

- 学出版社,2000:739-741.
- 6 夏 荣,李从贵,丁佩玉,等. 中心静脉置管相关性感染的分析与预防[J]. 中国现代医学杂志,2001,11(1): 43-44.
- 7 徐雅萍,周 光,钟延法,等. 导管相关性血行感染的病原菌分析[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(9):1015-1017.
- 8 Jarris W, Edwards J, Culver D, et al. No so comial infection rates in a-
- dult and pediatric inter sivecare units in the unite[J]. Am J Med, 1991,9(1):185.
- 9 吴泽芳,赵秀铤. 中心静脉留置导管感染的预防和控制[J] 中华医院感染杂志,1997,7(2): 68.
- [收稿日期 2010-03-18][本文编辑 宋卓孙 刘京虹]

临床研究

Gap-PCR 与反向斑点杂交技术检测 α -地中海贫血

覃桂芳, 周 莹, 刘 鑫, 赵 林, 赵红英

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院检验科

作者简介: 覃桂芳(1956-),女,大学学历,主任技师,研究方向:免疫学实验室诊断、感染性疾病分子生物学。E-mail: qinguifang0512@yahoo.com.cn

[摘要] **目的** 探讨 Gap-PCR 与反向斑点杂交技术在 α -地中海贫血中的应用价值。**方法** 采用 PCR (即 Gap-PCR) 技术检测缺失型 α -地中海贫血;用反向斑点杂交技术检测非缺失型 α -地中海贫血。**结果** 在 3 896 份标本中共检出 237 例 α 地贫,阳性检出率为 6.08%;通过 Gap-PCR 技术检测出 56 例 α 缺失型地贫,基因型分别为东南亚缺失型($--^{SEA}$)、右侧缺失型($-\alpha^{3.7}$)和左侧缺失型($-\alpha^{4.2}$);4 例 HbH 型;通过反向斑点杂交技术检测出 8 例非缺失型 α 地贫,基因型分别为 $\alpha\alpha/\alpha^{QS}$ 和 $\alpha\alpha/\alpha^{WS}$ 。**结论** α -地中海贫血是我国南方影响最大的常见遗传病之一,应加强对地中海贫血的血液学筛查和基因诊断,提高诊断符合率。

[关键词] Gap-PCR; 反向斑点杂交技术; α -地中海贫血

[中图分类号] R 556.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)07-0638-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.07.14

Application of Gap-PCR and reverse dot blot hybridization technique in the detection of α -thalassemia QIN Gui-fang, ZHOU Ying, LIU Xin, et al. Department of Clinical Laboratories, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomons Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To understand the appilcation of Gap-PCR and reverse dot-blot hybridization technique in the detection of α -thalassemia. **Methods** The gap PCR (or Gap-PCR) detection was used for deletional α -thalassemia, reverse dot-blot hybridization for non-deletional α -thalassemia. **Results** Of 3896 specimens, 237 cases of α -thalassemia were detected and the detection rate was 6.08 percent. By Gap-PCR technique, 56 cases of deletional α -thalassemia were detected and genotypes were: missing in Southeast Asia type ($--^{SEA}$), the right side of deletional ($-\alpha^{3.7}$) and the left side of deletional ($-\alpha^{4.2}$); 4 cases of HbH were found. Through reverse dot blot hybridization, 8 cases of non-deletional α -thalassemia were detected and genotypes were: $\alpha\alpha/\alpha^{QS}$ and $\alpha\alpha/\alpha^{WS}$. **Conclusion** α -thalassemia is a common genetic disease with greatest influence in southern China, and the hematology screening and genetic diagnosis of thalassemia should be strengthened to improve the diagnosis rate.

[Key words] Gap-PCR; Reverse dot blot hybridization; α -thalassemia

α -地中海贫血是由于 α -珠蛋白基因缺失导致其合成速率改变而致,在遗传学上具有高度的异质性,我国南方有较高的发病率^[1]。 α -地中海贫血是最常见的常染色体隐性遗传病之一,是由于第 16 号染色体短臂末端 α -珠蛋白基因缺陷所致,常见 3 种

α 地贫基因($-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 、 $--^{SEA}$)和 5 种 α 地贫基因突变(Hb Constant Spring、Hb Quong Sze、Hb Westmead、 $\alpha\alpha^{CD30}$ 、 $\alpha\alpha^{CD59}$)。为了解地贫高发地区人群地贫发生率及基因类型,我们对在我院就诊的 3 896 份患者的血液标本进行血液学和常见基因的检测分

析,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 3 896 例均为 2006-01 ~ 2008-01 在我院就诊的患者,其中男性 1 885 例,女性 2 011 例;年龄在 6 个月 ~ 35 岁之间。

