

论著·临床研究

SPR 技术在产前检测胎儿 RhD 血型基因中的应用*

李妙珊¹, 伍昌林^{2△}, 何建安³, 顾大勇³, 邵超鹏²

(1. 广东省梅州市中医医院检验科, 广东梅州 514000; 2. 深圳市第二人民医院输血科, 广东深圳 518035; 3. 深圳市检验检疫局保健中心, 广东深圳 518045)

摘要:目的 探讨利用表面等离子体共振技术(SPR)检测胎儿 RhD 血型基因的可行性, 建立一种胎儿 RhD 血型基因快速诊断的新方法。方法 采用氨基偶联法在 SPR 芯片表面固定不同种类 DNA 对应的 RNA 探针, 并优化芯片分析条件, 再运用 RNase H 酶水解, 放大检测信号, 确定该方法检测的条件; 再用 RhD 血型基因第 5, 7 外显子的 RNA 探针检测其相应的 DNA 分子, 分析 SPR 芯片检测信号的特异性与灵敏性。结果 SPR 技术检测 RhD 血型基因第 5, 7 外显子的灵敏度与特异性均较好, RhD 血型的 RNA 探针在 SPR 芯片上可特异性地检测 RhD 血型基因第 5, 7 外显子, SPR 信号检测 RhD 血型基因 DNA 分子的浓度为 100 pmol/L。结论 SPR 技术可快速检测 RhD 血型基因的相应外显子, 且 SPR 技术操作简便快速、可靠直观, 且非标记, 可为 RhD 阴性孕妇产前预测胎儿 RhD 血型基因提供一种新方法。

关键词: RhD 血型基因; 产前检测; 新生儿溶血病; SPR 技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.006 **中图法分类号:** Q786

文章编号: 1673-4130(2018)07-0788-04 **文献标识码:** A

The application of SPR technology in prenatal testing of fetal RHD blood type gene*

LI Miaoshan¹, WU Changlin^{2△}, HE Jian'an³, GU Dayong³, SHAO Chaopeng²

(1. Department of Clinical Laboratory, Meizhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Meizhou, Guangdong 514000, China; 2. Department of Blood Transfusion, the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518035, China; 3. Inspection and Quarantine Academy of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518045, China)

Abstract: Objective To study the feasibility of detecting fetus RhD type gene by Surface Plasmon Resonance (SPR) technology, and to establish a new rapid diagnosis method for fetus RhD type gene. **Methods** The different types of DNA corresponding RNA probes were fixed on the surface of SPR chip by using amino coupling methods, and optimize the chip analysis condition, and then using the RNase H enzyme hydrolysis, signal amplification detection, at last the detection conditions were determined. We use the RhD type gene exon 5, 7 of RNA probe to test its corresponding DNA molecules, and analyse the specificity and sensitivity of SPR chip detection signal. **Results** The SPR technique for detecting the exon 5, 7 of RhD blood type gene shows good sensitivity and specificity in all, SPR technology can specifically detect the Exon 5, 7 of RhD blood type gene, and the sensitivity of for detecting RhD gene exon 5, 7 is 100 pmol/L by SPR. **Conclusion** The SPR technology can quickly detect RhD gene accordingly, SPR technology is simple, rapid, reliable and label-free, which can provide a new way predicting fetal RhD type for RhD negative prenatal.

Key words: RhD blood gene; preneec detecion; HDN; SPR technology

目前国内外主要采用 PCR-SSP、PCR-RFLP、荧光定量 PCR 等技术检测 RhD 血型基因^[1-2]。然而, 这些传统基因诊断技术往往需要荧光、酶等标记, 或者需要 PCR 实现信号的扩增; 但这些技术成本高、操作复杂、易污染、假阳性或假阴性多, 难以适应大规模的临床 RhD 基因分析。无标记的基因诊断新技术可实现快速、高通量的目标。本项目基于表面等离子共振

技术(SPR)基因芯片构建一种新型的 RhD 血型基因检测平台, 为临床上大量快速检测打下良好基础。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 SPR 分析仪(美国 GWC 公司, SPRImager® II 型), DNA Isolation KIT 提取试剂盒(中国, 北京 PEL-FREEZ 公司), 离心机(长春博研), SPR 检测芯片(广州高通)。QIAamp DNA 提取试剂

* 基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2017B020210006); 深圳市科技创新项目(No. JCYJ20130401110246572)。

作者简介: 李妙珊, 女, 主管技师, 主要从事临床输血研究。△ 通信作者, E-mail: wuchlin@126.com。

本文引用格式: 李妙珊, 伍昌林, 何建安, 等. SPR 技术在产前检测胎儿 RhD 血型基因中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7): 788-

