

• 论 著 •

滤纸干血片毛细管电泳技术在新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的应用*

万志丹, 陈敬林, 黄 湘[△], 吴学威, 李冬秀, 杨海鑫

(南方医科大学附属中山博爱医院新生儿疾病筛查中心, 广东中山 528403)

摘要:目的 探讨干血片毛细管电泳技术在新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血(以下简称 α -地贫)筛查中的应用价值。方法 使用干血片毛细管电泳仪对 46 718 例新生儿足跟血滤纸干血片标本进行血红蛋白(Hb)电泳分析,检测 HbA、HbF、HbA₂ 和异常 Hb 的水平,对筛查表型阳性的病例召回进行基因分析。结果 46 718 例新生儿足跟血滤纸干血片标本中检测出巴特血红蛋白(Hb Bart's)阳性者 2 598 例,筛查阳性率 5.56%(2 598/46 718);召回 544 例经基因分析确诊 477 例 α -地贫基因携带者,故 Hb Bart's 带筛查与基因确诊的符合率为 87.68%(477/544)。进一步分析其临床表型与 Hb Bart's 水平的关系可见,随着临床表型的加重,Hb Bart's 水平逐渐增加,且差异有统计学意义($P=0.000$)。结论 滤纸干血片毛细管电泳分析技术与基因分析有较好的一致性,可根据 Hb Bart's 水平的多少初步判断 α -地贫的临床分型。

关键词:干血片; 毛细管电泳; α -珠蛋白生成障碍性贫血; 新生儿

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)06-0731-03

Application of capillary electrophoresis by dried filter blood paper for screening of α -thalassemia in neonates*

Wan Zhidan, Chen Jinglin, Huang Xiang[△], Wu Xuewei, Li Dongxiu, Yang Haixin

(The Screening Center for Neonatal Diseases of Bo'ai Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To investigate the application of capillary electrophoresis by dried filter blood paper for screening of α -thalassemia in neonates. **Methods** The hemoglobin (Hb) of 46 718 cases of neonatal dried heel blood spots were analyzed by the capillary electrophoresis and the content of HbA, HbF, HbA₂ and abnormal Hb were detected, the phenotype cases which was screened positive were recalled for genetic analysis. **Results** A total of 2 598 cases of Bart hemoglobin (Hb Bart's) positive were detected in 46 718 cases of neonatal heel blood dried blood spots. The screening positive rate was 5.56% (2 598/46 718). A total of 477 cases of α -thalassemia gene carriers were confirmed by genetic analysis in the 544 cases which were recalled. The coincidence rate of Hb Bart's screening and genetic diagnosis was 87.68%(477/544). By analyzing the relationship between the clinical phenotypes and the content of Hb Bart's, we found the Hb Bart's content gradually increased with the severity of clinical phenotype, and the difference was statistically significant ($P=0.000$). **Conclusion** There is a good consistency between the capillary electrophoresis of dried filter blood paper and the genetic analysis. It could be determined α -thalassemia clinical type according to the Hb Bart's content.

Key words: dried blood spots; capillary electrophoresis; α -thalassemia; neonates

α -珠蛋白生成障碍性贫血(简称 α -地贫),是一种常见的遗传性疾病^[1],主要流行于我国南方广东^[2]、广西^[3]及云南^[4]等省份,由于此类疾病无有效的治疗方法,产前筛查与诊断是有效阻止此类重型疾病胎儿出生的有效手段。本中心近年来将珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)筛查纳入新生儿疾病筛查体系,引进全自动干血片毛细管电泳技术,用于对新生儿足跟血滤纸干血片的检测,并对筛查表型阳性者召回进行常见地贫基因的检测分析,本研究就该系统的筛查价值报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 6 月至 2015 年 5 月,对包括本院在内的全市 25 个接产机构,在新生儿家属知情同意情况下采集新生儿足跟血制作滤纸干血片标本,共 46 718 份,送至本院新生儿疾病筛查中心,采用干血片毛细管电泳仪进行电泳筛查,对

筛查阳性人群及时召回做地贫基因检测。

1.2 仪器与试剂 全自动毛细管电泳采用法国 Sebia 公司的 Capillarys2 全自动毛细管电泳仪、配套血红蛋白(Hb)电泳试剂盒 Capillarys2 Hemoglobin(E)及质控品进行。采用 PCR 扩增仪、分子杂交仪、电泳仪及 α -珠蛋白基因诊断试剂盒进行基因分析,由深圳益生堂生物有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 电泳 新生儿出生后 3~5 d 采集足跟血,按照 Capillarys2 全自动毛细管电泳仪的操作要求完成定标、质控和标本检测。

