

## · 论 著 ·

102 例罕见珠蛋白生成障碍性贫血基因突变测序分析<sup>\*</sup>靳旺杰<sup>1</sup>, 李莉艳<sup>1#</sup>, 钟 梅<sup>1</sup>, 宋兰林<sup>1</sup>, 阎文宏<sup>2△</sup>

(1. 南方医科大学南方医院产前诊断和遗传病诊断技术中心, 广州 510515;

2. 南方医科大学法医学院, 广州 510515)

**摘要:**目的 通过对  $\alpha$  及  $\beta$ -珠蛋白基因测序分析发现罕见珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)基因突变,了解罕见突变的出现频率,丰富中国人群地贫基因突变谱。方法 采用一代测序对表型与基因型不符的患者进行  $\alpha$  或  $\beta$ -珠蛋白基因编码区序列分析。结果 通过测序发现 102 例罕见地贫基因突变,其中  $\beta$ -地贫 79 例,共 35 种突变类型;  $\alpha$ -地贫 23 例,共 11 种突变类型。结论 地贫基因测序可以发现罕见突变基因,明确患者的基因型,为罕见地贫家系产前诊断提供重要支持,降低漏检率,降低重型地贫患儿出生率。

**关键词:**罕见地贫; 测序; 基因突变**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.15.002**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2017)15-2019-03Sequencing analysis of 102 cases of rare thalassemia gene mutations<sup>\*</sup>JIN Wangjie<sup>1</sup>, LI Liyan<sup>1#</sup>, ZHONG Mei<sup>1</sup>, SONG Lanlin<sup>1</sup>, KAN WenHong<sup>2△</sup>

(1. Technology Center of Prenatal Diagnosis and Genetic Disorders, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. School of Forensic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

**Abstract: Objective** To discover the mutations of rare thalassemia genes by sequencing of  $\alpha$  and  $\beta$ -globin genes, to understand the frequency of rare mutations and to enrich thalassemia gene mutation spectrum in Chinese population. **Methods** For the cases of phenotype and genotype inconsistent, the 1st generation of sequencing was performed for  $\alpha$  or  $\beta$ -globin gene coding region sequence analysis. **Results** A total of 102 patients with rare thalassemia gene mutations were found by sequencing, including 79 cases of  $\beta$ -thalassemia with 35 kinds of mutant types, and 23 cases of  $\alpha$ -thalassemia with 11 kinds of mutant types. **Conclusion** The thalassemia gene sequencing could reveal rare mutations in genes, identify the genotype of patients, provide important support for prenatal diagnosis of rare thalassemia families, and reduce the missing rate and birth rate of children with thalassemia.

**Key words:**rare thalassemia; sequencing; gene mutation

珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫),是世界上最早被阐明分子基础的人类单基因病之一。根据其致病基因不同分为  $\alpha$  和  $\beta$  两类。 $\alpha$ -珠蛋白基因位于 16 号染色体 16p13.3 位点; $\beta$ -珠蛋白基因位于 11 号染色体 11p15.3 位点。目前我国常见  $\alpha$ -地贫基因检测包括 3 种缺失突变(-SEA、- $\alpha$ 3.7 和- $\alpha$ 4.2)和 3 种点突变(CS、WS 和 QS),常见  $\beta$ -地贫基因检测包括 17 种点突变(CD41-42、CD43、IVS-II-654、-28、-29、-30、-32、CD71-72、 $\beta^E$ 、CD17、CD31、CD14-15、CD27-28、IVS-I-1、IVS-I-5、CAP+1 和 IntM)<sup>[1]</sup>,涵盖了中国人群中 95% 以上的  $\alpha$  和  $\beta$ -地贫致病基因缺陷,但仍有 5% 罕见或未知突变不能用常规方法进行检测。如果不做进一步的检测,则容易出现漏诊、误诊。罕见地贫基因突变需要通过测序和多重连接探针扩增技术(MLPA)等方法进行检测<sup>[2]</sup>。本研究通过对  $\alpha$  及  $\beta$ -珠蛋白基因编码区序列进行测序分析,试图找到罕见地贫基因位点。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 通过分析南方医科大学南方医院产前诊断和遗传病诊断技术中心 2011—2016 年检测的地贫基因患者资料,发现疑似罕见地贫患者共 153 例,其中  $\alpha$ -地贫 45 例, $\beta$ -地贫 108 例。罕见  $\alpha$ -地贫的纳入标准:血红蛋白(Hb)H 病表型,

