

## 血友病 A 的基因诊断研究

李茹 韩瑾 李东至 廖灿\*

(广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510623)

**【摘要】 目的** 建立1套简易、快速且诊断率高的血友病 A(hemophilia A, HA)的直接基因诊断方法。**方法** 对7例 HA 患者及家系成员采用倒位 PCR(inversion-PCR, I-PCR)和序列特异性 PCR 分别进行凝血因子Ⅷ(F8)基因内含子 22 和内含子 1 倒位突变检测,对倒位突变阴性者采用高分辨熔解曲线分析法(high-resolution melting, HRM)针对 F8 基因所有外显子及外显子-内含子交界区进行突变筛查,筛查阳性片段进一步作测序分析以确定致病突变。对其中 1 例倒位突变携带者进行了产前诊断。**结果** 检出第 22 内含子倒位者 4 例,其中 1 例患者的母亲为倒位携带者,对此倒位突变携带者于孕 27 周抽取脐带血进行产前诊断,胎儿性别为男性,经检测确定其为倒位突变者;检出 c. 986G>A(p. Cys329Tyr)点突变者 1 例,此患者姐姐为此突变携带者;未检出第 1 内含子倒位突变。本研究中所有患者及家系成员均得到确切诊断,基因诊断率为 100%。**结论** I-PCR 技术可快速检测 F8 基因第 22 内含子倒位突变,可用于患者及携带者的基因诊断,并用于产前诊断。HRM 是 1 种快速、低成本的突变扫描技术,适用于 F8 基因的突变筛查。采用联合基因诊断方法,即联合应用 I-PCR、序列特异性 PCR、HRM、DNA 测序技术进行直接基因诊断,可提高血友病 A 的诊断率及准确率。

**【关键词】** 血友病 A; 倒位 PCR; 高分辨熔解曲线分析; 基因诊断

### A Study on Genetic Diagnosis of Hemophilia A

Li Ru, Han Jin, Li Dong-zhi, Liao Can\*.

(Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a simple, rapid and accurate method for direct genetic diagnosis on hemophilia A (HA). **Methods** Seven HA patients and their families were tested for the F8 gene mutations. Inversion-PCR (I-PCR) and sequence-specific PCR were used to detect intron 22 and 1 inversions respectively. Mutation scanning of the F8 gene was performed by high resolution melting (HRM) analysis in HA patient negative for inversion mutations. Fragments showing abnormal melting curves were further confirmed by direct sequencing. Cord blood was collected from a pregnant woman carrying intron 22 inversion mutation at 27 weeks' gestation, then prenatal diagnosis was performed. **Results** Intron 22 inversion was detected in 4 HA patients, and one of the patients' mother was diagnosed as a carrier. Prenatal diagnosis for this mother showed that the fetus was a male with intron 22 inversion. A point mutation c. 986G>A (p. Cys329Tyr) was identified in one patient negative for inversion mutations, and his sisters was diagnosed as a carrier. No intron 1 inversion was found. The overall mutation detection rate of hemophilia A was 100% in this study, all the subjects obtained direct genetic diagnosis. **Conclusion** I-PCR is a simple and rapid method to detect intron 22 inversion, and could be used for genetic and prenatal diagnosis. HRM is a time-saving and cost-effective approach for mutation screening of the F8 gene. By combining I-PCR,

\* 通讯作者:廖灿, E-mail: canliao@126.com

基金项目:广州市医药卫生科技项目(2009-YB-070);广州市妇女儿童医疗中心博士启动基金(200913);广东省医学科学技术研究基金(B2010276)

sequence-specific PCR, HRM analysis and DNA sequencing, we can improve the mutation identification in the *F8* gene and the diagnosis rate of hemophilia A.

**【Key words】** hemophilia A; I-PCR; HRM analysis; Genetic diagnosis

血友病 A (hemophilia A, HA) 又称甲型血友病, 是最常见的 1 种遗传性出血性疾病, 在男性中的发病率为 1/5 000~1/10 000<sup>[1]</sup>, 约占先天性出血性疾病的 85%。HA 是由凝血因子 VIII (*F8*) 基因缺陷引起, 导致凝血因子 VIII 含量不足或功能缺陷而造成凝血障碍, 呈 X 连锁隐性遗传方式。根据患者血浆凝血因子 VIII 促凝活性及症状严重程度可分为轻、中、重 3 型, 分别占 HA 患者的 40%、10% 和 50%<sup>[2]</sup>。目前, HA 尚无有效根治疗法, 开展 HA 携带者检测和产前诊断, 阻断致病基因传递, 防止新的 HA 患儿出生, 是降低 HA 发病率的有效办法。

