

· 临床研究 ·

运用 PCR-DGGE 技术检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏的初步研究

李长钢¹, 陈小文², 陈运生³, 王纓¹, 赵维玲¹, 石红松¹, 李成荣²

(深圳市儿童医院, 1. 内科; 2. 儿研所; 3. 检验科, 广东 深圳 518026)

[摘要] 目的 运用多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)缺乏患者及基因携带者基因变异,探讨其对该病的诊断和研究价值。方法 提取G-6-PD缺乏症患者及其家系(患者父亲和/或母亲等)的外周血RNA,逆转录合成cDNA后,选取第11至12外显子部分cDNA片段进行PCR-DGGE,观察其电泳行为,将电泳行为异常的标本进行基因测序,最后做出基因诊断。结果 36个家系中33个家系发现G-6-PD基因在1304至1520片段出现PCR-DGGE多种异常电泳区带。9例母亲G-6-PD/6-PGD比值低于1.00,其中3例比值低于0.50,而且PCR-DGGE电泳行为一致,基因测序发现为双重杂合子;比值正常的G-6-PD缺乏基因携带者母亲均为单杂合子。该片段基因测序发现3个突变位点分别为:C1311T, G1376T, G1388A。各基因突变的位点有其特殊的电泳行为。结论 PCR-DGGE技术是一种敏感性高、可靠性强的筛查基因突变的方法。在临床研究G-6-PD缺乏,特别是常规诊断技术不能发现的女性G-6-PD缺乏基因携带者的检测中具有很强的应用价值。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(6): 529-532]

[关键词] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏; 变性梯度凝胶电泳; 基因测序; 突变

[中图分类号] R556.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)06-0529-04

Application of PCR-DGGE technique in G-6-PD deficiency

Li Chang-Gang, CHEN Xiao-Wen, CHEN Yun-Sheng, WANG Ying, ZHAO Wei-Ling, SHI Hong-Song, LI Cheng-Rong, et al. Children's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Email: licg6336@sina.com)

Abstract: Objective To detect gene mutations of children with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency and of carriers of G-6-PD deficiency gene with the technique of polymerase chain reaction and denatured gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), and to explore the value of the technique in the diagnosis of G-6-PD deficiency and G-6-PD deficiency gene carrying. **Methods** cDNAs were harvested by reverse transcription method after RNAs had been extracted from peripheral blood of 43 children with G-6-PD deficiency and of their family members (36 lineages). Electrophoresis behaviors of the fragment from exons 11-12 of G-6-PD cDNA were detected with the technique of PCR-DGGE. Gene sequencing was then performed for the abnormal electrophoresis bands. **Results** Abnormal electrophoresis bands were found in the 1304-1520 fragment of G-6-PD cDNA in 33 out of 36 family lineages. The G-6-PD/6-PGD ratio was below 1.00 in 9 mothers of patients. Three of them had the G-6-PD/6-PGD ratio lower than 0.50. The PCR-DGGE bands were the same in the 3 mothers. Gene sequencing showed double heterozygote in the 3 mothers, but the maternal carriers of G-6-PD deficiency gene who had normal G-6-PD/6-PGD ratio showed mono-heterozygote in gene sequencing. Three mutational sites were found in the 1304-1520 fragment, i. e., C1311T, G1376T and G1388A. The electrophoresis behaviors were different among the 3 gene mutational sites. **Conclusions** PCR-DGGE is a sensitive and reliable technique in the screening of gene mutations. It is useful in the diagnosis of G-6-PD deficiency, especially in the diagnosis of female G-6-PD deficiency gene carrying.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6): 529-532]

Key words: G-6-PD; DGGE; Gene sequence; Mutation

红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)缺乏症,是最常见的遗传性红细胞酶缺陷性疾病,据估计全球约有该病基因携带者4亿^[1]。在我国南方地区常见,部分地区近十年来已将其列为产前和围生期重点筛查的疾病之一。但目前所采用的检测方法常出

现假阴性或假阳性,特别是对母系G-6-PD缺乏基因携带者的检出阳性率并非十分理想,从而影响了本病准确筛查和防治。近年开展的基因诊断技术,由于所要求的技术条件、设备及检验成本高,加之该病的突变位点多达130余种,因此目前临床上尚无法

[基金项目] 深圳市科技计划重点项目(200601004)