1.2 仪器与试剂 Sebia 全自动电泳分析系统、全自动光密度扫描仪、相应配套的琼脂糖凝胶电泳试剂、BIO-RAD VARIANT II 全自动高压快速电泳分析仪和相应配套的试剂由 Sebia 公司提供。PCR 扩增仪为美国 Opticon Monitoer 2TM 荧光定量分析系统,全自动血细胞分析仪为 ADVIA120。DNA 抽提试剂、 α 地贫 Gap-PCR 基因诊断试剂盒、反向斑点杂交(reverse dot blot, RDB) 基因诊断试剂盒(PCR-RDB)由深圳益生堂生物技术有限公司提供;电泳所需 1.5% 琼脂糖凝胶等为自配。

1.3 方法

1.3.1 血红蛋白(Hb)液的制备 抽取全部受检者 EDTA 抗凝血 2 ml,按《全国临床检验操作规程》中介绍的常规法制备,并将 Hb 含量调整至 10 g/L 左右。

1.3.2 全自动 Hb 电泳 按仪器操作说明进行。对出现异常快速带者,加做 pH 6.5 磷酸缓冲液电泳以确定其为 HbBart's、HbH。将确定为 Hb Bart's、HbH 的标本冰冻保存,作为下次同样情况下的对照品。对于 7 个月以内的儿童凡电泳出现 Hb Bart's 带或 H 带即可初步诊断为 α 地贫;对于大于 8 个月的儿童,结合红细胞形态(MCV < 80 fl, MCH < 27 pg、Heniz 小体阳性及临床表现(排除缺铁性贫血)者为 α 地中海贫血可疑者;对于电泳未发现异常而血细胞分析发现 MCV < 80 fl, MCH < 27 pg 的人群也要进行基因检测。

1.3.3 地贫可疑者的基因诊断 用 DNA 试剂提取液 200 μ l 加入全血(EDTA 抗凝)65 μ l 提取 DNA,取 DNA 模版进行 Gap-PCR 与反向斑点杂交技术基因检测。

1.3.4 α 地贫可疑者的 3 种常见缺失基因诊断 用以缺口 PCR(即 gap-PCR)为原理的单管多重 PCR(multiplex PCR, M-PCR)扩增待检 DNA,单管 PCR 反应混合液为 23 μ l(已含有 7 种引物、反应用酶 1.0 μ l),加入待测样本 DNA 2.0 μ l 总反应体系为 25 μ l。盖严管盖,短暂离心;按下条件循环:95 $^{\circ}$ C 变性 15 min,然后 98 $^{\circ}$ C 45 s;64 $^{\circ}$ C 75 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,共 35 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 10 μ l 扩增产物加入 1 μ l 溴酚蓝上样缓冲液,以溴化乙

锭(EB)为染色剂,在水平电泳仪上,恒压 5 V/cm 电泳 40 min,在紫外凝胶透射仪上观察。每次反应均设正常对照和 Marker。

1.3.5 非缺失型 α 地贫反向斑点杂交 取出 PCR 扩增管,标号,分别加入 30 μ l PCR 反应混合物至各管(扩增管内含多种 DNA 多聚酶),吸取 3 μ l 处理样本液至 PCR 反应管,混匀,5 000 rpm 离心数秒;盖严管盖,按下条件循环:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 60 s;55 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取出当天检测;然后放入同样标有患者编号的膜条进行杂交、洗膜、显色和结果判断。

1.4 统计学方法 计数资料采用组间比较 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在 3 896 份标本中检出 237 例 α 地贫,阳性检出率为 6.08%,其中通过血细胞分析和血红蛋白电泳诊断血红蛋白 H 病 43 例,检出率为 1.1%;HbBart's α 地贫 65 例,占 α 地贫 27.4%,其它 α 地贫(如 HbJ、HbK 等在电泳中发现的快速异常区带)61 例,占 α 地贫 25.7%。通过基因分析发现 68 例 α 地贫,通过 Gap-PCR 检测出 56 例 α 地贫;本反应体系可扩增出长度约为 1.8、2.0、1.6 kb 和 1.3 kb 的 4 个条带,分别代表人类 α 珠蛋白基因(即正常人)、3.7 缺失型、4.2 缺失型、SEA 缺失型的扩增产物。阴性对照管无扩增产物,阳性对照管出现长度约为 1.3 kb 和 1.8 kb 的 2 个条带,分别为 SEA 缺失型和正常 α 珠蛋白基因扩增的产物。有 4 例在电泳中无 H 带(表型判断为标准型)基因证实为 HbH 病(基因型全部都是 $--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$);通过反向斑点杂交技术检测出 8 例非缺失型 α 地贫,基因型分别为 $\alpha\alpha/\alpha^{QS}$ 和 $\alpha\alpha/\alpha^{WS}$ (见表 1)。 α 地贫男女两性阳性检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.68$, $P > 0.05$)。见表 2。

