

## • 短篇论著 •

# MLPA 技术在 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血罕见基因型患者及家系分析中的应用<sup>\*</sup>

刘发娣<sup>1</sup>, 卢娟<sup>1</sup>, 周红平<sup>1</sup>, 王珂<sup>1</sup>, 胡蓉<sup>2</sup>, 柯江维<sup>1△</sup>

1. 江西省儿童医院检验科, 江西南昌 330006; 2. 南昌大学医学部基础医学院, 江西南昌 330006

**摘要:** 目的 探讨多重连接探针扩增(MLPA)技术在  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)患者罕见基因型及家系分析中的应用价值, 为临床检测工作提供帮助。方法 采用血细胞分析仪和血红蛋白电泳技术对患者进行地贫表型分析, 运用 PCR-反向斑点杂交技术进行常规  $\alpha$ -珠蛋白基因和  $\beta$ -珠蛋白基因检测, 采用 MLPA 技术对  $\alpha$ -珠蛋白基因进行检测, 运用 Gap-PCR 和一代测序的方法对罕见缺失突变进行扩增并测序验证。结果 先证者为  $-\text{SEA}$  缺失复合  $-\alpha^{27.6}$  大片段缺失, 罕见  $-\alpha^{27.6}$  大片段缺失源自患儿父亲。结论 家系分析对发现和诊断地贫的罕见基因型尤为重要; MLPA 技术是检测罕见缺失型  $\alpha$ -珠蛋白基因突变的有效手段。

**关键词:**  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血;  $-\alpha^{27.6}$ ; 多重连接探针扩增; 跨越断裂点聚合酶链反应

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.04.025

**文章编号:** 1673-4130(2022)04-0502-04

**中图法分类号:** R446.9

**文献标志码:** A

$\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)是人类常见的单基因遗传病之一<sup>[1]</sup>, 临床以小细胞低色素性贫血为主要表现, 临床表型包括几乎无症状的携带者至致死性溶血性贫血患者<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -地贫主要分布在热带和亚热带地区, 在中国, 则以广西、广东、福建、江西、四川和海南为主, 地域性强<sup>[3-8]</sup>。 $\alpha$ -地贫是由于编码珠蛋白  $\alpha$  链的  $\alpha$ -珠蛋白基因簇出现片段缺失或(和)点突变而引起, 该基因簇位于人类染色体 16p13.3, 健康人每条 16 号染色体均有两个  $\alpha$ -珠蛋白基因。 $\alpha$ -地贫患者的临床表型与受累的  $\alpha$ -珠蛋白基因个数直接相关, 当一条染色体中两个  $\alpha$ -珠蛋白基因均失活时, 为  $\alpha^0$ -地贫; 而一条染色体中任意失活一个  $\alpha$ -珠蛋白基因则称为  $\alpha^+$ -地贫; 两条染色体仅失活一个  $\alpha$ -珠蛋白基因的携带者往往表现为没有临床症状的静止型; 而失活两个  $\alpha$ -珠蛋白基因的患者主要表现为轻度贫血; 若 4 个  $\alpha$ -珠蛋白基因中有 3 个基因受累则表现为血红蛋白 H 病; 4 个  $\alpha$ -珠蛋白基因全部受累表现为 Hb Bart's 胎儿水肿综合征。

目前, 珠蛋白基因检测最常用的方法是跨越断裂点聚合酶链反应(Gap-PCR)和反向斑点杂交技术。在我国, 引起  $\alpha$ -地贫的突变类型包括缺失型突变和点突变,  $-\text{SEA}$  是最常见的缺失突变类型, 其次为  $-\alpha^{3.7}$  和  $-\alpha^{4.2}$ ; 而点突变则以  $\alpha^{\text{QS}}$  (Hb Quong Sze)、 $\alpha^{\text{CS}}$  (Hb Constant Spring) 和  $\alpha^{\text{WS}}$  (Hb Westmead) 为主。本文将阐述运用多重连接探针扩增(MLPA)技术对  $\alpha$ -珠

