

膜反向斑点杂交法检测广东人 G6PD 基因 6 种常见突变

郑卫东¹, 张太松², 陈冬¹, 葛艳芬¹, 林婷¹, 胡斌²

(1.广东省人民医院//广东省医学科学院 病理医学部检验科; 2.中山大学达安基因诊断中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨膜反向斑点杂交法在广东人 G6PD 基因 6 种常见突变同步检测中的应用。【方法】用高铁血红蛋白还原试验和 G6PD/6-PGD 酶活性比值法进行 G6PD 缺乏症筛查。应用多重 PCR 方法扩增 G6PD 基因目的片段。用 Premier Primer6.0 软件设计和优化针对广东人常见 6 种 G6PD 基因突变型的特异性寡核苷酸探针,用乙基-3-二甲氨基丙碳二亚胺(EDC)法处理尼龙膜并固定探针,制成 G6PD 基因突变检测用膜条。多重 PCR 扩增产物与固定在膜条上寡核苷酸探针进行杂交,通过显色反应判读结果。以 G6PD 基因测序为金标准,对膜反向斑点杂交法进行评价。【结果】26 例标本中膜反向斑点杂交法检测结果:95 A→G 突变型 5 例,1024C→T 突变型 3 例,1376 G→T 突变型 8 例,1388G→A 突变型 7 例,392 G→T 突变型 1 例,未发现 1311C→T 突变型,有两例检测为阴性。膜反向斑点杂交法未能测出的 2 例标本经基因测序证实存在 392G→T 突变,其余 24 例膜反向斑点法与基因测序法的结果完全一致,符合率为 92.3%(24/26)。【结论】在优化探针设计和杂交条件前提下,膜反向斑点杂交法可用于广东人 G6PD 基因 6 种常见突变型的同步检测。

关键词: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 基因突变; 反向斑点杂交法(RDB)

中图分类号: R555 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)04-0463-04

Detection of Six Common Mutations of Cantonese G6PD Gene by RDB Assay

ZHENG Wei-dong¹, ZHANG Tai-song², CHEN Dong¹, GE Yan-fen¹, LIN Ting¹, HU bin²

(1.Department of Pathology and Laboratory Medicine, Guangdong General Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Daan Center of Genetics Diagnosis, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the application of reverse dot blotting (RDB) assay in the simultaneous detection of the most common six Cantonese G6PD gene mutations. 【Methods】 Glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency was screened using the methemoglobin reduction test and G6PD/6-PGD ratio method. Multiplex PCR was used to amplify the objective fragments of G6PD gene. The specific oligonucleotide probes were designed and optimized using the Premier Primer 6.0 program. Nylon membrane was treated by (ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC) and then was dotted with the specific hybridization probes. The genotypes were judged by colorimetric reaction after the RDB. Moreover, the RDB assay was evaluated by using the sequencing result as a gold standard. 【Results】 Among 26 severe G6PD deficient patients, five individuals was found carrying 95 A→G mutation, three with 1024 C→T, eight with 1376 G→T, seven with 1388G→A, one with 392 G→T. Moreover, two G392T homozygote identified by DNA sequencing could not be correctly detected by the RDB assay. 【Conclusions】 The RDB assay could be used to simultaneously detect the most common six Cantonese G6PD gene mutations after optimizing probe design and hybridization condition.

Key words: G6PD; gene mutation; reverse dot blotting

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4):463-466]

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose 6 phosphate dehydrogenase, G6PD) 缺乏症是一种最常见的 X 连锁不完全显性遗传病,在我国广东地区有较高的发生率^[1-3]。G6PD 缺乏症患者在临床上常表现为新

生儿黄疸,蚕豆、感染、药物诱发急性溶血性贫血、慢性非球形红细胞性溶血性贫血等,而大多数平时可无临床症状。早期准确诊断对于该病的预防和控制非常重要。本文采用膜反向斑点杂交法对

收稿日期:2010-11-04

基金项目:广东省医学科学研究基金(A2009040)

作者简介:郑卫东,博士,副教授,主要研究方向:血液分子病理学, E-mail: zwdin@126.com

广东人 G6PD 缺乏症常见 6 种突变型进行同步检测,现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

