

· 临床研究 ·

应用荧光 PCR 技术检测单细胞 β 地中海贫血基因邓捷¹, 庄广伦¹, 彭文林¹, 周灿权¹, 梁晓燕¹, 詹前胜¹, 孙宏钰², 陈勇², 曾艳红²

(中山大学 1. 附属第一医院生殖中心, 2. 法医学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】应用荧光 PCR 技术检测单细胞 β 地中海贫血(β 地贫)基因,并与巢式 PCR 相比较,探讨荧光 PCR 应用于 β 地贫植入前诊断中的可行性。【方法】获取 β 地贫 41-42 突变杂合子单个淋巴细胞,用巢式 PCR 及荧光 PCR 技术检测 β 珠蛋白基因。【结果】160 个淋巴细胞进行荧光 PCR 扩增, β 地贫基因的平均扩增效率为 92.5%,等位基因脱扣(ADO)率为 8.8%;240 个淋巴细胞进行巢式 PCR 扩增, β 地贫基因的扩增效率为 91.7%,ADO 率为 15.8%。两种方法的扩增效率没有统计学差异,但荧光 PCR 的 ADO 发生率显著低于巢式 PCR 的 ADO 发生率($P < 0.05$)。【结论】本研究建立的单细胞荧光 PCR 技术具有较高的扩增效率,可显著降低 ADO 发生率,可望用于 β 地贫的临床植入前诊断。

关键词 β 地中海贫血;聚合酶链反应(荧光);植入前诊断

中图分类号 R556

文献标识码 A

文章编号 1672-3554(2004)02-0131-04

Fluorescent PCR for Detection of β -Thalassemia Genes in a Single CellDENG Jie¹, ZHUANG Guang-lun¹, PENG Wen-lin¹, ZHOU Can-quan¹, LIANG Xiao-yan¹,ZHAN Qian-sheng¹, SUN Hong-yu², CHEN Yong², ZENG Yan-hong²

(1. Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, 2. Department of Forensical Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To apply fluorescent PCR to detect the mutation of β -Thalassemia genes and evaluate its effectiveness in preimplantation genetic diagnosis compared with the nested PCR. 【Methods】Fluorescent PCR and nested PCR followed by reverse dot blot (RDB) were applied to detect the β -Thalassemia 41-42 mutation heterozygote from a single lymphocyte. 【Results】The fluorescent PCR achieved amplification efficiency of 92.5% and allele drop-out (ADO) rate of 8.8%. The nested PCR achieved amplification efficiency of 91.7% and ADO rate of 15.8%. There was no significant difference in the amplification efficiency between two protocols, but the ADO rate of fluorescent PCR was significantly lower than that of the nested PCR ($P < 0.05$). 【Conclusion】Single-cell fluorescent PCR can markedly decrease ADO rate and may be a powerful technique for clinical use of PGD for β -Thalassemia.

Key words β -thalassemia; fluorescent PCR; preimplantation genetic diagnosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(2): 131-134]

我国南方人群中 β 地中海贫血(β 地贫)致病基因携带率为 2.8%^[1]。胚胎植入前遗传学诊断(PGD)借助辅助生育技术,对体外受精并发育到 6~8 细胞期的植入前胚胎进行 β 地贫基因的遗传

学诊断,选择非重型 β 地贫的胚胎移植回子宫,从一开始就可避免妊娠一个重型 β 地贫胎儿及所造成的治疗性引产。

但 PGD 的分析材料仅为 1~2 个细胞,建立可

收稿日期 2003-11-12

基金项目 卫生部临床学科重点资助项目(2001321)

作者简介 邓捷(1976-),女,辽宁岫岩人,博士生 庄广伦,教授,导师 周灿权,教授,基金项目负责人. E-mail: ida1976@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

行的单细胞基因检测技术是开展 β 地贫 PGD 的先决条件。到目前为止, β 地贫的植入前诊断主要依靠巢式 PCR 结合突变检测技术^[2-4]。国内有报道应用巢式 PCR 进行 β 地贫的植入前诊断^[5], 但扩增失败和等位基因脱扣仍然是影响植入前诊断准确性的主要问题。荧光 PCR 是近年发展起来的新兴技术, 它比普通的 PCR 敏感性高出 1 千倍以上^[6]。本研究应用荧光 PCR (F-PCR) 技术在单细胞水平检测 β 地贫基因, 并与传统的巢式 PCR 相比较, 评估荧光 PCR 在 β 地贫植入前诊断中的可行性。