蛋白基因罕见的 27.6 kb 大片段缺失突变家系的检测分析过程, 而该突变为首次在江西籍人群中被发现并报道。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 先证者, 男, 5 岁 9 个月, 江西景德镇人, 因发现贫血 1 年半来江西省儿童医院就诊。入院时, 贫血面容, 皮肤无黄染, 口唇淡红, 口腔黏膜正常, 未触及肝脾肿大。患儿父亲既往体健, 系退伍军人, 无贫血症状。患儿母亲贫血面容, 怀孕期间曾 3 次晕倒。患儿有两个姐姐, 均体健, 无贫血表现。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集与血液学分析** 采集患儿及其家系成员外周血 2 mL(EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝), 红细胞相关参数分析采用血细胞分析仪(XN-1000, 日本 Sysmex 公司); 血红蛋白电泳及组分定量分析采用快速自动电泳分析系统(Capillarys Sebia-2, 法国 Sebia 公司)。外周血基因组 DNA 提取采用外周血 DNA 提取试剂盒(广东凯普生物技术有限公司)。

**1.2.2 反向斑点杂交** 试验采用广东凯普生物技术有限公司的地贫检测试剂盒(含  $\alpha$ -地贫常见缺失突变、 $\alpha$ -地贫常见点突变和  $\beta$ -地贫的常见点突变), 严格按照说明书操作。

**1.2.3 MLPA** 采用 P140-C1 HBA 试剂(MRC-HOLLAND, 荷兰), 委托中翰金诺医学检验所进行检测。

\* 基金项目: 江西省卫生健康委员会科技计划(202110101)。

△ 通信作者, E-mail: kjw0791@163.com。

本文引用格式: 刘发娣, 卢娟, 周红平, 等. MLPA 技术在  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血罕见基因型患者及家系分析中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(4): 502-505.

**1.2.4 Gap-PCR** 根据 MLPA 检测结果,参考文献 [9],委托上海捷瑞生物公司合成引物(F: 5'-ATCT-GAGGTGGCACACAAGCA-3'; R: 5'-AGCCCCAA GTCATGGACTCAC-3'),运用 Gap-PCR 对患者及其家系成员进行扩增,引物水平为 10  $\mu$ mol/L,扩增体系为 20  $\mu$ L;其中 2 $\times$ PCR mix 10  $\mu$ L,引物 F 1  $\mu$ L,引物 R 1  $\mu$ L,DNA 模板 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。扩增反应条件:95 °C,3 min,1 个循环;95 °C 50 s,62 °C 1 min,72 °C 2 min,35 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,同时将先证者 PCR 产物

送广东凯普生物技术有限公司进行基因测序。

## 2 结 果

**2.1 血液学分析** 先证者及其家系成员的地贫筛查血液学指标如表 1 所示,先证者及其母亲平均红细胞体积(MCV)和平均红细胞血红蛋白量(MCH)均显著降低,为典型的小细胞低色素性贫血,且血红蛋白 A2(HbA2)均偏低,提示先证者及其母亲可能是  $\alpha$ -珠蛋白基因突变携带者;而先证者父亲及其两个姐姐血液学指标未见明显异常。

表 1 先证者及其家系成员的血液学和生化参数

家系成员	性别	年龄(岁)	RBC( $\times 10^{12}/L$ )	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	HbA(%)	HbF(%)	HbA2(%)	Hb Bart's(%)
先证者	男	5	6.82	91	42.0	13.0	96.6	1.4	1.5	0.5
父亲	男	41	5.16	142	88.2	27.5	97.4	0.0	2.6	0.0
母亲	女	40	5.40	86	55.9	15.9	97.2	0.5	2.3	0.0
姐姐(大)	女	17	4.36	125	87.2	28.7	96.7	0.4	2.9	0.0
姐姐(小)	女	8	4.94	119	76.3	24.1	96.2	1.0	2.8	0.0

