

研究报告

Research Report

一个黎族 α -地中海贫血融合基因遗传家系的鉴定

胡俊杰^{1*} 陈鑫苹^{1*} 张继业¹ 赵立强² 李晓娟¹ 徐卫华¹ 符生苗^{1**}

1 海南省人民医院医学检验中心, 海南省细胞与分子遗传转化医学重点实验室, 海口, 570311; 2 海南省妇幼保健院, 海口, 570206

* 同等贡献作者

** 通信作者, smfu2000@126.com

摘要 鉴定海南黎族人群中发现的一种 α -地中海贫血融合基因, 并对其家系进行分析, 探讨融合基因形成机制及遗传规律。采集先证者及其家系成员外周全血, 进行血细胞分析、血红蛋白电泳和地贫常见基因型检测, 并采用 Gap-PCR 法结合特异引物和基因测序技术对先证者基因型进行鉴定。结果显示先证者基因型为 Fusion gene/- α 4.2, 且该融合基因是由于 α 珠蛋白基因的 α 2 段与 $\Psi\alpha$ 1 段序列发生融合所致。家系遗传分析显示, 其祖父基因型为 Fusion gene/ $\alpha\alpha$, 伯父和父亲的基因型均为 Fusion gene/- α 4.2, 母亲基因型为 - α 4.2/ $\alpha^{ws}\alpha^{ws}$, 弟弟基因型为 - α 4.2/ $\alpha^{ws}\alpha^{ws}$ 。海南省黎族人群中存在有 α -地贫融合基因, 该发现丰富了黎族地贫基因突变数据库, 对遗传咨询及地贫基因诊断和防治具有重要意义。

关键词 黎族, 血细胞分析, 血红蛋白电泳, 基因检测, 测序

Identification of a Genetic Family With α -thalassemia Fusion Gene in Li Nationality

Hu Junjie^{1*} Chen Xinping^{1*} Zhang Jiye¹ Zhao Liqiang² Li Xiaojuan¹ Xu Weihua¹ Fu Shengmiao^{1**}

1 Hainan Provincial Key Laboratory for Cell and Molecular Genetic Translational Medicine, Medical Examination Center, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, 570311; 2 Maternal and Child Health Hospital of Hainan Province, Haikou, 570206

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author, smfu2000@126.com

DOI: 10.13417/j.gab.038.001525

Abstract This study identified a α -thalassemia fusion gene in Hainan Li nationality, analyzed its family, and discussed the formation mechanism and genetic law of fusion gene. The peripheral blood of proband and its family members was collected, blood cell analysis, hemoglobin electrophoresis and routine thalassemia genotype detection were carried out, and genotype of the proband was identified by Gap-PCR combined with specific primers and gene sequencing technique. The result showed that genotype of the proband was Fusion gene/- α 4.2, which was formed by the fusion of α 2 and $\Psi\alpha$ 1 sequence of α -globin gene. Family genetic analysis suggested that the genotype of grandfather was Fusion gene/ $\alpha\alpha$, uncle and father were Fusion gene/- α 4.2, mother was - α 4.2/ $\alpha^{ws}\alpha^{ws}$ and younger brother was - α 4.2/ $\alpha^{ws}\alpha^{ws}$. There are existing α -thalassemia fusion genes in Hainan Li nationality population. The finding enriches the gene mutation database of thalassemia in Li nationality, and might have great significance for genetic counseling, thalassemia genetic diagnosis and prevention.

Keywords Li nationality, Blood cell analysis, Hemoglobin electrophoresis, Gene detection, Sequencing

基金项目 本研究由海南省医药卫生科技重点支撑项目(琼卫重点 2010-48)和海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM201-5071)共同资助

引用格式 Hu J.J., Chen X.P., Zhang J.L., Zhao L.Q., Li X.J., Xu W.H., and Fu S.M., 2019, Identification of a genetic family with α -thalassemia fusion gene in Li nationality, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 38(4): 1525-1531 (胡俊杰, 陈鑫苹, 张继业, 赵立强, 李晓娟, 徐卫华, 符生苗, 2019, 一个黎族 α -地中海贫血融合基因遗传家系的鉴定, 基因组学与应用生物学, 38(4): 1525-1531)

