

# 应用 PCR-斑点杂交方法进行 β 地中海贫血产前基因诊断

## The Prenatal Gene Diagnoses of β-thalassaemia by PCR-dot-blotting

龙桂芳      李 卫      林伟雄      金 琪      谢健生      唐智宁  
Long Guifang    Li Wei    Lin Weixiong    Jin Qi    Xie Jiensheng    Tang Zhining

(广西医科大学儿科血红蛋白研究室, 南宁市滨湖路 6 号, 530021)  
(Laboratory of Haemoglobin, Department of Pediatrics, Guangxi  
Medical University, 6 BinHu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

**摘要** 从 1989 年以来, 我们应用聚合酶链反应 (PCR) 和等位基因特异寡核苷酸斑点杂交 (ASO-dot-blotting) 技术对 60 例 β 地中海贫血高危胎儿进行产前基因诊断。结果查出 β 地中海贫血纯合子 6 例、双重杂合子 8 例、杂合子 27 例, 其余 19 例为正常胎儿。PCR-dot-blotting 方法准确可靠, 尤其适合于 β 地中海贫血的产前诊断。

**关键词** 聚合酶链反应 (PCR) β 地中海贫血 产前诊断

**Abstract** Prenatal gene diagnoses on 60 fetuses at risk of β-thalassaemia major by PCR-dot-blotting have been performed since 1989. 6 β-thalassaemia homozygotes, 8 double heterozygotes and 27 heterozygotes were detected and, others were normal fetuses. PCR-dot-blotting was proved accurate and reliable, and especially applies to the prenatal gene diagnoses of β-thalassaemia.

**Key words** polymerase chain reaction (PCR), β-thalassaemia, prenatal gene diagnoses

β 地中海贫血 (β-thalassaemia), 简称 β 地贫, 是由于 β-珠蛋白基因突变使 β-珠蛋白链合成减少或缺如而引起的一种常染色体隐性遗传病。若胎儿同时接受分别来自其父母的两个 β 地贫基因, 则为纯合子或双重杂合子, 绝大多数表现为重型 β 地贫, 这些病人往往幼年夭折, 即使输血并结合使用去铁剂, 其预期寿命也只有 25~30 岁。虽然个别可能表现为中间型 β 地贫, 输血量较少或不需输血, 但也丧失劳动能力, 给社会及家庭造成极大的经济负担和精神压力。目前国内已知的 β 地贫基因型有 15 种, 可以用 PCR-dot-blotting 等方法进行产前诊断, 对重型 β 地贫胎儿及时终止妊娠, 减轻孕妇负担, 提高我国人口的身体素质。

### 1 材料与方

#### 1.1 对象

曾生育重型 β 地贫患儿或个别婚前检查发现为 β 地贫基因携带者而要求产前诊断的夫妇 56 对, 共 60 胎次, 除 2 对夫妇来自广东省, 1 对来自贵州省外, 其

余全部来自广西各地。

#### 1.2 取样

取夫妻双方静脉血各 2 mL, ACD 抗凝。对妊娠 7~10 周的孕妇, 取绒毛, 共 37 例; 妊娠 16~24 周的, 12 例取羊水, 7 例取胎儿脐带血。取样方法见文献 [1, 2]。

#### 1.3 基因诊断

用酚/氯仿法提取 DNA<sup>[1]</sup>。PCR-dot-blotting 按 Gonzalez-Redondo 等方法<sup>[3]</sup>, 略有改动。所用引物和探针由北京微生物所合成, 它们的碱基序列分别见表 1 和表 2。

表 1 扩增 β-珠蛋白基因所用的两对引物序列

Table 1 Sequence of the primers used for the amplification of β-globin gene

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence
I	GCC AAG GAC AGG TAC GGC TGT CAT C
II	CCC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT
III	TAT CAT GCC TCT TTG CAC CAT TC
IV	AAT GCA CTG ACC TCC CAC ATT CC

1994-03-07 收稿。

表 2 10 对  $\beta$  地贫探针序列

Table 2 Sequence of 10 pairs of probes used in the detection of  $\beta$ -thalassaemia genae

