

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.11.019

贵阳地区新生儿 G6PD 缺乏症分子筛查结果分析*

黄盛文¹, 吴 娴¹, 许 吟², 周 曼², 刘兴梅¹

(贵州省人民医院:1. 检验科;2. 产科, 贵阳 550002)

[摘要] 目的 了解贵阳地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症的发生率及基因突变分布情况。方法 选取新生儿脐血 DNA 样本 515 例,采用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱系统检测 G6PD 基因 15 种突变类型和 1 种多态位点。结果 515 份样本检出 G6PD 基因突变 10 例,检出率为 1.94%。检出 5 种突变类型:1388G>A 4 例(40.0%),1024C>T 和 519C>T 各 2 例(20.0%),1376G>T 和 95A>G 各 1 例(10.0%)。多态位点 1311C>T 的等位基因频率为 12.79%。结论 贵阳地区是 G6PD 缺乏症的高发区,1388G>A 是该地区最常见的 G6PD 基因突变类型。

[关键词] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症;基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱;新生儿;分子筛查

[中图分类号] R446.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)11-1505-03

Molecular neonatal screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Guiyang region*

Huang Shengwen¹, Wu Xian¹, Xu Yin², Zhou Man², Liu Xingmei¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Obstetrics, Guizhou Provincial

People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and distribution of mutations in G6PD gene in Guiyang region. **Methods** A total of 515 DNA samples taken from newborn umbilical cord blood were collected, 15 mutations and one single nucleotide polymorphism in G6PD gene were detected by using of the Sequenom MassArray MALDI-TOF-MS system. **Results** Among the 515 samples, 10 were determined to have one of the G6PD gene mutations with a detection rate of 1.94%, 5 mutation types were detected as follow: 1388G>A accounted for 40.0% (4/10 cases), 1024C>T and 519C>T accounted for 20.0% (2/10 cases) respectively, 1376G>T and 95A>G accounted for 10.0% (1/10 cases) respectively. The single nucleotide polymorphism allele frequency of 1311C>T was 12.79%. **Conclusion** Guiyang is a region with higher prevalence of G6PD deficiency, 1388 G>A is the most common mutation of G6PD gene in this region.

[Key words] glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; desorption/ionization time of flight mass spectrometry; neonatus; molecular screening

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症是最常见的人类酶缺陷症之一,全世界范围内约有 4 亿人受累^[1]。我国长江以南地区是 G6PD 缺乏症的高发区,人群中基因携带率为 4%~20%^[2]。G6PD 缺乏症是引起新生儿黄疸的主要原因之一,约 50% 的患儿有新生儿黄疸,严重者可发展为核黄疸,引起脑组织病理性损害,导致脑瘫、智力低下等严重后遗症^[3]。因此,开展新生儿 G6PD 缺乏症筛查,可指导临床及早采取措施,预防新生儿高胆红素血症和核黄疸的发生。目前临床上主要是通过直接或间接检测 G6PD 活性的方法来进行 G6PD 缺乏症的筛查。由于女性杂合子的酶活性变异程度较大,这些方法容易造成女性杂合子的漏检。采用分子筛查的方法可提高杂合子的检出率。为了解贵阳地区 G6PD 缺乏症的发生率及基因突变分布情况,本研究采用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术,对 515 例新生儿的 G6PD 基因突变进行分子筛查。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究样本来自于贵州省人民医院分子生物室

样本库,共 515 份新生儿脐血 DNA 样本,其中男 264 例,女 251 例。

1.2 方法

1.2.1 突变位点及引物设计 选取我国人群中已发现的 3 种常见突变位点(1388G>A、1376G>T、95A>G),12 种少见突变位点(1387C>T、1381G>A、1360C>T、1024C>T、1004C>A、871G>A、835A>G、592C>T、519C>T、517C>T、487G>A、392G>T)及 1 种常见多态位点(1311C>T),采用 As-sayDesigner3.1 软件进行 PCR 引物和延伸引物设计,引物序列见表 1。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 PCR 及引物延伸反应 将样本标准化至 10~20 ng/μL,按照 384 孔板配置试剂。每孔 5 μL PCR 反应体系含:10×PCR 缓冲液 0.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 0.4 μL,25 mmol/L dNTP Mix 0.1 μL,0.5 μmol/L Primer Mix 1 μL,5 U/μL HotStar Taq 0.2 μL,标化 DNA 模板 1 μL。循环参数:94 °C 预变性 15 min,94 °C 20 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 45 个循环;最后 72 °C 延伸 3 min。PCR 产物中加入 2 μL 虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase enzyme, SAP)消化液进