地中海贫血(地贫)是一种常见的单基因隐性遗传病,可分为 α 和 β 两种类型,其分子机制涉及 α 或 β 珠蛋白基因发生改变造成珠蛋白合成异常进而发生溶血性贫血(Weatherall, 1997; Weatherall et al., 2010)。 α -珠蛋白基因定位于人类16号染色体末端16p13.3,包含的 $\zeta 2$ -珠蛋白和 $\psi\zeta 1$ -珠蛋白基因之间以及 $\alpha 1$ -珠蛋白和 $\alpha 2$ -珠蛋白基因之间由于序列同源性较高,两个 ζ 和两个 α 基因之间常常发生不均匀的同源重组,导致珠蛋白基因结构发生改变,所以 α -地贫基因型中除常见类型 $\alpha\alpha$ -SEA、 $\alpha\alpha$ -3.7和 $\alpha\alpha$ -4.2缺失,以及QS、CS和WS点突变外,仍存在许多罕见或未知突变(Law et al., 2006; Hartevel and Higgs, 2010)。

本研究采用Gap-PCR法结合特异引物和基因测序技术对黎族一例疑似有罕见或突变地贫基因携带者进行鉴定,鉴定结果显示其基因型为Fusion gene/ $\alpha\alpha$ -4.2,并通过序列检索和比对探讨该融合基因的生成原因,同时对其家系遗传进行分析以寻找该突变基因的遗传起源。

1 结果与分析

1.1 血细胞和血红蛋白电泳分析

先证者及其家系成员的血细胞分析结果中MCV、MCH、MCHC和HGB检测值均显示降低,呈小细胞低色素贫血表型,同时血红蛋白电泳结果也显示HbA2值降低($\leq 2.5\%$)。根据上述检测结果初步判断家系所有成员均疑似为 α -地贫携带者(表1;图1)。

1.2 地贫常见基因型检测

用Gap-PCR、RDB法检测 α -和 β -地贫常见基因型,家系所有成员的 β -突变基因型均未检测到检测范围内的点突变, α -突变基因型中2号未检测到

检测范围内的点突变,4和5号为WS纯合突变(图2)。 α -缺失基因型结果中除6号只扩增出1.7 kb的 $\alpha\alpha$ 条带外,其他均扩增出1.4 kb的 $\alpha\alpha$ -4.2条带及1.7 kb的 $\alpha\alpha$ 条带(图3),所以2号(祖母)的基因型为 $\alpha\alpha$ -4.2/ $\alpha\alpha$ -4号(母亲)和5号(弟弟)的基因型为 $\alpha\alpha$ -4.2/ $\alpha^{WS}\alpha^{WS}$ 。通过对7号(先证者)和1号(父亲)、3号(伯父)、6号(祖父)的 α -突变基因型检测结果与 α -缺失基因型结果综合分析提示他们可能存在罕见突变基因型。

1.3 罕见突变地贫基因型鉴定

采用Gap-PCR法结合特异引物进行罕见突变地贫基因型检测,与正常对照组(2号)和阳性对照组(1号)比较,先证者(3号)结果在750~1 000 bp区域检测到Fusion gene阳性片段(图4)。

α -珠蛋白基因测序结果显示先证者的 $\alpha 2$ 基因存在8个突变位点: nt875 C、nt879 C、nt882 A、nt885 A、nt893 A、nt903 G、nt909 C、nt918 G(正常的 α -珠蛋白基因对应位点为: nt34528 T, nt34532 A, nt34535 G, nt34538 C, nt34546 G, nt34556 A, nt34562 T, nt3-4537 A)(图5)。

利用NCBI基因数据库进行序列相似型检索和对比,发现先证者 $\alpha 2$ 段基因的8个突变位点(Fusion gene)与 $\Psi\alpha 1$ 段对应的碱基序列相同,同时 α 基因正常参考序列nt34577-nt34578位点碱基序列“TG”与先证者 $\alpha 2$ 段对应位点相同(图6A),所以该Fusion gene是由 α -珠蛋白基因的 $\alpha 2$ 段与 $\Psi\alpha 1$ 段序列发生融合所致,且先证者伴有 $\alpha\alpha$ -4.2缺失,因此鉴定先证者地贫基因型为Fusion gene/ $\alpha\alpha$ -4.2,根据研究结果构建相应的基因结构模型(图6B)。

