

· 技术与方法 ·

应用 Taqman-MGB 探针法检测地中海贫血 Hb Westmead 突变*

陈文强¹, 陈萍¹, 庞丽红², 李树全¹, 林伟雄¹, 杨德寨¹

(1. 广西医科大学医学科学实验中心, 南宁 530021;

2. 广西医科大学第一附属医院产前诊断中心, 南宁 530021)

摘要:目的 建立 Taqman-MGB 探针法对 α 地中海贫血 Hb Westmead 突变进行检测, 了解在广西地区平均红细胞体积在 70~80 fL 患者的 Hb Westmead 突变基因携带情况。方法 对 200 例入选患者进行 Taqman-MGB 探针法检测 Hb Westmead 突变, 并用基因测序法进行验证。结果 共检测出 12 例 Hb Westmead 突变基因携带者, Taqman-MGB 探针法检测结果和基因测序法检测结果相符。结论 Taqman-MGB 探针法可快速、简便检测 Hb Westmead 突变, 特异性高, 结果可靠。广西地区的 Hb Westmead 突变有较高的发生率。

关键词: Taqman-MGB 探针; 地中海贫血; Hb Westmead 突变

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.32.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)32-3408-02

Detection on Hb Westmead mutation of thalassemia by Taqman-MGB probe*

Chen Wenqiang¹, Chen Ping¹, Pang Lihong², Li Shuquan¹, Lin Weixiong¹, Yang Dezhai¹

(1. Medical Science center of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China;

2. Department of Prenatal Diagnosis, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To establish a detection methods by Taqman-MGB probe, which can detect mutation of Hb Westmead, and understand the mutant gene carrying at Hb Westmead patients whose mean corpuscular volume in the 70—80 fL rang in the Guangxi region. **Methods** 200 cases of selected patients were detected by Taqman-MGB probe at Hb Westmead mutation, and verified by gene sequencing. **Results** A total of 12 cases of Hb at Westmead mutation carriers were found, the Taqman-MGB probe assay results is match with gene sequencing assay results. **Conclusion** The Taqman-MGB probe is a quick, specificity, easy and reliable detection method at Hb Westmead mutations. There have a higher incidence of Westmead mutation in Guangxi region.

Key words: Taqman-MG probe; thalassemia; Hb Westmead mutation

地中海贫血(以下简称地贫)是一种常染色体遗传慢性溶血性疾病, 该病多见于我国广东, 广西等地区。根据基因突变的不同, 主要分为 α 地贫和 β 地贫两大类。Hb Westmead 突变属于非缺失型地贫中的一种, 可产生轻度不稳定的血红蛋白变异体^[1]。单纯的 Hb Westmead 突变携带者没有贫血的临床表现, 但是与携带有轻型地贫患者婚育, 则有可能生下中间型 α 地贫患儿。为了准确、简单、快速地诊断该病, 本文应用 Taqman-MGB 探针技术, 建立了 Hb Westmead 突变荧光探针检测方法, 检测过程操作简单、快速, 检验结果准确、特异性高。

1 资料与方法

1.1 一般资料 全部病例来自在广西医科大学第一附属医院门诊就诊的患者, 选择平均红细胞体积在 70~80 fl 之间的患者共 200 例, 其中, 男 96 例, 女 104 例。

1.2 方法

1.2.1 血液学分析 用血细胞自动分析仪 (ACT5DF, 美国 Beckman) 进行检测, 收集平均红细胞体积 (MCV) 等数据。

1.2.2 DNA 提取 自动核酸提取仪 (Lab-Aid 820, 厦门百维信) 提取 DNA, 微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-8000, 美国 Thermo) 检测 DNA 浓度。

1.2.3 引物设计与合成 设计正向扩增引物: W1: GCG CAG GAG GAA CGG CTA 和反向扩增引物 W2: CGG CAC TGA CCC TCT TCT CT, 扩增目标片段; 合成两条 MGB 探针 M1: FAM-CAG GGA GGC GTG CA, M2: VIC-CAG GGA GGC CTG CA; 检测含 $\alpha 2$ 珠蛋白基因 CD122 (CAC \rightarrow CAG) 突变, 引物和探针由美国 ABI 公司合成。

1.2.4 实时定量 PCR 反应 PCR 扩增体系总体积为 25 μ L: 其中 Master mix 12.5 μ L, 20 \times Taqman genotype assay 1.25 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, 加双蒸水至 25 μ L。实时定量 PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min \rightarrow (95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s) 共 40 个循环; 在实时荧光定量 PCR 仪 (7500Fast, 美国 ABI) 进行扩增反应。反应结束后对扩增曲线进行分析, 判定结果。