探针 Probe		序列 (5'-3') Sequence								Tm °C	杂交温度 Hybridizing temperature °C	漂洗温度 Washing temperature °C
CD17	N	CTG	TGG	GGC	AAG	GTG	AAC	G	62	62	64	
(A-T)	M	CTG	TGG	GGC	TAG	GTG	AAC	G	62	62	64	
CD41-42	N	CCA	GAG	GTT	CTT	TGA	GTC	C	58	60	62	
(-TTCT)	M	ACC	CAG	AGG	TTG	AGT	CCT	T	58	60	62	
-28	N	GCT	GGG	CAT	AAA	AGT	CAG	G	58	58	61	
(A-G)	M	GCT	GGG	CAT	AGA	AGT	CAG	G	60	60	63	
-29	N'	GCT	GGG	CAT	AAA	AGT	CAG	G	58	58	61	
(A-G)	M	GCT	GGG	CAT	GAA	AGT	CAG	G	60	60	62	
-30	N	GCT	GGG	CAT	AAA	AGT	CAG	G	58	58	61	
(T-C)	M	GGG	CTG	GGC	ACA	AAA	GTC	A	60	60	63	
IVS-1-654	N	GGG	TTA	AGG	CAA	TAG	CAA	T	54	54	58	
(C-T)	M	GGG	TTA	AGG	TAA	TAG	CAA	T	52	52	56	
CD71-72	N	GGT	GCC	TTT	AGT	GAT	GGC	C	60	62	65	
(+A)	M	GGT	GCC	TTT	AAG	TGA	TGG	C	58	60	62	
CD43	N	CCA	GAG	GTT	CTT	TGA	GTC	C	58	60	62	
(G-T)	M	GGT	TCT	TTT	AGT	CCT	TTG	G	54	54	56	
IVS-I-5	N	GCA	GGT	TGG	TAT	CAA	GGT	T	56	56	59	
(G-C)	M	GGC	AGG	TTG	CTA	TCA	AGG	T	58	58	61	
IVS-I-1	N	CCT	GGG	CAG	GTT	GGT	ATC	A	60	60	62	
(G-T)	M	CCT	GGG	CAG	TTT	GGT	ATC	A	58	58	60	

N: 正常探针 Normal probe; M: 突变探针 Mutant probe

引物 I、II 扩增的片段长约 700 bp, 含中国人已知 15 种突变中的 14 种; 引物 III、IV 扩增的片段长约 580 bp, 用于检测 IVS-1-654 (C-T) 突变。在 50  $\mu$ L PCR 混合物中含有上游和下游引物各 100 pmol/L, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 16.6 mmol/L, Tris-HCL 67 mmol/L, pH 8.3, dATP、dGTP、dCTP 或 dTTP 各 1.5 mmol/L, BSA 8.5  $\mu$ g, 标本 DNA 1  $\mu$ g, 混匀, 离心后加入 30 mL 液体石蜡覆盖液面, 然后置混合物于 94°C 预变性 10 分钟, 加入 TaqDNA 聚合酶 2  $\mu$  (协和医科大学友谊医学科技公司) 混匀, 94°C 变性 30 秒, 55°C 退火 30 秒, 71°C 延伸 120 秒, 共 35 循环。取 PCR 产物 8  $\mu$ L 在含有 0.5  $\mu$ g/mL 溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察结果 (图 1)。有特异性扩增的 PCR 产物在 Zeta probe 尼龙膜上打点, 80°C 烘烤 1.5 小时, 与 r-<sup>32</sup>P 标记的寡核苷酸探针进行杂交反应, 同时设置阴性和阳性对照, 杂交和洗膜温度见表 2。洗膜后先用放射线检测仪 (Monitor 4) 进行检测, 有特异性杂交的斑点的放射强度一般比背景高出 40 cpm 以上, 这时压上 x 线胶片, 在 -20°C 放射自显

影。曝光时间的长短依放射线的强弱而定, 例如, 放射读数在 60~100 cpm 的, 曝光 3~4 天, 200 cpm 以上的, 则半天或过夜。图 2 为 4 例胎儿及其



图 1 紫外灯下观察到的 PCR 产物电泳区带杂交的放射自显影照片。  
1. 引物 III 和 IV 的扩增片段, 长约 580bp;  
2. 引物 I 和 II 的扩增片段, 长约 700bp;  
3. DNA 长度标记物 PBR<sub>322</sub>-Hae III

Fig. 1 The electrophoretic belts of PCR product in ultraviolet light  
Lane 1. The amplified fragment of primers III and IV, about 580 bp long; Lane 2. The amplified fragment of primers I and II, about

700 bp long; Lane 3. The DNA size marker; PBR<sub>322</sub> DNA digested with Hae I.