1.4 家系遗传分析

α -突变基因型检测结果中祖父、伯父和父亲的

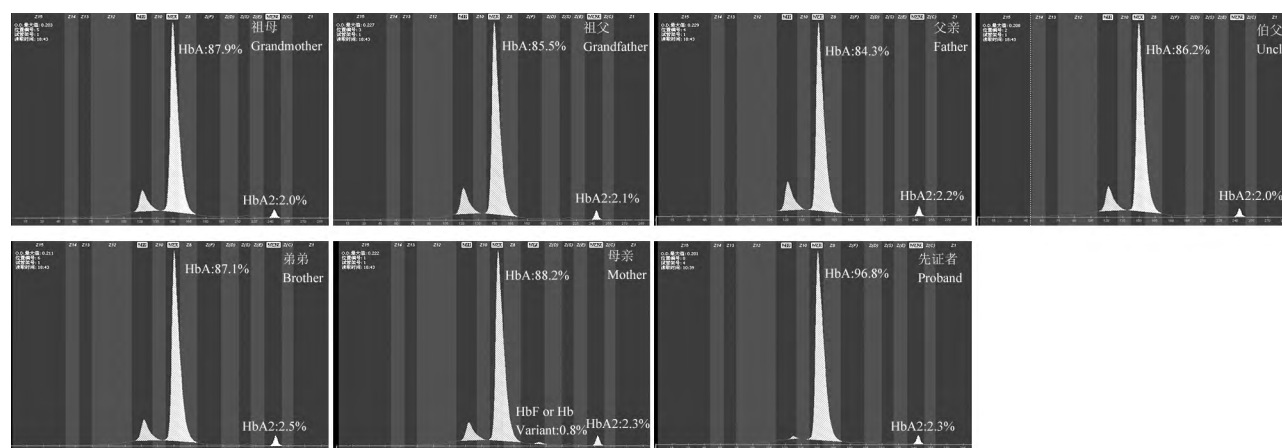


图1 家系成员的血红蛋白电泳

Figure 1 Hemoglobin electrophoresis atlas of family members

表 1 先证者及家系成员血细胞分析和血红蛋白电泳

Table 1 Blood cell analysis and hemoglobin electrophoresis of the proband and family members

成员 Member	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	HGB (g/L)	HbA (%)	HbA2 (%)	HbF or Hb variant (%)
祖父 Grandfather	67.4	20.6	287.2	108	85.5	2.1	
祖母 Grandmother	74.2	21.8	304.5	112	87.9	2.0	
伯父 Uncle	65.3	16.2	269.5	97	86.2	2.0	
父亲 Father	69.6	19.8	287.8	81	84.3	2.2	
母亲 Mother	70.3	19.5	299.4	96	88.2	2.3	0.8
弟弟 Brother	69.4	18.4	278.3	84	87.1	2.5	
先证者 Proband	68.1	20.5	301.6	115	96.8	2.3	

注: MCV: 红细胞平均体积; MCH: 平均红细胞血红蛋白量; MCHC: 平均红细胞血红蛋白浓度; HGB: 血红蛋白浓度; HbA: 血红蛋白 A; HbA2: 血红蛋白 A2; HbF or Hb Variant: 血红蛋白 F 或血红蛋白变异体

Note: MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular hemoglobin; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration; HGB: Hemoglobin concentration; HbA: Hemoglobin A; HbA2: Hemoglobin A2; HbF or Hb variant: Hemoglobin For hemoglobin variant

基因表型与先证者相同(图 2) 根据孟德尔遗传定律, Fusion gene 是由祖父(基因型为 Fusion gene/ $\alpha\alpha$)遗传,伯父和父亲的基因型均为 Fusion gene/ $-\alpha 4.2$,其中 $-\alpha 4.2$ 由祖母(基因型 $-\alpha 4.2/\alpha\alpha$)遗传,母亲的基因型为 $-\alpha 4.2/\alpha^{ws}\alpha^{ws}$,先证者 $-\alpha 4.2$ 由母亲遗传,弟弟基因型为 $-\alpha 4.2/\alpha^{ws}\alpha^{ws}$,其中 $-\alpha 4.2$ 由父亲遗传, α^{ws}/α^{ws} 由母亲遗传(图 7)。

2 讨论

地贫是一种单基因遗传性疾病,中国南方是地贫的高发区域,海南黎族人群地贫的流行现状形势严峻,地贫基因携带率高,其中缺失型 α 地贫是地贫中较为多见的类型(Yao et al., 2014; Lai et al., 2017; 杨阳和张杰, 2017)。应用 RDB 法和 Gap-PCR 法能够检测出中国常见的地贫基因型,但不能检出某些罕见突变基因型,因而会造成漏诊。采用血细胞指数分析和血红蛋白电泳对血液学表型进行分析在地贫筛查中具有较高的灵敏度和特异性,当研究对象的血液学表型与基因型不相符或地贫基因检测结果提示可能存在罕见突变基因型时,需借助测序技术进一步分析予以确认。颜善活等(2016)报道发现一种罕见 α 地贫基因型,并证实为 $\alpha 2$ 基因 3'UTR 的 PolyA 区域 92A>G 突变(AATAAA>AATGAA),该突变型患者具

有小细胞低色素表型,纯合个体呈现 HbH 病的特征。陈碧艳(2013)对 3 例罕见地贫基因型和 3 个家系进行基因检测,提示罕见或未知突变不在常规检测的范围之内,在遵循表型与基因型相结合的地贫基因诊断基本原则基础上,为避免漏检,须作进一步分析以明确突变的类型及性质。

