敏度高,检测通量高的优势,近年来在基因突变筛查领域应用逐渐广泛。本研究在长期从事地中海贫血基因诊断的工作基础上,利用积累的大量各种基因型标本,将常见的 5 种点突变利用 HRM 技术进行分析,结果显示无论纯合或者杂合突变均可以较好的区分于野生型。因为其原理是不同 DNA 解链温度不同,扩增片段一般限制在 100~

• 检验技术与方法 •

BV 三联检测在细菌性阴道病诊断中的应用

徐慧丽,吴冬生,钟桥

(苏州市立医院本部检验科,江苏苏州 215002)

摘要:目的 探讨 BV 三联检测在妇科患者诊断细菌性阴道病中的临床价值。方法 对 3 300 例妇科患者行阴道分泌物 BV 三联(唾液酸苷酶、过氧化氢酶、白细胞酯酶)检测及显微镜阴道分泌物常规检测,并统计细菌性阴道炎、滴虫性阴道炎及霉菌性阴道炎在临床妇科炎症中的发生率。结果 根据临床表现和 BV 三联检测及阴道分泌物常规检测结果显示,细菌性阴道病发生率为 32.6%,显著高于滴虫性阴道炎 3.6% 及霉菌性阴道炎 12.2%,其中 20~49 岁的育龄妇女均为 BV 高发年龄,其他年龄段也有一定的阳性率。结论 BV 在妇科门诊的发病率较高,应加强 BV 三联检测在妇科门诊的推广与应用。

关键词:细菌性阴道病; 阴道分泌物; BV 三联试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.046

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3203-03

细菌性阴道病(BV)的发病原因主要是阴道中正常菌群的

200 bp 范围之内,每一个碱基的突变均导致一个变性峰的出现。在研究过程中,发现了 5 种常见突变以外的未知突变,经过 PCR 产物测序发现该突变为 IVS-II-666(c. 316-185 C>T),经过后期增加测序数据(尚未报道)发现该突变在中国人群中普遍存在,目前依据已有数据一般将其定义为多态变异,但其是否与其他位点之间存在协同效应尚需要进一步研究。

本研究针对广东地区常见的五种点突变 β 地中海贫血基因型,利用 PCR-HRM 技术对 β 地中海贫血进行基因筛查,建立了实验室快速检测的方法,可以明显缩短检测周期。因其检测突变依据变性峰的差异,必须依赖于 DNA 测序作为最后判断标准。作为一种快速的筛查手段,PCR-HRM 技术可以成为临床地中海贫血基因诊断有效地方法学备份。

参考文献

- 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):126-127.
- 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(5):517-522.
- Martino A, Mancuso T, Rossi AM. Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: a comparison with the TaqMan method[J]. J Biomol Screen, 2010, 15(6):623-629.
- Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations[J]. Hum Mutat, 2009, 30(6):857-859.
- Vossen RM, Aten E, Roos A, et al. High-Resolution melting analysis(HRMA)-More than just sequence variant screening human mutation[J]. Hum Mutat, 2009, 30(6):860-866.
- 田晶,王峰,薛金凤,等.2型重组腺病毒介导的 β -地中海贫血基因治疗实验[J].上海交通大学学报:医学版,2011,31(1):9-14.
- 潘婷.广西重型 β -地中海贫血 BCL11A 基因多态性与 HbF 及 γ -珠蛋白表达的相关性研究[D].广西:广西医科大学,2012.
- Takahashi N, Hiyama K, Kodaira M, et al. An improved method for the detection of genetic variations in DNA with denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Mutat Res, 1990, 234(2):61-70.

(收稿日期:2013-10-01)

优势被厌氧菌群所取代,如加特纳菌、棒状杆菌、嗜血杆菌等引