注:RBC 为白细胞计数; Hb 为血红蛋白; HbA 为血红蛋白 A; HbF 为血红蛋白 F; Hb Bart's 为血红蛋白 Bart's 带。

**2.2 反向斑点杂交** 如图 1 所示,先证者  $\alpha$ -地贫缺失突变对照点 NP 和点突变的正常对照点均未显示,先证者父亲未见常见的  $\alpha$ -地贫缺失突变和点突变,先证者携带的  $\alpha^{SEA}$  缺失突变来源于母亲,而先证者两个姐姐的反向斑点杂交结果均未见异常。

**2.3 MLPA 检测结果** 先证者样本自 346 nt 探针至

400 nt 探针处均出现不同程度缺失,该缺失区域包含 HBZ、HBZP1、HBAP2、HBAP1、HBA2、HBA1 及 HBQ1 基因。根据试剂说明书可知 184 nt 探针至 400 nt 探针缺失为  $\alpha^{SEA}$ ,包含 HBAP1、HBA2、HBA1 及 HBQ1 基因,而 346 nt 探针至 337 nt 探针缺失为  $\alpha^{27.6}$ 。见图 2。

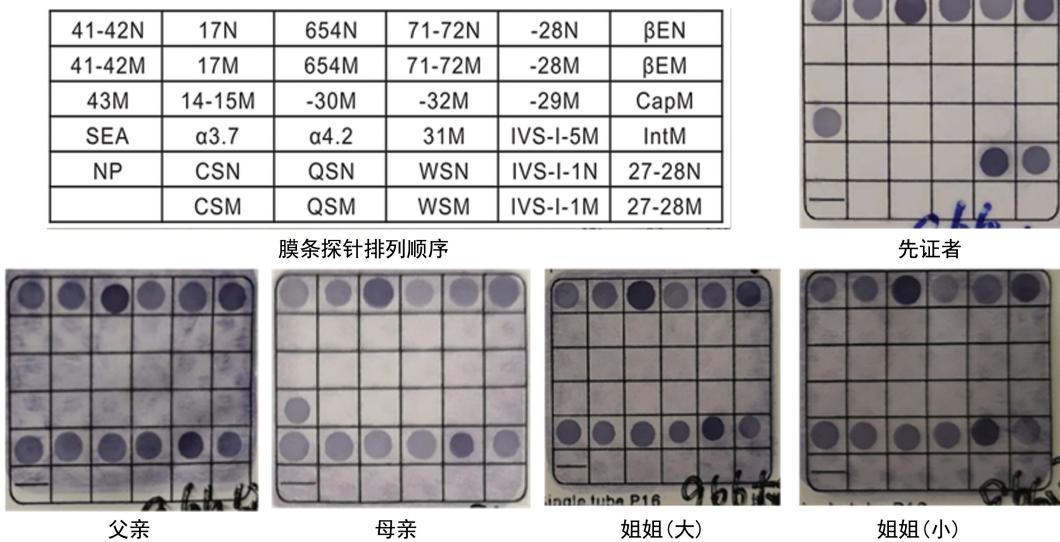


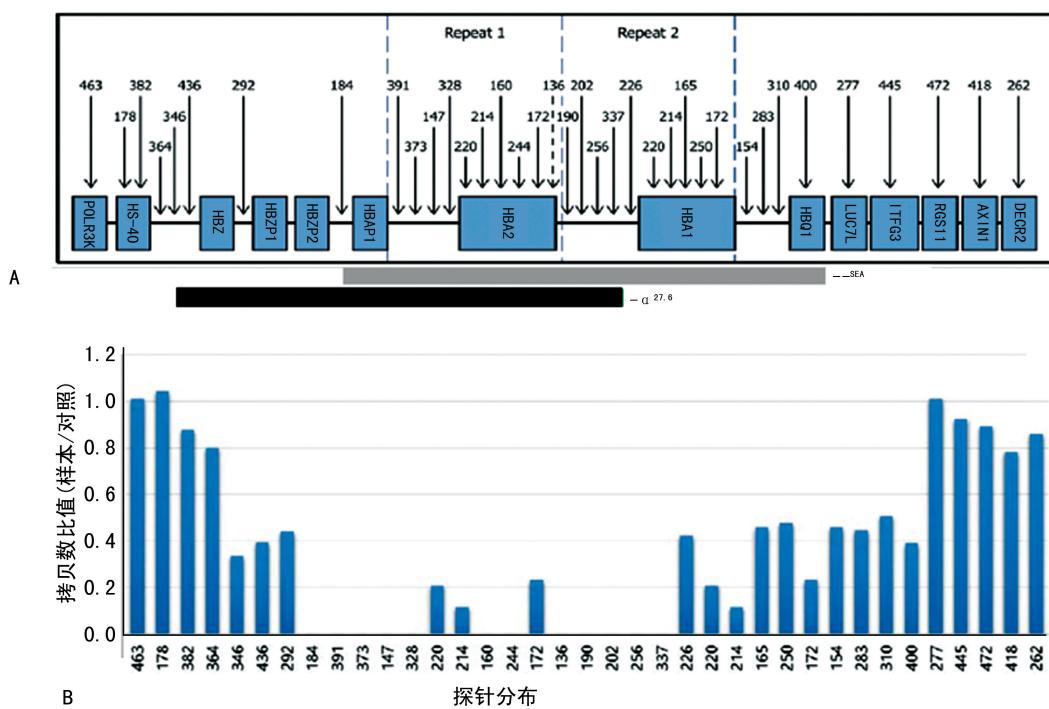
图 1 反向斑点杂交膜条探针排列顺序及先证者家系成员检测结果