[收稿日期] 2007-09-17; [修回日期] 2007-10-09

[作者简介] 李长钢,男,大学,主任医师。主攻方向:血液与肿瘤。

检测所有突变位点,从而限制了临床的广泛开展。为此我们采用发现基因突变位点的敏感技术——变性梯度凝胶电泳(DGGE)法对该病进行研究,以弥补上述的不足,探讨临床应用和研究的可行性。初步研究显示效果满意,报告如下。

1 材料及方法

1.1 资料来源

43名患儿,36个家系(30个全家系,包括患儿及父母和兄妹等直系亲属),均来自我院门诊及住院病人。

1.2 诊断标准及依据

根据临床和/或实验室葡萄糖-6-磷酸脱氢酶/6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PD/6-PGD)比值测定结果。比值低于1.00者,诊断为G-6-PD缺乏^[2]。

1.3 G-6-PD/6-PGD 比值测定

采用广州市天一医药保健品有限公司生产的改良G-6-PD定量比值法试剂盒。检测方法按试剂盒说明书进行。

1.4 G-6-PD cDNA 的制备

1.4.1 RNA的提取及cDNA的制备 RNA提取:1.5 mL全血,采用德国QIAGEN公司RNA提取试剂盒(QIAamp RNA Blood Mini Kit)按说明书操作。提取的RNA质量由OD 260/OD 280比值(>1.9)和0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

cDNA合成:取1 μg RNA,以poly(N)₆为引物进行反转录。20 μL体系中含有MgCl₂ 5 mM,dNTP 10 mM,Rnase抑制剂0.8 U,AMV逆转录酶0.2 U,poly(N)₆ 20 pmol,RNA 1 μg。逆转录反应条件为:70℃ 10 min,42℃ 60 min。逆转录制备成cDNA后置-20℃冰箱保存备用。

1.4.2 G-6-PD片段基因引物的设计及PCR扩增

①cDNA编码区全长扩增:参照mRNA碱基序列(GenBank登录号:BC000337)设计引物;上游引物:5'GAAGCGCAGACAGCGTCATGGCAGA,下游引物:5'TGCCCAGGGCTCAG AGCTTGT。②巢式PCR:应用软件Win Melt™ 2.0自行设计引物,上游引物为:5'GCGGTCGGAGCT GGACCTGACCTA3',下游引物为:5'GCGGGCGGCG CGGGGCGGGGCAGGGCG-GCGGGGGCGGGGCCTCGGCTGCCATA3',反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环30次;72℃ 5 min PCR扩增在PTC-200 Peltier热循环仪(MJ Research™,美国)上进行。(注:引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。所检测的G-6-PD

cDNA的片段为第1304至1520,扩增后电泳片段总长为256 bp)。

1.4.3 DGGE筛查变异 制备10%聚丙烯酰胺凝胶(丙烯:双丙烯=37.5:1),变性剂梯度范围为30%~60%(100%变性为40 g/dL甲酰胺及7 mol/L尿素),呈线性梯度增加,方向与电泳方向平行。25 μL PCR扩增产物与等量的载样缓冲液混合,于60℃,150 V的条件下电泳6 h,用50 mg/L溴化乙锭1×TAE染色5 min,1×TAE缓冲液浸泡脱色20 min,紫外灯下观察电泳结果并摄像。主要仪器为DCode™基因突变检测系统(BIO-RAD,美国),GDS800凝胶成像分析系统(UVP,美国)。主要试剂为丙烯酰胺、双丙烯酰胺、去离子甲酰胺和尿素(AMRESCO,美国)。

1.5 DNA序列测定及分析

对部分PCR-DGGE出现异常条带的样本进行测序(测序由上海生工或大连TaKaRa完成)。参照GenBank中mRNA序列判断每一个变异,并经基因组DNA扩增测序再验证。

