

罕见和未知基因型珠蛋白生成障碍性 贫血的分析与鉴定

龙 辉, 欧阳慧[△], 许伟华, 汤美芬, 胡新年

广东省清远市妇幼保健院优生与遗传实验诊断中心, 广东清远 511500

摘要:目的 对珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)血液学表型阳性但未检出常见地贫基因型的疑似个体做进一步分子水平检测,以明确诊断。**方法** 收集 2015 年 5 月至 2018 年 8 月在清远市妇幼保健院就诊的地贫血液学表型阳性但常见地贫基因型检测为阴性的标本 96 例(包括疑似 α -地贫 88 例和 β -地贫 8 例),分别采用单管多重 PCR、DNA 测序法、荧光定量 PCR 和芯片捕获测序法检测罕见和未知缺失型地贫基因。**结果** 从上述疑似 α -地贫标本中共检出罕见 α -地贫基因型 17 例,其中泰国缺失型(--^{THAI}/ $\alpha\alpha$)5 例,菲律宾缺失型(--^{FIL}/ $\alpha\alpha$)2 例, $\alpha^{\Delta CD30}$ 3 例, α 珠蛋白基因拷贝数增加($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$ 或 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$)5 例,并且发现 2 例新的 α -地贫突变,即 $\alpha^{\Delta CD272-279}$ delAGCTTCGG 和 CD167-169insT。在 8 例 β -地贫特征个体中检出罕见 β -地贫基因型 Poly A(A>G)2 例,-90(C>T)3 例,CD37(TGG>TAG)1 例,IVS-I-2(T>A)1 例,另外还鉴定出 1 例新的缺失型 β -地贫基因(缺失位置为 ch11:5,246,000-5,250,500,缺失长度为 4 kb 左右)。**结论** 对未检出常见地贫突变但血液学表型阳性个体进行深度分析,既可提高地贫基因的检出率,有利于遗传咨询和产前诊断,又可能发现新的地贫突变,丰富了中国人群众的地贫基因突变谱。

关键词:珠蛋白生成障碍性贫血; 突变; DNA 测序

中图法分类号:R556.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)02-0170-04

Analysis and identification of rare and unknown genotype of thalassemia

LONG Hui, OUYANG Hui[△], XU Weihua, TANG Meifen, HU Xinnian

Eugenics Genetic Diagnostic Center, Qingyuan Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Qingyuan, Guangdong 511500, China

Abstract: Objective To investigate the rare or unknown genotypes of thalassemia for suspected as thalassemia subjects whose hematological phenotype were positive, but regular gene type were negative. **Methods** From May 2015 and August 2018, 96 samples were collected from Qingyuan Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital. In the patients, 88 cases were suspected as α -thalassemia and 8 cases were suspected as β -thalassemia with positive hematological phenotype and negative regular gene type, which were selected to be detected for rare genotypes of thalassemia with Gap-PCR, DNA-sequencing, real-time PCR and unknown deletion genotypes of thalassemia by chip-captured-sequencing analysis. **Results** Seventeen cases with rare genotypes of α -thalassemia were detected, including Thailand deletion (--^{THAI}/ $\alpha\alpha$, 5 cases), Filipino deletion (--^{FIL}/ $\alpha\alpha$, 2 cases), $\alpha^{\Delta CD30}$ (-GAG) (3 cases) and increasing of copies of α -globin gene ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$ or $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$, 5 cases). Besides above mentioning rare mutation, two types of novel frame shift mutations ($\alpha^{\Delta CD272-279}$ delAGCTTCGG and CD167-169insT) were detected. Among 8 samples suspected as β -thalassemia, 2 cases were detected as Poly A(A>G), 3 cases were detected as -90(C>T), 1 case were detected as CD37(TGG>TAG) and 1 case were detected as IVS-I-2(T>A). In addition, 1 case of novel deletion mutation was identified by DNA sequencing and chip-captured-sequencing analysis the location was ch11:5,246,000-5,250,500, the deletion length was about 4 kb. **Conclusion** Further analysis for rare and novel mutations of thalassemia can be explored for subjects with positive screening indicators and negative regular gene detection, so as to raise the detection rate of thalassemia gene, provide the help of genetic counseling and prenatal diagnosis, enrich gene mutation spectrum of thalassemia in Chinese population.

