

# 荧光 PCR 熔解曲线技术在地中海贫血产前诊断中的应用

马占忠\* 范舒舒 徐静 刘玉兰 钟延东 郭艳乐 肖凤金 吴平

(汕头大学医学院附属粤北人民医院,广东 韶关 512026)

**【摘要】 目的** 探讨荧光 PCR 熔解曲线技术在地中海贫血产前诊断中的应用价值。**方法** 采用 Gap-PCR、PCR+导流杂交和荧光 PCR 熔解曲线技术检测 143 例产前标本的地中海贫血基因,结果不一致时采用 DNA 测序确认。**结果** 143 例产前标本中检出重症地贫 27 例,包括 20 例重型  $\alpha$ -地贫和 7 例重型  $\beta$ -地贫。荧光 PCR 熔解曲线技术在地中海贫血基因产前诊断中符合率 100%。PCR+导流杂交技术检测  $\alpha$ -和  $\beta$ -地中海贫血基因与其他 2 种方法各有 1 例结果不符,经 DNA 测序分析是由于 PCR+导流杂交技术灵敏度高,因存在低比例的母体细胞污染所致。**结论** 荧光 PCR 熔解曲线技术是一种高效、快速、准确的地中海贫血基因检测新技术,可用于地中海贫血产前诊断。地中海贫血产前诊断最好采用 2 种不同技术原理的方法独立检测,保证结果的准确可靠。STR 技术检测母体细胞污染的低灵敏度需要警惕。

**【关键词】** 地中海贫血;产前诊断;荧光 PCR 熔解曲线

**【中图分类号】** R715.5 **【文献标识码】** A

**【Abstract】 Objective** To discuss the application value of fluorescence PCR melting curve technique for prenatal diagnosis of thalassemia. **Method** Gap-PCR, PCR + diversion hybridization and fluorescence PCR melting curve techniques were used to detect thalassemia genes in 143 prenatal specimens. DNA sequencing was confirmed when the results were inconsistent. **Results** 27 cases of severe thalassaemia were detected in 143 prenatal specimens, including 20 cases severe thalassemia and 7 cases severe  $\beta$ -thalassemia. The fluorescence PCR melting curve technique in prenatal diagnosis of thalassemia coincidence rate was 100%. PCR+diversion hybridization detection of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia genes was inconsistent with one of the other two methods. DNA sequencing analysis was due to the high sensitivity of PCR+diversion hybridization technique and has low proportion of maternal cell contamination. **Conclusions** Fluorescence PCR melting curve technology is a efficient and rapid technique for detecting thalassemia gene which can be applied to the prenatal diagnosis of thalassemia. Prenatal diagnosis of thalassemia would be best tested independently using two different technical principles to ensure accurate and reliable results. The low sensitivity of STR technology to detect maternal cell contamination requires attention.

**【Key words】** thalassemia; prenatal diagnosis; fluorescent PCR melting curve

地中海贫血(简称地贫)是全球分布最广、累及人群最多的单基因遗传病,也是危害严重的公共卫

生问题。该病高发于我国南方地区,广东人群地贫基因携带率高达 16.83%<sup>[1]</sup>。重型地贫是致死或致残性遗传病,给患者家庭和社会带来沉重的精神和经济负担。开展产前诊断是预防重症地贫患儿出生最有效的措施<sup>[2]</sup>。目前,地贫基因产前诊断的方法

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2018.04.001

基金项目:韶关市科技计划项目(2017cx/016);韶关市卫生计生科研项目(Y17063)

\* 通讯作者:马占忠, E-mail: mazhanzhong816@163.com

主要有跨越断裂点 PCR 技术(Gap-PCR)、PCR+导流杂交技术等,但这些方法手工操作烦琐、耗时长,且实验过程中的影响因素多等局限性<sup>[3]</sup>。广东省卫生计生委颁布的《地中海贫血产前诊断技术规范》中要求地贫基因产前诊断的标本需要两次独立检测,结果一致时方可发出报告。因此,临床上迫切需要一种更加高效、快速、准确的新技术用于地贫基因产前诊断。本研究将探讨荧光 PCR 熔解曲线法在地贫基因产前诊断中的应用价值。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 1 月至 2018 年 5 月到粤北人民医院进行地贫基因产前诊断的 143 例标本(包括 130 例羊水、7 例绒毛和 6 例脐血)。孕妇及家属签署知情同意后,经有资质的临床医生在 B 超引导下按标准操作规程采集产前标本送检。

