

液相芯片技术在地中海贫血基因诊断中的应用

黄培坚, 邓文成, 尹志军

(南方医科大学附属小榄医院检验科, 广东 中山 528415)

【摘要】 目的 探讨液相芯片技术在地中海贫血(以下简称地贫)基因诊断中的临床价值。方法 收集南方医科大学附属小榄医院 2017 年 1~6 月已确诊的各类地贫基因型患者血液标本 832 份, 采用液相芯片技术进行地贫基因检测; 同时采用跨越断裂点 PCR 法(Gap-PCR)对 α 缺失型进行验证, 采用 PCR 反点膜杂交法(PCR-RDB)对 α 和 β 突变型进行验证, 并比较两种方法的检测结果; 若两种检测方法结果不一致则用基因测序作最终验证。结果 两种方法检测结果总符合率为 99.199%, 总 Kappa 值为 0.982, 液相芯片法出现黄区或灰区标注的结果, 使用分析软件进行人工判读后, 一致率达到 100%。结论 液相芯片技术能同时检测 α 地贫缺失型和 α 、 β 地贫突变型, 适合大批量标本运作, 具有极大的临床应用潜力。

【关键词】 地中海贫血; 液相芯片; 基因诊断

【中图分类号】 R556 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)15-2128-03

Application of liquid chip technology in the gene diagnosis of thalassemia. HUANG Pei-jian, DENG Wen-cheng, YIN Zhi-jun. Department of Clinical Laboratory, Xiaolan Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan 528415, Guangdong, CHINA

【Abstract】 **Objective** To the clinical value of liquid chip technology in the gene diagnosis of thalassemia. **Methods** A total of 832 blood samples from patients with thalassemia in Xiaolan Hospital Affiliated to Southern Medical University from January 2017 to June 2017 were collected, which were detected by liquid chip technology; Gap PCR method (Gap-PCR) was used to verify the α absent type, and PCR reverse membrane hybridization (PCR-RDB) was applied to verify the α and β mutant type. The results of two detection methods were compared. Gene sequencing was performed for final verification if the results of the two methods were not consistent. **Results** The total coincidence rate of the two methods was 99.199%, and the total Kappa value was 0.982. Yellow or gray area labeled results appeared in the liquid chip method, and the concordance rate reached 100% after the manual analysis by software. **Conclusion** Liquid chip technology can simultaneously detect α -thalassemia of absent type, α - and β - thalassemia of mutant type, which is suitable for mass sample operation and has great potential for clinical application.

【Key words】 Thalassemia; Liquid chip; Gene diagnosis

液相芯片技术是以 100 种不同荧光编码的微球作为探针的载体, 生物分子间的反应在悬浮液体系中进行的一类新的生物芯片技术, 液相芯片技术被用于检测方法的生物大分子, 如 DNA 检测、免疫检测、细胞因子检测、激素检测、环境调查与分析^[1]。地中海贫血(thalassemia)是最常见的人类单基因遗传性血液病, 是一组由于珠蛋白基因缺陷导致珠蛋白链合成比例失衡引起的遗传性溶血性贫血, 而跨越断裂点 PCR 技术和 PCR 反点膜杂交法技术(以下简称传统方法)是现时地中海贫血基因诊断主流而传统的检测方法^[2-3]。本研究旨在探讨液相芯片技术用于地贫基因诊断的优势与临床价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集南方医科大学附属小榄医院 2017 年 1~6 月期间已确诊的各类地贫基因型患者血液标本 832 份, 为方便统计计算各组数据, 选取的血液标本均为单一基因型患者, 排除复合两种基因型患

者, 每份样本均取静脉血 2 mL 置于无菌抗凝管中, 抗凝剂采用 EDTA-2K 抗凝。

1.2 试剂 地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒(PCR-流式荧光杂交法)以及配套质控品。 α -地中海贫血基因检测试剂盒(Gap-PCR 法)、 β 地中海贫血基因分型检测试剂盒(PCR-反向膜杂交法)、非缺失型 α -地中海贫血点突变基因检测试剂盒(PCR-反向膜杂交法), 以上试剂由中山大学达安基因股份有限公司(广东广州)生产提供。