盒(德国, Qiagen 公司)、活化液 EDC/NHS:1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)及再生液甘氨酸, 封闭液乙醇胺, RNA 检测探针, PCR 扩增仪(美国 PE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SPR 技术检测 DNA 条件建立 溶液的离子强度、pH 值及 RNA 探针浓度是影响 SPR 芯片表面固定的主要因素。将 RhD 基因 RNA 检测探针进行倍比稀释, 点样 SPR 芯片, 确定 RNA 探针稀释度。选用不同 pH 值的 10 mmol/L 醋酸盐缓冲溶液作为 RNA 探针固定液, 探讨 pH 值对 RNA 探针固定的影响, 确定最佳 pH 值。SPR 芯片表面固定 RNA 探针; 具体方法: (1) 活化, 室温下将 EDC(0.4 mmol/L) 和 NHS(0.1 mmol/L) 配制成 10 mL EDC/NHS 活化液, 将 SPR 芯片置于活化液中活化 30 min, 流水冲洗; (2) 点样, 用 pH=6.0 的 10 mmol/L 醋酸盐与甘油配制 10% 的甘油点样液, 将 RNA 探针用点样液作 5 倍稀释, 取 0.5 μ L 混合液点样于芯片表面, 室温固定 1 h; (3) 封闭, 将点样的芯片固定后, 装在 SPR 分析仪上, PBS 调选最佳共振角(由最小角至最大角调试, 确定最佳的共振角为 70°~100°), 基线平稳后, 封闭液乙醇胺处理 10 min, 封闭芯片未反应的活化表面。

1.2.2 RNA 探针检测 DNA 性能评价 用上述 SPR 芯片, 将阴阳样本、待检测的 RhD 血型基因 DNA 样本等作相应的检测, 评价 SPR 芯片的稳定性、灵敏度、特异性, SPR 分析仪检测的数据运用 BIAevaluation 软件分析。

2 结 果

2.1 RNA 探针在 SPR 芯片上检测相应 DNA 的特异性结果 RNA 探针检测 DNA 的特异性方法是运用 SH-29a-3p-Biotin、SH-ssDNA-Biotin、SH-181a-5p-Biotin、阴性对照、生物素标记的探针, 灵敏度较好, RNA 特异性探针可与 DNA 分子特异性结合, 特异性探针与 SH-29a-3p-Biotin、SH-181a-5p-Biotin 结合为 RNA-DNA 复合物后, 加入的 RNase H 酶是能够特异度水解 RNA-DNA 杂交体中的 RNA 链的核糖核酸内切酶, 产生放大效应。见图 1。

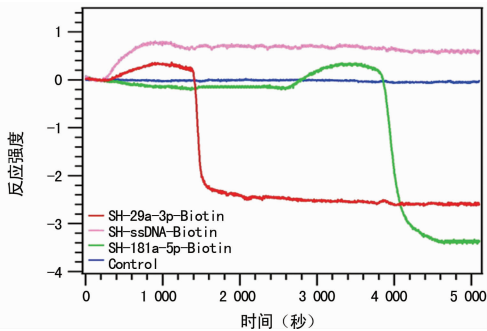


图 1 SPR 芯片检测 DNA 特异性的分析

2.2 RNA 探针在 SPR 芯片上检测 RhD 血型基因外显子的特异性结果 将合成的 RhD 血型基因第 5 外

显子的 RNA 探针点样于 SPR 检测芯片上, 同时将合成的 miR-29a-3p 的探针作为检测 DNA 的阳性对照, 然后加入 RNase H 核糖核酸内切酶, 产生放大效应, 如 2 图所示, SPR 芯片的探针检测 RhD 血型基因的特异性较好, 反应体系的放大效应显著。

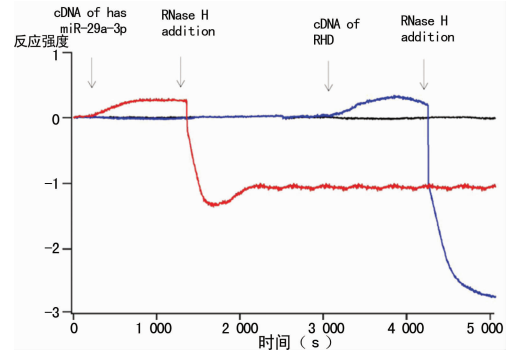


图 2 SPR 芯片探针检测 RhD 血型基因 DNA 的特异性

2.3 RNA 探针检测 RhD 血型基因的灵敏度分析 根据 RhD 血型基因 DNA 分子第 5 外显子的 DNA 的序列, 合成相应的 RNA 探针, 再将提取的 DNA 分子进行倍比稀释度分析, 如图 3, 能够检测到的 RhD 血型基因 DNA 分子的最低浓度为 100 pmol/L。