1.2.5 DNA 测序 设计上游引物: L1: 5'-CCT GGG CCG CAC TGA CCC TCT T-3'。下游引物 L2: 5'-GTC TGA GAC AGG TAA ACA CCT CCA T-3, 扩增含目标基因第 122 位密码子的 $\alpha 2$ 珠蛋白基因片段, 扩增产物长度为 340 bp。反应体系包括: 10 \times Buffer 5 μ L, 2.5 mMol/L d NTPs 4 μ L, 15 pmol/L 引物 1 μ L, 1.0 U Taq 酶 (大连宝生物), 模板 2.0 μ L, 加双蒸水至 50 μ L。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C

* 基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (2011GXNSFA018251); 广西地方性高发疾病防治研究重点实验室开放课题基金 (KFJJ2010-38)。

30 s,退火、延伸 64 °C 90 s,共 30 个循环,72 °C 延伸 10 min。经纯化后使用 BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing 试剂盒在全自动测序仪 (PRISM3730,美国 ABI)上进行产物测序。

1.3 统计学处理 使用 SPSS17.0 软件,利用 Kappa 分析比较两种检测方法检测结果的一致性。

2 结果

2.1 血常规情况 200 例患者的 RBC 水平为 $(4.92 \pm 0.65) \times 10^{12}/L$,HB 水平为 $(122.66 \pm 17.89)g/L$,MCV 水平为 $(76.04 \pm 2.93)fL$,MCH 水平为 $(24.91 \pm 1.42)pg$ 。

2.2 Taqman-MGB 探针法检测 Hb Westmead 突变结果 在检测 200 例患者中,发现 Hb Westmead 突变 12 例,其中,男 5 例,女 7 例,其余 188 例患者检测结果为正常。在健康人标本检测结果可见三条反应曲线,而 Hb Westmead 突变基因携带者标本的扩增曲线可见四条曲线,健康人和携带者扩增曲线的位置,形态有区别明显。

2.3 基因测序法检测 Hb Westmead 突变结果 基因测序法检测结果见图 1,在 200 例患者中,其余 188 例患者检测结果为正常,结果见图 1A,检测出 Hb Westmead 突变 12 例,其中,男 5 例,女 7 例,结果见图 1B。

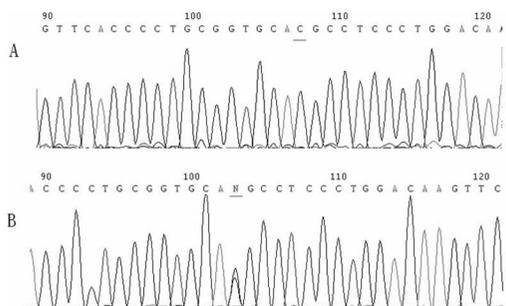


图 1 地贫 Hb Westmead 突变 DNA 测序结果
A:正常人,测序图 A 上可见 α 珠蛋白基因第 122 密码子为 CAC,没有发生突变;B:Hb Westmead 杂合子,测序图 A 上可见 α 珠蛋白基因第 122 密码子发生突变 (CAC \rightarrow CAG)。

图 1 地贫 Hb Westmead 突变 DNA 测序结果

2.4 统计学分析结果 经 Kappa 分析,Kappa=1, $P<0.01$,两种检测方法的检测结果一致,即对所研究对象同时用 Taqman-MGB 探针法和基因测序法检测 Hb Westmead 突变发生率,统计结果表明两种检测方法对 Hb Westmead 突变的检出率没有差别。

3 讨论

Hb Westmead 是一种非缺失型 α 地贫,是 $\alpha 2$ -珠蛋白基因 CD122(CAC \rightarrow CAG)突变所致的静止性血红蛋白变异体,具有轻度不稳定性。Hb Westmead 突变基因携带者,临床上没有贫血、黄疸等表现,血常规检测可以是正常或只有轻微改变,如血色素、MCV、MCH 等指标轻微降低,比较容易漏诊。Hb Westmead 突变基因携带者可在感染、发热或使用磺胺等氧化性药物的情况下出现溶血,导致轻微的贫血^[2]。本文中所发现的 12 例患者,均没有贫血表现,而是在例行婚前、孕期体检中发现 MCV 轻微降低,进一步做基因诊断而发现。

