

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.10.10

· 临床研究技术 ·

α -地中海贫血融合基因检测方法及应用评价*

鞠爱萍¹, 李友琼², 李娜³, 刘淑贤¹, 梁亮² (1. 广州市花都区妇幼保健院检验科, 广州 510800; 2. 广西壮族自治区人民医院医学遗传与产前诊断中心, 广西南宁 530021; 3. 广州市花都区炭步镇中心卫生院计划免疫科, 广州 510820)

摘要: **目的** 探讨当前分子诊断常规方法在 α -地中海贫血(地贫)融合基因检测中的应用。**方法** 采用缺口 PCR 法、PCR-导流杂交法和 α_2 珠蛋白基因 Sanger 测序 3 种方法, 检测 2 例 α_2 珠蛋白融合地贫基因并进行比对。**结果** 2 例样本 PCR-导流杂交法在 $-\alpha^{4.2}$ 突变位点有弱显影; 缺口 PCR 法未检出异常条带; Sanger 测序准确检出 α_2 珠蛋白基因 7 个点突变(nt34528T>C、nt34532A>C、nt34535G>A、nt34538C>A、nt34546G>A、nt34556A>G、nt34662T>C)。**结论** PCR-导流杂交法试剂盒提示可能存在 α -地贫融合基因, α_2 珠蛋白基因直接测序可准确检测 α -地贫融合基因。

关键词: 融合基因; 地中海贫血; 基因测序; 导流杂交

中图分类号: R446

文献标志码: A

地中海贫血(以下简称“地贫”)是一种常见的溶血性单基因隐性遗传病, 主要是由于珠蛋白基因缺陷导致珠蛋白链合成减少或缺如而引起的^[1]。我国长江以南地区, 特别是广西、广东、云南、海南是该病的高发区^[2-4]。目前临床实践中常规使用的检测试剂盒, 主要是针对中国人群的常见基因突变。导致地贫表型的 α_2 珠蛋白融合基因于 2013 年首次报道^[5], 其人群分布尚不清楚, 常规试剂盒常不包含该检测位点, 故此突变的临床检测是目前所面临的一个具体问题。本研究采用临床常规使用的缺口 PCR(gap-PCR)、PCR-导流杂交法 α -地贫基因检测试剂盒以及 Sanger 一代测序技术, 检测 2 例 α_2 珠蛋白融合基因样本, 探讨当前分子诊断常规方法在 α -地贫融合基因检测中的应用。

1 对象和方法

1.1 研究对象 2 例 α_2 珠蛋白融合基因样本来自广州市花都区妇幼保健院婚育体检者, 其籍贯为广州花都区, 汉族, 既往体健, 否认输血史, 无贫血貌, 均签署知情同意书。

1.2 标本采集与处理 分别采集 2 份 2 mL 静脉血, EDTA-K₂ 抗凝, 1 份用于血细胞和血红蛋白电泳分析, 另 1 份用于地贫基因分析。

1.3 表型分析 在确定仪器运行状态良好、室内

质控在控后, 进行血细胞分析和血红蛋白电泳。观察红细胞参数即血红蛋白(Hb)、红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH); 参考区间: Hb, 女性 110~155 g/L, 男性 120~160 g/L, MCV 80~100 fL, MCH 26~34 pg。血红蛋白组分定量以电泳出所有条带的峰值为 100%, 各个条带所占的峰面积作为条带的相对含量; 参考区间: HbA 91.5%~98%, HbF 0~5%, HbA2 2.4%~3.5%。

1.4 地贫基因常规检测 用 gap-PCR 法(深圳益生堂公司试剂盒)检测中国人群常见的 4 种缺失型 α -地贫($--^{SEA}$ 、 $--^{THAI}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$)。用 PCR-导流杂交法(广州凯普公司试剂盒)检测中国人群常见的 3 种缺失型($--^{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$)和 3 种非缺失型 α -地贫(Hb Constant Spring 即 Hb CS、Hb Westmead 即 Hb WS、Hb Quong Sze 即 Hb QS)。

1.5 α 珠蛋白基因 DNA 测序 根据参考文献^[6]设计引物, 进行 α 珠蛋白基因 Sanger 测序(委托广州凯普生物公司)。上游引物序列为 5'-GCGAGCGG GATGGCGGGAGT-3', 下游引物序列为 5'-TGAGT GCTGTGTTGACCTA-3'。扩增体系 50 μ L (Qiagen 公司产品), 含 5 μ L 10 \times PCR buffer, 5 μ L Q-solution, 2.5 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 1.0 μ L 25 mmol/L dNTPs, 1.5 U Taq polymerase, 5 pmol 上、下游引物。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 97 $^{\circ}$ C 50 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min,