1.3 仪器 Luminex MAGPIX 多功能液相悬浮芯片系统(Luminex 公司, 美国)、核酸提取仪(DA Smart32 型)、PCR 扩增仪(ABI2720 型)、琼脂糖凝胶电泳仪等。

1.4 方法

1.4.1 核酸提取与扩增 采用 DASmart32 型核酸提取仪进行核酸提取, 提取后的核酸样本采用 PCR 扩增仪 ABI2720 型进行扩增。

通讯作者: 黄培坚。E-mail: 68164877@qq.com

1.4.2 Gap-PCR 和 PCR 反向膜杂交法 采用 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测^{-37/αα}、^{-42/αα}、^{-SEA/αα} 三种常见缺失型α地中海贫血,采用 PCR 反向膜杂交法检测αCS、αQS、αWS 三种常见的α点突变型地中海贫血以及包括-29 (A→G)、-28 (A→G)、CD17 (A→T)、βE (GAG→AAG)、CD41-42 (-TTCT)、CD43 (G→T)、CD71-72 (+A)、IVS- II -654 (C→T) 8种常见的突变型β地中海贫血,具体实验步骤严格按照试剂说明书和 SOP 作业指导文件进行操作。

1.4.3 液相芯片法 使用 PCR 技术和多重微珠杂交技术,针对地中海贫血的突变热点设计 PCR 引物和杂交探针,分别加入核酸提取样本 2.5 μL 到 PCR Mix A 管(α、β突变管)和 PCR Mix B 管(α缺失管),使用 PCR 扩增仪进行扩增,标记的 PCR 产物与微珠杂交,加入显色剂上机检测,根据信号的高低对检测结果进行判断,具体实验步骤严格按照试剂说明书和仪器操作使用说明书进行操作。

1.5 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理和统计学分析。符合率等计数资料以百分率表示,地贫基因检测结果一致性分析采用 Kappa 检验,≤0.4 表示一致性很差,0.4~0.6 表示中度一致性,0.6~0.8 表示高度一致性,≥0.8 表示一致性极好。

2 结果

2.1 α缺失组结果比较 该组 832 例结果中,Gap-PCR 法与液相芯片法阳性率均为 62.139% (517/832),两种方法结果一致率为 100% (Kappa 值为 1)。

2.2 α突变组结果比较 液相芯片法在αCS、αQS、αWS 三项中均出现 17 个黄区,原因是α链出现 3.7/4.2 和 SEA 的双缺失,α突变位点断裂掉了,判读软件报黄色警告,这 17 例α突变结果本文列为假阳性结果。PCR-反向膜杂交法阳性率为 7.572% (63/832),液相芯片法阳性率为 9.615% (80/832),两种方法结果一致率为 97.957% (Kappa 值为 0.87)。

2.3 β突变组结果比较 液相芯片法中 CD17 (A→T)项和 CD41-42 (-TTCT)项均有 1 例经软件判读报灰色警告的结果,原因是软件暂时无法区分纯合子和杂合子,这两例结果本文列为假阴性结果处理,而 CD43 (G→T)项的 1 例黄色警告结果为假阳性结果。PCR-反向膜杂交法阳性率为 30.288% (252/832),液相芯片法阳性率为 30.168% (251/832),两种方法结果一致率为 99.639% (Kappa 值为 0.992)。

以上两种方法不一致的结果分析均与基因测序结果相符,832 份样本分为三组,两种方法合计 4 992 个实验结果,均未出现无效结果,各基因型阳性例数分布见表 1,两种检测方法的一致性评价见表 2。