为提高 HA 携带者和患者的检出率, 本研究联合应用倒位 PCR (inversion-PCR, I-PCR)、序列特异性 PCR、高分辨熔解曲线分析法 (high-resolution melting, HRM)、DNA 测序等方法进行 *F8* 基因缺陷检测, 对所有研究对象进行了直接基因诊断, 现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 7 例 HA 患者及相关家系成员 (包括患者 5 例, 其中 1 例患者的母亲和 1 例患者的姐姐) 和 1 例产前诊断样本均由广州市妇女儿童医疗中心遗传咨询门诊和血液科提供。

1.2 DNA 提取 患者及家系成员取静脉血 4 ml, 1 例产前诊断病例在孕 27 周时经腹穿刺抽取脐带血 2 ml, 均用 EDTA 抗凝。DNA 提取采用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, TIANGEN)。

### 1.3 检测方法

1.3.1 I-PCR 检测内含子 22 倒位 引物设计和反应条件参照文献<sup>[3,4]</sup>, 根据扩增产物的片段长度进行判断。正常人的 I-PCR 产物片段为 487 bp, 内含子 22 倒位者产物片段为 559 bp, 倒位携带者产物片段为 487 bp 和 559 bp 2 条带。

1.3.2 PCR 检测内含子 1 倒位 对内含子 22 倒位阴性者, 进一步检测内含子 1 倒位。按文献<sup>[5]</sup>方法操作, 分别扩增 *F8* 基因内含子 1 中的 Int1h-1 片段及 *F8* 基因外的 Int1h-2 片段, 产物经琼脂糖凝胶电泳后观察电泳条带。对 int1h-1 片段, 若 PCR 产物片段长为 1908 bp 为正常, 1323bp 为倒位, 携带者有此 2 条带; 对 int1h-2 片段, 若产物片段长为 1191 bp 为正常, 1776 bp 为倒位, 携带者有此 2 条带。

1.3.3 HRM 和 DNA 测序检测点突变 对内含子 22 和 1 倒位阴性者, 首先将男性患者的 DNA 与正常男性的 DNA 以 1:1 比例混合, 引物设计和反应条件参照文献<sup>[6,7]</sup>, PCR 扩增 *F8* 基因所有外显子及外显子-内含子交界区, 然后应用高分辨熔解曲线分析仪 LightScanner 进行突变扫描, 对筛查阳性片段进一步作测序分析确定致病突变。

## 2 结果

2.1 *F8* 基因内含子 22 倒位 4 例 HA 患者扩增得到 559 bp 的片段, 为第 22 内含子倒位者, 这其中 1 位患者的母亲扩增得到 487 bp 和 559 bp 2 个片段, 为倒位携带者。结果见图 1。此倒位携带者母亲于孕 27 周抽取脐带血进行产前诊断, 胎儿性别为男性, I-PCR 扩增产物片段为 559 bp, 诊断为 HA 患者。余 1 例 HA 患者及其姐姐未检出内含子 22 倒位。

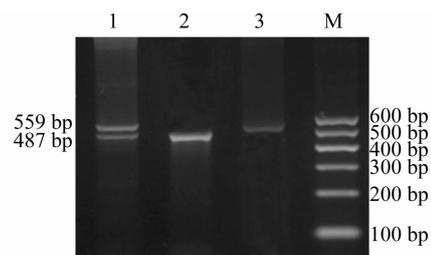


图 1 I-PCR 检测内含子 22 倒位电泳结果

注: M 为 100 bp Marker, 1 为内含子 22 倒位携带者, 2 为正常对照 (内含子 22 倒位阴性), 3 为内含子 22 倒位患者

2.2 F8 基因内含子 1 倒位 对未检出内含子 22 倒位的 HA 患者及其姐姐进行内含子 1 倒位检测。对 int1h-1 片段,PCR 产物片段长 1 908 bp,为正常;对 int1h-2 片段,PCR 产物片段长为 1 191 bp,为正常。因此排除内含子 1 倒位突变。结果见图 2。