用高铁血红蛋白还原试验筛查的还原率在 75% 以下,且进一步经 G6PD/6PGD 酶活性比值法检测 G6PD 呈重度缺乏患者标本 26 例,其中男 24 例,女 2 例,具体情况:婴幼儿 6 例,年龄范围 2 d ~ 11 月,成人的年龄范围是 23 ~ 48 岁,平均年龄 34 岁,均为广东省人民医院门诊及住院患者。

1.2 主要试剂

5'端用生物素标记的 PCR 引物和寡核苷酸探针,委托中山大学达安基因公司设计合成。TaqDNA 聚合酶为美国 Promega 公司产品,DNA 梯度分子量标准购自美国 MBI Fermentas 公司,低熔点琼脂糖为日本 TAKARA 公司产品。

1.3 寡核苷酸探针膜条的制备

根据广东人中常见的 6 种 G6PD 基因突变型:95A → G, 1024C → T, 1311C → T, 1376G → T, 1388G → A, 392G → T, 设计出 6 对特异性的寡核苷酸探针。探针在膜条上的布阵方式见表 1。

表 2 PCR 引物序列及扩增片段长度

Table 2 PCR primers for the most common six Cantonese G6PD gene mutations

Primer	Sequence(5'-3')	Primer site	Extron	Mutation point	Length(bp)
G1F	5'CTTCCTGGCTTTTAAGATGG3'	215939-215959	2	95A → G	295
G1R	5'TCACAAAGGAGTGATTTGGGC3'	216215-216234			
G2F	5'AGGTTCTGCACCATGCTCAG3'	204283-204302	5,6	392G → T	1 045
G2R	5'CTCCTACCAGATGATGCAGC3'	205240-205259			
G3F	5'AAAGGCTTGTGATGATAGGG3'	202140-202159	9,10,11,12	1024C → T, 1311C → T,	960
G3R	5'CATTTCGCTTCTCTCCCTTG3'	203080-203099		1376G → T, 1388G → A	

The positions of primers were labeled according to G6PD gene sequence registered in GenBank(HUMFLNG6PD, Serial No. L44140)

用生物素标记的扩增产物与处理后的膜杂交。预杂交、杂交、洗膜及显色步骤参照文献[5],并做了改进。

1.7 结果判读

若在突变检测探针处出现显色强度与相应的野生型探针相近的蓝色斑点,则该位点为野生与突变的杂合子;若在突变检测探针处出现蓝色斑点,而相应的野生型探针处未出现蓝色斑点,则该位点为突变纯合子;若仅在野生型探针处出

表 1 膜条上的探针布阵方式

Table 1 The relative position of specific hybridization probes on nylon membrane

	1	2	3	4	5	6	7
A	95A	1024C	1311C	1376G	1388G	392G	control
B	95G	1024T	1311T	1376T	1388A	392T	negative

1.4 基因组 DNA 的提取

参照文献[4]报道的方法,并稍加改进。

1.5 多重 PCR

引物序列及扩增片段长度见表 2。多重 PCR 反应体系 50 μL,其中含有 10 × buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 1 μL,10 μmol/L 的 3 对引物各 1.2 μL,基因组 DNA 约 0.5 μg,Taq DNA 聚合酶 1.0 U,余下体积用灭菌去离子水补齐。反应混合物经 94 °C 预变性 5 min 后,94 °C 变性 50 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 8 min,4 °C 保存。取 PCR 产物 10 μL 与上样缓冲液(0.05% 溴酚蓝,0.05% 的二甲苯青,30% 的甘油)混合上样,在含有 0.5 μg/mL 溴化乙锭染液的 2.5% 的琼脂糖凝胶中 120 V 条件下进行电泳。在紫外透射仪上观察结果并摄影。