2 结果

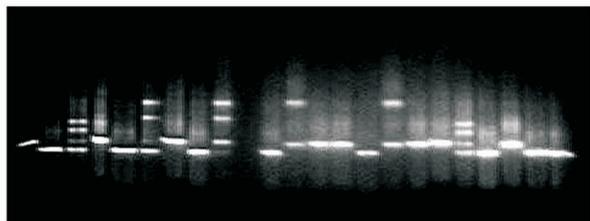
2.1 G-6-PD/6-PGD 比值测定

对43例患儿,36个家系,共112个血液标本例进行了G-6-PD/6-PGD比值测定。43例患儿中女性患儿3例(6.97%)。对36个患儿的母亲进行了G-6-PD/6-PGD比值检测。结果发现9例G-6-PD/6-PGD比值降低(其中4例比值低于0.70),占被检家系的25%;30例患儿的父亲中有3例G-6-PD/6-PGD比值降低(占10%)。

2.2 PCR-DGGE 检测结果

36个家系中有33个家系的患儿及母亲扩增的G-6-PD基因在1304至1520片段出现异常条带。阳性率达91.67%。两个家系在该片段的PCR-DGGE未发现异常,提示基因突变位点可能发生在其他片段。2例女性患儿的G-6-PD/6-PGD比值均低于0.50,家系PCR-DGGE结果显示:1例父系PCR-DGGE未见异常泳带,母与女均发现异常泳带但泳带不同,另1例父系发现异常泳带,但母系泳带未见异常。提示可能系其他片段的基因突变。

从图1可以看到:①正常女性纯合子表现为只有一条泳带(标号46),而G-6-PD正常的父亲(标号51,54,57,59,64,69,71)的电泳行为与正常女性纯合子的电泳行为一致;②G-6-PD缺乏男性患儿中出现3种不同的电泳条带(标号50,53,56,62,63,66,



50 51 52 53 54 55 56 57 61 59 60 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 46
1388 1388 1311 1311 1311 1311 1376 1376 1376
1388(twins) 1388

注:标号 50, 53, 56, 58, 62, 63, 66, 67, 70 为 G-6-PD/6-PGD < 1.00 男性患者 DGGE 电泳表现;标号 52, 55, 61, 60, 65, 68 为患者母亲杂合子, DGGE 电泳表现为 4 条或 2 条电泳带。标号下方数字示为经基因测序证实的异常电泳带的突变位点。

67);③母系 G-6-PD 缺乏基因携带者也呈现出 2~4 条不同的电泳条带,说明存在多种不同的基因突变位点,而其子的电泳条带只有一条,且与母系的其中一个条带一致。图中 62, 63 为同卵双胞胎 G-6-PD 缺乏男性患儿,两者的电泳条带一致,基因测序均为 G1376T 突变;64 为患儿父亲为正常电泳区带,65 为患儿母亲,呈两条电泳带。

2.3 基因测序

对本组异常电泳条带进行基因测序发现 3 个基因突变位点,分别为 G1311A、G1376T 及 G1388A。对 3 例 G-6-PD/6-PGD 比值低于 0.50 的母亲,PCR-DGGE 结果呈现同样为两条区带进行了基因测序,证实均为 1376 及 1388 双重突变杂合子(如标号 60 及 65)。本组未发现该项片段纯合子。见图 2。

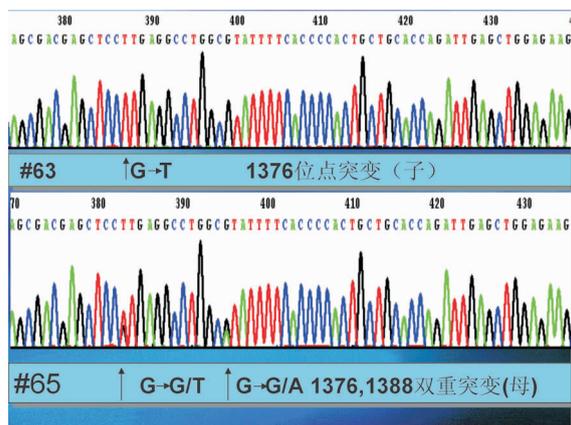


图 2 上图示 G1376T 男性患儿基因序列图;下图示 G1376T 及 G1388A 双重突变杂合子母亲基因序列图

3 讨论

有关 G-6-PD 的检测可分为定性、定量及基因诊断。目前临床最常采用的定性和定量检查方法是

G-6-PD 活性、G-6-PD/6-PGD 比值及四唑氮蓝试验, 后两者 G-6-PD 缺乏的检出率相近^[2,3]。但这两类检验方法只能做为临床诊断,并不能确定具体病变位点,而且存在一定的假阳性和假阴性,特别是针对杂合子的检出阳性率并不十分理想,易造成临床漏诊或误诊,不利于该病的防治和研究。各家采用 G-6-PD/6-PGD 比值法的阳性杂合子的检出率从 22%~71% 不等,但大多数阳性率不超过 50%^[4-9]。有人对 G-6-PD/6-PGD 比值的检测方法进行了改良可以将母系杂合子的检出率提高至 87%^[10],但仍会使一部份 G-6-PD 突变基因的杂合子女性漏诊,因此目前尚无一个理想的该病的筛查方法。