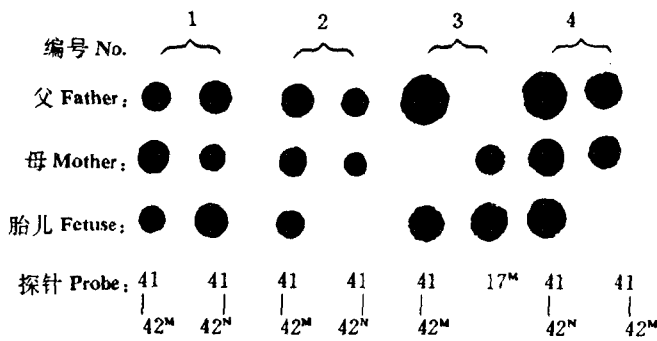


图2 4例胎儿及其父母斑点杂交放射自显影结果

1. 胎儿父母的β地贫基因型均为41-42<sup>M</sup>, 胎儿本身为41-42<sup>M</sup>杂合子。
2. 胎儿父母也是41-42<sup>M</sup>, 胎儿本身为41-42纯合子。
3. 胎儿父亲为41-42<sup>M</sup>, 母亲为17<sup>M</sup>, 胎儿为41-42<sup>M</sup>/17<sup>M</sup>双重杂合子。
4. 胎儿未接到其父母的41-42<sup>M</sup>β地贫基因, 为正常胎儿。

表3 60例胎儿产前基因诊断结果

Table3 The results of the prenatal gene diagnoses of 60 fetuses

父母β地贫基因型 Parents' β-thalassaemia genotypes (父/母) (Father/Mother)	胎儿基因型 (例) Fetuses' genotype of β-thalassaemia (Fetus)			
	正常 Normal	杂合子 Heterozygote	纯合子 Homozygotes	双重杂合子 Double Heterozygote
41-42 <sup>M</sup> /41-42 <sup>M</sup>	3	2	2	
17 <sup>M</sup> /17 <sup>M</sup>	1	1	3	
654 <sup>M</sup> /654 <sup>M</sup>		1	1	
41-42 <sup>M</sup> /17 <sup>M</sup>	6	4 ↑ 10 ↓		2
41-42 <sup>M</sup> /71-72 <sup>M</sup>	1			2
41-42 <sup>M</sup> /654 <sup>M</sup>	3	1 ↑ 1 ↓		
41-42 <sup>M</sup> /-28 <sup>M</sup>	1	2 ↓		
41-42 <sup>M</sup> /1 <sup>M</sup>		1 ↓		
17 <sup>M</sup> /-28 <sup>M</sup>		1 ↑		1
17 <sup>M</sup> /71-72 <sup>M</sup>	2	1 ↓		2
17 <sup>M</sup> /654 <sup>M</sup>	1	1 ↓		1
-28 <sup>M</sup> /654 <sup>M</sup>	1			
-28 <sup>M</sup> /1 <sup>M</sup>		1 ↓		
合计 Total	19	27	6	8

注 Note: 41-42<sup>M</sup>=Codons41-42 (-TTCT), 17<sup>M</sup>=Codon17 (A-T), 654<sup>M</sup>=IVS-I-654 (C-T), 71-72<sup>M</sup>=Codons71-72 (+A), -28<sup>M</sup>=-28 (A-G), 1<sup>M</sup>=IVS-I-1 (G-T).

↑, 表示胎儿接受其父亲的β地贫基因型 The fetus inherited his (her) father's β-thalassaemia gene. ↓表示胎儿接受其母亲β地贫基因型 The fetus inherited his (her) mother's β-thalassaemia gene.