由于 Hb Westmead 是一种电泳静止型的血红蛋白变异体,因此各种酸性或碱性醋酸纤维膜电泳、垂直等电聚焦法均

不能使之分离;高效液相色谱法进行血红蛋白分析时也没有特异性波峰出现。针对该异常血红蛋白的特异性检测方法是 Fleming 等使用的 pH 6.4 柱层析电泳法,他用这个方法从血红蛋白中分离并发现了 Hb Westmead^[1],另外,对该血红蛋白的测定使用毛细管电泳法^[3],反相高效液相色谱法等方法^[4]。对 Hb Westmead 的 CD122(CAC \rightarrow CAG)突变的基因诊断则使用 PCR 联合 StuI 内切酶法^[5],温度梯度凝胶电泳法^[6]和反向斑点杂交等方法检测该突变点,但这些方法操作步骤多,检测周期长。本研究采用 Taqman-MGB 探针法直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化,以获得定性的结果,不需要 PCR 后处理或电泳检测,检测步骤简单,检测周期短,可在短时间内得出结果。本文 200 例标本用 Taqman-MGB 探针法检测,结果和基因测序的结果一致,说明该方法具有较高的可靠性。同时该方法所设计的 MGB 探针结合在 DNA 双螺旋内,使探针的结合稳定;其次 MGB 探针的较短,报告基团与淬灭分子在位置上很接近,这样使得实验的结果有较高的精确度;另外探针 3C 端结合了 MGB,探针的 T_m 值提高,使突变与非突变模板间的 T_m 值差异增加,提高了检测的特异性。综上所述,Taqman-MGB 探针法可以快速检测 Hb Westmead 突变,结果稳定可靠,特异性高。

Hb Westmead 在澳大利亚^[1]、巴西^[7]、老挝^[8]及国内香港地区^[9]均有报道,但病例报道数量不多。在广西也有相关报道^[10-11],在本文中,检测的 200 红细胞体积轻微异常患者共发现 12 例 Hb Westmead 突变,发生率为 6%,说明 Hb Westmead 突变在广西有着比较高的基因携带率。在这 12 例患者中,均无明显贫血症状,但当 Hb Westmead 复合东南亚 α 地贫时(HbH 病;-SEA/ α WS α)可出现脾脏增大,轻度贫血等临床症状^[12]。因此,在产前优生遗传咨询时,对于一方已诊断轻型或中间型 α 地贫,另一方没有贫血症状、但血常规有 MCV 轻微降低的夫妇,注意需要进一步做 Hb Westmead 突变的基因分析,以免漏诊,生下 HbH 病(-SEA/ α WS α)的患儿。

参考文献:

- [1] Fleming PJ, Hughes WG, Farmilo RK, et al. Hemoglobin Westmead alpha 2 122(H5) His replaced by Gln beta 2: a new hemoglobin variant with the substitution in the alpha 1 beta 1 contact area[J]. Hemoglobin, 1980, 4(1): 39-52.
- [2] Liang S, Tang Z, Su C, et al. Hb Duan [α 75(EF4) Asp \rightarrow Ala], Hb Westmead [α 122(H5) His \rightarrow Gln], and α -thalassaemia-2 (-4.2 kb deletion) in a Chinese family[J]. Hemoglobin, 1988, 12(1): 13-21.
- [3] Tang HS, Zhou JY, Xie XM, et al. Screening for common nondeletional α -thalassemias in Chinese newborns by determination of Hb Bart's using the Sebia Capillarys 2 electrophoresis system[J]. Hemoglobin, 2012, 36(2): 196-199.
- [4] Wan JH, Tian PL, Luo WH, et al. Rapid determination of human globin chains using reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 901: 53-58. (下转第 3411 页)

表 1 坏死性小肠结肠炎患儿不同临床分期 CBG 浓度比较($\bar{x}\pm s$)

临床分期	n	CBG 浓度(nmol/L)
I 期	18	98.2±10.7
II 期	23	156.7±11.2
III 期	21	329.3±21.6

3 讨 论

NEC 是新生儿最常见的疾病之一,病情复杂,研究发现低体温或硬肿、肺炎、窒息、败血症等都可能成为诱发因素^[4-6],因确切病因不清,近几十年来该病死亡率一直居高不下^[7-8]。CBG 是纤维素酶系的重要成员,在纤维素的糖化作用中,将纤维素二糖和纤维素寡糖水解成葡萄糖,主要存在于微生物和植物中^[9]。国外学者发现,CBG 在动物组织缺血损伤的早期迅速上升,且随着缺血时间的延长,浓度逐渐增加^[2]。陈冬梅等^[10]研究显示,NEC 患者血清 CBG 浓度比非 NEC 患者血清 CBG 浓度高,本研究得到同样结果,NEC 患儿血清 CBG 浓度比非 NEC 患儿平均约高 112.3 nmol/L,约为非 NEC 患儿的 3 倍($P<0.01$),提示 CBG 可能与 NEC 的发生有关,有临床诊断价值。