**2.4 Gap-PCR 和基因测序结果** 根据 MLPA 结果,于  $\alpha^{27.6}$  缺失的两侧设计引物,通过 Gap-PCR 扩增,将产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,如图 3 所示,1、2、5 这 3 个泳道可见约 1.7 kb 的特异性条带,分别是先证者

及其父亲和姐姐(小);而 3、4 泳道显示,先证者母亲和姐姐(大)未携带该缺失突变。为了进一步明确患者的基因缺失位置,采用 Sanger 测序对 Gap-PCR 扩增产物进行测序,结果见图 4,缺失的范围位于 NG\_

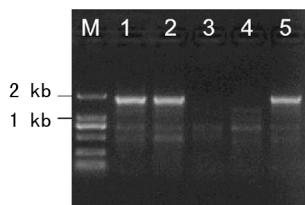
000006.1:9079 与 NG\_000006.1:36718 之间, 同时,

两个断点之间还插入了 AATCCC 6 个碱基。



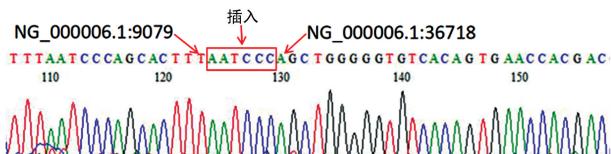
注: A 为 MLPA 技术检测 HBA 基因的探针分布位置, 灰色横条代表 -SEA 缺失的范围(探针 184~400 nt), 黑色横条代表  $\alpha^{27.6}$  缺失的范围(探针 346~337 nt); B 为先证者不同探针位置的拷贝数比值, 其中比值在 0.7~1.3 为拷贝数正常, 0.3~<0.7 为杂合缺失, 比值为 0 则是纯合缺失, 比值>1.3 代表重复。

图 2 MLPA 探针分布及其各区域拷贝数比值柱状图



注: M 为标志物; 1 为先证者; 2 为父亲; 3 为母亲; 4 为姐姐(大); 5 为姐姐(小); 1.7 kb 条带为  $\alpha^{27.6}$  缺失的特异性条带。

