

悬浮阵列技术在地中海贫血基因诊断中的应用

王逾男[†] 林建昌[†] 张亮 何天文 刘畅 杜丽 尹爱华*

(广州医科大学附属广东省妇儿医院, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 地中海贫血是由于 α/β -珠蛋白基因突变或缺失导致的 α/β 链生成不足或完全缺失引起的以珠蛋白生成障碍为特点的遗传性血液病。本研究旨在研发一个针对中国南方人群高发位点的地贫检测平台,并了解广东省各地区地贫基因流行性情况。**方法** 基于悬浮阵列技术开发一个能同时检测中国南方人群高发的20种地中海贫血点突变及3种缺失突变的平台,利用200多例已知地贫基因型的样本评估引物和探针的性能,以及确定突变位点检测探针的截断值,并将此方法用于广东省地贫防控项目中的81 052例标本,以分析广东省各地区地贫流行性现状。**结果** 本平台使用的微球反应面积大及探针数量多,加快了检测速度,可同时检测20种突变型地贫基因与3种缺失型地贫基因。广东省地贫防控项目中的81 052例标本中,共检出12 296(15.20%)例携带地贫基因,其中8975(11.07%)例携带 α 地贫基因,2857(3.52%)例携带 β 地贫基因,464(0.57%)例携带 α 地贫基因及 β 地贫基因。**结论** 悬浮阵列技术是一种快速、准确、经济的技术,尤其适用于大规模地贫基因诊断。

【关键词】 悬浮阵列技术;地中海贫血;点突变;缺失突变;分子诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective Thalassemia is a group of inherited hematologic disorders caused by defects in the synthesis of one or more of the hemoglobin chains. The aim of this study was to develop an effective diagnostic platform for thalassemia targeting the hotspot mutation sites and deletion combinations, as well as to reveal the prevalence and molecular variation of α/β -globin gene mutations in Guangdong Province.

Method We developed a new diagnostic assay using the bead-based suspension array technology (BBSAT), which can detect 20 point mutations and 3 deletions of Asian prevalent thalassemia in parallel within 5 hours. More than 200 previously genotyped clinical samples were used to determine the cut-off values and to validate the accuracy of new assay. Moreover, the new assay was applied to screen thalassemia in 40,813 clinical samples to investigate the prevalence and mutation spectrum of thalassemia in the population of Guangdong Province, China. **Results** In the BBSAT assay, suspended beads increase surface area to 3-D and more probes concentrated on beads. With the multiplex PCR primer and probe design strategy, both deletion mutations and point mutations of α/β thalassemia can be simultaneously detected in a single assay. Among 81,052 clinical samples, 12,296 samples carry thalassemia gene mutations, of which 8,975 samples (11.07%) carry α -thalassemia gene mutations, 2,857 samples (3.52%) carry β -thalassemia gene mutations, and 464 samples (0.57%) carry both α - and β -thalassemia gene mutations.

Conclusions The BBSAT is a rapid, accurate and cost-effective technology, suitable for molecular diagnosis of the thalassemia in large populations.

【Key words】 bead-based suspension array technology (BBSAT); thalassemia; point and deletion mutation; molecular diagnosis

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2015.04.005

基金项目:广东省自然科学基金委(S2012010008318)

* 通讯作者:尹爱华, E-mail: yinaiwa@vip.126.com

[†]:王逾男与林建昌为并列第一作者

地中海贫血(简称“地贫”)是由于 α/β -珠蛋白基因突变或缺失导致的 α/β 链生成不足或完全缺失引起的以珠蛋白生成障碍为特点的遗传性血液病^[1]。地贫是全球分布最广、累积人群最多的常染色体隐性遗传病,约有占全世界人口 5% 的患者和携带者^[2],其中 α 地贫广泛分布于广大热带和亚热带地区,而 β 地贫高发于地中海沿岸国家和东南亚各国^[3,4]。我国以南方地区多见,尤以广东、广西和海南为甚,以往研究表明,广东省不同地区 α 地贫的携带率为 5.2%~13.31%, β 地贫的携带率为 0.5%~4.53%^[5]。 α 地贫大部分是由于位于 16 号染色体 16p13.3 的 α 珠蛋白基因大片段缺失引起的,少部分是由于点突变引起的。而 β 地贫主要是由位于 11 号染色体 11p15.4 的 β -珠蛋白基因的点突变引起的,目前已发现了超过 200 种突变类型^[6]。尽管地贫突变种类众多,但突变类型有地域及种族特异性,且仅有少数几种为常见突变。以往研究表明,我国南方人群有 23 种常见突变,占全部突变的 98% 以上,分别是-SEA、 $-\alpha(3,7)$ 、 $-\alpha(4,2)$ 、 $-29A>G$ 、 $-28A>G$ 、 $CAP+40+43(-AAAC)$ 、 $CD17A>T$ 、 $CD26G>A$ 、 $CD41-42(-TCTT)$ 、 $IVS2-654C>T$ 、 αWS 、 αQS 、 αCS 、 $CD27-28(+C)$ 、 $IVS-1-1(G>T)$ 、 $CD71-72(+A)$ 、 $-32C>A$ 、 $-30T>C$ 、 $IntATG>AGG$ 、 $CD14-15(+G)$ 、 $IVS-1-5(G>C)$ 、 $CD31(-C)$ 和 $CD43G>T$ ^[5,7,8]。

