

Gap-PCR作为临床一线 琢地中海贫血携带者筛查技术的应用评价

周玉球¹ 肖鸽飞¹ 蓉莉艳² 蓉文典¹ 袁忠英² 袁兰芳¹ 袁秋华² 袁信军¹ 袁湘民² 渊珠海市妇幼保健院遗传所 袁广东 珠海 519001 曰第一军医大学细胞生物和医学遗传学教研室 袁广东 广州 510515 冤

摘要 目的 评价检测中国人 3 种常见的缺失型 琢地中海贫血渊地贫冤基因的 gap-PCR 作为临床一线 琢地贫携带者筛查技术的可行性遥方法 以双盲试验对随机抽取的 382 份血样同时采用 gap-PCR 分子筛查技术和血液学分析法分别检测 琢地贫基因型和 琢地贫表型袁并以 Southernblot 分析法作平行对照分析遥结果 在 382 份样品中袁用 gap-PCR 法检出 3 种常见的 琢地贫基因 -^{SEA}尧琢⁷ 和 -琢² 分别为 21 尧和 3 例袁据此该市人群中 琢地贫的基因携带率为 8.12%遥在这些阳性样品中,有 7 例和 3 例分别检出自血液学表型正常渊10冤和缺铁性贫血渊10冤样品遥这些结果与 Southernblot 分析完全一致遥血液学表型筛查法仅检出其中的 21 例渊除 2 例 琢地贫表型阳性未定型外冤袁该法的假阴性率为 32.3%遥因血液学表型筛查漏检了 7 例静止型和 3 例轻型 琢地贫样品袁故此法总的漏检率为 2.62%遥结论 与血液学筛查法比较袁ap-PCR 分子筛查技术更具有特异性和可靠性袁是临床上进行 琢地贫基因携带者渊尤其是静止型 琢地贫冤筛查的可选用的一线技术遥

关键词 琢地中海贫血 遗传筛查 聚合酶链反应 曰分子诊断

中图分类号 渊556.61 文献标识码 渊 文章编号 院000-2588渊002冤5-0434-03

Evaluation of clinical application of gap-PCR as a routine method for 琢thalassemia carrier detection

ZHOUYu-qiu¹,XIAOGe-fei¹,LILi-yan², LIWen-dian¹, LIU Zhong-ying², ZHULan-fang¹, MO Qiu-hua², QUXin-jun¹,XUXiang-min²

¹Women and Children'sHealthcareHospitalofZhuhaiCity, Zhuhai 519001,China; ²Department ofCellBiologyand Medical Genetics,FirstMilitaryMedicalUniversity,Guangzhou510515,China

Abstract: Objective Toevaluatethefeasibilityofusinggap-PCRforroutinescreeningof 琢thalassemiaclinicallaboratory. Methods Atotalof382clinicalbloodsamplesrandomlycollectedfromthepopulationofZhuhaiCitywerescreenedfor 琢thalassemiadeterminantwithhematologicalandgap-PCRmethodrespectivelyinadouble-blindmanner. Parallelanalysis withSouthernblottingwasperformedtoverifythegenotypingresultsbyPCR. Results Ofthe382sampletested,3common 琢thalassemia genotypes of -^{SEA}琢⁷, -琢² and 琢⁷琢² were detected in 21 (5.50%), 7 (1.83%) and 3 (0.79%) cases respectively by gap-PCR, including 7 cases with normal phenotype and 3 cases of iron-deficiency anemia. The overall incidence of 琢thalassemia was 8.12% in the population of Zhuhai City, as determined by gap-PCR, in total agreement with the results by Southern blotting. Only 21 of the 31 琢thalassemia cases were identified by hematological analysis (besides 2 cases with 琢thalassemia phenotype undetermined), which had a false-negative rate of 32.3%. Seven silent 琢thalassemia and 3 mild 琢thalassemia cases failed to be detected by hematological analysis, resulting in a rate of 2.62% for failure of detection. Conclusion Gap-PCR method is specific and feasible as a better alternative for 琢thalassemia screening, especially advantageous in detecting silent carriers in comparison with the hematological method.