1.6 反向斑点杂交及显色

现蓝色斑点,则待检样品没有上述 6 种突变。正常情况下显色控制点始终为深蓝色,阴性对照始终为无色,若有两个点出现异常则说明膜条失效。

1.8 基因测序

采用分段扩增的策略,扩增与测序引物序列同表 2 列出的引物,但未进行生物素标记。PCR 扩增产物经纯化后,交由上海英骏生物技术有限公司进行序列分析。

2 结果

2.1 PCR反应产物分析的结果

本实验根据G6PD基因全长序列设计了3对特异性引物,用多重PCR成功扩增出G6PD基因目的片段。部分患者DNA标本经多重PCR扩增后的电泳结果见图1。

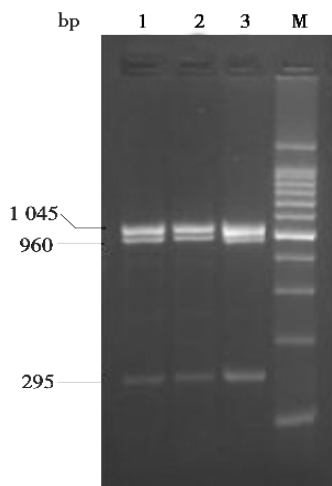


图1 G6PD基因多重PCR扩增产物电泳图谱
Fig.1 Multiplex PCR amplification of G6PD gene

Lane 1-3: Three cases with severe G6PD deficiency; M: DNA molecular marker

2.2 反向斑点杂交的结果

根据杂交信号强弱判读膜杂交结果显示:26例标本中1376G→T突变8例,1388G→A突变的7例,95A→G突变的5例,392G→T突变的1例,1024C→T突变的3例,没有发现1311C→T突变型,有两例检测结果为阴性。部分膜反向斑点杂交法杂交结果见图2。

2.3 基因测序结果

26例标本DNA经基因测序之后得出的结果是G1388A 7例,G1376T 8例,A95G 5例,G392T 3例,C1024T 3例,未见C1311T突变型(图3)。

3 讨论

目前G6PD缺乏症的实验室检测方法包括酶学方法^[6]和基因突变检测方法^[1]。G6PD酶活性检测是临床最基本也是最常用的筛查和诊断方法。而G6PD基因突变检测对于疾病的分子诊断、探