由于我国南方地区地贫携带率高且无有效治疗方法,因此在高发地区开展地贫筛查和产前诊断是预防重型患儿出生的重要措施。目前国际常规的实验室诊断方法包括血常规检测分析红细胞参数、血红蛋白电泳、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)等定量分析血红蛋白各组分含量以及地贫基因诊断。随着分子生物学技术的发展,基因诊断技术已经大量应用于地贫的诊断。我国地贫的基因诊断始于 20 世纪 80 年代初,先后经历了 DNA 点杂交、限制性内切酶酶谱分析、限制性片段长度(restriction fragment length polymorphism, RFLP)多态性连锁分析、寡核苷酸探针杂交和跨越断裂点的 PCR 技术(Gap-PCR)、多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent

probe amplification, MLPA)及比较基因组杂交技术(array comparative genomic hybridization, aCGH)等^[9-11]。其中 Gap-PCR、MLPA 及 aCGH 技术适用于缺失型 α 地贫的基因检测。由于 β 地贫突变位点多样,检测金标准为 DNA 测序技术,但目前该技术价格昂贵且耗时耗力,其他的检测技术包括反向斑点膜杂交(reverse dot-blot hybridization, RDB)、RFLP 多态性连锁分析等^[12,13]。在众多地贫的检测平台中,目前最常用的是串联三级筛查法,即初筛为血常规检查,MCV<82fl 或 MCH<27pg 者行复筛血红蛋白电泳检查, HbA₂<2.5 者行 α 地贫基因检查, HbA₂>3.5 者行 $\alpha+\beta$ 地贫基因检查。而同时行 $\alpha+\beta$ 地贫基因检查需分缺失型 α 地贫,非缺失型 α 地贫及 β 地贫检测 3 次反应进行,费时费力,效率低,结果判读不明确。

悬浮阵列技术较传统的固相芯片的优势在于检测通量大且速度快。由于微球直径小,容易混悬在液体中,反应接触面积比固相芯片大,反应快速、充分;液态芯片杂交发生在准均相的液体环境中,在反应中有利于生物大分子保持其正确空间构象,使检测结果稳定。基于以上两点,本方法也更适用于大样本基因检测^[17]。目前,悬浮阵列技术已广泛应用于基因检测,包括细胞因子检测、囊胞性纤维症筛查、HLA(human lymphocyte antigen)分类以及线粒体 DNA 突变检测等^[18-22]。故我们基于悬浮阵列技术平台研发了一种能同时检测中国南方人群高发的 3 种缺失型 α 地贫, 3 种点突变型 α 地贫及 17 种点突变型 β 地贫的检测平台(专利号: ZL201110301528.9)。

1 方法

1.1 实验设计与标本收集 本试验研发了一种基于悬浮阵列技术能同时检测中国南方人群高发的 20 种点突变和 3 种缺失型突变的诊断平台。研究获得了广东省妇幼保健院机构审查委员会及广州医科大学伦理委员会的批准。利用广东省妇幼保健院生物样品银行中 200 多例已知地贫基因型的样本评估引物和探针的性能,以及确定突变位点检测探针的截断值(cut-off value)。生物样品银行中所有样

品的采集、储存和利用均遵循广东省妇幼保健院机构审查委员会及广州医科大学伦理委员会制订的标准操作规程。所有样品的采集均取得了参与者的书面知情同意书,且标本在存储与处理的过程中均匿名。临床适用性的评估选用来自广东省地贫防控流调项目中的 81 052 例标本^[5]。所有样品的采集、储存和利用均遵循广东省妇幼保健院机构审查委员会及广州医科大学伦理委员会制订的标准操作规程。DNA 的提取使用厦门至善生物 DNA 抽提试剂盒(至善生物,厦门,中国),各操作步骤按说明书进行。

1.2 探针与引物的设计 设计长度为 20 bp 的寡核苷酸捕获探针检测突变位点,在每个探针内部设定特异序列以区分野生型探针及各突变探针。缺失型突变的检测探针为长度 40 bp 的寡核苷酸探针且探针序列与-SEA,-3.7,-4.2 序列高度匹配。利用探针 5'端氨基化修饰共价耦合羧酸盐微球。探针的具体信息如表 1。为了达到最佳杂交反应条件,点突变序列 PCR 产物均在 300 bp 左右。

共设计 4 对引物用于扩增包含 17 种点突变的 β 珠蛋白基因序列,一对引物用于扩增包含 3 种点突变的 α 珠蛋白基因序列。Gap-PCR 用于检测缺失型 α 地贫,引物设计跨越断裂位点。

1.3 多重 PCR 与标记 同一 DNA 样本分两管进行扩增。分别使用 PCR mix A 和 PCR mix B。其中一管用于检测 3 种缺失型 α 地贫 (-SEA,-α(3.7),-α(4.2)),另一管用于检测 3 种突变型 α 地贫及 17 种突变型 β 地贫。PCR 体系为 25 μl,包含 0.2 mmol dNTPs,0.2 mmol Mg²⁺,1 U · TaqHS (TaKaRa, 大连,中国)及 25 ng DNA 样本。突变型地贫 PCR 扩增条件如表 2,缺失型地贫 PCR 扩增条件如表 3,具体步骤按照说明书要求进行操作。