表 1 传统方法和液相芯片法检测阳性例数比较

基因型	分类	传统方法(例)	液相芯片法(例)	
			确诊区	灰区、黄区
α缺失组	静止型(^{-37/αα} 、 ^{-42/αα})	156	156	0
	标准型(-- ^{SEA/αα})	344	344	0
	中间型(^{-37/α/-SEA} 、 ^{-42/α/-SEA})	17	17	0
α突变组	αCS(Constant Spring)	34	34	17
	αQS(Quong Sze)	7	7	17
	αWS(Westmead)	22	22	17
β突变组	-29(A→G)	2	2	0
	-28(A→G)	28	28	0
	CD17(A→T)	44	43	1
	βE(GAG→AAG)	12	12	0
	CD41-42(-TTCT)	99	98	1
	CD43(G→T)	2	2	1
	CD71-72(+A)	10	10	0
	IVS- II -654(C→T)	55	55	0

表 2 两种方法各组符合率和 Kappa 值

组别	例数	符合率(%)	Kappa 值
α缺失组	832	100.00	1
α突变组	832	97.96	0.87
β突变组	832	99.64	0.992
总数	2 496	99.20	0.982

3 讨论

地中海贫血是一组严重影响生活甚至致死的遗传性血液病,是世界上发病率最高、危害性最大的单基因

遗传病之一^[4]。全世界至少有 3.45 亿人携带地贫的致病基因,我国则主要分布于长江以南地区,尤其以广东、广西及海南为高发,其中广西地区发病率最高,α地贫和β地贫发病率分别约为 17.55%和 6.43%^[5]。地贫尚无有效的治疗方法,遗传咨询、产前诊断以及在我国南方开展大人群的分子筛查是防治该疾病的首要途径^[6]。婚前、孕期或产前夫妻双方地贫基因检查,对控制重型地贫患儿的出生,提高出生人口素质具有重要意义^[7]。

目前,地中海贫血基因诊断应用的主流技术都是基于 PCR 反应基础上的基因突变分析技术^[8],单管多重跨越断裂点 PCR 技术(Gap-PCR)是现时检测 α 地贫基因缺失型的主流方法^[2,8], α 与 β 地贫点突变基因型的检测方法则是 PCR 反点膜杂交(RDB)技术^[3,9]。传统方法需要繁琐的抄写和洗涤等手工操作,不适合大批量标本运作,同时还存在着杂交时间长、实验结果肉眼判读、显色污染容易造成误判等缺点。本研究采用的 Luminex MAGPIX 多功能液相悬浮芯片系统同时检测 α 缺失型和 α 、 β 点突变型两类基因型,能够解决传统方法的缺点。液相芯片(liquid chip)是近年来新出现的一种临床应用型生物芯片,是美国纳斯达克上市的 Luminex 公司研制出的新一代生物芯片技术^[10]。该技术既保持了生物芯片高通量的特性,又具有高灵敏度、高准确度、高精密度和线性测定范围宽及易操作等优点^[11]。

本研究对液相芯片技术和传统方法(Gap-PCR 法、PCR-RDB 法)进行地贫基因分型检测比较,两种方法不一致的实验结果则使用基因测序进行验证。结果显示两种方法检测的总符合率为 97.837%,总 Kappa 值为 0.958,表明两种检测方法的总体一致性极好。在 α 地贫缺失组中两检测方法结果完全一致,符合率 100%,Kappa 值为 1。在 α 突变组的液相芯片法结果中,有 17 例 α 缺失中间型地贫($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{SEA}$ 、 $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{SEA}$)的 α 链出现双缺失,三个突变点(α CS、 α QS、 α WS)位于缺失的部位而造成突变位点没有信号,判读软件不能判读反馈黄色警报信号但属于正常现象,符合率和 Kappa 值分别为 97.957%和 0.870,结合人工判读一致率能达 100%。在 β 突变组中存在 2 例纯合子基因型结果,判读软件对于 β 纯合子这类比较稀有外周血样本暂时不能完美判读,软件判读反馈灰色警报信号需要人工判读结果或复查,两种检测方法在 β 突变组中的符合率和 Kappa 值分别为 99.639%和 0.992。从分析结果上面来看,三组的组内比较差异均无统计学意义且高度相关,在医学决定水平的符合率很高,两种方法 Kappa 一致性评判较好。