* 基金项目:贵州省国际科技合作项目(黔科合外 G 字[2011]7039)。 作者简介:黄盛文(1971—),主任医师,主要从事遗传病基因诊断研究。

行去磷酸化反应以去除未用完的 dNTP。将配置好的 iPLEX 引物延伸反应混合液 2 μ L 加入已完成 SAP 反应的 PCR 产物中进行延伸反应。PCR 反应和引物延伸反应均在 ABI veriti 384 孔 PCR 仪上进行。

1.2.3 MALDI-TOF-MS 检测 将完成全部反应过程的产物用树脂进行脱盐洗涤,再将检测样品从 384 孔板中转移到表面覆盖基质的 MassARRAY 芯片中,放入 Sequenom 质谱仪中进行检测。根据质谱图中的峰值确定每份样本的基因型,导出基因分型数据。

表 1 G6PD 基因突变位点 MALDI-TOF-MS 检测
扩增引物和延伸引物

| 突变位点 | 引物序列(5'→3') |
|---------|--|
| 1388G>A | F:ACGTTGGATGCAAAGGTGCCCTTGAGGTTG R:ACGTTGGATGGAAGGCTCATGGCAAGAAAG E:AGCCAGGCCATCACT |
| 1387C>T | F:ACGTTGGATGTCAATCTGGTGCAGCAGTGG R:ACGTTGGATGTCCCAAGCCATACTATGTCC E:GGGACTCCGTGAGGCCTGG |
| 1381G>A | F:ACGTTGGATGTCCCAAGCCATACTATGTCC R:ACGTTGGATGTCAATCTGGTGCAGCAGTGG E:GGTGTGGTGAATAACGCCAGG |
| 1376G>T | F:ACGTTGGATGTCCCAAGCCATACTATGTCC R:ACGTTGGATGTCAATCTGGTGCAGCAGTGG E:ATACGCCAGGCCTCA |
| 1360C>T | F:ACGTTGGATGTCACTCTGGACGTCTTCTGC R:ACGTTGGATGATAGCCACAGGTATGCAGG E:CTTCCGCTGGGCCTCACCTGC |
| 1024C>T | F:ACGTTGGATGCAAAGGGTACCTGGACGAC R:ACGTTGGATGTACCATCCCACCTCTCATTC E:CCCTCTCATTCTCCACATAGA |
| 1004C>A | F:ACGTTGGATGACCAAAGGGTACCTGGACGAC R:ACGTTGGATGTTCTCCACATAGAGGACGAC E:GACGGCTGCAAAAAGTG |
| 871G>A | F:ACGTTGGATGCATCTCTCCCTTGCTTTTC R:ACGTTGGATGATTGTTGGCCTGCACCTCTG E:GGAACCTCTGAGATGCATTTCAACA |
| 835A>G | F:ACGTTGGATGAGAACCACCTACTGCAGATG R:ACGTTGGATGTTCTCATCACGGACGTCATC E:GGCTGACGTCATCTGAGTTGG |
| 592C>T | F:ACGTTGGATGTGAGGTTCTGCACCATCTCC R:ACGTTGGATGACCACATCTCCTCCCTGTTT E:TCCGTGAGGACCAGATCTAC |
| 519C>T | F:ACGTTGGATGACAGGGAGGAGATGTGGTTG R:ACGTTGGATGAACCGCATCATCGTGGAGAA E:ATCGTGGAGAAGCCCTT |
| 517C>T | F:ACGTTGGATGAGAGGCTGGAACCGCATCAT |