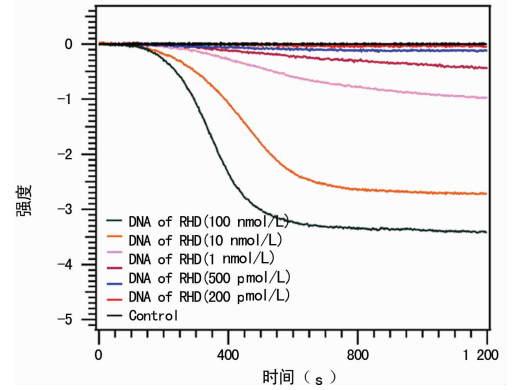


图 3 RNA 探针检测 RhD 血型基因的灵敏度

2.4 RNA 探针检测 RhD 阴性孕妇胎儿 RhD 血型基因结果

2.4.1 SPR 芯片技术检测 RhD 阴性孕妇外周血胎儿 RhD 血型基因的结果 运用 SPR 芯片技术检测 30 例 RhD 阴性孕妇外周血胎儿 RhD 血型基因, 结果显示, 检测出 RhD 血型基因第 5, 7 外显子阳性者 24 例, 阴性 6 例, 其中 Rh1227A 基因阳性 3 例, 表明 6 例阴性样本中表型为 DEL 型有 3 例, 见图 4。运用 PCR-SSP 法检测 30 例 RhD 阴性孕妇外周血胎儿 RhD 血型基因, 结果显示, 检测出 RhD 血型基因第 5, 7 外显子阳性者 25 例, 阴性 5 例, 其中 Rh1227A 基因阳性 3 例, 表明 5 例阴性样本中表型为 DEL 型有 3 例, 见图 5。

2.4.2 SPR 芯片技术与 PCR-SSP 法检测 RhD 血型基因的结果分析 经过比较分析发现, SPR 芯片技术检测 RhD 血型基因第 5, 7 外显子阳性结果比 PCR-SSP 技术少 1 例, 胎儿出生后, 经过血型血清学分析, PCR-SSP 技术检测的结果与其完全一致, 但是 SPR

芯片技术检测的结果出现 1 例假阴性,将 PCR 结果进行再扩增分析发现该样本为 RhD 血型的变异体,SPR 芯片的探针无法检测到相应的信号。

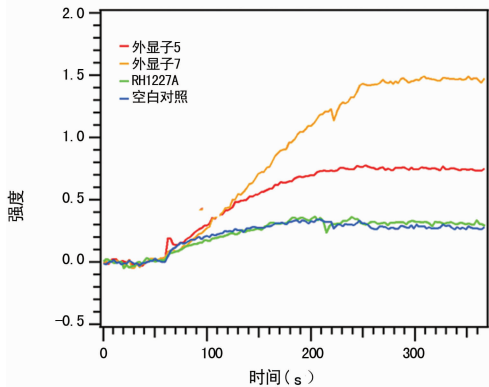


图 4 SPR 芯片检测 RhD 血型第 5,7 外显子及 Rh1227A 等位基因

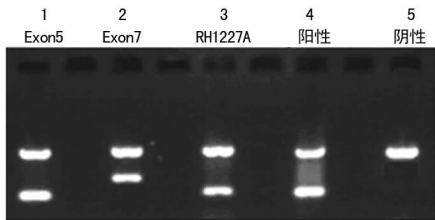


图 5 PCR-SSP 检测 RhD 血型第 5,7 外显子及 Rh1227A 等位基因

3 讨 论

近年来发展起来的 SPR 检测技术被公认为“最好的无标记生物检测方法”,在生命科学领域的应用得到了爆发性增长,是未来疾病早期诊断迫切需要的核心技术^[3-6]。SPR 技术的优点是可以快速、实时、直观地测定生物分子间的相互作用而无需标记,可以连续监测吸附和解离过程,并可以进行多种成分相互作用的研究,并使系统性、高通量功能基因筛选和快速检测成为可能。