仪器: BIOER PCR 仪、BIO-RAD CFX96 荧光定量 PCR 仪、DYY-8C 电泳仪、ChampGel5000 凝胶成像分析仪、HB-2012A 核酸杂交仪、ABI3130xl 遗传分析仪、Sebiacapillars2 fp 电泳仪和 Thermo CO<sub>2</sub> 恒温培养箱等。

### 1.2 方法

1.2.1 鉴定产前标本有无母体细胞污染 用 STR 鉴定绒毛和羊水标本有无母体细胞污染,血红蛋白电泳鉴定脐血标本有无母血污染。羊水标本发现肉眼可见的红细胞污染时先进行羊水细胞培养,再取贴壁细胞进行鉴定和地贫基因检测。

1.2.2 地贫基因检测  $\alpha$ -地贫和  $\beta$ -地贫基因按标准操作规程和试剂盒说明书进行检测。每份标本均用 3 种方法检测。有结果不一致时,送亚能生物技术有限公司和广东凯普生物科技股份有限公司进行 DNA 测序确认。

1.2.3 随访确认 对进行产前诊断后出生或流产、引产的胎儿进行地贫基因复查和随访,以确认产前诊断结果准确可靠。

## 2 结果

2.1 绒毛和羊水标本经 STR 分析,脐血标本经血红蛋白电泳分析均未发现母体细胞污染。

2.2 产前地贫基因检测结果 共检测了 143 例产前地贫基因(包括 116 例产前  $\alpha$ -地贫基因和 27 例产前  $\beta$ -地贫基因),检出重型  $\alpha$ -地贫 20 例,重型  $\beta$ -地贫 7 例。

荧光 PCR 熔解曲线法检测 116 例产前  $\alpha$ -地贫基因标本与 Gap-PCR 检测结果均一致,与导流杂交法有 1 例不符,荧光 PCR 熔解曲线法和 Gap-PCR 检测结果是  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ,导流杂交法检测结果是  $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ ,该标本 DNA 测序结果为  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ,经实验分析是由于该例绒毛标本有极微量母体细胞污染,导流杂交法灵敏度高,导致假阳性。荧光 PCR 熔解曲线法检测结果符合率达 100%,见表 1。

表 1 116 例产前  $\alpha$ -地贫基因检测结果

表型	基因型	Gap-PCR (例)	导流杂交法 (例)	荧光 PCR 熔解 曲线法(例)	构成比 (%)
正常	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	31	31	31	26.73
静止型	$\alpha\alpha/\alpha^{\text{CS}}\alpha$	2	2	2	1.72
静止型	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	1	0	1	0.86
标准型	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	58	58	58	50.00
中间型	$-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$	2	3	2	1.72
中间型	$-\text{SEA}/\alpha^{\text{WS}}\alpha$	1	1	1	0.86
中间型	$-\text{SEA}/\alpha^{\text{CS}}\alpha$	1	1	1	0.86
重型	$-\text{SEA}/-\text{SEA}$	20	20	20	17.24
合计		116	116	116	100

荧光 PCR 熔解曲线法检测 27 例产前  $\beta$ -地贫基因标本与 PCR-反向点杂交技术检测结果均相同,与导流杂交法有 1 例不符,荧光 PCR 熔解曲线法和 PCR-反向点杂交技术检测结果是 IVS-II-654M/N,导流杂交法检测结果是 IVS-II-654M/CAPM,该标本 DNA 测序结果为 IVS-II-654M/N,经实验分析是由于该例绒毛标本有低比例母体细胞污染,导流杂交法灵敏度高,导致假阳性。荧光 PCR 熔解曲线法检测结果符合率达 100%,见表 2。

## 3 讨论

荧光 PCR 熔解曲线法是通过荧光 PCR 仪实时监测温度和荧光强度的变化生成熔解曲线,通过分析探针与靶序列形成杂交体的熔点温度( $T_m$ 值),不同突变点有不同的熔解温度,据此计算野生型与突变型  $T_m$  值的差值( $\Delta T_m$ ),即可判断突变位点<sup>[4]</sup>。在临床上已经应用于 G6PD 缺乏症、结核分枝杆菌和沙门菌分型等疾病的检测<sup>[5-7]</sup>。

表2 27例产前 $\beta$ -地贫基因检测结果

表型	基因型	反向点杂交法 (例)	导流杂交法 (例)	荧光 PCR 熔解曲线法 (例)	构成比 (%)
正常	N/N	6	6	6	22.22
轻型	IVS-II-654M/N	5	4	5	18.52
轻型	CD41-42M/N	5	5	5	18.52
轻型	-28M/N	3	3	3	11.11
轻型	CD17M/N	1	1	1	3.70
中间型	IVS-II-654M/CAPM	0	1	0	0
重型	IVS-II-654M/CD41-42M	4	4	4	14.81
重型	IVS-II-654M/17M	2	2	2	7.41
重型	CD17M/-28M	1	1	1	3.70
合计		27	27	27	100

