

应用高分辨熔解曲线分析方法检测 β -地中海贫血纯合突变

欧展辉¹ 孙筱放^{2*}

(1. 暨南大学第三附属医院产科, 广东 珠海 519000;
2. 广州医学院第三附属医院 妇产科研究所, 广东 广州 510150)

【摘要】 目的 探讨高分辨熔解曲线分析方法 (HRM) 检测 β -地中海贫血纯合突变的有效性。**方法** 应用 HRM 方法对中国最常见的 4 种 β -地中海贫血 (4 个 IVS-II-654 即 HBB:c. 316-197C>T, 3 个 Codons 41/42 即 HBB:c. 126_129 delCTTT, 1 个 Codon 17 即 HBB:c. 52A>T 和 4 个 -28 即 HBB:c. -78A>G) 纯合突变进行检测, 通过直接检测与野生型标本混合后再检测 2 种方法检测。**结果** HRM 方法可以检测出中国常见的 4 种 β -地中海贫血纯合突变。**结论** HRM 方法可以对中国常见的 4 种 β -地中海贫血纯合突变进行检测, 在产前诊断上有很好的应用前景。

【关键词】 β -地中海贫血; β -珠蛋白; 纯合突变; 高分辨熔解曲线分析; 熔解曲线

Detecting β -thalassemia Homozygous Mutations by High-resolution Melting Analysis

Ou Zhan-hui¹, Sun Xiao-fang^{2*}.

(1. Department of Obstetrics, Zhanhui People's hospital, The Third Affiliated Hospital of Jinan University, Zhuhai 519000, China; 2. Institute of Gynecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Duobao Road, Guangzhou 510150, China)

【Abstract】 Objective To Detect β -thalassemia homozygous mutations by high-resolution melting analysis. **Methods** In this study, we used high-resolution melting (HRM) analysis to identify four kinds of most common β -thalassemia homozygous mutations in China. We also used homozygous mutations PCR product and wild-type product mixture to perform HRM analysis again. **Results** We successfully detected four kinds of common homozygous mutations samples (IVS-II-654 (HBB:c. 316-197C>T), Codons 41/42 (HBB:c. 126_129 delCTTT), Codon 17 (HBB:c. 52A>T) and -28 (HBB:c. -78A>G)). **Conclusion**

Our results indicated that High-resolution melting analysis is a time saving and cost-effective technique. It can be used to identification of the commonest homozygous mutations. HRM will be a simple method to β -thalassemia prenatal diagnosis.

【Key words】 β -thalassemia; β -globin gene; homozygous mutations; high-resolution melting; Melting curve

β -地中海贫血是最常见的单基因遗传病之一^[1], 广东省的人群携带率约为 2.54%^[2]。中重型 β -地中海贫血可以由 β -珠蛋白基因的复合杂合突变或者纯合突变引起, 这些中重型患儿出生后往往需要长期输血及去铁治疗, 但仍然导致很高的死亡

率。 β -地中海贫血可表现为轻度或者没有贫血, 平均血细胞容积(MCV)和/或红细胞平均血红蛋白含量(MCH)降低及血红蛋白 A2(HbA2)升高。因此这些指标是筛查 β -地中海贫血很好的方法^[3-5]。但是要检测出 β -地中海贫血基因型或者作产前诊断, 则必须进行基因诊断。目前, 许多方法已经用于检

* 通讯作者: 孙筱放. E-mail: xiaofangsun@hotmail.com

测 β -地中海贫血,如:PCR结合特异性寡核苷酸探针斑点杂交法^[6]、扩增受阻突变体系PCR^[7]、反向斑点杂交法^[8]、限制性片段长度多态性^[9]、多重连接依赖性探针^[10];另外还有一些是对突变进行筛查,但结果需要测序确认的方法如:单链构象多态性^[11]、变性梯度凝胶电泳^[12]、变性高效液相色谱法^[13]、高分辨溶解曲线分析^[14]等。本研究应用最近发展起来的高分辨溶解曲线分析方法检测中国最常见的4种 β -地中海贫血纯合突变。

1 材料与方法

1.1 对象 4个IVS-II-654、3个Codons 41/42、1个Codon 17和4个-28纯合突变标本均为羊水来源的DNA标本,另外还有对应的杂合突变标本各2个及5个野生型标本。

1.2 试剂 提取标本DNA的QIAamp blood kit DNA提取试剂盒购自德国QIAGEN公司;检测 β -地中海贫血的反向斑点杂交试剂盒购自深圳益生堂公司;用于HRM分析的饱和荧光染料LC Green plus荧光染料购自美国Idaho公司;PCR反应的TaqDNA聚合酶购自美国promega公司;测序用的SAP-Exon I纯化试剂盒和BigDye测序反应试剂盒购自美国ABI公司。

1.3 仪器 核酸蛋白检测仪:美国Nanodrop公司ND-1000型;HRM分析仪:美国Idaho公司的LightScanner32型;基因测序仪:美国ABI公司3100基因测序仪。