表 1 检出 α 地贫基因型及其构成比

基因型	例数	构成比(%)	表型
$--^{SEA}/\alpha\alpha$	47	69.11	标准型
$--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$	9	13.23	HbH
$--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$	4	5.89	标准型
$\alpha\alpha/-\alpha^{QS}$	4	5.89	静止型
$\alpha\alpha/-\alpha^{WS}$	4	5.89	静止型
合计	68	100.00	

表2 α 地贫性别阳性检出率比较

性 别	检测人数	阳性	阴性	阳性检出率(%)
男性	1885	108	1777	5.73
女性	2011	129	1882	6.41
合计	3896	237	3659	6.08

注:性别阳性检出率比较, $\chi^2 = 0.80, P > 0.05$

3 讨论

3.1 地中海贫血是由于珠蛋白基因缺失或突变,导致珠蛋白肽链合成障碍,使 α 链 β 链合成失去平衡而导致的溶血性贫血^[2]。可根据缺乏的珠蛋白链的种类及缺乏程度分为 α 珠蛋白生成障碍性贫血和 β 珠蛋白生成障碍性贫血,也称 α 地中海贫血和 β 地中海贫血。 α 珠蛋白生成障碍性贫血可分为重型 α 珠蛋白生成障碍性贫血(血红蛋白 Bart's 胎儿水肿综合征)、血红蛋白 H 病、 α 轻型珠蛋白生成障碍性贫血和静止型 α 珠蛋白生成障碍性贫血^[3]。 α 地贫是由 α 链合成减少造成非 α 链的相对过剩而形成四聚体,如 HbBart's(γ_4)和 HbH(β_4),这些异常 Hb 分子量和带电情况有别于正常 Hb,可以利用电泳原理加以分离^[4],因此,电泳分析是分离和诊断异常血红蛋白的有效方法。但对于静止型 α 珠蛋白生成障碍性贫血基因携带者和极少部分 HbH 病电泳时往往不发现异常区带,这可能是 HbH 为不稳定蛋白,易于降解而含量较少所致,亦有可能是 Hb 溶液浓度过稀、染色时间不够使 Hb 区带不清晰、缓冲液发生变化所致。本实验就发现 4 例血红蛋白电泳时未发现 HbH 区带,但基因诊断为 HbH 病。基因诊断技术是检测地中海贫血最敏感方法。

3.2 引起 α 地贫的分子基础主要是 α 珠蛋白基因

簇 3 种大的缺失,即 2.0 kb($-\alpha^{3.7}$)和 1.6 kb($-\alpha^{4.2}$)两种单基因缺失(α^+ 地贫)和 1.3 kb 的东南亚型缺失($--^{SEA}$),我们对表型诊断为 α -地贫的 68 例进行了上述常见的三种缺失型基因诊断,其中东南亚缺失型占绝对主导地位,占 69.9%,说明缺失型 α -地贫以东南亚缺失型为主,与广东省各地及香港报道的结果一致。非缺失型 α 地贫发生率不高,主要基因型有: $\alpha\alpha/\alpha^{CS}$ 、 $\alpha\alpha/\alpha^{QS}$ 及 $\alpha\alpha/\alpha^{WS}$ 。本次检测未发现 $\alpha\alpha/\alpha^{CS}$,这可能与时间、标本选择范围等因素有关。另外,本次调查发现 α 地贫男女两性阳性检出率差异无统计学意义,说明地贫发病与性别无关,也印证了地贫为常染色体不完全显性遗传病的遗传本质。

总之,我国南方是地中海贫血的高发地区,由于该病目前尚无根本有效的治疗方法,携带者的检查及产前基因检测、血细胞分析、血红蛋白电泳等是唯一方法,是开展人口筛查和产前诊断,降低患儿的出生,减少本病发生,进一步提高人口素质的有效措施。

参考文献

- 1 Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, et al. A review of the molecular genetics of the human alpha globin gene cluster [J]. Blood, 1989, 73(5):1081-1104.
- 2 黄钰君,伍绍国,区小冰,等.儿童地中海贫血的发生率及发病基因分析[J].中国优生与遗传杂志,2007,15(6):28-31.
- 3 农建宏,钟润,梁莉,等.全自动琼脂糖电泳系统在孕妇 Hb 病检查中的应用[J].现代科学仪器,2008,122(6):54-58.
- 4 周艳洁,阮丽明,何桂琼,等.全自动琼脂糖凝胶电泳检测地中海贫血 7500 例结果分析[J].中国计划生育学杂志,2007,140(6):355-357.

[收稿日期 2010-01-20][本文编辑 韦挥德 韦颖(见习)]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件,务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目,作者(汉拼),英文单位名称,英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、性别、出生年月、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送)A4 纸打印稿一份,并发电子邮件到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。

· 本刊编辑部 ·