

PCR/异源双链形成分析法在 β 地中海贫血产前诊断中的应用

李洪义 杜传书 曾瑞萍 许卫明

(医学遗传学教研室)

摘要 采用聚合酶链反应(PCR)结合聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),检测PCR产物异源双链形成情况,诊断和产前诊断 β 珠蛋白生成障碍性贫血(β 地中海贫血)CD41-42(-CTTT)突变。此方法简便快速,可区分有无突变,并能鉴别纯合子与杂合子。应用本方法进行了4例产前诊断。对此方法的优点和局限性及应用前景进行了讨论。

关键词 聚合酶链反应;异源双链; β 地中海贫血;突变;产前诊断

中图分类号 R394.3

迄今为止,全世界已发现100多种 β 珠蛋白生成障碍性贫血(β 地中海贫血,本文简称 β -地贫)突变类型。中国人中至少鉴定了16种突变^[1],基因频率最高的是密码子41-42(-CTTT)突变,大于40%^[2],某些地区和民族高达94.7%^[3]。1989年Nagamine等^[4]报道,PCR之后用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检出了18bp缺失的杂合子。其基本原理如图1所示。在适当浓度的PAGE中,由于异源双链二级结构的缘故,它们的移动速度较同源双链慢,两种不同的异源双链泳动速度亦不相同^[4]。根据PCR产物大小,缺失或插入碱基数目多少等,两种不同的同源双链区分成2条带或重叠为1条带。经染色杂合子可见3或4条带,而纯合子只有1条带。张基增等^[5]报道DNA异源双链电泳分离识别 β 地贫CD41-424bp缺失突变。作者在方法学上进行了某些改进并用于产前基因诊断。实践表明这种简单快速的CD41-42(-4bp)突变诊断方法对我国优生工作有实际意义。

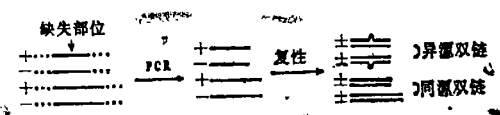


图1 杂合子PCR产物异源双链形成示意图

材料和方法

标本与DNA提取

已知的CD41-42突变纯合子、CD41-42杂合子、CD17(A→T)杂合子、-28(A→G)杂合子和正常标本均经PCR/ASO探针斑点杂交证实。4例产前诊断标本为孕16周羊水或19周脐带血DNA,取胎儿父母外周血3~4ml,均按本室常规酚-氯仿法提取基因组DNA。

PCR扩增基因组DNA

所用一对引物核苷酸序列见文献^[5](由上海细胞所合成)。扩增包括-28、CD17和CD41-42等突变点在内的601bp珠蛋白基因序列。PCR条件为97℃热变性7min,加入Taq DNA聚合酶2U/50μl反应体积(上海复旦大学遗传所产品),之后按92℃,30s→55℃,30s→70℃,1min完成30个循环。取产物10μl于1%琼脂糖凝胶电泳1h,EB染色检查扩增结果。

异源双链形成

CD41-42杂合子之PCR产物中已有异源双链形成;该突变纯合子或无此突变之PCR产物中无异源双链,与约等体积的同引物扩增的已知正常标本之PCR产物混合,混合液经95℃,5min变性和室温20min复性,前者产

生异源双链, 而后者无异源双链。若与已知突变纯合子 PCR 产物混和, 经变性和复性后结果恰相反。

非变性 PAGE

取 PCR 产物 10μl 或变性后的混合液 20μl 加 2μl 载样缓冲液混匀, 于 4% 聚丙烯酰胺凝胶 (1.5mm×10cm) 上, 室温下 100V 电泳 1.5h, 经 EB 染色 15min 后紫外灯光下观察记录结果。

结 果

PCR 扩增/异源双链分析

PCR 扩增结果见图 2。PAGE 异源双链分析见图 3。正常、-28 杂合子、CD17 杂合子和 CD41-42 纯合子均显示 1 条 601/597 bp 带; CD41-42 杂合子以及正常与 CD41-42 纯合子 PCR 产物混合液均出现 3 条带, 1 条为 601/597bp 带, 另 2 条移动较慢, 为异源双链带。由于扩增片段较长, 相差 4bp 的 601bp 与 597bp 片段不能区分。