Key words: 琢thalassemia; genetics screening; polymerase chain reaction; molecular diagnostic

琢地中海贫血简称 琢地贫是由于 琢珠蛋白基因的缺陷致 琢珠蛋白肽链缺如或合成不足所引起的遗传性血液病遥其基因突变具有高度的异质性袁主要为 琢珠蛋白基因大片断缺失渊缺失型冤少数为碱基替代尧几个核苷酸缺失或插入渊非缺失型冤遥目前

世界上已报道了至少 50 种不同种族人群中的缺失型 琢地贫基因袁中国人中有 7 种^{〔1〕}袁其中 -^{SEA}尧琢⁷ 和 -琢² 为中国人最常见的 琢地贫突变类型遥 -^{SEA} 基因自身或与 -琢² 渊-琢²冤基因相互组合可分别产生致死性的 Hb Bart's 水肿胎和严重影响生存质量的 HbH 病^{〔2〕}遥鉴于我国南方人群中 琢地贫基因有很高的携带率^{〔3〕}袁且此病尚无理想的根治方法,通过人群筛查和遗传咨询袁对那些携有 琢地贫基因的高风险家族实施产前诊断袁是当前条件下控制 琢地贫重症患儿出生的首选途径遥传统的 琢地贫血液学筛查法,是基于红细胞指数和血红蛋白电泳等多指标的综合分析法袁

收稿日期 院002-01-08
基金项目 院广东省卫生厅医药卫生重点基金渊996A0036冤 广东省科委和广东省卫生厅联合攻关重大课题基金渊9B06704G冤 珠海市科委重点科技攻关资助项目渊998冤6号-9818
作者简介 周玉球 渊963 冤男 袁湖南衡山人 袁毕业于湖南医学院袁硕士袁副研究员 袁电话:0756-2291974 渊本文通讯作者 袁陈湘民冤

虽可检出标准型 琢地贫携带者但却存在漏检在人群中占相当比重的静止型 琢地贫的缺陷而经典的诊断缺失型 琢地贫的 Southernblotting 技术虽然准确可靠但也存在操作复杂耗时需用同位素等诸多弊端使其难以用于临床实验室的筛查工作本室基于跨越断裂点扩增策略而建立的 gap-PCR 方法可简便快速检测中国人常见的 3 种缺失型 琢地贫突变 Δ SEA 和 Δ 7 和 Δ 2 基因本文尝试将在特异性和可操作性上较血液学分析法具有优势的这一技术用于临床一线筛查 琢地贫个体以期能为 琢地贫的人群筛查提供新的技术选择

1 材料和方法

1.1 研究对象

受检者为在院行例行婚检的珠海市户籍待婚青年共随机采集样本 382 例其中男性 167 例女性 215 例

1.2 方法

1.2.1 琢地贫的筛查策略 采用血液学筛查法和 gap-PCR 法对样品分别进行表型筛查和基因型分析以双盲法进行

1.2.2 琢地贫的表型筛查 诊断 琢地贫主要依据红细胞指数和 HbA₂ 定量测定以血清铁和血清铁蛋白检查以排除缺铁性贫血红细胞指数测定采用全自动血细胞计数仪 MAX-M-Coulter 意大利 HbA₂ 定量采用微柱法美国 Helena Laboratories 公司血清铁测定采用比色法铁蛋白的测定采用化学发光法检测试剂盒 Automatic Chemiluminescence System, Chiron Diagnosis Corp., 美国进行

琢地贫表型阳性样品的诊断指标为: MCV < 82 fl 和 / 或 MCH < 27 pg HbA₂ 和抗碱血红蛋白正常(分别 < 3.0% 和 臆 2.0%) 血清铁逸 10.7 μmol/L 和铁蛋白逸 14 μg/L 在上述 MCV 和 / 或 MCH 指标阳性时若 HbA₂ 逸 3.5% 则诊断为 茁地贫表型阳性 缺铁性贫血的诊断标准见文献

1.2.3 DNA 样品抽提和基因型分析 用酚 - 氯仿法抽提外周血白细胞中的 DNA Δ SEA 和 Δ 7 和 Δ 2 三种基因型的检测则按第一军医大学细胞生我和医学遗传学教研室建立的 gap-PCR 方法进行 RDB 技术用于 茁地贫疑诊病例的基因分型

1.2.4 Southernblot 分析 从 gap-PCR 确定为 Δ SEA 和 Δ 7 和 Δ 2 基因型的 DNA 样品中分别随机抽取 10 和 2 份依文献进行 Southernblot 分析以佐证 gap-PCR 方法的可靠性

2 结果

2.1 琢地贫表型阳性检出率

在 382 份珠海市户籍的婚检样品中血液学分析检出 琢地贫表型阳性样品 23 例此外还检出 茁地贫阳性病例 11 例 缺铁性贫血 7 例 均为女性由此得出 琢地贫 茁地贫和缺铁性贫血的检出率分别为 6.02% 8.88% 和 1.83%