但基因型仅为标准型的患者;生育过 HbH 病患儿,但基因型正常的父母。排除缺铁性贫血,但表型仍为小细胞低色素贫血,基因型正常的患者。罕见  $\beta$ -地贫的纳入标准:Hb 电泳结果显示 HbA2>3.5%,小细胞低色素贫血,基因型正常患者;重型地贫表型,但基因型仅为携带者。

**1.2 方法** 对 153 例患者分别进行  $\alpha$  和  $\beta$ -珠蛋白基因测序分析。目前用于临床基因诊断的测序技术主要是 Sanger 双脱氧链终止法<sup>[3]</sup>。其基本原理是以基于 PCR 反应制备的目的序列为模板,利用双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)通过 DNA 复制的原理产生一系列长度只差 1 个碱基连续排列的片段。利用测序仪进行检测,得到序列图谱。具体操作步骤如下。

**1.2.1 DNA 提取** 采用普通柱式法全血 DNA 提取试剂盒提取 200  $\mu$ L 全血 DNA,最后得到 100  $\mu$ L DNA 样品,浓度在 50 ng/mL 左右。

**1.2.2 PCR 扩增** 用提取好的 DNA 样品作为模板,加入 H<sub>2</sub>O、10×PCR 缓冲液、2.5 mmol/L dNTP、rTaq 酶和  $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 珠蛋白基因引物或  $\beta$ -珠蛋白基因引物(引物由上海英潍捷基公司合成),引物序列见表 1。配制好反应体系,在普通 PCR 仪上设置好程序进行扩增。

<sup>\*</sup> 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2015A030310516)。作者简介:靳旺杰,男,技师,主要从事地中海贫血基因诊断方向的研究。 <sup>#</sup> 共同第一作者:李莉艳,女,讲师,主要从事遗传病的分子诊断及产前诊断方向的研究。 <sup>△</sup> 通信作者,E-mail:jwj261@163.com。

**1.2.3 产物分析** 对 PCR 扩增产物进行琼脂糖电泳, 确定扩增产物为目的片段, 并且在浓度达标后, 将扩增产物和相对应的引物送公司进行测序。

**1.2.4 测序** 对 PCR 扩增产物进行预处理后, 在测序仪上进行测序分析, 测序完成后, 公司发回测序图谱及序列, 通过对比分析序列图谱, 找到突变基因位点, 将检测到的突变与已知的突变谱进行对比, 确定其是否为有功能的突变。

表 1  $\alpha$  及  $\beta$ -珠蛋白基因引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
HBA1-F	TGG AGG GTG GAG ACG TCC TG
HBA1-R	TCC ATC CCC TCC TCC CGC CCC TGC CTT TTC
HBA2-F	TGG AGG GTG GAG ACG TCC TG
HBA2-R	CCA TTG TTG GCA CAT TCC GG
BETA-FP	AAC TCC TAA GCC AGT GCC AGA AGA GC
BETA-RP	ATG CAC TGA CCT CCC ACA TTC CC

## 2 结 果

**2.1  $\alpha$ -珠蛋白基因测序** 通过对 45 例疑似罕见  $\alpha$ -地贫患者进行  $\alpha$ -珠蛋白基因测序分析, 共发现 23 例罕见突变基因, 11 种突变类型, 见表 2。其余 22 例疑似  $\alpha$ -地贫患者测序结果未