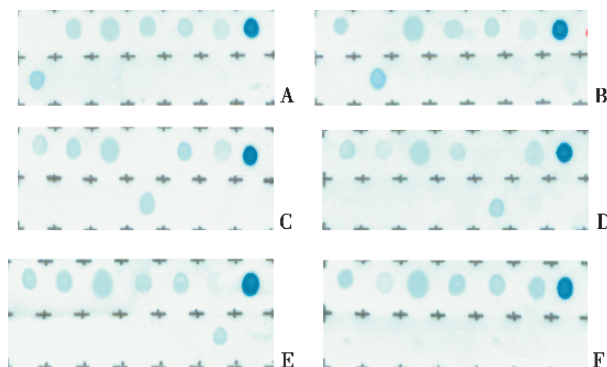


图2 G6PD基因膜反向斑点杂交分析结果

Fig.2 The RDB assay for the most common six Cantonese G6PD gene mutations

A:95 A→G; B:1024C→T; C:1376 G→T; D:1388 G→A; E:392 G→T; F:normal individual

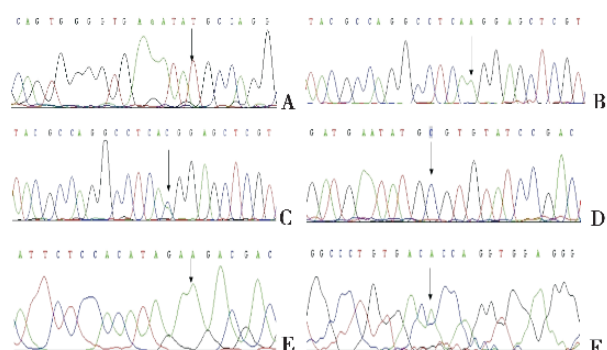


图3 G6PD基因核苷酸序列图

Fig.3 The sequencing chromatogram of G6PD gene

A:G1388A;B:G1376T;C:G1376T;D:A95G;E:C1024T;F:G392T

讨G6PD结构与功能的关系以及完善人类遗传学资料有重要意义。

反向斑点杂交(reverse dot blot, RDB)是Saiki等^[7]提出的一种斑点杂交技术,该技术采用固化了多种特异性探针的膜条与扩增靶序列杂交,使一次杂交即可同时筛查被检DNA中的多种突变。其原理是应用生物素修饰的特异引物扩增DNA,使PCR产物带有生物素标记,将PCR产物变性后与固定在膜上的特异寡核苷酸探针杂交,通过观察斑点杂交信号强弱判读结果。该方法廉价,快速,特异性高,已经在在基因突变检测、基因分型、病原体的检测等领域显示出其独特的优势^[5,8-11]。世界范围内已知的G6PD基因突变已经超过100种,但G6PD基因突变类型也有明显的地区分布特点,如广东人群中G6PD缺乏症患者基因突变类型以1376G→T,1388G→A,95A→G,392G→T,1024C→T及1311C→T为主。因此可以针对特定

人群 G6PD 基因突变特点, 用膜反向斑点杂交法对这些突变进行同步检测。

G6PD 基因全长约 18 ku, 有 13 个外显子和 12 个内含子, 由于基因长度太长很难通过一对引物经过一次 PCR 而扩增, 一般采用多重 PCR 分段扩增。本实验优化引物设计, 将 G6PD 基因全长分 3 段通过一次 PCR 扩增, 效果满意(图 1)。

在 26 例标本中, 膜反向斑点杂交法检测出了 95A→G 突变型 5 例, 1024C→T 突变型 3 例, 1376G→T 突变型 8 例, 1388G→A 突变型 7 例, 392G→T 突变型 1 例, 未发现 1311C→T 突变型, 有两例检测为阴性。基因测序显示有 3 例存在 392G→T 突变, 但膜反向斑点杂交法只检测出了 1 例。以基因测序为金标准, 膜反向斑点杂交法的阳性检出率为 24/26(92.3%)。除 392G→T 突变型外, 其余 5 种突变的阳性检出率均为 100%。2 例 392G→T 检测结果为假阴性的原因可能有: ①引物设计因素; ②探针与杂交条件不匹配。本研究初步建立了检测广东人 G6PD 基因 6 种常见突变型的膜反向斑点杂交法。进一步的工作主要是对 392G→T 突变型检测探针进行重新优化, 并扩大对临床标本的检测范围, 以进一步评价反向斑点杂交法的性能。

膜反向斑点杂交法检测 G6PD 基因突变, 可以实现对多个突变位点的同步检测, 相对于对每个突变点分别检测的基因诊断方法而言, 更加简单适用和经济。但是应用膜反向斑点杂交法检测多个 G6PD 基因突变位点时, 引物与探针设计以及杂交条件的优化对检测结果的准确性尤为重要, 应用于临床标本检测之前还需进行充分的临床试验验证。

参考文献:

- [1] 徐芸, 罗建明. 我国 G6PD 缺乏症基因突变的研究现状[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2009, 14(3): 143-145.
- [2] 杜传书. 遗传性红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症[J]. 中山医科大学学报, 1992, 13(2): 1-7.
- [3] 范联, 付涌水, 丁艳. 佛山地区小儿 G6PD 常见基因突变型的临床研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10(4): 30-31.
- [4] Loparev VN, Cartas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents [J]. J Virol Methods, 1991, 34(9): 105-112.
- [5] 李国利, 庄玉辉, 赵铭, 等. 聚合酶链反应-反向斑点杂交鉴定分枝杆菌菌种 [J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(4): 241-243.
- [6] 贾冰, 苏晓梅. G6PD 缺乏不同检测方法的临床应用 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(7): 31-32.
- [7] 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(9): 6230-6234.
- [8] 杨光, 崔金环, 陈妹, 等. 乙型肝炎病毒逆向点杂交基因分型法建立及应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(11): 677-680.
- [9] 荣卡彬, 李运雄, 陈冬, 等. 反向点杂交法在 β -地中海贫血基因诊断中的应用[J]. 广东医学, 2006, 27(7): 1050-1051.
- [10] 梁建琴, 吴雪琼, 张俊仙, 等. 应用膜反向斑点杂交技术检测耐异烟肼结核分支杆菌基因型[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(15): 2272-2276.
- [11] 何桂蓉, 李芳芳, 何林, 等. 反向斑点杂交技术应用于人乳头瘤病毒基因分型的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(7): 658-662.

(编辑 徐杰)