产前诊断

产前诊断结果见附表和图 4。家庭 1 和 2 夫妇双方之 PCR 产物电泳均显示 3 条带, 故都是 CD41-42 突变杂合子。胎儿 1 显示 3 条

带, 为该突变的杂合子。胎儿 2 PCR 产物电泳显示 1 条带, 与已知正常 PCR 产物混合变性、复性后电泳也显示 1 条带, 故诊断为无 CD41-42 突变的正常胎儿。家庭 3 和 4 双亲中有一方为 CD41-42 突变杂合子, 另一方无此突变, 但根据地贫筛查结果和曾出生重型 β 地贫患儿史, 可判定为引起 β 地贫的其它某种突变的杂合子 (本法不能检出)。胎儿 3 电泳显示 1 条带, 与正常产物混合后仍为 1 条带, 故该胎儿肯定未获得其母亲的 CD41-42 突变基因, 此时有两种可能: 正常或与其父亲突变相同的杂合子, 取决于是否遗传获得了父亲的突变基因, 理论上这两种可能各占 50%。胎儿 4 之 PCR 产物电泳显示 3 条带, 其父亲的 CD41-42 突变基因遗传给了胎儿, 该胎儿亦有两种可能: CD41-42 杂合子或是 CD41-42 与另一突变的双重杂合子, 可能性各为 50%。若属后者将产生重型 β 地贫表型。

胎儿 1 和 2 获得明确基因诊断, 胎儿 3 和 4 获部分诊断。胎儿 1~3 的结果已基本达到优生目的。对胎儿 4 应用其它方法进一步检测母方突变类型及是否遗传给胎儿, 以决定是否继续妊娠。上述胎儿 1 已出生, 生后验证与产前诊断相符。

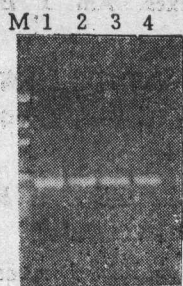


图 2 1% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增



图 3 4% PAGE 异源双链分析
1. 正常; 2. CD41-42 纯合子; 3. CD41-42 杂合子; 4. 正常+CD41-42 纯合子; 5. CD17 杂合子; 6. -28 杂合子

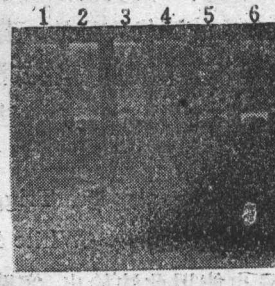


图 4 家庭 1 的产前诊断结果

1. 正常对照; 2. 父亲; 3. 母亲; 4. 胎儿; 5~6. CD41-42 杂合子对照

讨 论

张基增等^[5]在鉴定 CD41-42 纯合子和无 CD41-42 突变个体时, 采用待测标本和已知正

常标本同时 PCR, 25 循环时各取 1/2 体积反应液合并成 1 管, 3 个管再进行 5 个循环, 然后对三个反应产物进行电泳分析。本实验免去了 3 管 PCR, 每次只需待测标本 1 管 PCR 反应。

附表 4 例产前诊断结果*

家庭	父 亲	母 亲	胎 儿
1	41-42杂合子(3)	41-42杂合子(3)	41-42杂合子(3,3)
2	41-42杂合子(3)	41-42杂合子(3)	正常者(1,1)
3	无41-42突变(1)	41-42杂合子(3)	无41-42突变(1,1)
4	41-42杂合子(3)	无41-42突变(1)	有41-42突变(3,3)

*括号内数字示电泳带数。第一个数字示 PCR 产物直接电泳带数,第二个数是与正常 PCR 产物混合后的电泳带数

反应后取 10 μ l 与已备好的已知正常标本的 PCR 产物 10 μ l 混合,经加热变性和室温复性后与前述待测标本之 PCR 产物 10 μ l 同时电泳,即可对待测标本作出纯合子、杂合子或无该突变的准确判定。此基因诊断方法成本低、方法简单易于操作、无需分子杂交和内切酶酶解,适合我国 β 地贫产前诊断,因为 4bp 缺失的 CD41-42 突变在我国是最常见的突变类型^[2,3]。另一依据是中国人中尚未发现其它 2bp 或以上缺失、插入 β 地贫等位基因^[1,2]。