Key words: thalassemia; mutation; DNA sequencing

珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)主要见于地中海和东南亚地区,在我国则主要集中在长江以南地区,以广西、广东、海南最多见。2011 年广东省启动地

贫预防控制项目,2012 年由项目牵头单位广东省妇幼保健院进行了全省地贫基线调查,结果显示广东省地贫基因携带率为 16.83%^[1]。由于重症地贫是一种致

死或致残性疾病,给个人、家庭和社会带来严重的经济和精神上的负担。因此,在地贫高发区开展大规模地贫的遗传筛查、遗传咨询和产前基因诊断,以防止重症地贫胎儿出生尤为重要。目前常规的地贫基因检测能检测出 98% 的地贫基因型,但仍有 2% 左右的罕见地贫类型被漏检。本研究对 96 例地贫血液学表型阳性但常见基因型检测为阴性的疑似地贫标本进行罕见及未知地贫基因型检测,以进一步对这些标本确诊,防止漏诊和误诊。同时可发现新的地贫基因型,丰富中国人群的地贫基因突变谱,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 5 月至 2018 年 8 月在本院血液学表型筛查为地贫表型阳性但常见 6 种 α -地贫基因型($--^{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 、 α^{WS} 、 α^{CS} 、 α^{QS})或 17 种 β -地贫基因型[CD41-42(-TCTT)、CD71-72(+A)、CD27-28(+C)、CD14/15(+G)、CD17(A T)、CD26(G A)、CD31(-C)、CD43(G T)、IVS-II-654(C T)、IVS-I-1(G T)、IVS-I-5(G C)、-28(A C)、-29(A G)、-32(C A)、-30(T A)、CAP、IntM]检测为阴性的标本 96 例,其中疑似 α -地贫 88 例,疑似 β -地贫 8 例;男 60 例,女 36 例;年龄 5 个月至 36 岁,均为清远地区人群。

1.2 方法

1.2.1 罕见缺失型 α -地贫基因检测 采用单管多重 PCR 检测罕见泰国型($--^{THAI}$)和菲律宾型($--^{FIL}$)缺失 α -地贫,引物序列见表 1^[2]。同时采用引物设计软件 Primer5.0 设计 1 对引物 α -F 和 α -R 作为正常 α -珠蛋白基因对照,引物由宝生物工程有限公司合成。PCR 扩增试剂为 TaKaRa 产品(宝生物工程有限公司),总反应体积为 25 μ L,各引物比例为:10 pmol/ μ L α -F 和 α -R 各 0.5 μ L,10 pmol/ μ L THAI-F 和 THAI-R 各 1.2 μ L,10 pmol/ μ L FIL-F 和 FIL-R 各 1.5 μ L, TaKaRa LA Taq(5 U/ μ L)0.2 μ L,2 \times GC Buffer I 12.5 μ L,Template DNA 1 μ L,另加 ddH₂O 至总体积为 25 μ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,59 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。扩增完成后,取 5 μ L 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,在 UVP 凝胶成像仪(珠海黑马医学仪器有限公司)下观察并记录结果。

1.2.2 罕见 α -地贫和 β -地贫基因检测 罕见 α -地贫基因:采用单管多重 PCR、荧光定量 PCR 和 DNA 测序法(Sanger 双脱氧末端终止法)检测 19 种(包括 $--^{BRIT}$ 、 $--^{CAL}$ 、 $--^{CANT}$ 、 $--^{CL}$ 、 $--^{GEO}$ 、 $--^{MA}$ 、 $--^{MC}$ 等)大片段缺失型和 69 种[包括 Initiation codon(A>G)、Codon 22 C>T、CD23(GAG>TAG)、IVS I-1(G>T)等]非缺失型突变。罕见 β -地贫基因:检测 16 种罕见缺失型及 202 种罕见点突变型。上述检测均由深圳华大临床检验中心完成。

1.2.3 未知缺失型 β -地贫基因检测 采用芯片捕获

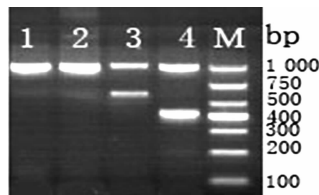
测序法和 DNA 测序法检测未知缺失型 β -地贫基因,该检测由深圳华大临床检验中心完成。