Fig. 2 The dot-blotting radioautograph of 4 fetuses and their parents

1. Both of the parents' β-thalassaemia genes were 41-41<sup>M</sup>, fetus was a heterozygote of 41-42<sup>M</sup>.
2. Both of the parents' β-thalassaemia genes were 41-41<sup>M</sup>, fetus was a homozygote of 41-42<sup>M</sup>.
3. Father, 41-42<sup>M</sup>; Mother, 17<sup>M</sup>; Fetus, a double heterozygote of 41-42<sup>M</sup> and 17<sup>M</sup>.
4. The fetus, a normal fetus, did not inherit his parents' β-thalassaemia gene (41-42<sup>M</sup>).

## 2 结果

60例胎儿中, 正常胎儿19例, 杂合子27例, 纯合子6例, 双重杂合子8例(表3)。纯合子及双重杂合子胎儿均已及时引产。已出生的正常胎儿有15例, 杂合子胎儿13例, 产后(包括引产后)复查, 结果与产前诊断相符。随访观察足月分娩的婴儿, 均无地贫症状或畸形、生理功能缺陷等。有4例正常胎儿和14例杂合子胎儿仍在怀孕中。

### 3 讨论

$\beta$ 地贫产前诊断的主要目的在于控制重型 $\beta$ 地贫胎儿出生,降低 $\beta$ 地贫的发生率,提高人口素质,减轻社会和家庭负担并保障孕产妇的身心健康。已知的 $\beta$ 地贫基因型绝大多数为点突变,致病基因与正常基因之间仅有1个或几个碱基上的差异。因此检测方法必须具有高度特异性和可靠性,否则就容易发生误诊,造成严重的不良后果。PCR-dot-blotting方法的准确性和可靠性现已得到公认。这是因为寡核苷酸探针与靶基因的杂交具有高度特异性,是一个不需酶的反应过程,杂交和洗膜条件很容易控制,不受严格的酶触反应条件的影响。本研究对60例胎儿产前基因诊断的结果都很确切,没有假阳性或假阴性,可重复率100%。从取样到出结果,一般只需要3~14天。再次表明PCR-dot-blotting方法准确可靠,所需样品量少,

且较简便、经济、易于操作,尤其适合于 $\beta$ 地贫的产前基因诊断。

#### 致谢

中国医学科学院基础所吴冠芸教授、刘敬忠研究员等在技术上大力支持并馈赠探针等,广西医科大学附院妇产科遗传室帮助取标本等,在此深表谢意!

#### 参考文献

- 1 吴冠芸,王申五主编. 基因诊断. 北京:人民卫生出版社, 1988, 131~144.
- 2 李琪,廖灿,许代娣等. 经母腹取胎血及其脆性x检测的临床应用. 广西医学院学报, 1989, 6(4): 5~10.
- 3 Gonzalez-Redondo J M, Storing T A, Lanclos K D, et al. Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous  $\beta$ -thalassaemia from the southeastern United States. Blood, 1988, 72: 1007~1014.

(责任编辑:蒋汉明)



龙桂芳(Long Guifang), 1929年8月生,1954年毕业于广西医学院,现为学院教授及附属医院儿科主任医师,中华医学会会员,中国遗传学会广西分会副理事长,1990年获博士导师资格,1992年美国纽约科学协会邀请她为该会会员。龙教授1961年开始对血红蛋白(Hb)病的临床诊断、流行病学、遗传学、防治等方面进行研究,带领同事在广西36个县对6个民族,约4万人进行血红蛋白调查,发现约30种异常血红蛋白和地中海贫血类型及其复合体,其中Hb-都安,Hb-武鸣为世界首次发现的新类型,并已列入国际血红蛋白谱系,填补了我国在国际上该项研究的空白。此外,Hb-Calabri等5种为国内首次发现的新类型。1983年与中国医学科学院基础医学研究所合作,开展地中海贫血

(地贫)、血友病甲型的基因研究,继而又与本院妇产科共同探索绒毛活检与采集孕中期胎儿脐血技术,进行产前诊断,检出 $\beta$ 地贫基因8种类型,有效地控制了地中海贫血、血友病甲型的胎儿出生。在国内外主要刊物发表论文40余篇,参加编著《急症疑难病例讨论》和《血液病诊断及疗效标准》两本书,已于1990年和1991年出版。