1.4 方法

1.4.1 按QIAGEN试剂盒说明书的方法提取所有的外周血和羊水样本。按益生堂反向斑点杂交试剂盒说明书方法对上述DNA标本进行检测中国常见的17种突变。

1.4.2 对RDB方法未发现任何突变的标本进行测序反应,以明确为野生型标本,对HRM分析存在怀疑突变的标本也进行测序反应,以明确是否存在突变。

1.4.3 进行HRM分析的DNA标本用ND-1000

核酸分析仪检测浓度后,全部稀释为10 ng/ μ l。

1.4.4 PCR反应体系取10 μ l,其中LC Green Plus染料1 μ l,2.5 mM镁离子,引物浓度为0.2 μ M,序列参考Shih等^[14]。检测Codons 41/42和Codon 17突变时所用的引物退火温度为56 $^{\circ}$ C,检测IVS-II-654和-28所用的引物退火温度为60 $^{\circ}$ C,PCR反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性10分钟,然后95 $^{\circ}$ C变性30秒,退火30秒及72 $^{\circ}$ C延伸30秒进行35个循环。反应后取4 μ l反应产物在毛细管中放入高分辨溶解曲线分析仪进行第一次扫描;另外取2 μ l纯合突变的产物与2 μ l已知的野生型标本混合后再扫描。

1.4.5 HRM扫描时先进行95 $^{\circ}$ C变性10秒,40 $^{\circ}$ C复性10秒后以0.1 $^{\circ}$ C/秒从70 $^{\circ}$ C到92 $^{\circ}$ C收集荧光。

1.4.6 加入野生型标本及杂合突变标本作为对照。

1.4.7 使用HRM分析仪的LightScanner软件进行结果分析。

1.4.8 对标本进行测序时引物参照Foulon等^[15],使用ABI Prism 3100基因分析仪和BigDye Terminator sequencing kit试剂盒进行测序。

2 结果

经过HRM分析检测,数据整理后,结果如下图(图1~4),可见通过第一次检测,可以把纯合突变的标本从野生型和杂合突变的标本中区分出来;纯合突变标本和野生型标本混合后形成与杂合突变一致的峰型,可进一步证明纯合突变。

3 讨论

HRM分析是依赖于DNA熔解时LCGreen PLUS饱和染料的存在,该染料在熔解时不发生重新分配,并且对PCR反应没有明显的抑制^[16]。当溶液的温度升高,染料从DNA双链中释放,从而使荧光强度减少。为了得到精确的结果,引物设计是最重要的前提。虽然有报道该方法能检测达1 000 bp长的产物,但是保证敏感性达到100%,推

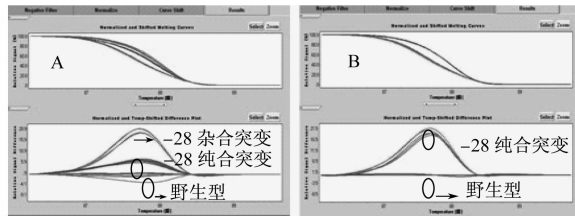


图 1

注:图 A 可见通过 HRM 检测分析后可以把 -28 纯合突变从 -28 杂合突变和野生型标本中区别出来;图 B 纯合突变标本经过混合后再扫描可形成杂合子相同的峰形

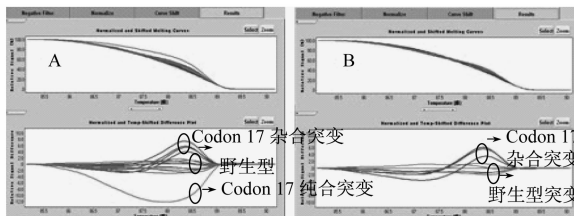


图 2

注:图 A 可见通过 HRM 检测分析后可以把 Codon 17 纯合突变从 Codon 17 杂合突变和野生型标本中区别出来;图 B 纯合突变标本经过混合后再扫描可形成杂合子相同的峰形

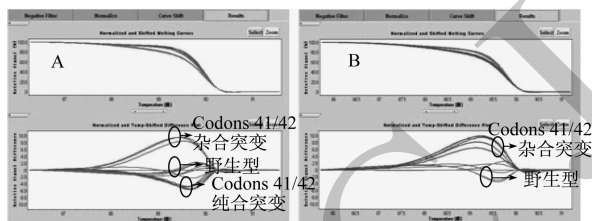


图 3

注:图 A 可见通过 HRM 检测分析后可以把 Codons 41/42 纯合突变从 Codons 41/42 杂合突变和野生型标本中区别出来;图 B 纯合突变标本经过混合后再扫描可形成杂合子相同的峰形