续表 1 G6PD 基因突变位点 MALDI-TOF-MS 检测
扩增引物和延伸引物

| 突变位点 | 引物序列(5'→3') |
|---------|---|
| | R:ACGTTGGATGAGGAGATGTGGTTGGACAGC E:GGCAGGTCCTCCCGA |
| 487G>A | F:ACGTTGGATGTGCAGCTCTGATCCTCACTC R:ACGTTGGATGAGGGCTTCTCCACGATGATG E:CCTGATGCGGTTCCAGC |
| 392G>T | F:ACGTTGGATGACAGCCACATGAATGCCCTC R:ACGTTGGATGTGAATGTTCTTGGTGACGGC E:AGGCGGTTGGCCTGTGAC |
| 95A>G | F:ACGTTGGATGGGCACTTCTGGCTTTTAAG R:ACGTTGGATGGATGCCTTCCATCAGTCGG E:GGTGCCATCAGTCGGATACAC |
| 1311C>T | F:ACGTTGGATGCAGAAGACGTCCAGGATGAG R:ACGTTGGATGCATCAGCAAGACACTCTCTC E:GGAGGGAAGCTCCCTGACGCCTA |

F:上游引物;R:下游引物;E:延伸引物。

2 结 果

2.1 基因分型结果 将导出的基因分型数据进行聚合分析,得到 15 个突变位点和 1 个多态位点的基因型散点图,并判别出每个位点的基因型分布情况。16 个位点的判读成功率均在 98.5% 以上,总判读成功率为 99.4%(8 190/8 240)。

2.2 分子筛查结果 515 份样本中检出 G6PD 基因突变 10 例(1.94%),其中男性 4 例(1.52%),女性 6 例(2.39%),均为突变杂合子。共检出 5 种突变类型:1388G>A 4 例(40.0%),1024C>T 和 519C>T 各 2 例(20.0%),1376G>T 和 95A>G 各 1 例(10.0%)。多态位点 1311C>T 在男性中检出半合子 35 例(13.26%);女性中基因型 CC、CT 和 TT 例数分别为 193 例(76.89%)、53 例(21.12%)和 5 例(1.99%)。该组样本中 1311C>T 的等位基因频率为 12.79%。见表 2。

表 2 G6PD 基因突变类型分布情况

| 突变位点 | n | 男性半合子 | 女性杂合子 | 女性纯合子 | 比例(%) |
|---------|----|-------|-------|-------|-------|
| 1388G>A | 4 | 0 | 4 | 0 | 40.0 |
| 1376G>T | 1 | 1 | 0 | 0 | 10.0 |
| 1024C>T | 2 | 1 | 1 | 0 | 20.0 |
| 519C>T | 2 | 2 | 0 | 0 | 20.0 |
| 95A>G | 1 | 0 | 1 | 0 | 10.0 |
| 合计 | 10 | 4 | 6 | 0 | 100.0 |

3 讨 论

G6PD 缺乏症患者临床表现变化较大。多数患者,尤其是女性杂合子平时可无临床症状。部分患者可表现为药物、食物或感染诱发的急性溶血,慢性非球形细胞溶血性贫血,新生儿黄疸等严重的临床症状。开展新生儿 G6PD 缺乏症筛查,不仅可以及早采取措施,防止核黄疸的发生,同时,可使携带有致病基因的患儿及家长在患儿的成长过程中做好预防工作,减少各种感染机会,避免服用或食用可诱发急性溶血的药物及

食物^[4]。

临床上 G6PD 缺乏症的筛查方法分为 G6PD 活性定性和定量检测两类。定性方法有高铁血红蛋白还原试验、硝基四氮唑蓝(NBT)纸片法、荧光斑点试验;定量方法有 NBT 定量法、G6PD/6PGD 比值法等。目前对新生儿 G6PD 缺乏症筛查的流程通常是先进行 G6PD 活性定性检测,阳性者再进行定量检测,可提高筛查的敏感性和准确性。由于 G6PD 缺乏症是一种 X-连锁不完全显性遗传,女性杂合子的 G6PD 活性差异较大。因此,采用 G6PD 活性检测的方法容易造成表型轻微的女性杂合子漏诊,而她们会将致病基因继续传给后代。近年来,随着分子诊断方法的迅速发展和普及,多种新技术用于 G6PD 的分子筛查,如反向点杂交^[5]、变性高效液相色谱^[6]、荧光探针 PCR 溶解曲线法^[7]、基因芯片^[8]和飞行时间质谱^[9]等,提高了女性杂合子的检出率。