见异常。

**2.2  $\beta$ -珠蛋白基因测序** 通过对 108 例疑似罕见  $\beta$ -地贫患者进行  $\beta$ -珠蛋白基因测序分析, 共发现 79 例罕见突变基因, 35 种突变类型, 见表 3。其余 29 例疑似  $\beta$ -地贫患者测序结果未见异常。

表 2 11 种罕见  $\alpha$ -地贫突变类型

突变类型	所在基因	n
CD29-30(-GGA)	$\alpha 2$	1
CD30(-GAG)	$\alpha 2$	5
CD30(G→C)	$\alpha 2$	2
CD40(-G)	$\alpha 2$	1
CD43(C→G)	$\alpha 2$	1
Fusion 融合基因突变	$\alpha 2$	2
CD29(T→C)	$\alpha 1$	6
CD59(G→C)	$\alpha 1$	1
CD74(G→C)	$\alpha 1$	1
CD121(G→T)	$\alpha 1$	2
IVS-1-30(C→G)	$\alpha 1$	1

注: IVS-1-30(C→G)突变意义尚不明确。

表 3 35 种罕见  $\beta$ -地贫突变类型

突变类型	n	突变类型	n	突变类型	n
IVS-1-2(T→A)	1	Int(A→G)	1	-90(C→T)	7
IVS-1-110(G→A)	1	IVS-2-806(G→C)	1	CD6(G→A)	1
IVS-1-129(A→G)	1	-28(A→C)	3	CD7(G→A)	1
IVS-2-1(G→A)	1	-29(A→G)	1	CD9(+G)	1
IVS-2-2(-T)	1	-31(A→C)	2	CD19(A→G)	2
IVS-2-5(G→C)	5	-50(G→A)	1	CD30(A→G)	1
IVS-2-672(A→C)	2	-88(C→T)	2	CD30-32(+CGCTG)	2
CD101(A→C)	1	CD113(T→A)	3	CD121(G→T)	1
Ploy(A→G)	4	Int(G→A)	3	5'UTR+22(G→A)	2
CD35(-C)	1	CD54-58(-TATGGGCAACCCT)	4	CD98(G→A)	2
CD35(+ACCT)	1	CD56(G→A)	1	3'UTR+131(G→A)	2
CD37(G→A)	14	CD89-93(-AGTGAGCTGCACTG)	2		

## 3 讨 论

地贫作为严重致死、致残的遗传性疾病, 在世界范围内分布广泛, 从地中海沿岸和非洲大部分地区到中东、印度次大陆、中国南方、东南亚, 并延伸至印度尼西亚和太平洋地区, 而美国及中美洲、南美洲等地国家因移民原因也成为高发地区<sup>[4-5]</sup>。地贫临床表型多样, 轻者需要反复输血, 重者在未成年即夭折, 甚至在胎儿时期就胎死腹中, 给家庭带来巨大的精神压力及经济负担。目前对于重型地贫最为有效的治疗措施是进行骨髓干细胞移植, 但是骨髓移植受到很多因素影响, 例如难以找到匹配供者; 移植手术费用昂贵, 一般家庭难以承受; 有复发风险, 术后需要不断监测等。因此, 控制和降低重型地贫患儿的出生率是目前地贫防治工作的重点<sup>[6]</sup>。通过人群筛查和遗传咨询, 发现携带同型地贫基因的育龄夫妇, 对其所孕育胎儿进行早期产前诊断, 明确其基因型, 有助于指导妊娠, 降低出生