表 1 $--^{THAI}$ 和 $--^{FIL}$ 缺失型 α -地贫引物序列

引物名称	引物序列	产物长度 (bp)
α -F	CTC TGT GTT CTC AGT ATT GGA	1 010
	GGG AAG GAG	
α -R	TGA AGA GCC TGC AGG ACC AGG	413
	TCA GTG ACC G	
THAI-F	CAC GAG TAA AAC ATC AAG TAC	413
	ACT CCA GCC	
THAI-R	TGG ATC TGC ACC TCT GGG TAG	573
	GTT CTG TAC C	
FIL-F	AAG AGA ATA AAC CAC CCA ATT	573
	TTT AAA TGG GCA	
FIL-R	GAG ATA ATA ACC TTT ATC TGC	573
	CAC ATG TAG CAA	

2 结果

2.1 罕见缺失型 α -地贫基因检测结果 采用单管多重 PCR 从上述疑似 α -地贫标本中共检出罕见 α -地贫基因型 17 例,其中泰国型缺失型($--^{THAI}/\alpha\alpha$)5 例和菲律宾型缺失型($--^{FIL}/\alpha\alpha$)2 例, $\alpha^{\Delta CD30}$ 3 例, α 珠蛋白基因拷贝数增加($\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ 或 $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$)5 例,并且发现 2 例新的 α -地贫突变,即 $\alpha^{\Delta CD272-279}delAGCTTCGG$ 和 CD167-169insT。 $--^{THAI}/\alpha\alpha$ 和 $--^{FIL}/\alpha\alpha$ 凝胶电泳图见图 1。

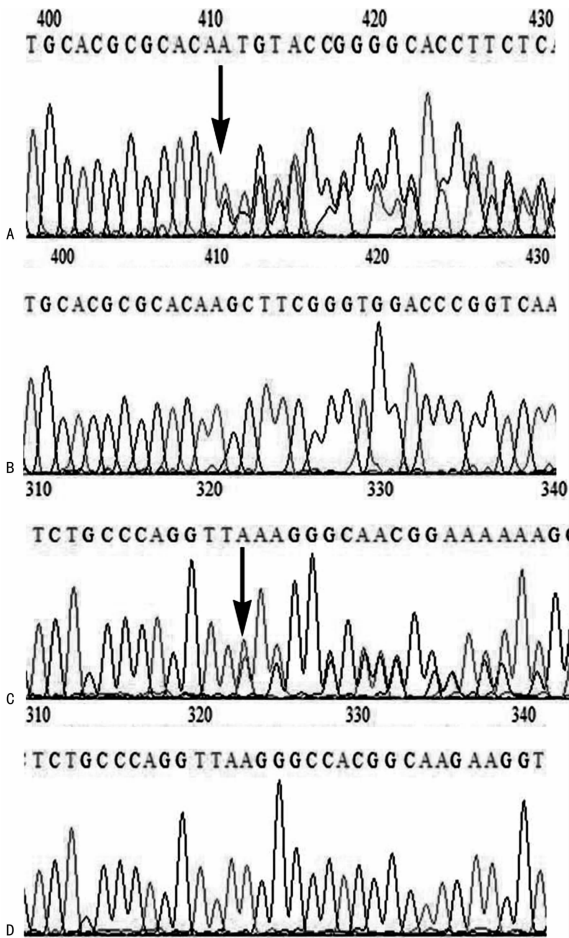


注:1 和 2 为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$;3 为 $--^{FIL}/\alpha\alpha$;4 为 $--^{THAI}/\alpha\alpha$;M 为 Marker。