1.4 探针与微球耦联 参照说明书将设计的 45 组探针偶联到不同荧光编码的微球(Luminex Corp., Austin, TX, USA)上,混合耦联好探针的微球,并悬浮于 1ml PBS-T 缓冲液(Phosphate Buffered Saline with Tween-20, pH7.5),4 °C 避光保存。

1.5 杂交与分析 涡旋颠倒多重微球杂交液,使微珠充分重悬后,按每体积 45 μl 分装至 96 孔反应板中。每个样品分别取 2.5 μl A 管产物和 B 管产物

表 1 地贫悬浮阵列技术各探针序列

Mutation	Probe	Probe sequence
-32C>A	N	AGGGCTGGGCATAAAAAGTC
	M	AGGGCTGGGAATAAAAAGTC
-30T>C	N	GGCTGGGCATAAAAAGTCAG
	M	GGCTGGGCACAAAAGTCAG
-29A>G	N	GCTGGGCATAAAAAGTCAGG
	M	GCTGGGCATGAAAAGTCAGG
-28A>G	N	CTGGGCATAAAAAGTCAGGG
	M	CTGGGCATAGAAGTCAGGG
CAP +40+43(-AAC)	N	GCAACCTCAAACAGACACC
	M	TAGCAACCTCAGACACCAT
Initial codon ATG>AGG	N	CAGACACCATGGTGCATCT
	M	CAGACACCAGGGTGCATCT
CD14-15(+G)	N	TACTGCCCTGTGGGGCAAG
	M	TACTGCCCTGGTGGGGCAA
CD17 A>T	N	CTGTGGGGCAAGGTGAACG
	M	CTGTGGGGCTAAGTGAACG
CD26 G>A	N	GTTGGTGGTGAGGCCCTGG
	M	GTTGGTGGTAAGGCCCTGG
CD27-28(+C)	N	GGTGGTGAGGCCCTGGGCA
	M	GTGGTGAGGCCCTGGGCA
IVS-1-1 G>T	N	CCTGGGCAGGTTGGTATCA
	M	CCTGGGCAGTTTGGTATCA
IVS-1-5 G>C	N	GGCAGGTTGGTATCAAGGT
	M	GGCAGGTTGCTATCAAGGT
CD31(-C)	N	ACCTTAGGCTGCTGGTGG
	M	CACCCTTAGGTGCTGGTGG
CD41-42 (-TCTT)	N	CCAGAGGTTCTTTGAGTCC
	M	ACCCAGAGGTTGAGTCCCTT
CD43 G>T	N	AGGTTCTTTGAGTCCCTTG
	M	AGGTTCTTTTAGTCCCTTG
CD71/72+A	N	GGTGCCTTTAGTGATGGCC
	M	GTGCCTTTAAGTGATGGCC
IVS2-654C->T	N	GGGTTAAGGCAATAGCAAT
	M	GGGTTAAGGTAATAGCAAT
Codon 122 (C->G)	N	GCGGTGCACGCCTCCCT
	M	GCGGTGCAGGCCTCCCT
Codon 125 (T->C)	N	CGCCTCCCTGGACAAGT
	M	CGCCTCCCCGACAAGT
Codon 142 (T->C)	N	CAAATACCGTTAAGCTGGAGC
	M	CAAATACCGTCAAGCTGGAGC
SEA del		AAGCTGAGTGATGGGTCCG
3.7del		CCCCTGCCTTTTCCTACCC
4.2del		GCTAGAGCATTGGTGGTCA
a2		CCGGTGCAAGGAGGGGAGGAG

表 2 突变型地贫 PCR 扩增条件

温度(°C)	时间	循环(次)
95	5 分钟	—
95	30 秒	—
50	45 秒	30
72	30 秒	—
95	30 秒	—
65	45 秒	20
72	30 秒	—
72	10 分钟	—

表 3 缺失型地贫 PCR 扩增条件

温度(°C)	时间	循环(次)
95	5 分钟	—
97	30 秒	—
70	45 秒	30
72	150 秒	—
72	5 分钟	—
97	30 秒	—
50	45 秒	20
72	30 秒	—
72	10 分钟	—

加之各反应孔中,总体积为 50 μ l,充分混匀,封板膜密封后,按如下条件进行杂交反应:95 °C 变性 5 分钟,迅速降至 4 °C。每个样本取 A 管变性产物和 B 管变性产物各 1 μ l 加至同一酶标板反应孔中,总体积 50 μ l,封板膜密封后,55 °C 杂交 15 分钟。然后,每个反应孔中加入 100 μ l 预热洗液终止反应。每孔加入 50 μ l 显色工作液 55 °C 显色 10 分钟。样品采用 Luminex 200 系统 (Luminex Corp., Austin, TX, USA) 进行分析。计算每个样品的平均荧光强度 (median fluorescence intensity, MFI),当样品的平均荧光强度大于背景平均荧光强度 10 倍标准差以上时,代表特异的杂交信号。

1.6 结果判读 同一突变位点检测体系中分别包含野生型探针(N 探针)及突变型探针(M 探针),突变型地贫基因型的判读基于 N/M 比值。由于缺失

型 α 地贫均发生在 $\alpha 2$ 珠蛋白基因,故设置内参照 $\alpha 2$ 探针用于提示杂合或者野生型基因型。缺失位点检测体系中包含缺失探针 SEA, 缺失探针 3.7, 缺失探针 4.2 及野生型内参照 $\alpha 2$ 探针,基因型的判定取决于检测探针的平均荧光强度 (median fluorescence intensity, MFI)。