基因重组一般发生于有性生殖过程中,即在性细胞减数分裂时同源染色体的部分遗传物质发生交换,基因重组中不平衡交换会导致基因拷贝数变化,造成基因数目增加或减少,而基因转换则会导致同源序列非交叉互换,这是改变基因序列、增加序列多样性和产生融合基因的主要原因,人珠蛋白基因中 $\zeta 2$ -珠蛋白基因和 $\psi\zeta 1$ -珠蛋白基因之间以及 $\alpha 1$ -珠蛋白基因和 $\alpha 2$ -珠蛋白基因之间同源性序列较多,发生同源重组导致珠蛋白基因结构发生改变,进而产生融合基因突变(Chen et al., 2007; Borg et al., 2009)。

本研究中先证者地贫常见基因检测结果提示疑似存在罕见突变基因型,经 Gap-PCR 法结合特异引物检测,在 750~1 000 bp 区域检测出 Fusion gene 阳性片段,进一步进行珠蛋白基因测序后发现在 $\alpha 2$ 基因上(Fusion gene)存在 8 个突变位点(nt875 C, nt879 C, nt882 A, nt885 A, nt893 A, nt903 G, nt909 C, nt918 G),这与 Huang 等(2016)研究报道的融合基因 1.7 kb

QSN	CSN	WSN	编号 1 Number 1
QSM	CSM	WSM	α 突变 α substitution

QSN	CSN	WSN	编号 2 Number 2
QSM	CSM	WSM	α 突变 α substitution

QSN	CSN	WSN	编号 3 Number 3
QSM	CSM	WSM	α 突变 α substitution

QSN	CSN	WSN	编号 4 Number 4
QSM	CSM	WSM	α 突变 α substitution

QSN	CSN	WSN	编号 5 Number 5
QSM	CSM	WSM	α 突变 α substitution

QSN	CSN	WSN	编号 6 Number 6
QSM	CSM	WSM	α 突变 α substitution

QSN	CSN	WSN	编号 7 Number 7
QSM	CSM	WSM	α 突变 α substitution

41-42N	654N	-28N	71-72N	17N	BEN	31N	27/28M	编号 Number
41-42M	654M	-28M	71-72M	17M	BEM	31M	IVS-I-1M	1
43M	-32M	-29M	-30M	14-15M	CAPM	IntM	IVS-I-5M	β 突变 β substitution

41-42N	654N	-28N	71-72N	17N	BEN	31N	27/28M	编号 Number
41-42M	654M	-28M	71-72M	17M	BEM	31M	IVS-I-1M	2
43M	-32M	-29M	-30M	14-15M	CAPM	IntM	IVS-I-5M	β 突变 β substitution

41-42N	654N	-28N	71-72N	17N	BEN	31N	27/28M	编号 Number
41-42M	654M	-28M	71-72M	17M	BEM	31M	IVS-I-1M	3
43M	-32M	-29M	-30M	14-15M	CAPM	IntM	IVS-I-5M	β 突变 β substitution

41-42N	654N	-28N	71-72N	17N	BEN	31N	27/28M	编号 Number
41-42M	654M	-28M	71-72M	17M	BEM	31M	IVS-I-1M	4
43M	-32M	-29M	-30M	14-15M	CAPM	IntM	IVS-I-5M	β 突变 β substitution

41-42N	654N	-28N	71-72N	17N	BEN	31N	27/28M	编号 Number
41-42M	654M	-28M	71-72M	17M	BEM	31M	IVS-I-1M	5
43M	-32M	-29M	-30M	14-15M	CAPM	IntM	IVS-I-5M	β 突变 β substitution

41-42N	654N	-28N	71-72N	17N	BEN	31N	27/28M	编号 Number
41-42M	654M	-28M	71-72M	17M	BEM	31M	IVS-I-1M	6
43M	-32M	-29M	-30M	14-15M	CAPM	IntM	IVS-I-5M	β 突变 β substitution

41-42N	654N	-28N	71-72N	17N	BEN	31N	27/28M	编号 Number
41-42M	654M	-28M	71-72M	17M	BEM	31M	IVS-I-1M	7
43M	-32M	-29M	-30M	14-15M	CAPM	IntM	IVS-I-5M	β 突变 β substitution

图 2 RDB 法检测 α 和 β 突变基因型

注: α -突变型检测: 2 号: 未检测到检测范围内的点突变; 4~5 号: WS 纯合突变; 1,3,6,7 号: 与 α -缺失基因型结果综合分析, 提示可能存在罕见突变基因型; β -突变型检测: 均未检测到检测范围内的 β -点突变

Figure 2 Detection of α and β mutation genotype by RDB method

Note: α -mutation detection: 2: No point mutation was detected within detection range; 4~5: WS homozygous mutation; 1, 3, 6, 7: Combined with α -deletion genotype results, suggesting that there may be rare mutation genotypes; β -mutation detection: No β -point mutation was detected within detection range