MALDI-TOF-MS 是一种生物分子定性和定量分析的标准检测方法^[10],结合引物延伸反应,已发展成为一种常用的单核苷酸多态性(SNP)和点突变检测技术,广泛用于分子诊断和多态与疾病易感性的关联研究^[11]。本研究采用 MALDI-TOF-MS 结合引物延伸技术,对新生儿进行 G6PD 基因突变筛查,包括 15 种突变位点和 1 种多态位点,涵盖了我国人群中绝大部分的 G6PD 基因突变类型。由于我国人群中已发现的 G6PD 基因突变类型有 30 多种,本研究的方法不能检测出其他少见和未知的突变类型。因此,在实际应用中,仍需要与 G6PD 活性检测的方法相结合,对 G6PD 活性检测阳性而分子筛查阴性的样本,需要进一步做序列分析以明确。

本研究中 G6PD 的检出率为 1.94%,高于文献报道的 1.21%^[12],这是因为作者采用的是分子筛查方法,而文献报道采用的是 G6PD 活性检测,说明分子筛查的敏感性更高,降低了女性杂合子的漏检率。国内最常见的 3 种 G6PD 基因突变类型,即 1388G>A、1376G>T 和 95A>G^[13]在本组样本中均有检出,但所占比例与其他地区有所不同。1388G>A 所占比例最高,达 40.0%,其次是 1024C>T 和 519C>T,各占 20.0%,而 1376G>T 和 95A>G 最低,分别占 10.0%,说明不同地区不同人群的 G6PD 基因突变谱不同。1311C>T 是不引起氨基酸改变的多态位点,在世界各地人群中分布广泛。本组样本中 1311C>T 的等位基因频率为 12.79%,显著高于广西地区的 7.8%^[14],同样也与不同地区和人群有关。这一位点的分型主要用于 G6PD 基因单倍型研究以确定不同突变发生的时间,对 G6PD 缺乏症的致病性尚存在一定的争议。

参考文献

- [1] Beutler E. G6PD: population genetics and clinical manifestations[J]. *Blood Rev*, 1996, 10(1): 45-52.
- [2] 蔡稔. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的分子流行病学及诊

断[J]. *广西医学*, 2007, 29(9): 1373-1375.

- [3] 李旺,范歆,林彩娟,等. 某地区新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶筛查结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(18): 2401-2402.
- [4] 韦永琼,郭健玉. 成都市新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(24): 3366-3367.
- [5] Li L, Zhou YQ, Xiao QZ, et al. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of six common Chinese G6PD mutations and one polymorphism[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, 41(1): 17-21.
- [6] Wu G, Liang WH, Zhu J, et al. Rapid, simultaneous genotyping of 10 Southeast Asian glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency-causing mutations and a silent polymorphism by multiplex primer extension/denaturing HPLC assay[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(7): 1288-1291.
- [7] 严提珍,钟青燕,唐宁,等. 多色探针荧光 PCR 溶解曲线法在 G6PD 基因突变检测中的临床应用评价[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(2): 156-162.
- [8] Bang CY, Hong QL, Zhen SL. Rapid detection of common Chinese glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations by microarray-based assay[J]. *Am J Hematol*, 2004, 76(4): 405-412.
- [9] Zhao F, Ou XL, Xu CC, et al. Rapid detection of six common Chinese G6PD mutations by MALDI-TOF MS[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 32(2): 315-318.
- [10] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 198-207.
- [11] Tost J, Gut IG. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications[J]. *Clin Bioc*, 2005, 38(4): 335-350.
- [12] 厉勇,杨明,菲肖琨. 贵阳地区新生儿 G6PD 酶筛查结果分析[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(7): 1171-1172.
- [13] Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association[J]. *Blood Rev*, 2007, 21(5): 267-283.
- [14] Yan T, Cai R, Mo O, et al. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China: description of four novel mutations[J]. *Haematologica*, 2006, 91(10): 1321-1328.

(收稿日期:2015-10-21 修回日期:2015-12-26)

(上接第 1504 页)

- [J]. *Acta Diabetol*, 2012, 49(Suppl 1): S81-85.
- [11] Chen T, Ding G, Jin Z, et al. Insulin ameliorates miR-1-induced injury in H9c2 cells under oxidative stress via Akt activation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 369(1/2): 167-174.

- [12] Palma H, Wolkmer P, Gallio M, et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 386(1/2): 199-210.

(收稿日期:2015-10-20 修回日期:2015-12-16)