2 结果

2.1 各位点检测探针的截断值的确定利用 200 多例已知地贫基因型的样本来确定本平台各位点检测探针的截断值 (cut-off value),采用 N/M 比值以及 AUC 法计算得到。共 122 份 DNA 样品用于突变型位点检测探针的截断值的确立,基因型包括-29A >G、-28A >G、CAP+40-+43(-AAAC)、CD17A >T、CD26G >A、CD41-42(-TCTT)、IVS2-654C >T、 α WS、 α QS、 α CS、CD27-28(+C)、IVS-1-1(G >T)、CD71-72(+A)、-32C >A、-30T >C、Int ATG >AGG、CD14-15(+G)、IVS-1-5(G >C)、CD31(-C)和 CD43G >T。共 78 份 DNA 样品用于缺失型 α 地贫的基因型确定,其中包括 40 份野生型及 38 份缺失型,缺失型 DNA 样品基因型包括 $\alpha\alpha$ /- α (3.7)、 $\alpha\alpha$ /- α (4.2)、 $\alpha\alpha$ /-SEA、-SEA/-SEA、-SEA/- α (4.2)、- α (3.7)/- α (3.7)和 - α (4.2)/- α (3.7)7 种。悬浮阵列技术检测缺失型地贫的结果进一步经过了 Gap-PCR 的验证,如表 4。

表 4 不同的点突变型 α/β 地贫及野生型标本的地贫基因检测结果

Sample	Probe									
	-32C>A	-30T>C	-29A>G	-28A>G	Cap+40+43(-AAAC)	Int ATG>GAA	CD14-15(+G)	CD17A>T	CD26G>A	CD27-28(+G)
WT/WT	5.5	8.9	4.7	7.7	2.4	6.6	3.2	2.2	7.0	2.3
WT/-32C>A	1.1	8.9	4.7	10.3	2.7	24.1	6.4	1.8	3.4	2.8
WT/-30T>C	6.1	0.9	4.9	10.7	3.6	12.8	6.5	2.6	7.0	2.7
WT/-29A>G	4.3	14.6	1.1	10.6	3.3	15.9	6.6	2.0	8.2	3.2
WT/-28A>G	9.2	18.3	5.9	1.3	2.8	5.5	3.9	1.8	6.2	2.9
WT/CAP+40-+43(-AAAC)	6.2	10.3	4.9	13.9	1.0	13.0	10.2	1.8	3.8	3.0
WT/Int ATG>AGG	6.2	6.5	4.1	9.3	3.3	1.1	7.4	2.0	10.1	4.1
WT/CD14-15(+G)	7.5	4.1	5.9	14.6	3.8	12.8	1.0	2.6	7.5	3.0
WT/CD17A>T	5.6	7.3	4.7	10.8	3.2	12.6	8.8	0.8	8.2	3.2
WT/C D26G>A	7.6	9.5	5.1	10.6	3.2	20.8	7.4	1.9	1.0	4.7
WT/CD27-28(+C)	5.1	8.2	4.4	9.6	2.5	14.6	6.8	1.8	4.0	1.0
WT/IVS-1-1(G>T)	6.0	9.5	4.5	10.0	2.7	18.2	8.2	1.8	3.3	3.1
WT/IVS-1-5(G>C)	4.6	9.7	4.0	10.0	2.7	18.3	8.5	1.7	4.2	3.1
WT/CD31(-C)	6.7	5.4	6.7	12.5	4.0	14.1	8.0	2.5	8.5	3.1
WT/CD41-42(-TCTT)	8.4	14.3	6.0	11.6	3.4	24.0	9.6	1.7	9.1	3.1
WT/CD43(G>T)	6.9	8.4	4.9	10.1	3.2	16.3	7.6	1.8	8.5	3.3
WT/CD71-72(+A)	8.2	8.8	6.0	13.4	3.3	22.2	11.9	2.1	13.4	4.5
WT/IVS2-654C>T	5.7	6.3	4.1	7.7	2.9	13.0	7.9	1.9	10.2	3.7
WT/aWS	6.4	10.1	5.4	8.4	2.7	6.8	4.0	2.4	7.3	2.7
WT/aQS	5.4	9.2	4.8	6.9	2.6	5.3	3.4	2.2	5.8	2.6
WT/aCS	5.9	9.0	4.7	10.7	2.9	12.2	8.0	1.7	3.3	3.0