陈冬梅等^[10]还发现早期新生儿坏死性小肠结肠炎患儿 CBG 浓度高于对照组,而晚期患儿 CBG 浓度高于早期,本研究结果与此类似,I~III 期患儿血清 CBG 浓度分别为 98.2、156.7、329.3 nmol/L,三者两两比较差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)提示血清 CBG 浓度随着新生儿坏死性小肠结肠炎的损伤程度的加重而升高,可能作为评价预后血清学指标。

尽管如此,目前由于新生儿血清 CBG 正常值尚未完全明确,NEC 的病因和发病机制尚未完全明了^[11-12],血清 CBG 对于诊断 NEC 的价值还有待于进一步研究证实。

参考文献:

[1] 陈盛,何念海. 136 例新生儿坏死性小肠结肠炎临床分析

(上接第 3409 页)

[5] Lin T, Shih H, Liu S, et al. Hb Westmead in a Taiwanese subject; detected by PCR and StuI restriction enzyme methods[J]. Int J Lab Hematol, 30 Suppl:124.
 [6] Li R, Liao C, Li DZ, et al. High-resolution melting analysis of the three common nondeletional α -thalassemia mutations in the chinese population; Hbs constant spring, quong sze and westmead[J]. Hemoglobin, 2010, 34(6): 587-593.
 [7] Wenning MR, Kimura EM, Costa FF, et al. alpha-globin genes: thalassaemic and structural alterations in a Brazilian population[J]. Braz J Med Biol Res, 2000, 33(9): 1041-1045.
 [8] Gu YC, Gu LH, Wilson JB, et al. Hb Westmead [α 122(H5)His \rightarrow Gln], Hb E [β 26(B8)Glu \rightarrow Lys], and alpha-thalassemia-2 (3.7 kb deletion) in a Laotian family [J]. Hemoglobin, 1991, 15(4): 297-302.

[J]. 重庆医学, 2004, 33(4): 494-496.
 [2] Dimmitt RA, Glew R, Colby C, et al. Serum cytosolic beta-glucosidase activity in a rat model of necrotizing enterocolitis[J]. Pediatr Res, 2003, 54(2): 462-465.
 [3] 金汉珍, 黄德珉, 官希吉. 实用新生儿学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 508.
 [4] 范跃, 黄良富, 李伟. 新生儿坏死性小肠结肠炎 66 例临床危险因素分析[J]. 当代医学, 2012, 18(21): 69-70.
 [5] 李爱华. 新生儿坏死性小肠结肠炎的发病机制和治疗[J]. 山西医药杂志: 下半月版, 2011, 40(4): 336-337.
 [6] 曾丽春. 新生儿坏死性小肠结肠炎诊治进展[J]. 江西医药, 2011, 46(12): 1143-1145.
 [7] 王梅, 晏玲, 薛媛. 新生儿坏死性小肠结肠炎的护理体会[J]. 重庆医学, 2006, 5(21): 1944.
 [8] Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts[J]. Pediatr Dev Pathol, 2003, 6(1): 6-23.
 [9] 韩笑, 陈介南, 王义强, 等. β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 3(1): 8-12.
 [10] 陈冬梅, 雷国锋, 彭维林. β -葡萄糖苷酶在诊断新生儿坏死性结肠炎中的应用价值[J]. 中华儿科学杂志, 2011, 49(5): 367-370.
 [11] 冯杰雄. 美国新生儿坏死性小肠结肠炎研究现状[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 27(7): 386-387.
 [12] 易小莲, 张丙宏, 严彩霞, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎发病机制研究进展[J]. 中国新生儿科杂志, 2011, 26(2): 130-132.

(收稿日期: 2012-03-23 修回日期: 2012-08-05)

[9] Chan AY, So CC, Chan LC, et al. A laboratory strategy for genotyping haemoglobin H disease in the Chinese[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(8): 931-934.
 [10] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(8): 139-148.
 [11] Chen-Guang Zheng, Ming Liu, Juan Du, et al. Molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations detected in the population of guangxi zhuang autonomous region, People's Republic of China[J]. Hemoglobin, 2011, 35(1): 28-39.
 [12] 陈萍, 林伟雄, 李树全. 3 例 Hb Westmead 复合东南亚缺失型 α 地贫 1 的分析[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(10): 619-611.

(收稿日期: 2012-06-30 修回日期: 2012-08-22)