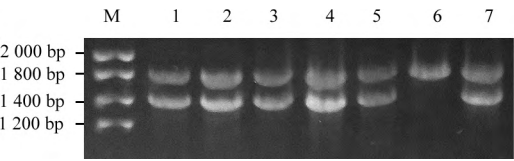


图 3 Gap-PCR 法检测 α -缺失基因型

注: M: DNA Marker; 1: 父亲; 2: 祖母; 3: 伯父; 4: 母亲; 5: 弟弟; 6: 祖父; 7: 先证者

Figure 3 Detection of alpha-deletion genotypes by Gap-PCR method

Note: M: DNA Marker; 1: Father; 2: Grandmother; 3: Uncle; 4: Mother; 5: Younger brother; 6: Grandfather; 7: Proband

片段上存在 7 个突变位点(nt284 C, nt288 C, nt291 A, nt294 A, nt302 G and nt308 C)有一定差异,但突变类型具有相似性,序列对比分析发现先证者 Fusion gene 突变位点序列与 $\Psi\alpha 1$ 对应的碱基序列相同,所以推断 Fusion gene 是由 $\alpha 2$ 段与 $\Psi\alpha 1$ 段基因序列

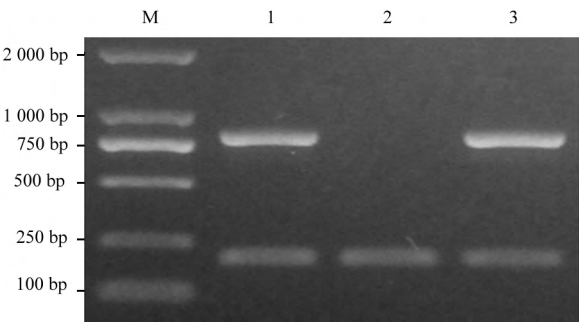


图 4 罕见突变地贫基因型检测

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 正常对照; 3: 先证者

Figure 4 Detection of rare mutation genotype of thalassemia

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Positive control; 2: Normal control; 3: Proband

发生融合所致, 与其不同的是本研究的先证者存在第 8 个突变位点(nt918 G>A)且伴有 $-\alpha 4.2$ 缺失。刘

	34 508	34 510	34 520	34 530	34 540	34 550	34 560	34 570	34 580	34 590
$\alpha 2$.rc	874	AACGGGCCCTCCTCCCTCCCTGCTCCAGCACTTCCTGATCTTTGAATAAAGTCCGAGTGGGCGCAGCCTC	-----							
Fusion gene	854	AACGGGCCCTCCTCCCTCCCTGCTCCAGCACTTCCTGATCTTTGAATAAAGTCCGAGTGGGCGCAGCC	-----							
α reference sequence	34 507	AACGGGCCCTCCTCCCTCCCTTGACACGGCCCTTCCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGCAGCCTCTGTGTGCCTGGGTTC								

图 5 先证者 α -珠蛋白基因测序

注: $\alpha 2$ 基因存在 8 个突变位点: nt875 C>T, nt879 C>A, nt882 A>G, nt885 A>C, nt893 A>G, nt903 G>A, nt909 C>T, nt918 G>A

Figure 5 α -globin gene sequencing of proband

Note: 8 mutation sites of $\alpha 2$ gene: nt875 C>T, nt879 C>A, nt882 A>G, nt885 A>C, nt893 A>G, nt903 G>A, nt909 C>T, nt918 G>A