2.2 gap-PCR 检测结果

在上述样品中用 gap-PCR 技术分别检出 21 和 3 例基因型为 Δ SEA 和 Δ 7 及 Δ 2 的 琢地贫样品由此计算出该市户籍人口中此 3 种 琢地贫的基因携带率分别为 5.50% 8.83% 和 0.79% 人群中总的 琢地贫基因携带率为 8.12% 值得一提的是有 10 例缺失型 琢地贫样品分别发现自表型正常 缺铁性贫血样品中 逾 351 份样品包括 11 例 茁地贫表型阳性的样品未检出这 3 种 琢地贫基因血液学筛查和分子筛查两法所得的结果见表 1

表 1 琢地贫血液学筛查和分子筛查结果
Tab.1 Results of phenotypic analysis and molecular detection of 琢thalassemia

Diagnosis	Phenotypicanalysis n	Moleculardetection			
		Δ SEA	Δ 7	Δ 2	Other
Normal	341	334	2*	4	1
琢thalassemia	23	2**	18	1	2
Irondeficiencyanemia	7	4	1	2	0
茁thalassemia	11	11	0	0	0
Total	382	351	21	7	3

*The genotypes of these 2 samples were found to be codon (CD) 41-42(-CTTT)/normal and IVS-2-654(C-T)/normal, respectively; **Other 琢thalassemia defect except for the above 3 deletions were not involved

2.3 Southernblot 分析结果

20 份随机抽取的不同基因型 DNA 样品经 Southernblot 分析所得结果与 gap-PCR 法完全一致 结果未列出

3 讨论

我们采取双盲法对例行婚前医学检查的珠海户籍人群中的 382 份随机血样分别进行了 琢地贫携带者的血液学表型和 gap-PCR 分子筛查结果显示珠海市户籍人群中 琢地贫表型阳性检出率为 6.02%, 而 gap-PCR 分子筛查的阳性率则为 8.12% 这与最近我们完成的 1548 份该市户籍新生儿脐血连续样品 琢地贫的分子流行病学调查结果 91% 完全吻合在检出的 138 例 琢地贫基因中 Δ SEA 和 Δ 7 及 Δ 2 这 3 种常见 琢地贫占 90.6% 结果待发表 这说明本研究所取的样品具有较好的代表性, 同时也

提示本文将上述 3 种 琢地贫基因作为 琢地贫的分子筛查对象是有临床意义的

经基因分析确诊的 31 例 琢地贫阳性的样品中血液学分析只筛查出 21 例 渊例暂未确定基因型的样品未计冤假阴性 10 例表其假阴性率高达 32.3% 渊0/31 冤由此可看出血液学筛查法最大的缺陷是漏诊袁在本文分析的 382 例临床样品中血液学方法共漏检了 10 例 琢地贫基因携带者袁故用传统血液学分析法筛查 琢地贫的总漏检率为 2.62% 渊0/382 冤此外袁在 23 例 琢地贫表型阳性的样品中尚有 2 例未能检出这 3 种常见的 琢地贫缺失突变, 是否为其其他类型的 琢地贫突变或某些造血干细胞疾病如骨髓增生不良症或铁幼粒性细胞贫血袁还有待进一步阐明

正如所预期的袁上述漏检样品中袁主要是表型为静止型 琢地贫样品的贡献所致 渊7/10 冤众所周知袁成人静止型 琢地贫用传统血液学筛查法难以诊断袁故本法所具有的 琢地贫高特异性和灵敏性的诊断价值袁主要体现在对静止型 琢地贫的诊断上遥由于 $\alpha\text{-SEA}$ 与 $\alpha\text{-琢}^7$ 或 $\alpha\text{-琢}^2$ 基因组合可能产生有严重临床后果的 Hb H 病袁为防止在以优生为目的的人群筛查中由于漏检而发生不良后果袁作者建议在有条件的地区或单位袁可将 gap-PCR 分子筛查法直接用于临床一线 琢地贫的筛查遥而以血液学筛查法作为主要技术手段检测 琢地贫时袁要特别谨慎遥此外袁缺铁性贫血也属于小细胞低色素贫血袁当 琢地贫合并缺铁性贫血时血液学指标易造成错误诊断袁而 琢地贫的分子筛查可对此作出准确的诊断遥为了防患于未然袁建议在地贫高发区对缺铁这一常见的孕妇病症袁需关注其合并地贫存在的问题袁必要时需进行 琢地贫的分子诊断遥本文在表型正常的样本中检出 2 例 $\alpha\text{-SEA}$ 基因携带者袁均属南方地区也较常见的 琢地贫复合 茁地贫病例袁这一结果提示袁琢和 茁复合型地贫可由于 琢和 茁珠蛋白肽链的合成趋于平衡而减轻异常表型袁故用 gap-PCR 在表型正常的样品中筛查发现这类病例是有价值的