1.3.2 基因检测 对召回的表型阳性病例采用多重断裂点 PCR(Gap-PCR)技术进行最常见的东南亚型(--SEA)、右侧缺失(- α 3.7)、左侧缺失(- α 4.2)3 种缺失型 α -地贫及非缺失型 α -

* 基金项目:中山市科技计划项目(2014A1FC006);广东省医学科研基金项目(A2014890)。 作者简介:万志丹,女,副主任检验师,主要从事新生儿疾病筛查、产前筛查及诊断等相关研究。 [△] 通讯作者, E-mail:340382761@qq.com。

地贫基因分析。

1.3.3 评估方法 新生儿足跟血滤纸干血片 Hb 电泳如出现异常 Hb 带,即巴特血红蛋白(Hb Bart's)为 α -地贫表型阳性。对表型阳性的病例进行召回,并进行基因检测,以基因检测作为参考方法,比较电泳筛查结果与基因检测结果的符合率;分析常见临床分型的 Hb Bart's 水平分布。

1.4 统计学处理 采用 Excle2007 软件录入数据,应用 SPSS19.0 进行数据处理及统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验,即 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干血片 Hb Bart's 筛查与基因诊断的符合率 对干血片毛细管电泳筛查结果中含有 Hb Bart's 的 2 598 例 α -地贫表型阳性的病例召回了 544 例行基因确诊,其中确诊为 α 珠蛋白基因缺失 477 例,符合率为 87.68% (477/544)。其中以--SEA/ $\alpha\alpha$ 型构成比最高,各基因型检出数及构成比情况见表 1。

表 1 各基因型检出数及其构成比

临床分型	n	基因型	构成比[n(%)]
静止型	58	- α 3.7/ $\alpha\alpha$	43(9.01)
		- α 4.2/ $\alpha\alpha$	15(3.14)
标准型	378	--SEA/ $\alpha\alpha$	375(78.62)
		- α 3.7/- α 4.2	3(0.63)
Hb H 病	19	--SEA/- α 3.7	7(1.47)
		--SEA/- α 4.2	6(1.26)
		--SEA/ $\alpha\alpha$ WS	6(1.26)
Hb Bart's 水肿胎	0	--SEA/--SEA	0(0.00)
非缺失型 α -地贫	22	$\alpha\alpha$ CS/ $\alpha\alpha$	12(2.52)
		$\alpha\alpha$ QS/ $\alpha\alpha$	9(1.89)
		$\alpha\alpha$ WS/ $\alpha\alpha$	1(0.21)

2.2 临床分型与 Hb Bart's 水平的分布 对召回人群做进一步的基因检测,分析其临床表型与 Hb Bart's 水平的关系,由分析结果可见,随着临床表型的加重,Hb Bart's 水平逐步增加,4 种临床分型 Hb Bart's 水平比较差异有统计学意义($\chi^2 = 223.167, P = 0.000$),见表 2。

表 2 临床表型与 Hb Bart's 水平的关系

临床分型	n	Hb Bart's 水平($\bar{x} \pm s, \%$)
静止型	58	0.40 \pm 0.19
标准型	378	2.10 \pm 0.71
Hb H 病	19	9.39 \pm 4.58
非缺失型 α -地贫	22	0.67 \pm 0.15

3 讨论

α -地贫的产生机制主要是 α -珠蛋白基因缺失或点突变造成 α -珠蛋白链合成减少,造成非 α -链相对过剩而形成四聚体,在新生儿期 γ 链形成四聚体,在 Hb 电泳中即表现为 Hb Bart's 带。因此,目前国内外多常用毛细管 Hb 电泳来进行地贫的筛查^[5-7]。在新生儿 α -地贫的筛查中,一般采用脐带血进行早期筛查^[8],脐血标本不易采集、保存、运送,临床应用受到一定

的限制。与脐带血比较,滤纸干血片具有更易长期保存,运输方便,对新生儿创伤小,且可与新筛项目同时检测等特点,通过新筛网络召回地贫基因诊断阳性的新生儿进行遗传咨询,发放地贫基因携带卡片并给予识别,作为以后婚育和优生指导的依据。及早检出重型地贫及重度贫血儿,并给予合理治疗,可提高患儿生活质量。后期的规范化管理与干预将从根本上降低人群地贫基因的携带率,提高人口素质。因此,滤纸干血片具有更广泛的应用前景。