续表 4

Sample	Probe									
	IVS-1-1(G>T)	IVS-1-5(G>C)	CD31(-G)	CD41-42(-TCTT)	CD43(G>T)	CD71-72(+A)	IVS2-654C>T	aWS	aQS	aCS
WT/WT	8.9	4.2	13.4	3.3	11.8	5.4	3.2	11.5	5.6	12.8
WT/-32C>A	13.0	4.6	17.7	6.4	25.8	9.3	14.5	10.2	8.1	20.2
WT/-30T>C	16.1	10.3	9.6	5.5	15.1	7.7	5.3	10.0	5.6	20.9
WT/-29A>G	17.4	8.5	12.0	2.5	16.7	6.5	8.1	10.5	7.6	17.4
WT/-28A>G	7.8	5.0	6.5	3.2	20.5	6.8	6.7	10.3	7.1	6.8
WT/CAP+40-+43(-AAAC)	15.8	4.4	20.3	7.6	34.3	7.0	11.7	18.9	7.6	26.7
WT/Int ATG>AGG	20.6	10.8	10.7	2.4	16.8	8.1	2.8	8.7	6.8	21.6
WT/CD14-15(+G)	15.5	10.3	11.3	5.4	20.8	6.2	3.9	11.9	7.0	21.4
WT/CD17A>T	15.8	8.4	10.5	2.4	25.8	6.7	6.9	10.5	6.8	20.8
WT/C D26G>A	16.1	9.0	10.3	2.4	16.7	6.2	5.5	9.8	6.6	28.7
WT/CD27-28(+C)	14.0	5.4	20.0	6.6	51.5	7.9	10.1	10.5	7.2	36.9
WT/IVS-1-1(G>T)	1.2	13.5	36.4	6.2	16.8	8.8	18.3	93.9	8.3	75.4
WT/IVS-1-5(G>C)	18.7	0.9	14.7	8.9	24.8	7.8	10.2	16.4	10.6	20.9
WT/CD31(-C)	19.5	11.6	1.2	7.2	25.4	9.1	6.7	22.6	9.8	26.8
WT/CD41-42(-TCTT)	15.0	9.4	14.2	1.0	35.4	5.6	10.3	20.1	10.1	42.7
WT/CD43(G>T)	18.2	8.9	11.0	3.1	0.9	7.6	7.4	10.0	7.7	22.3
WT/CD71-72(+A)	35.0	13.6	24.8	2.9	35.2	1.1	16.1	13.2	12.8	31.9
WT/IVS2-654C>T	23.1	8.0	30.7	2.6	30.8	6.9	1.2	29.8	12.6	24.7
WT/aWS	10.1	5.8	9.8	3.1	11.2	6.1	4.9	1.0	5.4	17.3
WT/aQS	6.8	4.1	7.3	2.1	8.1	4.1	3.3	8.6	0.8	7.6
WT/aCS	13.5	5.1	11.7	4.3	23.3	4.5	9.0	12.6	6.7	1.5

此外,表 4 为 20 种不同的点突变型 α/β 地贫及野生型标本的地贫基因结果。表 5 为缺失型 α 地贫的 MFI 值。每个样本重复检测 4 次,取平均 MFI 值。以上数据表明,多重 PCR 结合悬浮阵列技术的用法用于检测 α/β -地贫是可行的。

表 5 缺失型 α 地贫检测 MFI 值

Sample	Probe				Previous Gap-PCR results
	$\alpha 2$	$-\alpha 4. 2/\alpha\alpha$	$-\alpha 3. 7/\alpha\alpha$	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	
1	3017	145	42	151	WT
2	3720	1540	79	236.5	$-\alpha 4. 2/\alpha\alpha$
3	3467	100	3369	391	$-\alpha 3. 7/\alpha\alpha$
4	3247	185	130	1996	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$

2.2 临床验证 共有来自广东省地贫防控的 81052 份临床标本用于地贫悬浮阵列技术的临床验证。共检出 12296 (15.20%) 例携带地贫基因,其中 8975 (11.07%) 例携带 α 地贫基因,2857 (3.520%) 例携带 β 地贫基因,464 (0.57%) 例携带 α 地贫基因及 β 地贫基因。地贫悬浮阵列技术检出的基因型如表 6。各基因型的频率与以往中国南方人群的地贫基因频率的报道是一致的^[23, 24]。最常见的 3 种 α 地贫基因分别占总 α 地贫的比例分别为 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ (51.10%)、 $-\alpha 3. 7/\alpha\alpha$ (25.10%)、 $-\alpha 4. 2/\alpha\alpha$ (11.00%), 而 87.01% 的 β 地贫为 $\beta 41-42/\beta A$ 、 $\beta 654/\beta A$ 、 $\beta-28/$

βA 和 $\beta 17/\beta A$ 。为了进一步验证本方法的有效性,随机选取 2% 的野生型标本和 2% 的突变型标本,分别用 gap-PCR 检测缺失型地贫及 DNA 测序技术检测点突变型,结果完全与地贫悬浮阵列技术一致。

表 6 广东省地贫防控项目流调标本检测结果

Variable	Number of samples	Percent
α Thalassemia mutations	8975	11.07%
$-\text{SEA}/-\text{SEA}$	5	0.01%
$-\text{SEA}/-\alpha 3. 7$	74	0.09%
$-\text{SEA}/-\alpha 4. 2$	26	0.03%
$-\text{SEA}/\alpha \text{CS}\alpha$	8	0.01%
$-\text{SEA}/\alpha \text{QS}\alpha$	5	0.01%
$-\text{SEA}/\alpha \text{WS}\alpha$	19	0.02%
$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	4585	5.66%
$-\alpha 3. 7/-\alpha 3. 7$	11	0.01%
$-\alpha 3. 7/-\alpha 4. 2$	18	0.02%
$-\alpha 3. 7/\alpha \text{CS}\alpha$	4	0.00%
$-\alpha 3. 7/\alpha \text{QS}\alpha$	3	0.00%
$-\alpha 3. 7/\alpha \text{WS}\alpha$	11	0.01%
$-\alpha 3. 7/\alpha\alpha$	2253	2.78%
$-\alpha 4. 2/\alpha \text{CS}\alpha$	4	0.00%
$-\alpha 4. 2/\alpha \text{QS}\alpha$	3	0.00%
$-\alpha 4. 2/\alpha \text{WS}\alpha$	7	0.01%
$-\alpha 4. 2/\alpha\alpha$	987	1.22%
$\alpha \text{CS}\alpha/\alpha\alpha$	208	0.26%
$\alpha \text{QS}\alpha/\alpha\alpha$	141	0.17%
$\alpha \text{WS}\alpha/\alpha\alpha$	603	0.74%