鉴于 琢地贫不象 茁地贫那样有典型的血液学表型指征袁需靠多项指标才能作出综合判断袁且存在漏诊的问题袁故本文介绍的方法在特异性和准确性上具有明显的技术优势袁且证明在临床实验室作为一线筛查方法是可行的遥但其推广应用尚有待进一步简化 DNA 模板的制备和建立能同时筛查多种 琢地贫基

因的一管多重 gap-PCR 的技术

参考文献

- 咱暂 HiggsDR, VickersMA, WilkieAOM, et al. A review of the molecular genetics of the human 琢globin gene cluster 咱暂 Blood, 1989, 73(4):1081-104.
- 咱暂肖维威, 徐湘民, 徐 钤. 中国人缺失型 琢地中海贫血的分子基础及产前基因诊断 咱暂第一军医大学学报, 1998, 18(1):68-72. XiaoWW, XuXM, XuQ. Molecular basis and prenatal diagnosis of deletion 琢thalassemia in Chinese 咱暂 JFirstMilMedUniv. 1998, 18(1):68-72.
- 咱暂曾瑞萍, 胡 彬, 金龙金. 广东地区血红蛋白 H 病基因型分析及高危胎儿基因诊断 咱暂中华医学遗传学杂志, 1996, 13(5):266-8. ZengRP, HuB, JinLJ. Genotype analysis and prenatal diagnosis of fetal hemoglobin H disease in Guangdong area 咱暂 ChinJ Med Genet, 1996, 13(5):266-8.
- 咱暂 ChangJG, LeeLS, LinCP, et al. Rapid diagnosis of 琢thalassemia-1 of Southern Asiatic type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction 咱暂 Blood, 1991, 78(3):853-4.
- 咱暂肖维威, 徐湘民, 刘忠英. 东南亚缺失型 琢地中海贫血的聚合酶链反应快速诊断技术及其产前诊断 咱暂中华血液学杂志, 2000, 21(4):192-4. XiaoWW, XuXM, LiuZY. Rapid detection of 琢thalassemia of Southeast Asia deletion by polymerase chain reaction and its application to prenatal diagnosis 咱暂 ChinJ Hematol, 2000, 21(4):192-4.
- 咱暂赵永忠, 钟 梅, 刘忠英, 等. PCR 技术快速检测常见缺失型 琢地中海贫血 -2 基因 咱暂中华医学遗传学杂志, 2001, 18(3):216-8. ZhaoYZ, ZhongM, LiuZY, et al. Rapid detection of the common 琢thalassemia-2 determinants by PCR assay 咱暂 ChinJ Med Genet, 2001, 18(3):216-8.
- 咱暂张之南. 血液病诊断标准 咱暂天津科学技术出版社, 1991:9-14.
- 咱暂 ZhangLZ, XuXM, MaWF, et al. A rapid reversed dot blot assay for all 18 茁thalassemia in Chinese population 咱暂 Med Coll PLA, 1993, 8(3):213-5.
- 咱暂 ZhaoW, ZhangJ, WangNS, et al. The relationship between Hb Bart's levels in cord blood and deletion of 琢globin genes 咱暂 Hemoglobin, 1988, 12(5,6):519-27.
- 咱暂 SkogerboeKJ, WestSF, SmithC, et al. Screening for 琢thalassemia correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA-determined genotype 咱暂 Arch Pathol Lab Med, 1992, 116(8):1012-8.
- 咱暂 DumasK, BorinneB, EckmanJR, et al. Practical guide to the diagnosis of thalassemia 咱暂 AmJ Med Genet, 1996, 62(1):29-37.
- 咱暂 WilliamsTN, MaitlandK, GanczakowskiM, et al. Red blood cell phenotypes in the 琢thalassemias 咱暂 BrJ Haematol, 1996, 95(2):266-72.
- 咱暂 YongKN, WadsworthLD, LangloisS, et al. Thalassemia carrier screening and prenatal diagnosis among the British Columbia (Canada) population of Chinese descent 咱暂 Clin Genet, 1999, 55(1):20-5.