荧光 PCR 熔解曲线法与传统的 PCR+电泳或杂交法比较有以下优点:①快速:PCR 仪直接判读结果,免去了电泳和杂交等繁琐的人工操作环节,整个过程可在 3 小时内出结果;②闭管操作,最大程度减少交叉污染;③基因覆盖范围广:不仅可以判断探针覆盖的突变类型,还可以发现探针覆盖区域的未知突变点;④检测结果可直接导入实验室信息系统,减少人工判读和输入时的差错<sup>[8]</sup>。

荧光 PCR 熔解曲线法也存在局限性:①可检测到探针覆盖区域的其他突变,但是无法判断具体类型,还需要通过其他方法进一步确诊;②仪器自动判读有时会出错,需要人工对每个标本每个通道的峰型进行判断和审核;③仪器要求高,需要仪器具备多通道荧光检测和高分辨熔解曲线分析功能。

任何一种检测技术均存在其方法学的优缺点。根据国家规定,产前诊断项目需两次独立检测,结果一致时方可发出报告。实践证明,最好采用不同技术原理的两种方法独立检测,相互验证,提高准确率,防止漏诊误诊造成的严重后果,为预防出生缺陷提供技术保障。

本研究中 143 例产前样本中检出重型地贫 27 例,经遗传咨询医生与孕妇及家属进行沟通,在签署知情同意后选择了终止妊娠,有效避免了重症地贫患儿的出生。尤其开展 11~14 周绒毛产前地贫基因检测,可以更大程度地减轻对孕妇的身心伤害。但绒毛采样流产风险和母体细胞污染的风险需要警惕。本研究中经 STR 检测均未发现母体细胞污染,但在地贫基因检测发现 2 例绒毛标本,导流杂交法

与其他两种方法检测结果不一致,最终测序分析是由于发生低比例的母体细胞污染所致。导流杂交法检测地贫基因的高灵敏度和 STR 检测母体细胞污染的低灵敏度都值得警惕。肖奇志等<sup>[9]</sup>报道中也表明导流杂交法灵敏度高于其他方法。有研究证实当母体细胞污染比例小于 10%时,STR 方法可能无法测出<sup>[10,11]</sup>。实践中仍需探索排除产前诊断标本母源污染的有效方法,避免误诊。

综上所述,荧光 PCR 熔解曲线法检测 143 例产前地贫基因结果与传统的 Gap-PCR 和反向点杂交技术检测结果一致,结果准确可靠,可应用于地中海贫血基因产前诊断。

#### 参 考 文 献

- [1] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene mutations in 14332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89855.
- [2] Rund D. Thalassemia 2016: Modern medicine battles an ancient disease[J]. Am J Hematol, 2016, 91(1): 15-21.
- [3] 李继慧,覃运荣,梁毅.地中海贫血的实验室分子诊断技术研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(3): 202-205.
- [4] 王姣,尤崇革.高分辨溶解曲线技术及应用新进展[J].兰州大学学报(医学版),2016,42,(5):55-61.
- [5] 严提珍,钟青雁,唐宁,等.多色探针 PCR 熔解曲线法在 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.
- [6] 马艳艳,李辉,赵东阳,等.荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结核分枝杆菌耐利福平突变研究[J].中国国境卫生检疫杂志,2011,34(6):451-454.
- [7] 盛翔宇,张治杰,薛文成,等.聚合酶链反应-高分辨溶解曲线

技术在常见的沙门菌分型中的应用研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2015, 9(3): 409-413.

[8] 郝颖, 蒋妮萍, 徐晓昕, 等. 多色探针熔解曲线技术在 $\beta$ 地中海贫血产前基因诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(3): 192-196.

[9] 肖奇志, 王格, 李恋湘, 等. 不同原理的 PCR 方法用于地中海贫血产前诊断的验证应用[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(6): 994-996.

[10] 杨昕, 李发涛, 甄理, 等. 产前诊断病例母体细胞鉴定污染方法

的建立及临床应用[J]. 中国妇幼健康研究, 2015, 26(4): 815-817.

[11] Li DZ, Yang YD. Invasive prenatal diagnosis of fetal thalassaemia[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 39: 41-52.

(收稿日期: 2018-09-18)

编辑: 宋文颖