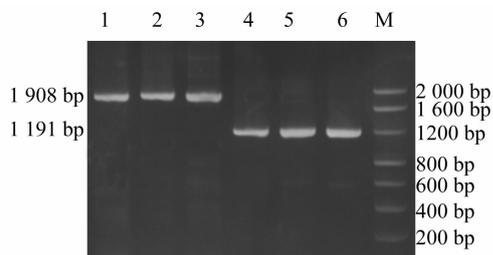


图 2 PCR 检测内含子 1 倒位电泳结果

注:M 为 1 kb Marker,int1h-1 片段,1 为正常对照,2 为 HA 患者(倒位阴性),3 为 2 的姐姐(倒位阴性);int1h-2 片段,4 为正常对照,5 为 HA 患者(倒位阴性),6 为 5 的姐姐(倒位阴性)

2.3 F8 基因点突变 对上述内含子 22 和 1 倒位阴性的 HA 患者,采用 HRM 进行突变扫描,结果显示第 8 外显子存在异常熔解曲线(图 3),经直接测序分析鉴定为第 329 位密码子错义突变 TGT→TAT(图 4),即 c. 986G>A(p. Cys329Tyr)。此突变已在 HAMSTeRS 数据库有报导。该患者姐姐经检测确诊为此错义突变携带者(图 4)。

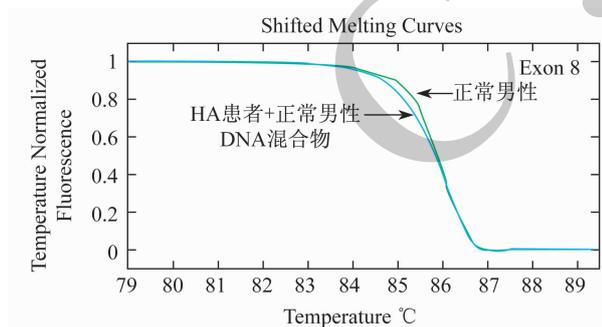


图 3 F8 基因第 8 外显子 HRM 突变筛查结果

注:灰色曲线为正常男性的熔解曲线,绿色曲线为 HA 患者与正常男性基因组 DNA 以 1:1 混合后所得熔解曲线

### 3 讨论

F8 基因位于 Xq28,大小约 186 kb,由 26 个外显子和 25 个内含子组成,mRNA 大小约 9kb,基因结构庞大。已知重型患者中近 50%为内含子 22 的

倒位突变<sup>[8]</sup>,近年来发现内含子 1 倒位是仅次于内含子 22 倒位导致重型 HA 的常见原因<sup>[5,9]</sup>。除此之外,大部分患者则多为点突变,目前已知有 797 种(HAMSTeRS 数据库),且无突变热点,多数散乱。

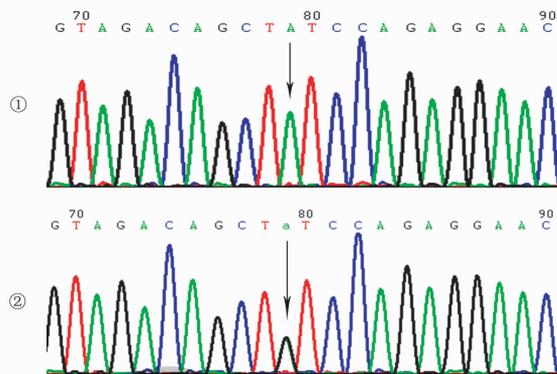


图 4 F8 基因第 8 外显子测序图部分序列

注:① 为 HA 患者,第 329 位密码子 TGT→TAT;② 为此 HA 患者的姐姐,为第 329 位密码子 TGT→TAT 突变杂合子

随着对血友病 A 分子基础的认识不断深入,该病的基因诊断技术也得到很大发展。F8 基因突变的诊断方法主要分为 2 类:直接基因诊断和间接基因诊断。

血友病 A 的直接基因诊断技术主要包括 Southern 杂交、LD-PCR(long-distance PCR)、SSCP(single strand conformation polymorphism)、DGGE(denatured gradient gel electrophoresis)及 DHPLC(denatured high performance liquid chromatography)等。对于最常见的内含子 22 倒位突变目前大多采用 LD-PCR 进行检测<sup>[10]</sup>。但 LD-PCR 专用酶及 deaza-dGTP 等的试剂价格昂贵,成本较高。近期出现的 1 种新技术即 I-PCR,也用于检测第 22 内含子倒位,与 LD-PCR 相比,由于扩增产物片段较短,大大减小了扩增难度,而且该方法对 DNA 样本的要求较低<sup>[11]</sup>。其他突变种类则多为点突变,一般先采用 SSCP、DGGE 或 DHPLC 的方法筛查突变,然后经测序明确致病突变。