1 材料与方法

- 1.1 研究对象
- 突变基因型为 CD41-42 的 β 地贫杂合子静脉血。
- 1.2 材料
- 1.2.1 单个淋巴细胞的制备
- 取静脉血 2 mL, EDTA 抗凝, 经淋巴细胞分离液(上海试剂二厂, Q/GHSB85-92)分离, 制成淋巴细胞悬液, 于倒置显微镜下吸取单个淋巴细胞于 Eppendorf 管中。KOH/DTT 法^[7]裂解单个细胞, 裂解后的模板立即行 PCR 扩增或 -20℃ 冻存。
- 1.2.2 引物
- 上海生物工程公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列 (5'-3')

Table 1 The primer sequences (5'-3')

The primer sequences		Fragment size
Nested PCR		
Outer primer	gccaaaggacaggtacggctgtcatc ; ccttctcatgacatgaacttaacct	597 bp
Inner primer	5'-biotin-ggccaatctactcccaggag ; acatcaagggtcccatagac	
F-PCR		
	acacaactgtgttcactagc ; 5'FL-ggttgtccaggtgagcca	408 bp

- 1.3 PCR 扩增
- 1.3.1 单个淋巴细胞荧光 PCR 扩增体系
- 扩增反应总体积为 50 μ L, 包括: 裂解模板液 10 μ L, 无 K^+ 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, 50 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 引物 (浓度为 10 mmol/L) 各 0.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 U。将扩增体系放置在 PCR 热循环仪 (PE-Cetus 9600) 中, 采用 96℃ 2 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s 40 个循环, 于 72℃ 延伸 5 min。 β 珠蛋白基因扩增产物在 ABI Prism 377 上进行电泳检测(图 1)。

- 1.3.2 单个淋巴细胞巢式 PCR 扩增体系
- 外侧扩增反应总体积为 50 μ L, 包括: 裂解模板液 10 μ L, 无 K^+ 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, 50 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 外侧引物 (浓度为 10 mmol/L) 各 0.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 U。将扩增体系放置在 PCR 热循环仪 (PE-Cetus 9600) 中, 采用 96℃ 2 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s 28 个循环, 于 72℃ 延伸 5 min。 内侧扩增反应总体积为 25 μ L, 包括: 外引物扩增产物 1 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, 50 mmol/L $MgCl_2$ 1.25 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 内侧引物 (浓度为 10 mmol/L) 各 0.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 U。PCR 反应条件同上述外侧引物, 只是扩增循环次数增加为 35 个循环。

β 珠蛋白基因扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色紫外透光器下检查有无扩增产物。扩增产物用寡核苷酸探针反向点杂交鉴定基因突变类型。 β 地贫寡核苷酸探针反向点杂交膜条购自达安基因有限公司。

- 1.4 统计学方法
- 用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。差异显著性检验采用 χ^2 检验, 检验水准 α 取 0.05。

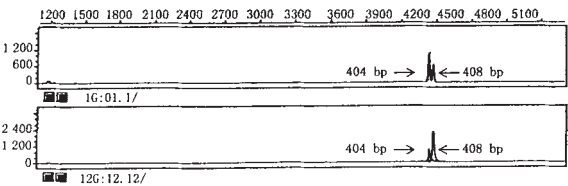


图 1 荧光 PCR 扩增单个淋巴细胞 β 地贫 CD41-42 基因型

Fig. 1 Amplification of β -thalassemia CD41-42 mutation type using F-PCR

Both 1G and 12G are β -thalassemia CD 41-42 mutation type heterozygotes. The 408 bp fragment is the normal allele while the 404 bp fragment is the mutational allele. The preferential amplification of the mutational allele occurred in 1 G while the preferential amplification of the normal allele occurred in 12G

2 结 果

2.1 单个淋巴细胞巢式 PCR
用巢式 PCR 扩增 240 个淋巴细胞, β 珠蛋白基因的扩增效率为 91.7%, 等位基因脱扣 (ADO) 发生率为 15.8%, 详见表 2。

2.2 单个淋巴细胞荧光 PCR
用荧光 PCR 扩增 160 个淋巴细胞, β 珠蛋白基因的扩增效率为 92.5%, 与巢式 PCR 扩增效率无统计学差异 ($\chi^2 = 0.09, P > 0.05$); 荧光 PCR 的 ADO 发生率为 8.8%, 显著低于巢式 PCR 的 ADO 率 ($\chi^2 = 4.26, P < 0.05$), 详见表 2。