续表 6

Variable	Number of samples	Percent
β Thalassemia mutations	2857	3.52%
β -28/ β -28	1	0.00%
β -28/ β 17	2	0.00%
β -28/ β A	384	0.47%
β -28/ β E	1	0.00%
β -28/ β A, β Cap/ β A	1	0.00%
β -29/ β A	35	0.04%
β 14-15/ β A	26	0.03%
β 17/ β 41-42	1	0.00%
β 17/ β A	231	0.29%
β 27-28/ β A	46	0.06%
β 41-42/ β -28	4	0.00%
β 41-42/ β A	1096	1.35%
β 41-42/ β Cap	2	0.00%
β 43/ β A	23	0.03%
β 654/ β A	775	0.96%
β 71-72/ β A	64	0.08%
β Cap/ β A	58	0.07%
β E/ β 41-42	2	0.00%
β E/ β A	80	0.10%
β Int/ β A	3	0.00%
β IVS-1/ β A	17	0.02%
β IVS-5/ β A	2	0.00%
β 41-42/ β 43	1	0.00%
β 41-42/ β 654	1	0.00%
β -32	1	0.00%
α and β Thalassemia mutations	464	0.57%
SEA/ α 3.7, β 41-42/ β A	1	0.00%
SEA/ α 3.7, β 654/ β A	2	0.00%
SEA/ α 3.7, β 17/ β A	1	0.00%
SEA/ α 4.2 α , β 654/ β A	1	0.00%
SEA/ α CS α , β 41-42/ β A	2	0.00%
SEA/ $\alpha\alpha$, β -28/ β A	33	0.04%
SEA/ $\alpha\alpha$, β -28/ β IVS-1	1	0.00%
SEA/ $\alpha\alpha$, β -29/ β A	2	0.00%
SEA/ $\alpha\alpha$, β 17/ β A	20	0.02%
SEA/ $\alpha\alpha$, β 41-42/ β A	68	0.08%
SEA/ $\alpha\alpha$, β 654/ β A	57	0.07%
SEA/ $\alpha\alpha$, β 71-72/ β A	5	0.01%
SEA/ $\alpha\alpha$, β E/ β A	11	0.01%
SEA/ $\alpha\alpha$, β IVS-5/ β A	1	0.00%
SEA/ $\alpha\alpha$, β 27-28/ β A	3	0.00%
SEA/ $\alpha\alpha$, β 43/ β A	1	0.00%
SEA/ $\alpha\alpha$, β -20/ β A	1	0.00%
α 3.7/ $\alpha\alpha$, β -28/ β A	19	0.02%
α 3.7/ $\alpha\alpha$, β 17/ β A	11	0.01%
α 3.7/ $\alpha\alpha$, β 41-42/ β A	48	0.06%
α 3.7/ $\alpha\alpha$, β 654/ β A	29	0.04%
α 3.7/ $\alpha\alpha$, β 71-72/ β A	3	0.00%
α 3.7/ $\alpha\alpha$, β IVS-5/ β A	1	0.00%
α 3.7/ $\alpha\alpha$, β -29/ β A	2	0.00%
α 3.7/ $\alpha\alpha$, β IVS-1/ β A	2	0.00%

续表 6

Variable	Number of samples	Percent
α 3.7/ $\alpha\alpha$,WS/WS	1	0.00%
α 3.7/ α CS α , β 17/ β A	1	0.00%
α 3.7/ α CS α , β 41-42/ β A	1	0.00%
α 3.7/ α WS α , β -28/ β A	1	0.00%
α 4.2/ $\alpha\alpha$, β -28/ β A	12	0.01%
α 4.2/ $\alpha\alpha$, β 17/ β A	12	0.01%
α 4.2/ $\alpha\alpha$, β 41-42/ β A	22	0.03%
α 4.2/ $\alpha\alpha$, β 654/ β A	8	0.01%
α 4.2/ $\alpha\alpha$, β 43/ β A	1	0.00%
α 4.2/ $\alpha\alpha$, β 71-72/ β A	1	0.00%
α 4.2/ $\alpha\alpha$, β Cap/ β A	3	0.00%
α 4.2/ $\alpha\alpha$, β E/ β A	2	0.00%
α 4.2/ α QS α , β 41-42/ β A	1	0.00%
α CS α / $\alpha\alpha$, β -28/ β A	2	0.00%
α CS α / $\alpha\alpha$, β 17/ β A	3	0.00%
α CS α / $\alpha\alpha$, β 41-42/ β A	8	0.01%
α CS α / $\alpha\alpha$, β 654/ β A	2	0.00%
α CS α / $\alpha\alpha$, β E/ β A	2	0.00%
α CS α / $\alpha\alpha$, β 27-28/ β A	1	0.00%
α WS α / $\alpha\alpha$, β 41-42/ β A	15	0.02%
α WS α / $\alpha\alpha$, β 654/ β A	5	0.01%
α WS α / $\alpha\alpha$, β IVS-1/ β A	1	0.00%
α WS α / $\alpha\alpha$, β 71-72/ β A	2	0.00%
α WS α / $\alpha\alpha$, β E/ β A	2	0.00%
α WS α / $\alpha\alpha$, β 17/ β A	2	0.00%
α WS α / $\alpha\alpha$, β E/ β A	2	0.00%
α WS α / $\alpha\alpha$, β 14-15/ β A	1	0.00%
α WS α / $\alpha\alpha$, β -28/ β A	1	0.00%
α WS α / $\alpha\alpha$, β 17/ β A	1	0.00%
α QS α / $\alpha\alpha$, β 27-28/ β A	1	0.00%