本研究采用 I-PCR 进行第 22 内含子倒位患者及携带者的检测,并成功完成了 1 例产前基因诊断。F8 基因的突变筛查则采用 HRM 技术。HRM 是近年来发展的 1 种用于突变扫描和基因分型的最新

遗传学分析方法。它是1种高效稳健的 post-PCR 技术,不受突变碱基位点与类型的局限,无需序列特异性标记探针,PCR 结束后直接运行熔解曲线分析,5分钟即可完成对样品的结果分析。这种方法因其操作简便快捷、成本低廉、结果准确,且可实现高通量(96或384孔板),因此尤其适用于测序前的大规模突变筛查,是1种高灵敏度高特异性的核酸突变筛查技术。本研究通过采用 LightScanner 进行 HRM 分析,可在2小时内(包括 PCR 反应和 HRM 分析)完成对 F8 基因全部 26 个外显子的突变筛查,且单孔单样本的检测成本仅为 2.5 元。筛查结果显示 1 例 HA 患者第 8 外显子存在异常熔解曲线,经测序确定为 c. 986G>A(p. Cys329Tyr)错义突变。致病突变和多态性位点都可以导致异常熔解曲线,因此应用 HRM 筛查得到异常熔解曲线时,须经测序以确定所检测到 SNP (single nucleotide polymorphism) 的性质。对于已知的 SNP,可在数据库中检索以明确其性质;对于新发突变,还需在正常对照人群(家系中正常人及无血缘关系健康人)中作进一步筛查以确定其致病性。

血友病 A 的间接基因诊断即为家系连锁分析,主要依靠 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、STR (short tandem repeat)、VNTR (variable number of tandem repeats)等多态性标记与致病突变等位基因的连锁关系及其向后代的传递情况进行诊断<sup>[12,13]</sup>。然而间接基因诊断存在显著局限性,如不能明确突变性质,可因基因内重组的发生而导致误诊,或家系成员无法提供多态信息等使诊断受到限制,对于新发、散在病例更无法诊断。

总的来说,由于现有技术的局限性,加上基因突变的多样性,部分家系在目前的条件下尚无法做出判断。特别是对于新突变造成的散发性血友病家系,诊断率更低。因此,HA 的基因诊断不能只单独依靠 1 项检测手段。本研究即联合应用 I-PCR、序列特异 PCR、HRM、DNA 测序技术实现了对所有研究对象的直接基因诊断。在临床实践中对于有先证者的家系,应首先对先证者依次进行以下检测:①采用 I-PCR 检测内含子 22 倒位;②排除内含子 22

倒位后,采用序列特异 PCR 检测内含子 1 倒位;③若排除以上 2 种倒位突变,则应用 HRM 进行点突变筛查,然后测序确定致病突变。在明确先证者致病突变后,再进一步对家系中其他患者和可能携带者进行检测。本研究所提出的 HA 的直接基因诊断策略,简便快捷、经济有效,可进一步提高现有诊断的有效率和准确性,在 HA 的基因诊断及产前诊断中具有较强的实用性,适于在临床推广应用。今后将进一步提高样本量来进行实践验证,逐步建立起一套完善的直接基因诊断体系,以提高血友病 A 的诊断率,并丰富中国人群血友病 A 的基因突变谱。

#### 参考文献

- [1] Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. The metabolic and molecular bases of inherited disease[M]. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
- [2] Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study[J]. Blood, 1995, 86: 2206-2212.
- [3] Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, et al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR[J]. Clin Chem, 2005, 51: 1154-1158.
- [4] Qi LY, Jin CL, Lin CK, et al. Application study on inversion diagnosis of F8 gene in hemophilia A[J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2007, 24: 405-408.
- [5] Bagnall RD, Waseem N, Green PM, et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A[J]. Blood, 2002, 99: 168-174.
- [6] Laurie AD, Smith MP, George PM. Detection of Factor VIII Gene Mutations by High-Resolution Melting Analysis[J]. Clin Chem, 2007, 53: 2211-2214.
- [7] Lin SY, Su YN, Hung CC, et al. Mutation spectrum of 122 hemophilia A families from Taiwanese population by LD-PCR, DHPLC, multiplex PCR and evaluating the clinical application of HRM[J]. BMC Medical Genetics, 2008, 20: 53.
- [8] Lakch D, Kazazion HH, Antonarakis SE, et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe hemophilia A[J]. Nat Genet, 1993, 5: 236.
- [9] Tizzano EF, Cornet M, Baiget M. Inversion of intron 1 of

the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A[J]. Haematologica, 2003, 88: 118-120.