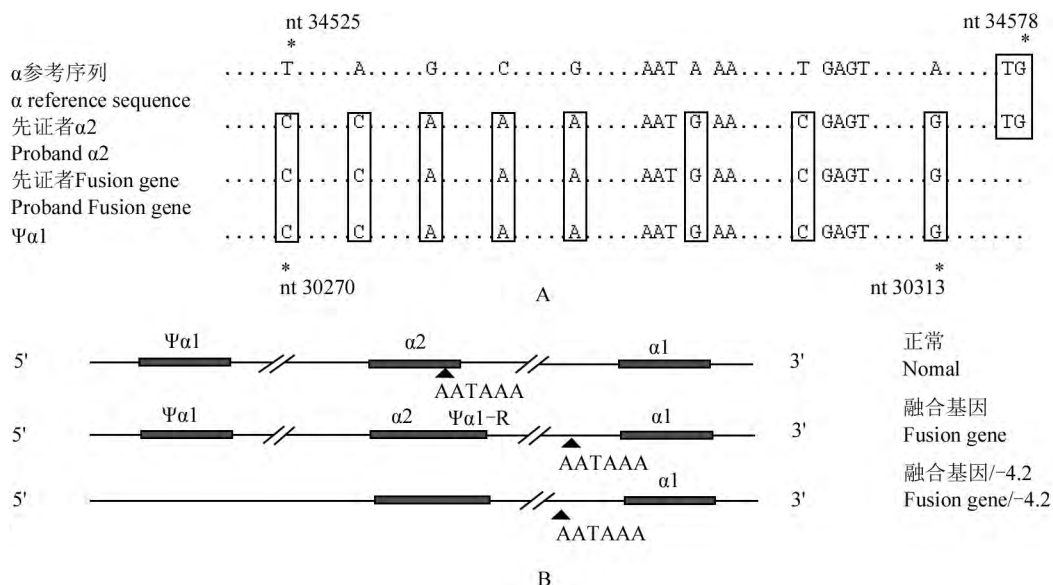


图 6 融合基因序列对比及结构模型构建

注: A: 先证者 $\alpha 2$ 基因 nt34577-nt34578 位点与 α 基因正常参考序列对比以及 $\alpha 2$ 基因上 8 个突变位点(Fusion gene)与 $\Psi\alpha 1$ 基因对应碱基序列对比; B: Fusion gene 是由 α 珠蛋白基因的 $\alpha 2$ 段与 $\Psi\alpha 1$ 段序列发生融合所致, 且先证者伴 -4.2 缺失, 即基因型为 Fusion gene/- $\alpha 4.2$

Figure 6 Fusion gene sequence alignment and structural model construction

Note: A: The proband's nt34577-nt34578 of $\alpha 2$ gene with normal reference sequence alignment of α gene and 8 mutations (Fusion gene) on $\alpha 2$ gene with $\Psi\alpha 1$ gene corresponding base sequence alignment; B: Fusion gene was formed by the fusion of $\alpha 2$ and $\Psi\alpha 1$ sequence of α -globin gene, and the proband was with -4.2 deletion, whose genotype was Fusion gene/- $\alpha 4.2$

朔婕等 (2016) 也报道了相似的融合基因研究结果。“AATAAA”六核苷酸是一种 mRNA 多腺苷酸化信号, 在珠蛋白基因中位于 $\alpha 2$ 基因簇中, 它能够指导核酸内切酶在下游序列 15~30 个碱基位点对前体 mRNA 进行裂解, 该多腺苷酸化信号通常不是严格保守的, 单个碱基突变的发生率很高, 该序列位点发生突变不仅在 α 地贫中有报道, 同样也发生在 β 地贫中 (Lim et al., 2016)。本研究中融合基因的生成致使多腺苷酸化信号位点发生改变, 即“AATGAA” (nt903 G>A) 生成使原有的 $\alpha 2$ 基因聚腺苷酸化信号突变, 引起单个 $\alpha 2$ 基因广泛转录表达导致地贫和类似血红蛋白病的发生。

黎族是海南省特有的少数民族, 由于存在近亲婚配的现象, 从而增加了遗传病的发病率, 同时也增加

了遗传病基因变异的复杂性。家系研究可以寻找遗传病的遗传起源, 也可以对家系中未婚者进行婚前指导, 以减少遗传病的发生。本研究中发现的融合基因是由珠蛋白基因 $\alpha 2$ 段与 $\Psi\alpha 1$ 段基因序列发生融合所致, 当合并其他类型变异时, 其致病效果与中间型地贫相同。家系遗传分析显示先证者及其父亲和伯父的 Fusion gene 由祖父遗传而来, 符合常染色体显性遗传规律, 所以对鉴定为罕见突变基因型的携带者有必要进行基因结构分析和家系遗传分析, 以了解该致病基因突变的意义及遗传规律。针对高风险家族成员应进行遗传咨询和产前诊断, 当血液学表型与基因检测结果不相符或基因检测结果异常时, 有必要进行罕见基因型检测及利用测序技术进行序列分析予以鉴定并及时采取有效的干预措施和治疗手段。

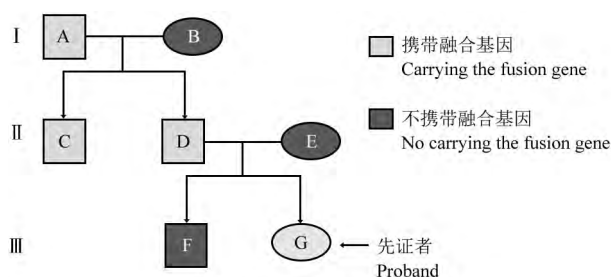


图7 先证者家系遗传图谱

注: A: 祖父: Fusion gene/ $\alpha\alpha$; B: 祖母: $-\alpha 4.2/\alpha\alpha$; C: 伯父: Fusion gene/ $-\alpha 4.2$; D: 父亲: Fusion gene/ $-\alpha 4.2$; E: 母亲: $-\alpha 4.2/\alpha^{ws}\alpha^{ws}$; F: 弟弟: $-\alpha 4.2/\alpha^{ws}\alpha^{ws}$; G: 先证者: Fusion gene/ $-\alpha 4.2$