应用此方法对双亲均为 CD41-42 杂合子的胎儿可作出准确的产前诊断;对双亲之一为该突变杂合子的胎儿可做出部分诊断,当检测出胎儿未遗传到亲代的 CD41-42 突变基因时,胎儿或正常或为另一突变的杂合子,后者亦可继续妊娠,基本达到优生目的。若胎儿遗传到了 CD41-42 突变,则应用其它方法进一步检测是否有亲代中的另一突变,本法不适合双亲均非 CD41-42 杂合子的胎儿的产前诊断。

自 Nagamine 等^[4]之后,Trigger 等^[7]用该方法检出了 4bp 插入突变,White 等^[8]发现小至 2bp 的差异也能用此法检出。实践表明,PCR/异源双链形成分析法是一种简单、经济、快速的缺失或插入突变检测方法。但它不能明确突变性质和精确定位是其不足之处。若与序列分析等技术联合应用,它将在鉴定缺失和插入型新突变方面发挥更大作用。

(第一军医大学分子生物学研究室徐湘民

讲师惠赠部分已知突变标本;本校附一院妇产科方群医师等抽取羊水标本。在此一并致谢)

参 考 文 献

1. Kazazian HH Jr. The β -thalassemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 1990;27(3):209
2. 黄有文,等. β 珠蛋白生成障碍性贫血病基因突变类型的研究. *中华血液学杂志* 1992;13(5):260
3. 陈洛夫,等. 95例黎族 β 地中海贫血病的基因类型分析. 见:中华医学会医学遗传学会分子代谢病学组. 全国第二届分子代谢病学术会论文摘要汇编. 武汉:中华医学会医学遗传学会,1992:94
4. Nagamine CM, et al. A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet* 1989;45:337
5. 张基增,廖丰平. DNA异源双链电泳分离识别 β 地中海贫血的一种突变. *第一军医大学学报* 1991;11(3):189
6. 蔡仕萍,等. β 地中海贫血产前诊断的简易途径. *中华医学杂志* 1988;68(9):506
7. Triggs-Raine BL, Gravel RA. Diagnostic heteroduplexes: Simple detection of carriers of a 4-bp insertion mutation in Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet* 1990;40:183
8. White MB, et al. A frameshift mutation in the cystic fibrosis gene. *Nature* 1990;344:665

(1993-02-22收稿 1993-06-08修回)

THE APPLICATION OF PCR/HETERODUPLEX FORMATION ANALYSIS TO β THALASSEMIA PRENATAL DIAGNOSIS

Li Hongyi Du Chuanshu Zeng Ruiping Xu Weiming

(Department of Medical Genetics)

A simple and rapid approach for detecting the β thalassemia gene [Codon41-42(-CT-TT)] by heteroduplex analysis after PCR is described. The diagnostic approach can disitinguish between the heterozygote and homozygote. Four pregnant women at risk for β thalassemia were also studied by using this approach. The advantages, limitations and vistas of the approach are discussed.

Key words PCR; heteroduplex; β thalassemia; mutation; prenatal diagnosis



· 简 报 ·

广东汉族人基因组D17S5位点遗传多态性

杨英浩 伍新尧 罗超权 郭俊明 刘煦文

(生化教研室)

关键词 D17S5位点; 遗传多态性; PCR; 汉族

中图分类号 R527.3, D919

本文介绍用二步法 PCR 检测广东汉族人基因组 D17S5 VNTR (数量可变的串联重复序列) 遗传多态性的结果。共发现有12个等位基因。这些等位基因片段的大小在 100bp至 870bp之间 (每一重复单位为70 bp), 等位基因的频率分布在0.005至0.19之间。统计学分析证明D17S5各等位基因频率在本组人群的分布符合哈-温氏平衡 ($\chi^2 = 74.63, df = 6.6, P > 0.05$), 并遵循孟德尔遗传规律。这一遗传多态性系统的杂合

度和父权排除率分别是85.95%和0.5575, 因而对个体识别和医学遗传学是一个很有价值的遗传标记。

Horn等曾提出在扩增 D17S5位点时会出现一些非特异性的扩增带。他们试图增加反应体系中 dNTP 的量来克服这种现象, 但这样会使实验的用费增加。我们提高复性温度至60℃, 使PCR变成二步法, 未再发现非特异扩增带。

(1993-03-19收稿 1993-08-23修回)