图 1 单管多重 PCR 检测 $--^{THAI}/\alpha\alpha$ 和 $--^{FIL}/\alpha\alpha$ 凝胶电泳图

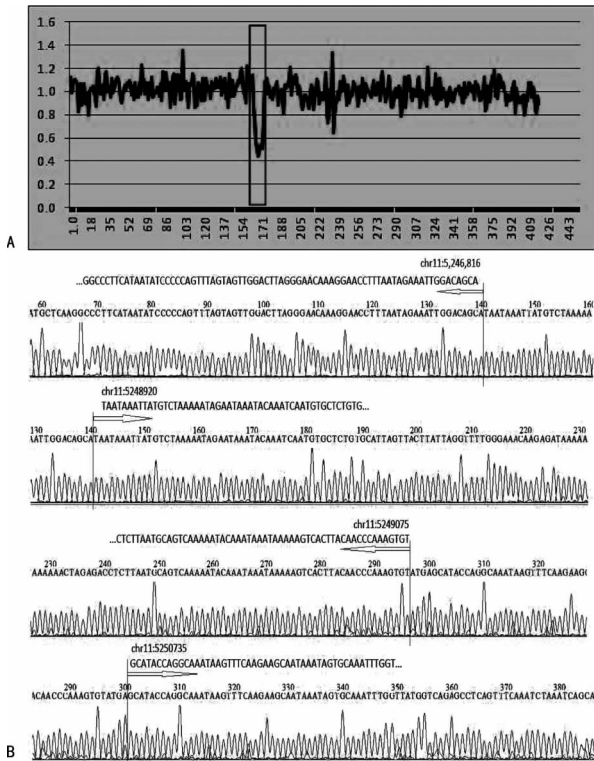
2.2 罕见 α -地贫基因检测结果 发现 1 种中国人群中罕见的突变类型为 $\alpha^{\Delta CD30}$ 地贫,以及两种新的移码突变,分别为 $\alpha^{\Delta CD272-279}delAGCTTCGG$ 和 CD167-169insT,见图 2。另外检测出 5 例 α 珠蛋白基因拷贝数增加,为 $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ 或 $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ 。

2.3 罕见和缺失型 β -地贫基因检测结果 本研究发发现罕见 β -地贫基因型有 Poly A(A>G)、-90(C>T)、CD37(TGG>TAG)及 IVS-I-2(T>A)4 种共 8 例 β -地贫;同时检测出 1 种新的缺失型 β -地贫基因,缺失位置为 ch11:5,246,000-5,250,500,大约缺失长度为 4 kb(暂命名为 $-\Delta$)。该缺失由 2 段组成,中间隔 500 bp 左右,第 1 段 ch11:5,246,800-5,248,900,第 2 段 ch11:5,249,500-5,250,800(图 3A)。后经 DNA 测序其精确缺失位置为 chr11:5,246,816-5,248,920 和 chr11:5,249,075-5,250,73(图 3B)。



注: A 为突变类型 $\alpha^{CD1272-279}$ delAGCTTCGG; C 为突变类型 CD167-169insT; B 和 D 为正常对照。

图 2 α -珠蛋白基因新的移码突变 DNA 测序图



注: A 为缺失型 β -地贫芯片捕获测序图; B 为缺失型 β -地贫的 DNA 测序图 (Sanger 测序)。

图 3 新的缺失型 β -地贫基因测序图

3 讨论

地贫是一组由于一种或几种珠蛋白基因突变(包括缺失和点突变)所引起的单基因常染色体隐性遗传性溶血性疾病。地贫临床表型分为静止型、轻型、中间型和重型。中间型地贫偶尔需要输血治疗或不需要输血治疗。重型地贫有的未成年即夭折,有的则需要长期输血治疗,有的甚至在胎儿时期就胎死腹中,给家庭带来巨大的精神及经济负担。因此,控制和降低重型地贫患儿的出生率是目前地贫防治工作的重点。地贫筛查、基因诊断、产前诊断等是预防生育重症地贫患儿的有效途径。由于地贫基因突变的多样性和复杂性,目前常规地贫基因检测仍存在漏检的风险。因此,必须严格遵循血液学表型检查与基因型分析相结合的分析原则方可得出可靠结果^[2]。对于地贫血液学表型阳性而未检出常见基因突变的“疑似地贫”个体,为尽量避免罕见或未知突变基因型漏检,需进一步做罕见类型地贫基因型检测,必要时还需要进行家系分析以确认新的突变。近年来,许多学者越来越认识到罕见地贫基因检测的重要性,也做了相关的研究报道^[3-5],对防止地贫的漏诊、误诊具有指导意义。