已有报道使用 Sebia 公司 Capillarys 2 系统分析胎儿 Hb,可替代 DNA 分析在产前确诊 Hb Bart's,是一种简单、快速、有效的方法^[9];Mantikou 等^[10]也认为该系统在对新生儿 Hb 异常进行筛查时,采用新鲜脐血和干血片,具有同样好的效果。而脐带血中 Hb Bart's 带增加与 α -Hb 链的缺陷存在相关性^[11],Rugless 等^[12]也指出 Hb Bart's 带是 α -地贫筛查的一项敏感指标。

为进一步验证 Capillarys 2 干血片毛细管电泳仪检测足跟血中的 Hb Bart's 带对 α -地贫的筛查价值,本研究回顾性分析近年来本院新生儿足跟血滤纸干血片标本的毛细管电泳结果及阳性召回的基因检测结果,对该方法与基因检测结果的符合率及各临床表型的 Hb Bart's 带进行分析。结果表明干血片筛查与地贫基因诊断的符合率达 87.68% (477/544),这稍低于叶立新等^[13]报道的干血片筛查基因符合率(91.8%),可能与本实验室的阳性召回率过低有关。在筛查及确诊病例中,以标准型 α -地贫最多,这与本地区人群 α -地贫基因携带率有关^[14]。本研究并未检出 Hb Bart's 水肿胎患儿,表明本地区通过产前筛查和诊断在重症地贫的防控上取得了一定成效。

本研究同时对 α -地贫各临床分型与 Hb Bart's 带水平间的关系进行了探讨,结果表明不同的临床分型中,Hb Bart's 水平不同,随着临床表型的加重,Hb Bart's 水平逐渐增加,且临床表型之间 Hb Bart's 水平的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。值得注意的是,本研究同时探讨了非缺失型 α -地贫,发现非缺失型 α -地贫 Hb Bart's 水平介于静止型与标准型之间,因此临床上应注重对非缺失型 α -地贫的筛查。本研究中各地贫临床表型 Hb Bart's 带水平与脐血 Hb Bart's 带水平相比,相对较低,可能与本方法的筛查敏感性有关。

综上所述,本研究通过回顾性分析滤纸干血片毛细管电泳与基因检测结果的符合率,讨论了临床表型与 Hb Bart's 带水平的关系,表明该方法对新生儿 α -地贫的筛查具有一定的临床意义,但该方法在 α -地贫中的筛查灵敏度、特异度等价值需进一步研究进行综合评判。

参考文献

[1] Siala H, Ouali F, Messaoud T, et al. alpha-Thalassaemia in Tunisia: some epidemiological and molecular data[J]. J Genet, 2008, 87 (3): 229-234.

[2] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of alpha-and beta-globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89855.

[3] Yin XL, Wu ZK, He YY, et al. Treatment and complications of thalassaemia major in Guangxi, Southern China[J]. Pediatr Blood Cancer, 2011, 57(7): 1174-1178.

[4] Zhang J, Zhu BS, He J, et al. The spectrum of alpha- (下转第 735 页)

2.5 精密度检测和回收试验 分别取不含有上述 16 种农药的空白水产品样品作为基质,进行低、中、高 3 种不同水平(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的加标回收试验,每个水平平行检测 6 次,3 个加标水平的平均回收率为 72.6%~115.2%,相对标准偏差(RSD)均小于 7.5%,见表 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。说明方法的准确度和精密度良好。

2.6 样品检测 应用本方法对 40 份不同采样地点的水产品,如鲫鱼、青虾、螃蟹、河蚌等样品进行有机氯农药残留的检测,均未检出有机氯。

3 讨论

目前,农药多残留分析方法采用的提取溶剂有丙酮、作为二氯甲烷、乙腈、正己烷等。通过试验比较,本实验采用乙腈作为溶剂,而乙腈也具有通用性强,对农药的溶解度较大,可溶入油脂类杂质少,且分子小,组织穿透能力强等特点。

使用固相萃取柱可以有效净化基质中脂肪等杂质,而不同的固相萃取柱对样品基质净化的效率也不相同。本文通过加标回收试验比较了 3 种不同固相萃取柱的回收率,选择 Carb/ NH_2 。

本文建立了采用乙腈提取,Carb/ NH_2 固相萃取柱净化,气相色谱检测水产品中有机氯类农药残留的检测方法。本方法检测灵敏度高,精密度好,线性好,能满足有机氯类农药残留分析的要求,为水产品类食物中有机氯类农药残留分析提供了可靠的检测手段,也为有机氯类及其他农药品种的检测提供了参考依据。

参考文献

[1] Ameer WB, Trabelsi S, Megdiche YE, et al. Concentration of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Bizerte Lagoon(Northern Tunisia)[J]. *Chemosphere*, 2013, 74(3): 2372-2380.