3 讨论

目前广泛用于临床地贫检测的方法由于耗时耗力已不适用于大样本筛查^[25]。随着技术的不断发展,新技术不断涌现,比如基因芯片技术也已经应用于地贫的诊断中。生物芯片具有高通量、高集成、微型化、连续化和自动化等特点,可将 α 、 β 地贫诊断在一张芯片上完成,适用于大量人口筛查。生物芯片主要包括基因芯片和蛋白芯片两大类,按寻址方式和最终检测载体又可分为固相芯片(solid microarray)和悬浮阵列技术(suspension array)。尽管固相芯片对于小样本量、多重位点的检测,其灵敏度和特异度都较好,但由于反应面积、空间效应、表面张力等对反应的干扰,其杂交动力反应差。此外,固相芯片通量小,一次仅能检测 8 个样本。悬浮阵列技术

与固相芯片相比,主要具有以下优点:①悬浮阵列技术增加了杂交反应面积,提高了检测效能;②微球直径小,容易混悬在液体中,且液体环境有利于分子间的相互作用,从而提高检测速度;③克服了固相芯片在大分子检测时受空间效应、表面张力等对反应的干扰,检测结果的准确性和可重复性大大提高;④自动化程度高。悬浮阵列技术是一种以经过特殊编码、可识别的微球作为生物分子(抗原、抗体、蛋白质、核酸等)反应及信号检测载体的阵列分析技术。迄今为止,悬浮阵列技术已被广泛应用于诸多领域,如基因分型,细胞因子及甲状腺激素的检测,HLA分型(human lymphocyte antigen (HLA)),及自身免疫性疾病的诊断^[26-29]。本实验组研发了一个能同时检测缺失型和点突变型地贫基因的简单易行的技术平台。具有以下优点:首先,本平台理论上一次反应可以检测一百人份标本,大大提高了检测通量^[30];其次,本平台使用的微球均有良好的生物相容性,稳定性高,容易洗脱和分离;第三,悬浮阵列技术规避了固相芯片技术的缺点。探针与目标分子混悬在液体中,有利于分子间的相互作用,提高了检测速度及检测结果的准确性和可重复性,使得本方法适用于大规模筛查。

地中海贫血是中国南方人群发病率最高,影响最大的单基因遗传性疾病。了解广东省各地区地中海贫血育龄夫妇患病现状,有利于为高风险家庭提供遗传咨询和及早干预。本研究所使用的地贫基因悬浮阵列技术平台可同时检测20种突变型地贫基因与3种缺失型地贫基因,以往研究表明这23种常见突变占我国人群全部突变的98%以上。利用已知基因型的样本对本实验的多重PCR反应及杂交反条件应进行优化。利用广东省妇幼保健院生物样品银行中200多例已知地贫基因型的样本评估引物和探针的性能,以及确定给突变位点检测探针的截断值(cut-off value)。地贫悬浮阵列技术的检测结果与已知的地贫基因型是完全一致的,灵敏度和特异度均为100%,表明本方法临床适用性良好。另外,由于本方法检测通量高,平均每天可检测800例标本。本方法已用于检测广东省地中海贫血流行现状基线调查中的81 052份标本^[5]。结果与以往报

道基本一致,而大规模大样本量的研究与科学的抽样方法使得本研究结果更具有代表性以及更接近流行现状。结果表明,东南亚型 α 地贫占全部 α 地贫的51.10%,最常见的 β 地贫是CD41-42(-TCTT)和IVS2-654C>T,这两种地贫加上CD17A>T、-28A>G、IVS-1-5(G>C)、IVS-1-1(G>T)和CD71-72(+A)占全部 β 地贫的90%以上。令人注意的是,有两种 β 突变的(CD17A>T、CD41-42(-TCTT))发生率显著高于以往报道,表明这两种 β 地贫携带率近几年可能有上升趋势,此结论需在更大的样本中验证。