RNase H 是能够特异性水解 RNA-DNA 杂交体中的 RNA 链的核糖核酸内切酶,产生游离的 3'-羟基和 5'-磷酸末端产物。相关研究显示,在靶向 DNA 中嵌合寡核苷酸作为酶降解底物,结果发现在 RNase H 的作用下 RNA 的水解具有特定的位点^[4]。结果同时证实其对于单链核酸、双链 DNA、双链 RNA 不起作用。在众多关于 RNA-DNA 杂交体的三级结构文献报道中, RNA-DNA 杂交体具有共同的特征是 RNA 链具有 A 折叠, DNA 单链具有 B 折叠,这种特殊的结构恰是 RNase H 的识别 RNA-DNA 杂交体作用机制。美国西北大学研究小组成功通过修饰 RNA 的 2'-OH,使得 RNA 链更容易形成 A 折叠的构象,增加与 RNase H 的亲和力,同时抑制其他核酸酶的降解^[5]。针对 RNase H 特异性降解 RNA 这一途径的药物研发已经取得了长足的发展,然而基于该作用机制的生物传感器的研究,国际上刚刚起步,目前尚在实验室的“概念性”研究阶段。

目前运用 RhD 阴性孕妇血浆游离 DNA 进行胎儿产前诊断的研究已获得成功。我国人群 D 变异体具有多样性和复杂性,与国外人群相比 D 变异体的基因结构和频率存在很大差异,国外有关 RhD 血型的基因分型方法并不适合中国人^[7-9]。亚洲约 30% 的 RhD 阴性为 DEL 表型,等位基因有多种,而我国仅发现 1 种等位基因 RhD1227A,并成为我国 DEL 表型基因诊断的特征性遗传标志物。目前国内外主要采用 PCR-SSP 技术预测胎儿 RhD 血型。这些基因诊断技术往往需要 PCR 实现信号的扩增,同时操作过于繁琐,容易污染造成假阳性或假阴性结果,而且成本较高。因此探索出一条适合于中国人 RhD 血型产前基因诊断的新方法,对预防新生儿溶血病的发生具有重要意义。

母亲与胎儿的 RhD 血型不相容可能会导致母婴发生同种免疫,由于抗-D 抗体可滤过胎盘屏障溶解胎儿红细胞,最坏的结果是引起宫内胎儿贫血,导致胎儿死亡。以前我国产前诊断胎儿 RhD 血型是依靠从绒毛膜滋养层细胞或羊水中获得胎儿 DNA,然后对胎儿组织 DNA 进行 RhD 基因扩增,该方法为侵入性取材,有引起流产及加重胎儿病情的风险。近年来,通过对 RhD 等位基因的深入研究,以及孕妇血浆中游离胎儿 DNA 的发现,为非侵入性产前诊断胎儿 RhD 血型提供了新思路。但是不同种族、不同地区的人群间 RhD 基因的结构存在差异,国外 RhD 基因定型的方法不适合用于中国人的检测^[10-13]。因此,应探索一种适用我国 RhD 血型特点的产前基因诊断新方法,以便有效预防新生儿溶血病的发生。

本项目开发基于 SPR 技术的 RNA 微阵列平台,以 RNase H 特异性水解芯片表面的 RNA-DNA 的杂合体的 RNA 探针,同时释放的靶向 DNA 反复与表面的 RNA 探针结合、再水解,直到芯片表面的 RNA 探针阵列完全被水解,形成了一种基于非 PCR 的放大检测效应,从而为实现高通量、高灵敏的基因快速检测提供了一个全新的解决方案^[14-15]。本研究结合了 SPR 技术的非标记优势, RNA 芯片技术的高通量优势以及基于 RNase H 酶特异性水解放大的非 PCR 优势,运用 RhD 阴性孕妇血浆中游离胎儿 DNA 产前预测 RhD 血型,为非侵入性产前诊断胎儿 RhD 血型提供了新思路。

这种非标记、非 PCR 的高通量、高灵敏的 SPR 检测技术可以大大简化 RhD 基因检测的难度,提高了基因检测的灵敏度。但是该技术运用过程中,血浆胎儿 DNA 的模板量较少,为了提高 DNA 的浓度,试验前应对样本进行浓缩,以增加检测的灵敏度。同时该技术为其他遗传性疾病、传染病等基因诊断提供了崭新的研究平台。

参考文献

[1] GRANIER T,BELEY S,CHIARONI J,et al. A comprehensive survey of both RHD and RHCE allele frequencies