Luminex 检测系统采用微流技术使微球快速单列通过检测通道,并使用红色和绿色两种激光分别对单个微球上的分类荧光和报告分子上的报告荧光进行检测。红色激光可将微球分类,从而鉴定各个不同的反应类型(定性);绿色激光可确定微球上结合的报告分子的数量,从而确定微球结合的目的分子的数量(定量)^[12]。液相芯片技术的检测结果为荧光强度值,通过各基因位点相应探针和正常探针(N)杂交信号强度的比值进行软件判读^[13]。该方法涵盖了中国人人群中常见的 α -珠蛋白基因 3 种缺失($-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)、3 种突变(WS122、QS125 和 CS142)及 β -珠蛋白基因 17 种突变基因型^[13]。Gap-PCR 法的制备凝胶、点样、电泳

以及 RDB-PCR 法的膜条杂交、洗涤、显色等需要手工操作的实验步骤并不适合大批量标本运作,难以实现高通量。液相芯片技术则能够实现自动化,操作简单耗时短,实验结果自动判读。判读软件是人工设置,不能完美判读所有基因型结果,如果通过软件升级更新或调整仪器判读参数等措施完善改进,将来必定被广泛应用。遇到 β 突变纯合子这类比较稀有样本,最终也需要人工判读再次核实后才能发出结果,假如人工判读后也不能确定,建议采用传统方法复检或使用基因测序验证。

综上所述,Gap-PCR 琼脂糖凝胶电泳法和 PCR 反点膜杂交法是当今地中海贫血基因诊断的传统主流方法,其优点是设备价格成本低廉,但缺点是需手工操作且步骤繁琐和检测标本量有限。液相芯片技术较传统方法相比主要优点在于,高通量、自动化、检测准确度高、信息质量稳定、检测用时短、操作简便、结果判读简洁明了可追溯等,是地中海贫血基因诊断较为理想的方法。液相芯片技术有成为新一代地中海贫血基因诊断检测方法的趋势,在分子诊断领域具有广阔的临床应用前景。

参考文献

- [1] 惠国华, 赵子恺. 液相芯片技术在生物医学工程领域的研究进展[J]. 生物医学工程杂志, 2010, 27(6): 1406-1409.
- [2] Li DZ. Prenatal diagnosis of hemoglobin Bart's hydrops fetalis with gap-PCR system [J]. Acta haematologica, 2009, 122(1): 50-51.
- [3] El-Fadaly N, Abd-Elhameed A, Abd-Elbar E. Accuracy of reverse dot-blot PCR in detection of different β -globin gene mutations [J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2016, 32(2): 239-243.
- [4] Yang Y, Li DZ. A survey of pregnancies with Hb Bart's disease in Mainland China [J]. Hemoglobin, 2009, 33(2): 132-136.
- [5] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China [J]. Clin Genet, 2010, 78: 139-148.
- [6] 方建培, 许吕宏. 规范儿童重型 β 地中海贫血的诊治[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(3): 166-169.
- [7] 李莉艳, 钟梅, 陈翠华, 等. 206 例地中海贫血家系产前基因诊断结果分析[J]. 中华围产医学杂志, 2012, 15(1): 5-9.
- [8] Hartevelde CL, Kleantous M, Traeger-Synodinos J. Prenatal diagnosis of hemoglobin disorders: present and future strategies [J]. Clinical biochemistry, 2009, 42(18): 1767-1779.
- [9] Tosto F, Salvatore M, Falbo V. The Italian scheme of external quality assessment for beta-thalassemia: genotyping and reporting results and testing strategies in a 5-year survey [J]. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2009, 13(1): 31-36.
- [10] 谢冲, 王国民. Luminex 液相芯片的发展及应用[J]. 复旦学报(医学版), 2010, 37(2): 241-244.
- [11] 徐湘民, 余艳红. 地中海贫血的产前诊断[J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(2): 81-84.
- [12] 曹红艳, 建芬, 肖春红, 等. 液相芯片技术在国内的发展现状[J]. 医学信息, 2014, 26: 676-677.
- [13] 韩卫宁, 许元根, 潘浩. 液相芯片技术在核酸检测中的应用研究进展[J]. 现代预防医学, 2008, 35(10): 1911-1915.

(收稿日期: 2018-02-21)