图 3 琼脂糖凝胶电泳图



注: 缺失范围见图中标识, 缺失碱基 T 与 A 之间插入了 6 个碱基。

图 4 先证者 Gap-PCR 产物测序图

### 3 讨 论

$\alpha$ -地贫为最常见的常染色体隐性遗传病, 随着基因检测和诊断技术的不断进步, 越来越多罕见的  $\alpha$ -地贫突变类型不断被发现。目前, 检测  $\alpha$ -地贫缺失突变最常用的方法是 Gap-PCR<sup>[10]</sup>, 结合琼脂糖凝胶电泳或者反向斑点杂交实验共同完成。临床推广的检测试剂主要包括  $\alpha$ -地贫的 3 种常见缺失类型和 3 种常见的点突变类型, 涵盖了国内约 98% 的  $\alpha$ -地贫类型<sup>[11]</sup>。本文中的先证者在常规斑点杂交实验中显示,

除了携带 -SEA 外, 缺失突变的正常对照点以及 3 个点突变的正常对照点均没有显示, 由于本实验室所使用的检测试剂中,  $\alpha$ -缺失突变的正常对照点的同源序列来自  $\alpha 2$  基因, 而 3 种常见的点突变也存在于  $\alpha 2$  基因中, 因此, 可以推测患者出现的罕见斑点杂交图是因为患者一条染色体携带了 -SEA 缺失, 而另一条染色体可能缺失了  $\alpha 2$  基因。

为了明确患儿所携带的  $\alpha$ -珠蛋白基因突变型, 本文选用 MLPA 技术进行检测, MLPA 技术是 2002 年由 SCHOUTEN 等<sup>[12]</sup>首先报道, 该方法结合了 DNA 探针杂交和 PCR 扩增技术, 可对待检 DNA 序列进行定性和半定量分析, 1 次反应可检测 45 个靶序列, 适用于基因片段缺失或重复以及已知点突变的检测, 用于检测已知与未知的大片段缺失型  $\alpha$ -珠蛋白基因。MLPA 技术检测结果显示, 先证者所携带的是一种罕见的  $\alpha^{27.6}$  缺失突变。

跨过  $\alpha^{27.6}$  缺失范围, 在两侧设计引物, 通过 Gap-PCR 可成功扩增出特异性条带。根据该家系的电泳结果可以看出, 先证者的  $\alpha^{27.6}$  缺失突变来自父亲, 先证者的姐姐(小)也携带了该突变。通过对 Gap-PCR 产物进行 Sanger 测序, 可准确判定缺失基因的断点, 将测序结果与 NCBI GeneBank 比对后发现, 该家系的缺失突变与此前报道的多个携带者为同一突变类

型<sup>[9,13-14]</sup>。尽管目前有多篇研究报道了- $\alpha^{27.6}$  缺失基因型携带者或家系,但患者均来自中国福建省<sup>[9,13-14]</sup>。本文的患者为江西省景德镇人,是江西省首次检测到该突变的携带者,丰富了江西省地贫疾病突变谱,同时也为罕见  $\alpha$ -地贫的基因诊断方法提供参考。

不同的突变类型导致患者贫血的临床表型和机制可能不同<sup>[15]</sup>,本文中先证者的父亲虽然也是- $\alpha^{27.6}$  缺失基因型携带者,但他没有血液学异常的表现,并且常规临床检测试剂又未能包含该缺失类型,因此,对于地贫的罕见基因型的发现与诊断,家系分析就显得尤为重要。自从 20 世纪 80 年代开始,我国严格执行计划生育政策后,大量独生子女的出现导致大家系明显减少,也使得此类罕见型突变的发现更加困难。就本文所研究的家系而言,患儿父母虽然同时携带  $\alpha$ -珠蛋白基因缺失突变,但是只有患儿同时遗传了父母双方的地贫缺陷基因时,才会在常规筛查实验中表现出异常的斑点杂交图,而下一代中同时携带父亲和母亲两种缺陷基因的概率仅为 25%。事实也正如此,该患儿为家系中的第 3 个孩子,姐姐(大)珠蛋白基因未见异常,姐姐(小)则携带了与其父亲一样的罕见缺失突变,若没有先证者的出生,那么该家系所携带的 27.6 kb 缺失突变也难以被发现。这可能是- $\alpha^{27.6}$  缺失突变携带者罕见的原因之一。因此,笔者认为- $\alpha^{27.6}$  缺失突变的人群携带率可能远比实际发现的高。