* 基金项目: 广西医药卫生科研课题(Z20200076)。

作者简介: 鞠爱萍, 1977 年生, 女, 副主任技师, 硕士, 研究方向: 地中海贫血筛查与诊断。

通信作者: 李友琼, 副主任技师, E-mail: liyouqiong327@163.com。

72 ℃ 2 min, 共 35 个循环; 72 ℃ 10 min。采用 3500 基因分析仪(美国 Life 公司)进行 DNA 测序。采用 Vector NTI Advance 11 分析软件进行序列分析, 将序列与 NCBI 上参考序列(NG_000006.1)进行比对。

2 结果

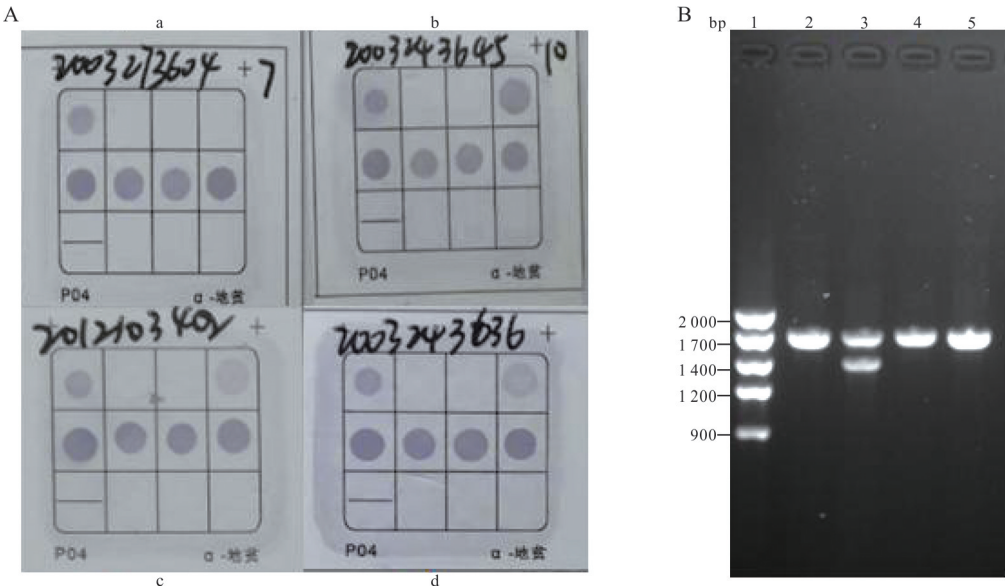
2.1 血液学表型 见表 1。红细胞参数(Hb、MCV、MCH)未见异常, 血红蛋白电泳分析未见异常

条带, HbA 和 HbA₂ 结果均在参考区间内。

表 1 2 例 α-地贫患者血液学表型和基因型结果

编号	性别	年龄 (岁)	Hb (g/L)	MCV (%)	MCH (%)	HbA (%)	HbA ₂ (%)	基因型
1	女	29	130	80.3	25.8	97.5	2.5	Fusion gene/αα
2	女	27	122	83.5	26.2	97.5	2.5	Fusion gene/αα

2.2 地贫基因常规检测 PCR-导流杂交法在-α^{4.2} 突变位点可见弱显影, 见图 1A; gap-PCR 法未见异常条带, 见图 1B。

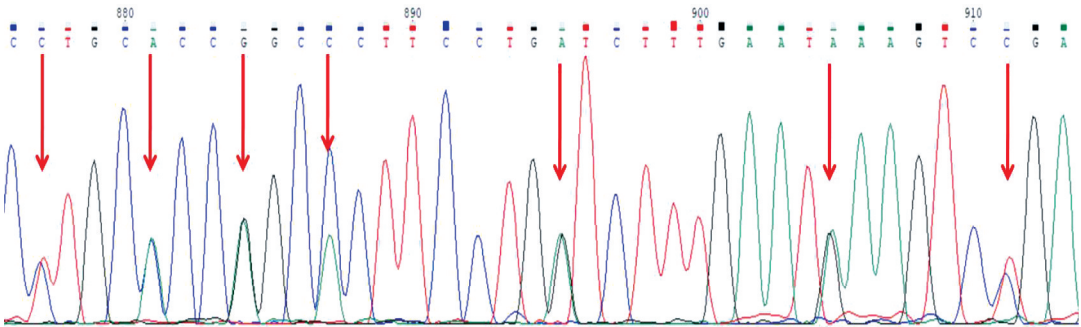


注: A, PCR-导流杂交法; B, gap-PCR 法; a, 阴性对照; b, -α^{4.2} 杂合子; c、d, 受检样本; 1, DL 2000 Marker; 2, 阴性对照; 3, -α^{4.2} 杂合子; 4、5, 受检样本。