[10] Mantilla-Capacho JM, Beltrán-Miranda CP, Luna-Záizar H, et al. Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A[J]. Am J Hematol, 2007, 82: 283-287.

[11] Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, et al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR[J]. Clin

Chem, 2005, 51: 1154-1158.

[12] 陆晔玲, 丁秋兰, 戴菁, 等. 血友病携带者与产前基因诊断[J]. 中国输血杂志, 2008, 21: 259-264.

[13] 张立, 余元勋, 吴竞生. 血友病 A 基因诊断和产前诊断技术的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15: 4-6.

编辑:杨春艳

(收稿日期:2010-04-01)

## “第五届产科危急重症救治学术研讨会(COCC)” 会议及征文通知

尊敬的医师:

我们诚挚地邀请您参加 2010 年 9 月 10-12 日在山东青岛召开的“第五届产科危急重症救治学术研讨会(COCC)”。本次会议由《现代妇产科进展》杂志社主办;同济大学附属第一妇婴保健院、广州医学院第三附属医院、山东省立医院共同协办;上海布鲁锡医疗科技有限公司承办。大会主席由段涛教授、陈敦金教授担任,执行主席由王谢桐教授担任。

“产科危急重症救治”一直是产科界重大的课题,为了切实加强产科急救的规范化管理,确保孕产妇的生命安全,推动我国产科重症医学的发展,提高产科危急重症救治水平,总结产科危急重症的治疗经验,于 2006 年开始发起了“产科危急重症救治学术研讨会(COCC)”,至今已成功举办了四届,在 2010 年金秋送爽之际,我们将在美丽的蓉城迎来“第五届产科危急重症救治学术研讨会”!

此次会议的主要内容和形式如下:

### 学术亮点

• 本次会议分为四个专题:剖宫产专题(多次剖宫产的问题;剖宫产切口部位妊娠的诊断与处理;降低剖宫产率-我们共同面对的任务)、合并症及并发症专题(不典型羊水栓塞;妊娠合并甲状腺疾病;妊娠合并脑血管意外的诊断与处理;妊娠期重症肺炎(H1N1)的诊断与处理;胎儿宫内窘迫诊断标准的评价;脑瘫与产科处理的关系-美国妇产科学会与儿科学会指南解读)、质量改进专题(孕产妇死亡病例分析;上海孕产妇死亡围产儿死亡评审制度介绍,外来孕产妇管理,重症孕产妇抢救中心;产科质量的评价与持续改进)。

• 现场互动(手术录像、现场模型演示;优秀论文、手术录像现场交流;现场疑难问题解答;专业书籍展示:《产前诊断》、《产科手术学》、《高危妊娠:处理选择》、《妊娠期用药》、等等)

### 征文通知

“学术论文”征稿:大会在所有投稿论文中,挑选优秀论文进行大会发言;内容:产科危急重症救治的临床经验总结与相关基础研究;抢救成功或失败的病例个案分析;也可以把抢救失败或有困惑的病例寄过来要求开会时由专家点评分析;投稿论文请务必提供“摘要”;

“手术录像”征稿:大会在送选的手术录像中,挑选优秀者进行现场播放和点评;内容与产科危急重症救治相关的手术,录像时间限定 20 分钟,以光盘的形式邮寄。

投稿专用邮箱:cocctougao2010@163.com,投稿截止日期:2010 年 8 月 25 日

### 报名、会务安排

会议地点:青岛汇泉王朝大饭店(地址:青岛市南区南海路 9 号 酒店总机:0532-8299888)

• 会议报到:2009 年 9 月 9 日(周四)下午 1:00 开始在汇泉王朝大饭店大堂报到

• 会议时间:2009 年 9 月 10 日-12 日(周五-周日)

• 会议收费:会务注册费 950 元/人(含会议期间餐费和会议资料费),住宿费自理。提前网上报名并支付(支付截止日期为 2010 年 8 月 31 日之前),注册费可享有 20% 优惠,即 760 元

• 学分:参加本次会议,授予国家级 I 类学分 10 分

### 组委会联系方式:

• 联系人: 顾先生,唐小姐  
• 电话: (021)64044507  
• 手机: 13817510016  
• 传真: (021)64389315  
• 网上报名: www.blueseachina.com  
• E-mail: services@blueseachina.com  
• 地址: 上海市宛平南路 99 弄 2 号 1702 室  
• 邮编: 200032