Figure 7 Genetic map of the proband family

Note: A: Grandfather: Fusion gene/ $\alpha\alpha$; B: Grandmother: $-\alpha 4.2/\alpha\alpha$; C: Uncle: Fusion gene/ $-\alpha 4.2$; D: Father: Fusion gene/ $-\alpha 4.2$; E: Mother: $-\alpha 4.2/\alpha^{ws}\alpha^{ws}$; F: Younger brother: $-\alpha 4.2/\alpha^{ws}\alpha^{ws}$; G: Proband: Fusion gene/ $-\alpha 4.2$

海南黎族人群地贫罕见突变基因研究尚未见报道,据现有资料表明黎族是地贫的高发人群,常见的地贫基因型多有报道,但融合基因发生于多个序列位点,导致珠蛋白基因序列改变因此较为少见。由于融合基因突变发生率较低,常规方法不易检出而造成漏诊,因此基因序列分析是目前首选方法。本家系研究丰富了黎族地贫基因突变数据库,对遗传咨询及地贫基因诊断和防治具有重要价值。建议在产前诊断中若父母携带有罕见或突变地贫基因,需要对胎儿进行基因序列分析,以避免罕见基因或未知突变基因型的漏诊。在科学研究和临床工作中,罕见突变时有发生,但地贫罕见突变的检测和防控面临挑战,因此开展地贫罕见突变的研究对地贫的防控具有实际指导意义。

3 材料与方法

3.1 研究对象

先证者,女,黎族,13周岁,血细胞分析结果 MCV 68.1 fL、MCH 20.5 pg、MCHC 301.6 g/L、HGB 115 g/L,呈小细胞低色素贫血,血红蛋白电泳结果 HbA₂ 2.3%。根据上述检测结果推断疑似 α 地贫携带者,行地贫常见基因型检测发现 α -缺失型扩增出1.4 kb的 $-\alpha 4.2$ 条带及1.7 kb的 $\alpha\alpha$ 条带,与 α -突变型基因检测结果综合分析提示可能存在罕见基因型突变,经Gap-PCR法检测和基因测序进一步分析后,验证其地贫基因型为Fusion gene/ $-\alpha 4.2$ 。在先证者及其监护人知情同意的情况下,采集先证者及其祖父母、父母、伯父、弟弟的静脉血3 mL,EDTA抗凝,4℃运输

保存,进行家系遗传分析。

3.2 血细胞和血红蛋白电泳分析

采集所有受试者静脉血3 mL,EDTA抗凝,应用五分类血细胞分析仪XE-2100(日本Sysmex公司)和Cappilarys 2型全自动毛细管电泳分析仪(法国Sebia公司)及配套试剂和质控品,严格按照标准操作规程进行血细胞指数分析和血红蛋白电泳检测。

3.3 地贫常见基因型检测

使用全血DNA提取试剂盒(北京天根生物技术公司)结合Smart-32核酸提取仪(广州中山大学达安基因股份有限公司)提取基因组DNA,用深圳亚能生物技术公司生产的Gap-PCR法-缺失型 α 地中海贫血基因诊断试剂盒和RDB法-非缺失型 α 地中海贫血基因诊断试剂盒检测--SEA、 $-\alpha 3.7$ 和 $-\alpha 4.2$ 等3种常见缺失类型和QS、CS和WS等3种常见点突变类型以及RDB法- β 地中海贫血基因诊断试剂盒检测17种常见 β 珠蛋白基因点突变(41-42M/N, 654M/N, -28 M/N, 71-72 M/N, 17 M/N, βE M/N, 43 M/N, -29 M/N, 31 M/N, -32 M/N, IVS-I-1 M, 27/28 M, -30 M, 14-15 M, CAP M, Int M和IVS-I-5 M)。

3.4 罕见突变地贫基因型鉴定

先证者采用Gap-PCR法结合特异引物(F: 5'-CT CTCAGGGCAGAGGATCAC-3'; R: 5'-TGTCTGCCA CCCTCTTCTGAC-3')进行地贫罕见突变基因型检测,同时收集其1.5 mL全血(EDTA抗凝)送至深圳亚能生物技术有限公司利用Sanger法进行 α -珠蛋白基因测序(美国ABI公司ABI-3730XL测序仪),测序结果参照<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>进行序列检索和对比分析。