本研究通过对 96 例血液学表型筛查阳性但常见地贫基因检测阴性患者进行罕见类型地贫基因系统分析,共发现 25 例罕见地贫突变患者,检出率为 26.0%,其中 α -地贫 17 例, β -地贫 8 例。但仍有 71 例未检出,其中 62 例为 5 岁以下儿童,可能存在慢性感染而引起小细胞低色素贫血。未采用芯片捕获测序法对整个 α 和 β -珠蛋白基因进行测序,可能存在漏检。在作者的临床工作中,以下情况应高度怀疑是罕见地贫:(1)罕见 α -地贫, HbA₂ 正常或降低,地贫筛查表型为小细胞低色素贫血,且排除缺铁性贫血、基因型正常的患者; HbH 病表型,但基因型仅为标准型的患者;生育过 HbH 病患儿,但基因型正常的父母。(2)罕见 β -地贫。 HbA₂ > 3.5%,小细胞低色素贫血,基因型正常的患者;中间型或重型地贫表型,但基因型仅为携带者;当 3.5% < HbA₂ < 9.0%,且 HbF 为 3%~15%时,应考虑为罕见缺失型 β -地贫。

本研究共发现缺失型、非缺失型、 α -珠蛋白基因拷贝数增加 3 种罕见 α -地贫基因突变类型,并发现新的移码突变。罕见缺失型 α -地贫为 $-^{THAI}$ 和 $-^{FIL}$,携带这两种缺失型的个体,其血液学表型均符合典型的轻型 α -地贫,但常见 6 种 α -地贫基因型检测为阴性,如果不对其血液学表型特征进行综合分析,很容易对这两种缺失型 α -地贫漏诊^[6-7]。 $-^{THAI}$ 和 $-^{FIL}$ 缺失型地贫均为 α -珠蛋白基因大片段缺失,为 α^0 -地贫,由于这两种缺失型与其他 α -地贫复合存在时,在临床上可形成中、重型 α -地贫,因而在中国人群中检测这两种罕见的缺失型具有重要临床意义。罕见非缺失型 α -地贫为中国人群中已报道的 α^{CD130} 杂合突变,该突变位于 α_2 基因外显子 1 区域,影响翻译后调节,使产生的 Hb

高度不稳定,易于降解,从而在翻译后水平导致 Hb 水平降低,引起 $\alpha^+-\alpha^0$ -地贫^[8]。而 α 珠蛋白基因拷贝数增加是由于 α 珠蛋白基因簇同源序列不等交换形成 α 三联体的结果,形成常见的两种基因型为 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$ 和 $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$,为 α^+ -地贫^[9]。与 $-\text{SEA}$ 合并时,血液学主要表现为小细胞低色素贫血,与 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 表型类似,容易引起漏诊^[10]。本研究在 α 基因中发现两种新的移码突变,均发生在 α_2 基因上,一种为 HbA2: $\alpha^{\Delta\text{CD}272-279}$ delAGCTTCGG,即在编码序列第 272-279 位点缺失了 8 个碱基;另一种为 HbA2: CD167-169insT,即在编码序列第 167-169 位点插入了碱基 T,这两种突变均造成编码框架发生改变,可导致氨基酸改变,引起合成的珠蛋白肽链不稳定。近年来,中国人群中新的 α -地贫屡有报道,使中国人群的地贫基因型更加丰富和复杂化^[11-13]。8 例疑为 β -地贫但常规基因检测阴性,经罕见 β -地贫基因型检测发现 4 种中国人群中罕见的点突变型,包括 Poly A(A>G): AATAAA>AATGAA、-90(C>T)、CD37(TGG>TAG)及 IVS-I-2(T>A),其中 Poly A(A>G)发现于地贫筛查表型为中间型 β -地贫,但常见基因型为 CD17(A>T)的患儿。后检测罕见 β -地贫基因为 Poly A(A>G)/CD17(A>T)双重杂合子,即 β^+/β^0 ,其父为 Poly A(A>G)杂合子,其母为 CD17(A>T)杂合子。因此,地贫表型筛查结果与基因型结果不相符时,应考虑存在罕见地贫基因。 β -地贫主要为点突变型,而缺失型罕见。本研究对 1 例高度怀疑为 β -地贫患者(典型的小细胞低色素症, HbA 27.8%, HbF 10.2%)进行系统分析,但均未检出常见和罕见的 β -地贫基因。根据其表型筛查结果,疑似缺失型 β -地贫。经芯片捕获测序法确定 β 基因缺失约 4 kb,缺失位置为 chr11:5,246,000-5,250,500,为 5' 启动子区缺失。最后经 DNA 测序定位于 chr11:5,246,816-5,248,920 和 chr11:5,249,075-5,250,735,即缺失了 2 段,中间保留了 155 bp,该缺失型 β -地贫基因少见文献报道。由于重症 β -地贫是一种致死或致残性疾病,常给患者、家庭和社会带来沉重的经济和精神负担。因此,近几年来,国内罕见及未知 β -基因突变类型不断被发现,将有助于地贫的遗传咨询和产前诊断,从而进一步降低重症地贫患儿出生^[14-16]。