(上接第 732 页)

and beta-thalassemia mutations in Yunnan Province of South-western China[J]. *Hemoglobin*, 2012, 36(5): 464-473.

[5] 陈星,初德强,梁开艳,等.全自动毛细管电泳技术在筛查地中海贫血中的临床诊断价值[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(4): 635-638.

[6] 张强,何升,阙婷,等. ROC 曲线确立血液学各指标在地贫筛查中的 CUT-OFF 值[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 19(1): 25-27.

[7] 索明环,温冬梅,张秀明,等.全自动毛细管电泳检测 11519 例血血红蛋白的结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(8): 913-914.

[8] 彭兰芬,汤惠华,曾见芬,等.新生儿脐血血红蛋白电泳对 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断的价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 23(1): 40-42.

[9] Liao C, Zhou JY, Xie XM, et al. Cord blood analysis for rapid prenatal confirmation of Hb Bart's disease using the Sebia Capillary electrophoresis system[J]. *Hemoglobin*, 2012, 36(2): 186-191.

[10] Mantikou E, Harteveld CL, Giordano PC. Newborn screening for

[2] 田良良,史永富,王媛,等.气相色谱法测定虾中有机氯农药和多氯联苯残留量[J]. *分析试验室*, 2014, 33(9): 1043-1046.

[3] 张小辉,贾海燕,祁士华,等.汉江水体和鱼体内有机氯农药残留水平及积累特征分析[J]. *安全与环境工程*, 2014, 21(2): 40-45.

[4] 刘慧慧,徐英江,邓旭修,等.莱州湾及东营近岸海域生物体中有机氯农药和多氯联苯污染状况与风险评价[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(5): 1325-1332.

[5] 郑林,施泽明,李佳宣,等.微波萃取气相色谱法测定鱼肉中有机氯残留[J]. *四川理工学院学报:自然科学版*, 2010, 23(1): 62-64.

[6] 张权,陈文生,洪亮,等. MSPD-GPC 净化 GC-ECD 法测定辣椒酱中 8 种有机氯农药残留分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(8): 295-298.

[7] 白有成,金海燕,卢勇,等.长江口嵊泗海域的生物体内持久性污染物残留量及分布特征[J]. *海洋学研究*, 2011, 29(3): 162-168.

[8] 安东,秦春艳,方展强,等.珠江口 14 种习见水生动物体内滴滴涕含量的测定与评价[J]. *天津农业科学*, 2014, 20(1): 33-39.

[9] 肖丽和,刁璇,谢耀轩,等. QuEChERS 法联合在线 GPC-GC-MS 检测冠心病丹参胶囊中 20 种有机氯农药残留[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(15): 1749-1753.

[10] 孙晓杰,郭萌萌,王苏玥,等.分散固相萃取-在线凝胶色谱-气相色谱-质谱联用法快速检测紫菜中的农药多残留[J]. *色谱*, 2014, 32(10): 1124-1130.

[11] 谢耀轩,王淑红,王铁杰,等.分散固相萃取-在线凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱法检测香港中成药中 20 种有机氯农药残留[J]. *沈阳药科大学学报*, 2014, 31(7): 535-541.

[12] 叶瑞洪,苏建峰.分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬、牛奶、植物油和动物肌肉中残留的 61 种有机磷农药[J]. *色谱*, 2011, 29(7): 618-623.

(收稿日期:2015-12-20)



hemoglobinopathies using capillary electrophoresis technology: testing the Capillary neonat fast Hb device[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(16): 1345-1350.

[11] Munkongdee T, Pichanun D, Butthep P, et al. Quantitative analysis of Hb Bart's in cord blood by capillary electrophoresis system[J]. *Ann Hematol*, 2011, 90(7): 741-746.

[12] Rugless MJ, Fisher CA, Stephens AD, et al. Hb Bart's in cord blood: an accurate indicator of alpha-thalassemia[J]. *Hemoglobin*, 2006, 30(1): 57-62.

[13] 叶立新,袁晃坤,甘文彬,等.干血斑毛细管电泳技术在新生儿 α -地中海贫血筛查中的应用[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 32(8): 1205-1207.

[14] 张翠梅,王莹,高建慧,等.中山市户籍人群中 α -地中海贫血的分子流行病学调查[J]. *中国儿童保健杂志*, 2010, 18(5): 361-364.

(收稿日期:2015-12-28)