

• 短篇论著 •

MLPA 技术在 α -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*

刘发娣¹, 卢娟¹, 周红平¹, 王珂¹, 胡蓉², 柯江维^{1△}

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 α -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 α -珠蛋白基因和 β -珠蛋白基因检测,采用 ML-PA 技术对 α -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--^{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 α -珠蛋白基因突变的有效手段。

关键词: α -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 **中图法分类号:**R446.9

文章编号:1673-4130(2022)04-0502-04 **文献标志码:**A

α -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^[1],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^[2]。 α -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^[3-8]。 α -地贫是由于编码珠蛋白 α 链的 α -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 α -珠蛋白基因。 α -地贫患者的临床表型与受累的 α -珠蛋白基因个数直接相关,当一条染色体中两个 α -珠蛋白基因均失活时,为 α^0 -地贫;而一条染色体中任意失活一个 α -珠蛋白基因则称为 α^+ -地贫;两条染色体仅失活一个 α -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 α -珠蛋白基因的患者主要表现为轻度贫血;若 4 个 α -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 α -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 α -地贫的突变类型包括缺失型突变和点突变,--^{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 α^{QS} (Hb Quong Sze)、 α^{CS} (Hb Constant Spring)和 α^{WS} (Hb Westmead)为主。本文将阐述运用多重连接探针扩增(MLPA)技术对 α -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-K₂ 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 α -地贫常见缺失突变、 α -地贫常见点突变和 β -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: kjiw0791@163.com。

本文引用格式:刘发娣,卢娟,周红平,等. MLPA 技术在 α -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 μmol/L,扩增体系为 20 μL;其中 2×PCR mix 10 μL,引物 F 1 μL,引物 R 1 μL,DNA 模板 2 μL,ddH₂O 6 μL。扩增反应条件:95 ℃,3 min,1 个循环;95 ℃ 50 s,62 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,35 个循环;72 ℃ 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 α-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(×10 ¹² /L)	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	HbA(%)	HbF(%)	HbA ₂ (%)	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 α-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 α-地贫缺失突变和点突变,先证者携带的-^{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-^{SEA},包含 HBAP1、HBA2、HBA1 及 HBQ1 基因,而 346 nt 探针至 337 nt 探针缺失为-α^{27.6}。见图 2。

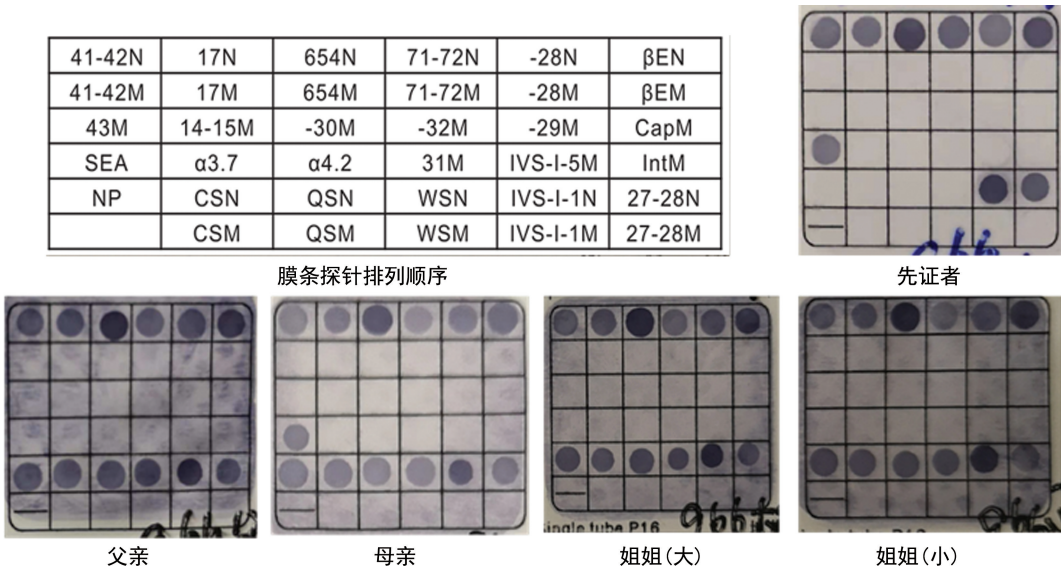
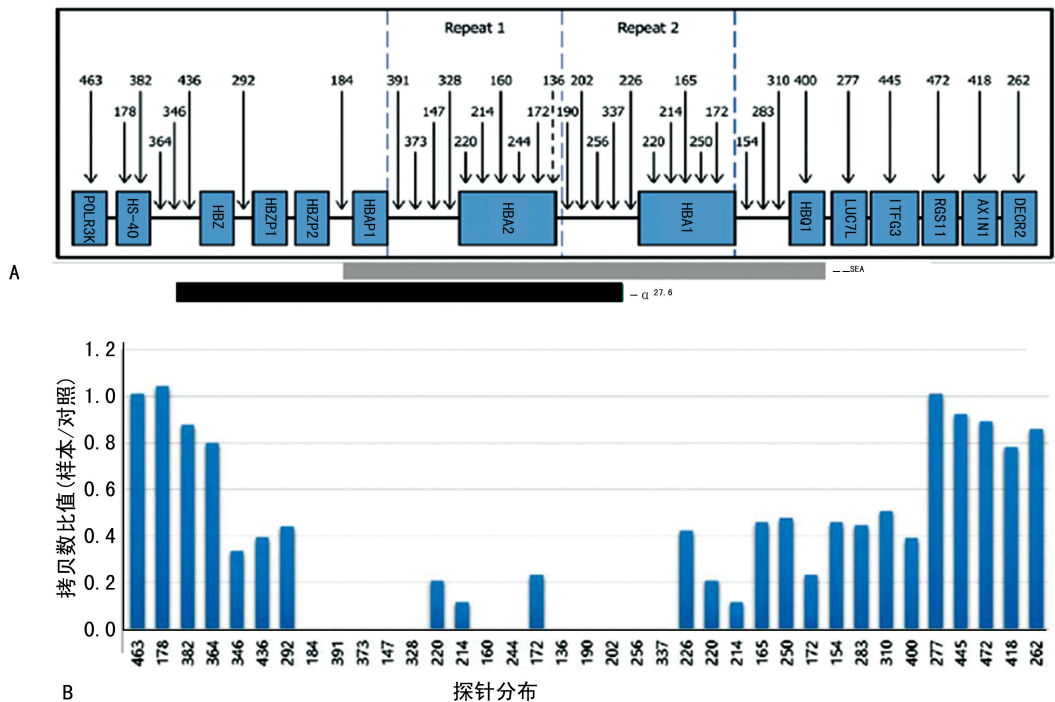