图 1 PCR-导流杂交法和 gap-PCR 法检测结果

2.3 α 珠蛋白基因 DNA 测序 α₂ 珠蛋白基因测序结果显示有 7 个突变位点, 分别为 nt34528T>C、nt34532A>C、nt34535G>A、nt34538C>A、nt34546G>A、

nt34556A>G、nt34662T>C, 见图 2, 与报道的 α₂ 珠蛋白融合基因结果^[5]一致。



注: 箭头指示 7 个突变位点。

图 2 Sanger 测序 α-地贫融合基因

3 讨论

据报道, α₂ 珠蛋白融合基因是在配子生成过程中, α₂ 珠蛋白基因与 Ψα1 发生了片段重组^[5,7],

改变了 α₂ 珠蛋白基因的 3'UTR, 并引起了多聚腺苷酸信号突变, 从而产生广泛的 α₂ 珠蛋白基因转录本, 引起 α⁺-地贫。此融合基因的序列结构是 α₂ 珠蛋白基因中有一段序列与 Ψα1 一致, 涉及 7 个

差异碱基位点,故据此 7 个差异位点,从而实现此基因的准确检测分析。

目前的地贫基因诊断临床实践中,未将 α_2 珠蛋白融合基因纳入检测位点范围;且其为 α^+ -地贫基因,携带者通常为静止型表型特征,这是 α_2 珠蛋白融合基因文献报道比较少的原因^[5-6,8]。因此, α_2 珠蛋白融合基因的表型筛查和分子诊断是目前所面临的难题之一。在当前此融合基因未纳入常规检测位点范围的情况下,若有线索提示其可能存在,进而检测确定,在某种程度上有一定的实际意义和应用价值。本研究发现,用 PCR-导流杂交法检测 2 例样本时,在- $\alpha^{4.2}$ 突变位点有弱显影,显色程度淡(图 1A),可能会误判为- $\alpha^{4.2}$ 杂合子,但经 α -地贫缺失 gap-PCR 试剂盒复核时,未检出缺失目的条带,结果为- $\alpha^{4.2}$ 阴性(图 1B)。通过随后的 α_2 珠蛋白基因 DNA 测序显示 7 个位点发生碱基置换,而确定为 α_2 珠蛋白融合基因,与已有的报道结果一致^[5]。经序列比对分析,此差异位点位于缺失型 α -地贫基因扩增体系中正常内参序列范围,很可能是此内参序列与反向点杂交膜上的- $\alpha^{4.2}$ 突变位点探针发生了非特异杂交,从而导致 PCR-导流杂交法- $\alpha^{4.2}$ 位点弱显影,易误判读为- $\alpha^{4.2}$ 杂合子。由此可见,PCR-导流杂交法的结果判断中,- $\alpha^{4.2}$ 突变位点的显色程度须与对照位点基本一致才能判读为- $\alpha^{4.2}$ 缺失突变;弱显影则提示可能存在其他情况,如本研究中的 α_2 珠蛋白融合基因。PCR-导流杂交法- $\alpha^{4.2}$ 位点弱显影虽然可以提示可能存在 α_2 珠蛋白融合基因,但需要通过基因测序来确证。

本研究中的 2 例患者均为杂合子状态,血液表型均未见异常,这提示 α_2 珠蛋白融合基因引起的

是 α^+ -地贫,不会造成贫血。但根据文献报道, α_2 珠蛋白融合基因合并--^{SEA} 时,可引起血红蛋白 H 病^[5],提醒我们在日常地贫筛查和基因诊断中需要注意。因为如果夫妻双方的一方为 α_2 珠蛋白融合基因,另外一方为轻型 α 地贫时,可能会有生育血红蛋白 H 病患儿的危险。

4 参考文献

- [1] Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical classification, screening and diagnosis for thalassemia[J]. Hematol Clin N Am, 2018, 32(2): 193-211.
- [2] 李友琼, 何升, 丘小霞, 等. 2010—2019 年广西地中海贫血发生现状与防治策略[J]. 中国临床新医学, 2020, 13(10): 955-959.
- [3] 揭秋玲, 李崎, 孙文页, 等. 海南地区地中海贫血筛查者的基因结果分析[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(8): 1092-1095.
- [4] 邹团标, 姚莉琴, 李智, 等. 中国云南省 23 个民族育龄人群地中海贫血基因检测与分析[J]. 中国公共卫生, 2019, 35(11): 1504-1509.
- [5] Huang JW, Shang X, Zhao Y, et al. A novel fusion gene and a common α^0 -thalassemia deletion cause hemoglobin H disease in a Chinese family[J]. Blood Cells Mol Dis, 2013, 51(1): 31-34.
- [6] 胡俊杰, 陈鑫苹, 张继业, 等. 一个黎族 α -地中海贫血融合基因遗传家系的鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(4): 1525-1531.
- [7] Pirastru M, Manca L, Trova S, et al. Biochemical and molecular analysis of the hb lepore Boston Washington in a Syrian homozygous child[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 1261972.
- [8] 刘翔婕, 孙鸣, 黄宇, 等. 闽南地区罕见 α 地中海贫血基因型分析[J]. 医学分子生物学杂志, 2016, 38(6): 311-316.

(收稿日期:2021-01-12)

(本文编辑:王海燕)