总之,对地贫表型筛查阳性但常规基因检测为阴性的“疑似地贫”患者,进一步进行罕见地贫基因检测,有可能发现罕见和新的地贫突变基因。在临床实践中,对于地贫的诊断必须遵循表型筛查与基因诊断相结合的原则,以防误诊和漏诊。“疑似地贫”的诊断和鉴别诊断,将大大提高遗传咨询、产前诊断及实验室技术水平,还可发现新的地贫基因突变类型,从而进一步丰富中国人群地贫基因突变谱。

参考文献

- [1] 王游声,郭浩,陈汉彪,等. Sebia 电泳仪检测 HbA2 在 α 地中海贫血筛查中的临床应用[J]. 医学检验与临床, 2017,28(1):4-6.
- [2] 徐湘民,张新华,陈荔丽,等. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社,2011:60.
- [3] 靳旺杰,李莉艳,钟梅,等. 102 例罕见珠蛋白生成障碍性贫血基因突变测序分析[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(15):2019-2021.
- [4] 林芬,杨立业,林敏,等. 华南人群中地中海贫血的罕见基因突变[J]. 中华医学遗传学杂志,2017,34(6):792-795.
- [5] 胡俊杰,陈鑫苹,王洁,等. 海南黎族中学生地中海贫血流行现状及罕见基因型研究[J]. 广东医学,2018,39(10):1471-1477.
- [6] 许涓涓,杜娟,唐斌,等. 泰国缺失型 α -地中海贫血基因诊断和误诊分析[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012,6(16):4921-4922.
- [7] 杜丽,王继成,秦丹卿,等. 泰国缺失型 α 地中海贫血的家系分析与产前诊断[J/CD]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2015,7(4):31-34.
- [8] HARTEVELD C L, HIGGS D R. Alpha-thalassemia[J]. Orphanet J Rare Dis, 2010,5(13):1-21.
- [9] WANG W, CHAN A Y, CHAN L C, et al. Unusual rearrangement of the α -globin gene cluster containing both the $\alpha^{-3.7}$ and $\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$ crossover junctions: Clinical diagnostic implications and possible mechanisms[J]. Clin Chem, 2005,51(11):2167-2170.
- [10] 钟良英,汪芳,陈培,等. HK $\alpha\alpha$ 合并东南亚型缺失地中海贫血的基因型与血液学分析[J]. 中华医学杂志,2018,98(2):117-121.
- [11] JIA S Q, LI J, MO Q H, et al. Alpha thalassemia as a result of a novel 11.1 kb deletion eliminating both of the duplicated alpha globin genes[J]. J Clin Pathol, 2004,57(2):164-167.
- [12] LONG J, YAN S, LAO K, et al. The diagnosis and molecular analysis of a novel 21.9 kb deletion(Qinzhou type deletion) causing α^+ thalassemia [J]. Blood Cells Mol Dis, 2014,52(4):225-229.
- [13] 李友琼,陈治中,赵林,等. 一个 α 地中海贫血基因新缺失突变家系[J]. 中华血液学杂志,2014,35(8):724.
- [14] 黄海龙,郭丹华,林娜,等. 两种中国人罕见 β -地中海贫血基因突变分析[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(10):939-941.
- [15] 郑秀婕,洪文旭,刘志强. 首例中国人 β -地中海贫血罕见突变的报道[J]. 中国计划生育学杂志,2018,26(1):61-62.
- [16] 吕杰忠,罗招凡,方建培,等. 一例 β -珠蛋白基因双重突变杂合体 HBBC. [219T>A;220G>T] 的基因诊断及家系分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2017,34(4):538-541.