- in sub-Saharan Africa[J]. *Transfusion*, 2013, 53(11 Suppl 2):3009-3017.
- [2] CHOU S T, JACKSON T, VEGE S. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors[J]. *Blood*, 2013, 122(6):1062-1071.
- [3] LIAO G J, GRONOWSKI A M, ZHAO Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 4(8):183-186.
- [4] LAU T K, CHEUNG S W, LO P S, et al. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA; review of 1982 consecutive cases in a single center[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2014, 43(3):254-264.
- [5] BONNAT L, DEJEU J, BONNET H. Templated formation of discrete RNA and DNA; RNA hybrid G-quadruplexes and their interactions with targeting ligands[J]. *Chemistry*, 2016, 22(9):3139-3147.
- [6] DA COSTA D C, PELLEGRINO J J R, GUELSIN G A, et al. Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients[J]. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2013, 35(1):35-38.
- [7] WILKINSON K, HARRIS S, GAUR P, et al. Molecular blood typing augments serologic testing and allows for enhanced matching of red blood cells for transfusion in patients with sickle cell disease[J]. *Transfusion*, 2012, 52(2):381-388.
- [8] HOJJATI M T, EINOLLAHI N, NABATCHIAN F, et al. Allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction for the determination of Rh C/c and Rh E/e antigens in thalassaemic patients[J]. *Blood Transfus*, 2011, 9(3):301-305.
- [9] BUYASSE K, BEULEN L, GOMES I, et al. Reliable noninvasive prenatal testing by massively parallel sequencing of circulating cell-free DNA from maternal plasma processed up to 24h after venipuncture[J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(18):1783-1786.
- [10] THEN W L, AGUILAR M I, GARNIER G. Quantitative detection of weak d antigen variants in blood typing using SPR[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):1616-1622.
- [11] PEUNGTUM P, SUDPRASERT K, AMARIT R, et al. Surface plasmon resonance imaging for ABH antigen detection on red blood cells and in saliva; secretor status-related ABO subgroup identification[J]. *Analyst*, 2017, 142(9):1471-1481.
- [12] TANGKAWSAKUL W, SRIKHIRIN T, SHINBO K, et al. Application of long-range surface plasmon resonance for ABO blood typing[J]. *Int J Anal Chem*, 2016, 2016:1432781.
- [13] THEN W L, MCLIESH H, AGUILAR M I, et al. Duffy blood group(Fya & Fyb) analysis using surface plasmon resonance[J]. *Biomed Microdevices*, 2016, 18(6):101.
- [14] SZITTNER Z, BENTLAGE A E, ROVERO P, et al. Label-free detection of immune complexes with myeloid cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 185(1):72-80.
- [15] TARASOV A, GRAY D W, TSAI M Y, et al. A potentiometric biosensor for rapid on-site disease diagnostics[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 79:669-678.

(收稿日期:2017-09-25 修回日期:2017-11-15)

(上接第 779 页)

- [6] LIN M, ZHONG T Y, CHEN Y G, et al. Molecular epidemiological characterization and health burden of thalassemia in Jiangxi Province, P. R. China[J]. *POLS One*, 2014, 9(7):e101505.
- [7] 周艳洁, 刘鲲, 黄水芬, 等. 静止型 α 地中海贫血基因携带者的血液学参数分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(21):2816-2818.
- [8] 熊符, 丘小霞, 张新华. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社, 2011:25-28.
- [9] 何平亚, 张鑫丽, 丁忠英, 等. 血红蛋白毛细管电泳筛查 α 地中海贫血的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2015, 29(1):65-67.
- [10] 何英, 张银辉, 吴润香, 等. 红细胞平均体积_脆性以及毛细管血红蛋白电泳联合检测在产前地中海贫血诊断中的价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(19):2521-2525.
- [11] 张艳芳, 谢丰华, 万志丹, 等. 血红蛋白电泳联合地中海贫血基因检测对地中海贫血患者的诊断价值[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 37(5):29-31.
- [12] 陈海坤. 缺铁性贫血和地中海贫血在血常规中的鉴别诊断研究[J]. *中国临床研究*, 2016, 8(36):39-40.
- [13] 黄莉萍, 朱莉艳, 宋兰林, 等. HbF 水平在 β 地中海贫血携带者妊娠期产前筛查中的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(6):384-387.
- [14] 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.
- [15] 何丽, 朱晓芳, 王薇, 等. 重庆地区 2 951 例地中海贫血基因检测结果分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 37(4):26-27.
- [16] 李娟, 黄楠. 血常规及 Hb 电泳在孕期筛查地中海贫血的临床价值分析[J]. *泸州医学院学报*, 2015, 38(3):264-266.
- [17] 马星卫, 许吟, 戴薇, 等. 贵阳地区 1 143 例孕妇地中海贫血筛查及基因检测结果分析[J]. *重庆医学*, 2013, 42(17):1990-1991.
- [18] 周玉球, 商璇, 尹保名, 等. 1998—2010 年珠海市地中海贫血大规模人群的遗传筛查和产前诊断结果分析[J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(2):90-95.

(收稿日期:2017-09-28 修回日期:2017-11-07)