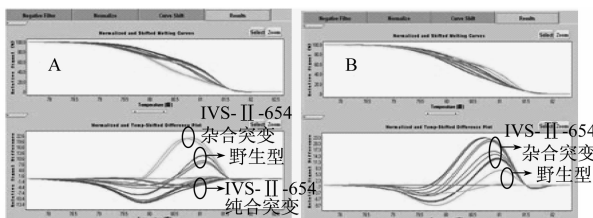


图 4

注:图 A 可见通过 HRM 检测分析后可以把 IVS-II-654 纯合突变从 IVS-II-654 杂合突变和野生型标本中区别出来;图 B 纯合突变标本经过混合后再扫描可形成杂合子相同的峰形

荐产物长度小于 400 bp^[17]。另外,应该避免扩增子中有多个熔解峰的存在,因为它会影响结果的分析从而影响结果的精确性。单核苷酸多态性也应该尽量避免,如果不能避免,可以尝试设计引物把该处屏蔽,在本实验中,检测 IVS-II-654 时,其附近存在一个单核苷酸多态性,但不影响对 IVS-II-654 结果的判断,因此不需要对其进行屏蔽。

单链构象多态性^[11]、变性梯度凝胶电泳^[12]、变性高效液相色谱法^[13]等方法操作均较复杂,实验要求高,需要特殊的标记引物,实验过程中需要使用有害的化学物质。因此在使用操作上,HRM 分析方法具有操作简单等优点。

与最近研究较多的变性高效液相色谱法比较,该方法更快速,不需要在特定的变性条件下进行,并且不需要标记的探针或者引物,只需要加入便宜的饱和染料。另外,该方法被认为是目前最好的检测纯合突变的方法^[16]。最近不少学者通过比较,发现该方法检测纯合突变的灵敏度和特异度达 100%,高于变性高效液相色谱法^[17,18]。该研究中,笔者对中国最常见的 4 种 β -地中海贫血纯合突变进行检测,不论是用直接扫描还是混合后再扫描敏感性也达 100%。复合杂合突变和纯合突变是引起中重度地中海贫血的原因,因此该方法在 β -地中海贫血的产前诊断上防止中重型患儿出生有很好的应用价值。

综上所述,HRM 分析是一种快速、方便的检测纯合突变的方法,具有很高的灵敏度,未来在产前诊断上具有很好的应用前景。

参考文献

- [1] Rund D, Rachmilewitz E. β -thalassemia[J]. N Engl J Med. 2005; 353:1135-1146.
- [2] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of α and β thalassemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57:517-522.

- [3] Cao A. Carrier screening and genetic counselling in beta-thalassemia[J]. *Int J Hematol.*, 2002, 76 (Suppl2): 105-113.
- [4] Sirichotiyakul S, Wanapirak C, Srisupundit K, et al. A comparison of the accuracy of the corpuscular fragility and mean corpuscular volume tests for the alpha-thalassemia 1 and beta-thalassemia traits[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009, 107 :26-29.
- [5] Ou ZH, Li Q, Liu WQ, et al. Elevated Hemoglobin A2 as a Marker for β -Thalassemia Trait in Pregnant Women [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2011, 223(3):223-226.
- [6] Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, et al. Analysis of enzymatic amplified β -globin and HLA-DQ α with allele specific oligonucleotide probe[J]. *Nature*, 1986, 324 (13): 163-169.
- [7] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17:2503-2516.
- [8] Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, et al. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:6230-6234.
- [9] Ward MA, Olivieri NF, Ng J, et al. Detection of beta-thalassemia using artificial-restriction fragment length polymorphism generated by polymerase chain reaction[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19:959.
- [10] Lee ST, Yoo EH, Kim JY, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification screening of isolated increased HbF levels revealed three cases of novel rearrangements/deletions in the beta-globin gene cluster[J]. *Br J Haematol*, 2010, 148(1):154-160.
- [11] Gupta A, Agarwal S. Efficiency and cost effectiveness: PAGE-SSCP versus MDE and Phast gels for the identification of unknown beta thalassaemia mutations[J]. *Mol Pathol*, 2003, 56(4):237-239.
- [12] Gorakshakar AC, Phanasaonkar SP, Nadkarni AH, et al. Detection of rare beta-thalassemia mutations by denaturing gradient gel electrophoresis among Indians[J]. *Hemoglobin*, 2004, 28(1):15-24.
- [13] Bournazos SN, Tserga A, Patrinos GP, et al. A versatile denaturing HPLC approach for human beta-globin gene mutation screening[J]. *Am J Hematol*, 2007, 82(2):168-170.
- [14] Shih HC, Er TK, Chang TJ, et al. Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42(16-17):1667-1676.
- [15] Foulon K, Rochette J, Cadet E. A novel beta-Thalassemic allele due to a two nucleotide deletion: beta76 (-GC) [J]. *Hemoglobin*, 2007, 31:31-37.
- [16] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. *Clin Chem*, 2003, 49:853-860.
- [17] Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(10):1748-1754.
- [18] Chou LS, Lyon E, Wittwer CT. A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model[J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 124(3):330-338.
- [19] Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Garcia-Hoyos M, et al. Comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning in the ABCA4 gene[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(5):2615-2619.

编辑:刘邓浩

(收稿日期:2011-08-25)