缺陷。

通过对 153 例疑似罕见地贫患者进行测序分析, 共发现 102 例罕见突变患者, 阳性率高达 66.7%, 其中  $\beta$ -地贫 79 例,  $\alpha$ -地贫 23 例。有 13 例罕见地贫家系进行了产前诊断, 同时对胎儿进行了罕见突变检测, 其中 4 例为双重杂合子, 3 例罕见突变携带者, 4 例常见突变携带者, 2 例未见异常。明确胎儿基因型, 能够为合理指导妊娠提供有力证据。因此,  $\alpha$  及  $\beta$ -珠蛋白基因测序对于指导产前地贫基因诊断具有重要作用。在临床实践工作中, 对于表型与基因型不符的患者, 应进行罕见基因检测以明确其基因型, 防止误诊或漏诊。下列情况应该高度怀疑罕见  $\alpha$ -地贫: HbH 病表型, 但基因型仅为标准型的患者; 生育过 HbH 病患儿, 但基因型正常的父母; 排除缺铁性贫血, 但表型仍为小细胞低色素贫血, 基因型正常的患者。下列情况应高度怀疑罕见  $\beta$ -地贫: Hb 电泳提示 HbA2>3.5%, 小细胞

低色素贫血,基因型正常的患者;重型地贫表型,但基因型仅为携带者。

本研究中发现的 11 种罕见  $\alpha$ -地贫突变类型,有 6 种出现在  $\alpha 2$  基因上,5 种出现在  $\alpha 1$  基因上;除 1 例为  $\alpha 1$  基因内含子区突变外,其他均为外显子区突变,提示  $\alpha$ -地贫主要是外显子区突变引起的,内含子区的突变意义尚不明确。测序发现的 35 种罕见  $\beta$ -地贫突变类型中,包括 8 种内含子区突变,22 种外显子区突变,2 种 Int 帽子区突变,1 种 5'UTR 非编码区突变,1 种 3'UTR 非编码区突变,1 种 Ploy 区突变。所有突变基因型均与其临床表型相符。可以看出导致  $\beta$ -地贫的基因突变分布区域较广,在编码区和非编码区均有出现,大部分为编码区基因突变。在本次研究中有一些突变位点出现频率较高,例如: $\alpha\alpha$ CD29(T→C)共 6 例, $\alpha$ CD30(-GAG) $\alpha$ 共 5 例,CD37(G→A)共 14 例,-90(C→T)共 7 例,IVS-2-5(G→C)共 5 例。建议将这些高频突变,加入常见突变检测范围,可以提高试剂盒检测准确性,降低漏诊率<sup>[7]</sup>。

本研究中仍有 51 例疑似罕见地贫患者测序未见异常,考虑可能为  $\alpha$  和  $\beta$ -珠蛋白基因上游调控机制的改变或修饰基因突变等引起<sup>[8-9]</sup>。尽管测序技术可以发现罕见的  $\alpha$  及  $\beta$ -地贫基因突变,但也有一定的局限性。一些罕见缺失突变无法通过测序检测,需要用 MLPA 等方法进行检测<sup>[10]</sup>。因此采用不同方法联合检测罕见地贫突变,可以起到取长补短的作用,使罕见地贫基因检测更加准确。

## 参考文献

- [1] 李朋,张杰.地中海贫血基因检测方法的研究进展[J].中国妇幼保健,2016,31(4):891-894.
- [2] 叶国永,张莉,黄国珍,等. MLPA 与基因测序技术检测联用检测地中海贫血基因缺陷分析[J]. 中国当代医药,2012,19(24):90-91.

(上接第 2018 页)

析系统其次,手工检测最差<sup>[7-8]</sup>。3 种检测方式检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 时,灵敏度均为 100.00%,由此可以看出,3 种检测方式都能灵敏地检测出 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag<sup>[9-10]</sup>。另外,3 种方式对 40 例患者血清分别进行 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 检测,检测结果完全一致,Pre-S1Ag 阳性 3 例和 Pre-S2Ag 阳性 3 例;3 种方法检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 为阴性的标本的 S/CO 值在所分的 5 个点段中所占的百分率几乎是相同的,经过  $\chi^2$  检验分析,差异无统计学意义( $P>0.05$ );试验中阳性标本的 S/CO 值的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

综合上述实验结果,可以看出,在临床应用中,Addcare ELISA800 全自动酶免仪检测方式精密度好,灵敏度高,能够较好地完成 ELISA 检测,提供较高质量的检测结果,更适合临床应用。