表 2 单个淋巴细胞巢式 PCR 及荧光 PCR 扩增效率及 ADO 发生率
Table 2 Amplification efficiency and ADO rate of single cell Nested PCR and F-PCR

	Nested PCR	F-PCR	χ^2	P
Lymphocyte numbers	240	160		
Amplification efficiency	91.7% (220)	92.5% (148)	0.09	> 0.05
ADO rate	15.8% (38)	8.8% (14)	4.26	< 0.05

3 讨 论

β 地贫的植入前诊断主要依靠巢式 PCR 结合突变检测技术^[2-4]。国内有报道应用巢式 PCR 进行 β 地贫的植入前诊断, 但扩增失败和等位基因脱扣仍然是影响植入前诊断准确性的主要问题。

等位基因脱扣 (ADO) 是指在单细胞的一对等位基因中, 只扩增出了其中一个等位基因。文献报道 ADO 的发生率为 5% ~ 25%^[8-10], 是造成 PGD 误诊的一个重要原因。ADO 可能与染色体嵌合体、部分二倍体胚胎中有单倍体细胞存在、细胞裂解不全或裂解过程中 DNA 单链发生断裂部分丢失等有关。本研究中巢式 PCR/RDB 平均 ADO 的发生率为 15.8%, 与文献报道接近。对双方具有不同 β 地贫突变类型的夫妇进行 PGD 时, 如果发生了 ADO, 就有可能将一个复合杂合子的胚胎误诊为一个轻型 β 地贫基因携带者。对双方具有相同突变类型的夫妇进行 PGD 时, 如果发生了 ADO, 不会将纯合子的胚胎误诊为轻型 β 地贫基因携带者, 但会将轻型 β 地贫基因携带者误诊为纯合子, 导致可移植的胚胎数减少, 降低妊娠的机会。

荧光 PCR 是近年发展起来的新兴技术, 它比普通的 PCR 敏感性高出 1 千倍以上^[6]。用不同颜色的荧光素进行标记, 可以在 DNA 测序仪同时检测出不同片段的 PCR 扩增产物。国外有利用荧光 PCR 对纤维囊腺病进行植入前诊断的报道^[11], 国内有利用荧光 PCR 进行 α 地中海贫血植入前诊断的报道^[12]。它避免了常规 PCR 需要对扩增产物进行异源双链杂交或琼脂糖电泳分析等繁琐的基因型分析工作。CD41-42 占中国人 β 地贫突变类型的 41.6%^[1], 临床上经常遇到夫妇双方都为 CD41-42 突变的情况。本研究用荧光 PCR 对单个淋巴细胞进行一次扩增, 即可检测出有无 β 地贫 CD41-42 突变, 其对单个淋巴细胞的诊断效率达到 92.5%。而且, 荧光 PCR 可以轻易地分辨优势扩增与等位基因脱扣^[13]。在单细胞 PCR 中, 非优势扩增的等位基因在扩增量少到不能被检测时, 会被认为是发生了 ADO。但荧光 PCR 具有高灵敏度, 即使一个等位基因的信号只有其它等位基因信号的 1%, 也能被准确检测。本研究中, 应用荧光 PCR 对 CD41-42 突变基因进行检测, 单个淋巴细胞的 ADO 率 8.8% 比巢式 PCR 的 ADO 率 15.8% 降低了约 1/3, 差异有显著性 ($\chi^2 = 4.26, P < 0.05$), 与文献报道的基本一致^[11]。

综上所述, 荧光 PCR 比传统巢式 PCR 具有更高的敏感性, 本研究设计的单细胞荧光 PCR 技术可以大大提高检测的敏感性, 降低 ADO 率, 且整个诊断过程只需要 7 个小时就可完成, 比传统的巢式 PCR 更符合 PGD 诊断的时效性, 可望用于 β 地贫的临床植入前诊断。

参考文献:

[1] 周玉球, 徐湘民. 中国人 β 地中海贫血的分子基础及产前诊断 [J]. 国外医学遗传学分册, 1995, 16(3): 132-6.
[2] el-Hashemite N, Wells D, Delhanty J D. Preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia[J]. Lancet, 1996, 348(9027): 620-1.
[3] Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, et al. Preimplantation diagnosis of thalassemia[J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15(5): 219-25.
[4] Kanavakis E, Vrettou C, Palmer G, et al. Preimplantation genetic diagnosis in 10 couples at risk for transmitting beta-thalassaemia major: clinical experience including the initiation of six singleton pregnancies[J]. Prenat Diagn, 1999, 19(13): 1209-16.