作者贡献

胡俊杰和陈鑫苹是本研究的实验设计和实验研究的执行人,胡俊杰完成论文初稿的写作和数据分析;赵立强、张继业、李晓娟和徐卫华参与实验结果分析;符生苗是项目的负责人并指导实验设计、数据分析、论文写作和修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由海南省医药卫生科技重点支撑项目(琼卫重点2010-48)和海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2015071)共同资助。

参考文献

- Borg J., Georgitsi M., Aleporou-Marinou V., Kollia P., and Patrinos G.P., 2009, Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters, *Clinical Biochemistry*, 42(18): 1839-1850
- Chen B.Y., 2013, Molecular and prenatal diagnosis and pedigree investigation for 3 cases of rare thalassemia, *Hainan Yixueyuan Xuebao (Journal of Hainan Medical College)*, 19(4): 452-456 (陈碧艳, 2013, 3 例罕见地中海贫血家系分子诊断和产前诊断, *海南医学院学报*, 19(4): 452-456)
- Chen J. M., Cooper D.N., Chuzhanova N., Férec C., and Patrinos G.P., 2007, Gene conversion: Mechanisms evolution and human disease, *Nat. Rev. Genet.*, 8(10): 762-775
- Harteveld C.L., and Higgs D.R., 2010, Alpha-thalassaemia, *Orphanet J. Rare Dis.*, 5: 13
- Huang J.W., Shang X., Zhao Y., Cai R., Zhang X.H., Wei X.F., Xiong F., and Xu X.M., 2016, A novel fusion gene and a common α^0 -thalassemia deletion cause hemoglobinH disease in a Chinese family, *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 51(1): 31-34
- Lai K.T., Huang G.F., Su L., and He Y.Y., 2017, The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys, *Scientific Report*, 7(1): 920
- Law H.Y., Luo H.Y., Wang W., Ho J.F., Najmabadi H., Ng I.S., Steinberg M.H., Chui D.H., and Chong S.S., 2006, Determining the cause of patchwork *HBA1* and *HBA2* genes: recurrent gene conversion or crossing over fixation events, *Haematologica*, 91(3): 297-302
- Lim Y.C., Tan K.M., Chong S.S., Rajendran J., and Sampath V., 2016, A patient with β -thalassemia intermedia secondary to homozygosity for a polyadenylation signal mutation (AATA-AA>AATAGA) (HBB: C.*112A>G) on the β -globin gene, *Hemoglobin*, 40(5): 359-360
- Liu S.J., Sun M., Huang Y., Hong G.L., Shen G.X., and Hu B., 2016, Genotype analysis of rare alpha-thalassemia in southern Fujian province, *Yixue Fenzi Shengwuxue Zazhi (Journal of Medical Molecular Biology)*, 13(6): 311-316 (刘朔婕, 孙鸣, 黄宇, 洪国舜, 沈关心, 胡斌, 2016, 闽南地区罕见 α 地中海贫血基因型分析, *医学分子生物学杂志*, 13(6): 311-316)
- Weatherall D.J., 1997, The thalassemias, *BMJ*, 314: 1675-1678
- Weatherall D.J., Williams T.N., Allen S.J., and O'Donnell A., 2010, The population genetics and dynamics of the thalassemias, *Hematology Oncology Clinics of North America*, 24(6): 1021-1031
- Yan S.H., Lao K.G., Fu K.P., Gong F.F., Wen X.J., and Zhou W. J., 2016, Hemoglobin H disease with a rare α -thalassemia gene mutation ($--SEA/\alpha^*92A>G\alpha$): pedigree analysis and genetic diagnosis, *Nanfang Yike Daxue Xuebao (Journal of Southern Medical University)*, 36(9): 1295-1298 (颜善活, 劳可干, 符可鹏, 龚菲菲, 温晓君, 周万军, 2016, 一种罕见 α -地贫基因突变 HbH 病($--SEA/\alpha^*92A>G\alpha$)的家系分析与基因诊断, *南方医科大学学报*, 36(9): 1295-1298)
- Yang Y., and Zhang J., 2017, Research progress on thalassemia in southern china review, *Zhongguo Shiyan Xueyexue Zazhi (Journal of Experimental Hematology)*, 25(1): 276-280 (杨阳, 张杰, 2017, 中国南方地区地中海贫血研究进展, *中国实验血液学杂志*, 25(1): 276-280)
- Yao H.X., Chen X.P., Lin L., Wu C.M., Fu X.J., Wang H., Yao Z.M., Chen W.T., Huang L., Tang R.M., Rao R., Wang S.W., and Ding Y.P., 2014, The spectrum of α - and β -thalassemia mutations of the Li people in Hainan province of China, *Blood Cells, Molecular and Diseases*, 53(1-2): 16-20