综上所述,对于罕见的  $\alpha$ -地贫突变类型,特别是尚未报道的缺失突变类型,MLPA 技术是一个良好的检测手段。因此,当临床发现可疑大片段缺失的地贫患者时,可先选择 MLPA 技术对  $\alpha$ -珠蛋白基因进行检测,寻找可能出现缺失的部位,再针对基因缺失部位的两端设计引物,进行 Gap-PCR 扩增和基因测序,便可进一步明确患者的基因型<sup>[9,16]</sup>。但是对于该家系先证者缺失了 3 个  $\alpha$  基因,却没有血红蛋白 H 带(HbH)这一现象,虽然有文献<sup>[17]</sup>谈及,但具体的机制还不明确,还需要进一步研究探讨。

## 参考文献

- TAHER A T, WEATHERALL D J, CAPPELLINI M D. Thalassaemia[J]. Lancet, 2018, 391(10116): 155-167.
- MUNCIE J R, CAMPBELL J. Alpha and beta thalassemia [J]. Am Fam Phys, 2009, 80(4): 339-344.
- 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.
- 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]. PLoS One, 2014, 9(7): e101505.
- 陈育华,周碧云,梁斯锶,等.1 071 例地中海贫血基因筛查结果分析[J].中国当代医药,2017,24(12):159-163.
- 陈雅斌,蒋燕成,陈紫萱,等.中国福建泉州地区育龄女性地中海贫血流行病学研究[J].中国实验血液学杂志,2018,26(5):1453-1458.
- YAO H, CHEN X, LIN L, et al. The spectrum of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia mutations of the Li people in Hainan Province of China[J]. Blood Cells Mol Dis, 2014, 53(1/2): 16-20.
- YU X, YANG L Y, YANG H T, et al. Molecular epidemiological investigation of thalassemia in the Chengdu Region, Sichuan Province, Southwest China[J]. Hemoglobin, 2015, 39(6): 393-397.
- WEI X F, SHANG X, HE D Q, et al. Molecular characterization of a novel 27.6-kb deletion causing  $\alpha^+$  thalassemia in a Chinese family[J]. Ann Hematol, 2011, 90(1): 17-22.
- 周玉球,肖鸽飞,李文典,等. Gap-PCR 作为临床一线  $\alpha$ -地中海贫血携带者筛查技术的应用评价[J].第一军医大学学报,2002,22(5):434-436.
- HUANG H, XU L, CHEN M, et al. Molecular characterization of thalassemia and hemoglobinopathy in South-eastern China[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 3493.
- SCHOUTEN J P, MCELGUNN C J, WAAIJER R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(12): e57.
- WANG X Y, LIN M X, LIN M. A novel 6.3 kb deletion and the rare 27.6 kb deletion causing  $\alpha^+$ -thalassemia in two Chinese patients[J]. Hemoglobin, 2016, 40(5): 365-368.
- HUANG H, CHEN M, CHEN X, et al. A rare  $\alpha$ -thalassemia deletion, - $\alpha^{27.6}$ , is identified from three Chinese families in Fujian province[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(8): 4012-4018.
- FERRÀO J, SILVA M, GONÇALVES L, et al. Widening the spectrum of deletions and molecular mechanisms underlying alpha-thalassemia[J]. Ann Hematol, 2017, 96(11): 1921-1929.
- ZHUANG J, TIAN J, WEI J, et al. Molecular analysis of a large novel deletion causing  $\alpha^+$ -thalassemia[J]. BMC Med Genet, 2019, 20(1): 74-81.
- LING L Q, CHEN H, YU S L, et al. A Phenotypically Unusual Hemoglobin H Disease Resulting from a Rare  $\alpha$ -Globin Genotype (-SEA/- $\alpha^{27.6}$ ) [J]. Ann Clin Lab Sci, 2018, 48(6): 782-784.