- [5] 焦泽旭,庄广伦,周灿权,等. 对 β 地中海贫血携带者进行胚胎植入前遗传学诊断[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(4): 298-301.
- [6] Hattori M, Yoshioka K, Sakaki Y. High-sensitive fluorescent DNA sequencing and its application for detection and mass-screening of point mutation[J]. Electrophoresis, 1992, 13(8): 560-5.
- [7] Zhang L, Cui X, Schmitt K, *et al.* Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(13): 5847-51.
- [8] Findlay I, Ray P, Quirke P, *et al.* Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis[J]. Hum Reprod, 1995, 10(6): 1609-18.
- [9] Richitsky S, Strom C, Verlinsky Y. Allele dropout in polar bodies and blastomeres[J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15(5): 253-7.
- [10] Ao A, Wells D, Handyside A H, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli[J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15(3): 140-4.
- [11] Sermon K, De Vos A, Van de Velde H, *et al.* Fluorescent PCR and automated fragment analysis for the clinical application of preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy (Steinert's disease) [J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(8): 791-6.
- [12] 李晓红, 庄广伦, 周灿权, 等. α -地中海贫血种植前基因诊断妊娠成功[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(4): 268-9.
- [13] Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, *et al.* Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells [J]. Ann Hum Genet, 1998, 62(1): 9-23.

(编辑 张恩健)

(上接第 121 页 from page 121)

是由 G1 期持续时间所决定的,而且 G1 启动是细胞周期启动的关键,因此 G1/S 期的调控尤为重要。本实验结果表明 HCV-C 蛋白促进 QBC939 细胞由 G1 期进入 S 期,因此主要作用于 G1/S 调控点,可能启动并加速细胞周期进程,促进细胞增生和抑制细胞凋亡。HCV-C 蛋白作用于 G1/S 调控点的机制有待进一步研究。

细胞凋亡和增生分化是独立的两种方式,但细胞凋亡和增生分化可同时存在;细胞凋亡可发生在细胞周期不同时期,细胞凋亡与细胞增生并非一定成负相关。研究证实肝门部胆管癌组织中细胞凋亡率和增生率同时升高,并且存在增生/凋亡失衡^[2]。Kwun 等^[6]发现 HCV-C 蛋白通过抑制 P21 促进细胞增生,当 HCV-C 转染 HepG2 细胞经 Fas 抗体诱导凋亡时 S 期百分率减少,细胞被阻滞于 G1 期,增生细胞对某些凋亡诱因的敏感性常依赖于细胞周期。但本实验结果表明,不管是 HCV-C 蛋白抑制细胞凋亡,还是由 Fas 抗体诱导细胞凋亡增加时都不是作用于 G2/M 期。细胞周期阻断与细胞凋亡关系不明确,并不是细胞周期阻断越完全越促使细胞凋亡,细胞周期阻断并不直接诱导细胞凋亡。

参考文献:

- [1] 陈汝福,邹声泉,赵西平. 门部胆管癌组织中丙肝病毒核心蛋白表达的生物学价值[J]. 中华普通外科杂志,2001,(6) 243-4.
- [2] 陈汝福,李志花,陈积圣,等. 丙肝病毒核心蛋白对肝门部胆管癌细胞增殖和细胞凋亡的调控作用[J]. 中华实验外科杂志,2002,19(6) 510-1.
- [3] 冯志华,周永兴,贾战生,等. 含有丙型肝炎病毒核心基因表达质粒构建及其基因免疫[J]. 中国免疫学杂志,2000,16(2) 184-6.
- [4] Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, *et al.* Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. Cancer, 2003, 97(12): 3036-43.
- [5] Liu X F, Zou S Q, Qiu F Z. Construction of HCV-core gene vector and its expression in cholangiocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 135-8.
- [6] Kwun H J, Jung E Y, Ahn J Y, *et al.* p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3[J]. J Gen Virol, 2001, 82(9): 2235-41.

(编辑 黄小延)