

• 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<sup>△</sup>  
(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<sup>[1]</sup>,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%<sup>[2]</sup>,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<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3-5]</sup>。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

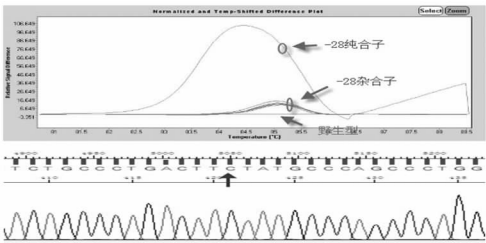
**1.1 检测样本** 选用已知基因型的地中海贫血 DNA 标本,进行检测。

**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 μL,2× conc. Master Mix 10 μL,引物及镁离子浓度为 2.5 mmol/L,并用去离子水补充至 20 μL。PCR 反应条件为 95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,56 ℃ 或 52 ℃ 15 s(检测-28 和 CD17 突变时引物退火温度为 56 ℃,检测 CD41-42、CD71-72、IVS-Ⅱ-654 突变时引物退火温度为 52 ℃),72 ℃ 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 ℃ 1 min,40 ℃ 1 min,然后以 0.1 ℃/s 的速度从 60 ℃ 升温至 90 ℃ 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。

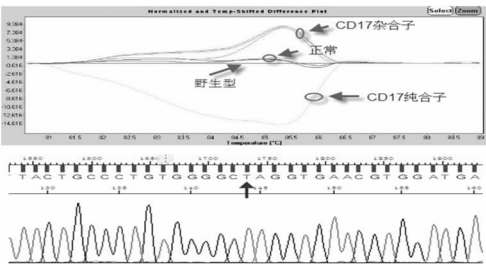
2 结 果

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

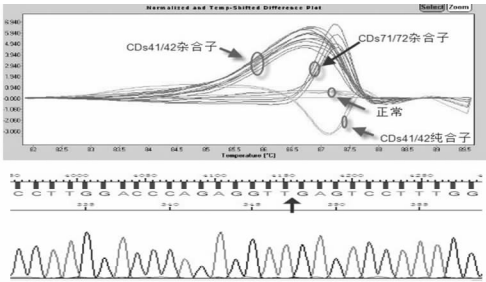
杂合突变与野生型基因型。见图 1~4。在 IVS-Ⅱ-654 位点下游发现一个中国人群常见的 SNP 位点,见图 4。



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)。 <sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:yinaihua@vip.126.com。

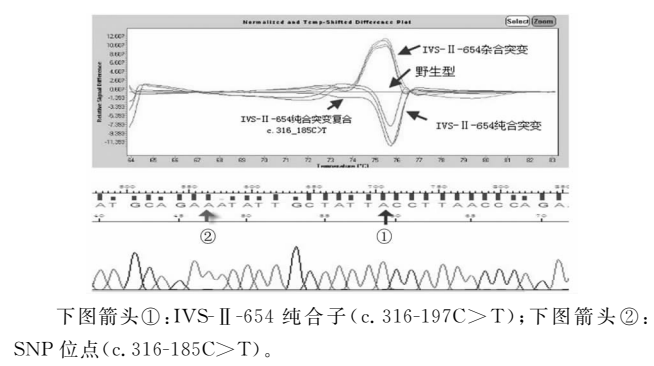


图 4 IVS-II-654 位点的熔解曲线以及纯合突变 PCR 产物测序结果

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<sup>[6]</sup>，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<sup>[7]</sup>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

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的方法学备份。

参考文献

[1] 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.  
[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(5):517-522.  
[3] 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.  
[4] Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations[J]. Hum Mutat,2009,30(6):857-859.  
[5] 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.  
[6] 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.  
[7] 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.  
[8] 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)