虽然目前本平台仅能检测23种地贫基因,但基于其平台优势,本方法也可扩展到其他基因型的检测。尽管 β 地贫基因突变类型有地域、种族特异性,目前已发现了超过250种突变。本平台已囊括中国人群常见的 β 地贫基因位点,余位点也可设计检测探针进行检测。例如,本实验中根据地中海贫血初步筛查血常规及血红蛋白电泳结果提示有2例参与者可能携带相对罕见的致病基因。但由于本平台未设计罕见地贫基因的检测,故结果提示是阴性的。基于本平台检测常见突变的高灵敏度和特异度,我们推测这2例标本所携带的致病基因未在检测范围内,故我们利用DNA测序技术检测到了相对罕见的致病基因rs111033605和rs34484056。据估计,这两种突变类型的携带率为1%左右,所以我们决定在以后的平台中引入这两种突变类型的检测。本方法展示了良好的多种基因突变检测的可扩展性。

传统的地中海贫血基因的检测需要分别用缺失型和突变型两种商业试剂盒,成本相对较高。本平台可在并行检测缺失型和突变型地贫,可大大提高检测量,减少周转时间,节约人力资源及降低试剂盒与设备成本。

4 结 论

悬浮阵列技术是一种快速、准确、自动及多重检测技术。因本平台可并行检测3种缺失型和20种突变型 α/β 地贫,被认为是适用于大规模地贫筛查的可靠的诊断技术。

参 考 文 献

- [1] Lau YL, Chan LC, Chan YY, et al. Prevalence and genotypes of alpha- and beta-thalassemia carriers in Hong Kong—implications for population screening[J]. *N Engl J Med*, 1997,336(18): 1298-1301.
- [2] Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in South-east Asia[J]. *Hemoglobin*, 1987,11(1): 65-88.
- [3] Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, et al. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *J Med Genet*, 2005,42(12): 922-931.
- [4] Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2010,5: 11.
- [5] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of alpha- and beta-globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89855.
- [6] Muncie HJ, Campbell J. Alpha and beta thalassemia[J]. *Am Fam Physician*, 2009, 80(4): 339-344.
- [7] Xu X, Liao C, Liu Z, et al. Antenatal screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in a Chinese population: prevalence of the beta-thalassemia trait in the Guangzhou area of China[J]. *Hum Genet*, 1996,98(2): 199-202.
- [8] Zeng YT, HuangSZ. Disorders of haemoglobin in China[J]. *J Med Genet*, 1987, 24(10): 578-583.
- [9] Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, et al. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletion determinants of alpha-thalassemia[J]. *Blood*, 2000, 95(1): 360-362.
- [10] Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia[J]. *Orphanet J Rare Dis*,2010,5: 13.
- [11] Phylipsen M, Chaibunruang A, Vogelaar IP, et al. Fine-tiling array CGH to improve diagnostics for alpha- and beta-thalassemia rearrangements[J]. *Hum Mutat*, 2012,33(1): 272-280.
- [12] Maggio A, Giambona A, Cai SP, et al. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily[J]. *Blood*, 1993, 81(1): 239-242.
- [13] Cai SP, Wall J, Kan YW, et al. Reverse dot blot probes for the screening of beta-thalassemia mutations in Asians and American blacks[J]. *Hum Mutat*, 1994,3(1): 59-63.
- [14] Braeckmans K, De Smedt SC, Leblans M, et al. Encoding microcarriers: present and future technologies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002,1(6): 447-456.
- [15] Dunbar SA, JacobsonJW. Application of the luminex Lab-MAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study [J]. *Clin Chem*, 2000,46(9): 1498-1500.
- [16] GordonRF, McDadeRL. Multiplexed quantification of human IgG, IgA, and IgM with the FlowMetrixsystem[J]. *Clin Chem*, 1997,43(9): 1799-1801.
- [17] Taylor JD, Briley D, Nguyen Q, et al. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis[J]. *Biotechniques*, 2001,30(3): 661-666, 668-669.
- [18] Ye F, Li MS, Taylor JD, et al. Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification[J]. *Hum Mutat*, 2001,17(4): 305-316.
- [19] Nishigaki Y, Ueno H, Coku J, et al. Extensive screening system using suspension array technology to detect mitochondrial DNA point mutations[J]. *Mitochondrion*, 2010,10(3): 300-308.
- [20] Lau YL, Chan LC, Chan YY, et al. Prevalence and genotypes of alpha- and beta-thalassemia carriers in Hong Kong—implications for population screening [J]. *N Engl J Med*, 1997,336(18): 1298-1301.
- [21] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening[J]. *J Clin Pathol*, 2004,57(5): 517-522.
- [22] Suzuki W, Osaka T, Sekizawa A, et al. Development of a fibrous DNA chip for cost-effective beta-thalassemia genotyping[J]. *Int J Hematol*, 2012,96(3): 301-307.
- [23] Dunbar SA, Jacobson JW. Application of the luminex Lab-MAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study [J]. *Clin Chem*, 2000,46(9): 1498-1500.
- [24] Gordon RF, McDade RL. Multiplexed quantification of human IgG, IgA, and IgM with the FlowMetrixsystem[J]. *Clin Chem*, 1997,43(9): 1799-1801.
- [25] Martins TB. Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(1): 41-45.
- [26] Oliver KG, Kettman JR, Fulton RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system[J]. *Clin Chem*, 1998,44(9): 2057-2060.
- [27] Braeckmans K, De Smedt SC, Leblans M, et al. Encoding microcarriers: present and future technologies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002,1(6): 447-456.

(收稿日期:2015-09-15)

编辑:刘邓浩