图 1 反向斑点杂交法膜条探针排列顺序及先证者家系成员检测结果

2.4 Gap-PCR 和基因测序结果 根据 MLPA 结果,于-α^{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

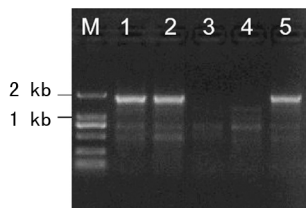
及其父亲和姐姐(小);而 3、4 泳道显示,先证者母亲和姐姐(大)未携带该缺失突变。为了进一步明确患者的基因缺失位置,采用 Sanger 测序对 Gap-PCR 扩增产物进行测序,结果见图 4,缺失的范围位于 NG_

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。



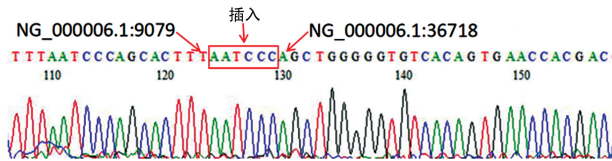
注:A 为 MLPA 技术检测 HBA 基因的探针分布位置,灰色横条代表 α -SEA 缺失的范围(探针 184~400 nt),黑色横条代表 α -27.6 缺失的范围(探针 346~337 nt);B 为先证者不同探针位置的拷贝数比值,其中比值在 0.7~1.3 为拷贝数正常,0.3~<0.7 为杂合缺失,比值为 0 则是纯合缺失,比值>1.3 代表重复。

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 α -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

α -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 α -地贫突变类型不断被发现。目前,检测 α -地贫缺失突变最常用的方法是 Gap-PCR^[10],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 α -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 α -地贫类型^[11]。本文中的先证者在常规斑点杂交实验中显示,

除了携带 α -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色,由于本实验室所使用的检测试剂中, α -缺失突变的正常对照点的同源序列来自 α 2 基因,而 3 种常见的点突变也存在于 α 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 α -SEA 缺失,而另一条染色体可能缺失了 α 2 基因。

为了明确患儿所携带的 α -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^[12]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 α -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 α -27.6 缺失突变。

跨过 α -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 α -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^[9,13-14]。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^[9,13-14]。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 α -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^[15],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 α -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 α -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 α -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^[9,16]。但是对于该家系先证者缺失了 3 个 α 基因,却没有血红蛋白 H 带(HbH)这一现象,虽然有文献^[17]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

- [1] TAHER A T,WEATHERALL D J,CAPPELLINI M D. Thalassaemia[J]. Lancet,2018,391(10116):155-167.
- [2] MUNCIE J R,CAMPBELL J. Alpha and beta thalassemia [J]. Am Fam Phys,2009,80(4):339-344.
- [3] YIN A,LI B,LUO M,et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014,9(2):e89855.
- [4] LIN M,ZHONG T Y,CHEN Y G,et al. Molecular epidemiological characterization and health burden of thalasse-

- mia in Jiangxi Province, P. R. China[J]. PLoS One,2014, 9(7):e101505.
- [5] 陈育华,周碧云,梁斯德,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.
- [6] 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.
- [7] YAO H,CHEN X,LIN L,et al. The spectrum of α - and β -thalassemia mutations of the Li people in Hainan Province of China[J]. Blood Cells Mol Dis,2014,53(1/2):16-20.
- [8] 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.
- [9] WEI X F,SHANG X,HE D Q,et al. Molecular characterization of a novel 27.6-kb deletion causing α^+ thalassemia in a Chinese family[J]. Ann Hematol,2011,90(1):17-22.
- [10] 周玉球,肖鸽飞,李文典,等. Gap-PCR 作为临床一线 α -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.
- [11] HUANG H,XU L,CHEN M,et al. Molecular characterization of thalassemia and hemoglobinopathy in Southeastern China[J]. Sci Rep,2019,9(1):3493.
- [12] 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.
- [13] WANG X Y,LIN M X,LIN M. A novel 6.3 kb deletion and the rare 27.6 kb deletion causing α^+ -thalassemia in two Chinese patients[J]. Hemoglobin,2016,40(5):365-368.
- [14] HUANG H,CHEN M,CHEN X,et al. A rare α -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.
- [15] FERRÃO 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.
- [16] ZHUANG J,TIAN J,WEI J,et al. Molecular analysis of a large novel deletion causing α^+ -thalassemia[J]. BMC Med Genet,2019,20(1):74-81.
- [17] LING L Q,CHEN H,YU S L,et al. A Phenotypically Unusual Hemoglobin H Disease Resulting from a Rare α -Globin Genotype (-SEA/- $\alpha^{27.6}$) [J]. Ann Clin Lab Sci, 2018,48(6):782-784.