## 参考文献

- [1] 王文碧.探讨酶联免疫吸附试验在包虫病诊断中的应用价值[J].中外医疗,2015,34(26):10-12.
- [2] 任秀,骆海朋,崔生辉.酶联免疫吸附法和 DNA 检测法在肉类鉴别中的应用[J].中国食品卫生杂志,2015,27(1):93-97.
- [3] Zhao B, Sedlak JC, Srinivas R, et al. Exploiting temporal

- [3] 解增言,林俊华,谭军,等.DNA 测序技术的发展历史与最新进展[J].生物技术通报,2010,26(8):64-70.
- [4] Abuzenadah AM, Hussein IM, Damanhouri GA, et al. Molecular basis of  $\beta$ -thalassemia in the western province of Saudi Arabia: identification of rare  $\beta$ -thalassemia mutations[J]. Hemoglobin, 2011, 35(4):346-357.
- [5] Viprakasit V, Ekwattanakit S, Chalaow N, et al. Clinical presentation and molecular identification of four uncommon alpha globin variants in Thailand. Initiation codon mutation of  $\alpha 2$ -globin Gene (HBA2: c. 1delA), donor splice site mutation of  $\alpha 1$ -globin gene (IVSI-1, HBA1: c. 95 + 1G > A), hemoglobin Queens Park/Chao Pra Ya (HBA1: c > A) and hemoglobin Westmead (HBA2: c. 369C > G)[J]. Acta Haematol, 2014, 131(2):88-94.
- [6] 李兵.广东省地中海贫血流行及防控现状评价[D].广州:南方医科大学,2015.
- [7] 黄海龙,方颖迪,林娜,等.4 种罕见  $\beta$ -地中海贫血基因检测膜条的制备及其临床应用[J].中国妇幼保健,2016,31(1):127-129.
- [8] 余丽华.评价 KLF1 基因对  $\alpha$ -地中海贫血的遗传修饰作用[C].广州:广东省遗传学会第九届代表大会暨学术研讨会,2014.
- [9] 王志鹏. AHSP 基因对  $\beta$ -地中海贫血表型的修饰及 BCL11A 基因在  $\beta$ -地中海贫血患者持续表达胎儿血红蛋白中的作用[D].广州:南方医科大学,2011.
- [10] 丁燕玲,黄际卫.地中海贫血罕见突变的研究进展[J].中国优生与遗传杂志,2016,36(2):4-5.

(收稿日期:2017-02-21 修回日期:2017-04-21)

- 
- collateral sensitivity in tumor clonal evolution[J]. Cell, 2016, 165(1):234-246.
  - [4] 侯佳宜,王晓玲,宋玲,等. Addcare 600 全自动酶免分析仪与手工法检测乙型肝炎表面抗原的对比[J]. 中国药物与临床,2015,15(11):1659-1660.
  - [5] Jordan D, Kirkland P, Morris S, et al. Describing the within laboratory and between laboratory agreement of a serum ELISA in a national laboratory network[J]. Prev Vet Med, 2012, 104(3-4):240-248.
  - [6] 王绍兴.质量控制在临床免疫检验中的作用[J].医疗卫生设备,2016,37(10):216.
  - [7] 成景松,朱小莉.两台国产生化仪器在常规实验室的精密度性能评价[J].检验医学与临床,2014,11(1):95-97.
  - [8] 周双艳,胡敏,赵克斌,等.全自动酶联免疫吸附法检测血清丙型肝炎抗体精密度评价[J].中国药物与临床,2016,16(3):305-309.
  - [9] 韩忠学,刘静,樊霞.儿童梅毒 4 种检测方法的灵敏度及特异性比较[J].武警医学,2015,26(2):116-117.
  - [10] 吴芳芳.甲亢、甲减患者甲功五项水平及其各项指标的灵敏度及临床意义[J].医学理论与实践,2016,29(4):520.

(收稿日期:2017-02-19 修回日期:2017-04-19)