基因诊断虽可以明确该病的基因突变位点是确诊的最直接证据。但由于该病的基因突变位点众多,采用目前已开展的位点特异性寡核苷酸探针杂交法、PCR 错配限制性酶切法及突变特异性扩增系统等检测 G-6-PD 基因突变^[4,11-13] 进行基因诊断的话,则需大量引物,而且要求的技术条件及临床检验成本高,因此限制了临床的普及应用。

DGGE 的原理是双链(ds)DNA 在递增的变性剂浓度梯度或递增的温度梯度中进行电泳。随着变性剂浓度或温度的递增,DNA 上的不同区段则依据它们不同的溶解温度(T_m)而解离,进而导致 DNA 在电泳中的速度发生变化,当不同基因位点发生突变时其电泳行为也会不一样。是目前发现基因突变理想的实验方法之一^[13,14]。Tehemitchko 等^[15]认为,当所检测的 DNA 同时包括由正义链和反义链形成的杂合体,且链的末端附带有 GC 夹时,可查出近 100% 的点突变。

我们运用该项技术对 G-6-PD 缺乏的患者及家系的研究证实,不同的突变位点其电泳的行为不同,较常规的定性和定量方法更为直观,也为进一步进行临床和基础研究提供了可能。该项技术不但可以弥补现行 G-6-PD 定性、定量检测上的不足,也突破了目前基因点突变检测方法一对引物仅能检测一个突变位点的制约,及大片段基因测序所需要昂贵仪器和高检验成本、高耗时的弊端。根据 PCR-DGGE 条带的异常的情况初步估计突变位点并选择性地地进行基因测序,减少工作量,提高准确性。另外,由于无基因诊断的依据,常规定量和定性方法在临床上无法确定患儿及母亲的 G-6-PD 基因携带状态(是否属于单位点或多位点突变、单杂合子、双重杂合子还是纯合子)。以往对母系该病基因携带状态的研究罕有报道。本项对家系 G-6-PD 基因的初步研究提示,PCR-DGGE 方法可以避免上述假阴性或假阳

性的发生。而且能够直观地了解和显示母系该病基因的携带状况。本组 36 个家系的母亲中有 9 位母亲检测出 G-6-PD/6-PGD 比值低于正常,基因分析显示有 3 例为双重杂合子。本组单杂合子母亲在 G-6-PD/6-PGD 比值测定时大都在正常值范围,而双重杂合子的女性 G-6-PD/6-PGD 比值明显降低。说明通过 DGGE 法可以更清晰地了解基因有否发生突变,明显提高杂合子状态的女性阳性检出率。另外,本组尚有 3 个家系在该片段 PCR-DGGE 结果为阴性,提示突变位点可能发生在其他片段。另有 2 例女性患儿的家系调查结果也提示可能存在本次研究片段以外的基因位点上发生突变,上述两种情况有待进一步研究加以证实。

本组研究采用的是 RNA 逆转录成 cDNA 后,进行 PCR-DGGE 检测,这样可以减少引物设计数量(3~4 对引物),提高 G-6-PD cDNA 片段突变位点的检出率。为临床开展该病的研究提供了良好的实验手段。目前有人采用变性高效液相色谱(DH-PLC)法,对该病的 DNA 序列进行了研究,也显示了对该病基因变异型的筛查具有准确、高效、半自动化及经济等优点^[11,16,17]。尤其对无症状女性杂合子及临床 IV 型个体的筛查具有重要意义。但由于该种技术要求的检验设备价格昂贵,要求设计的引物多,技术要求较高,从而也限制了临床的普及。

[参 考 文 献]

- [1] 吴瑞萍,胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第 6 版,北京:人民卫生出版社,1996,1709-1715.
- [2] 王慕逖. 儿科学[M]. 第 4 版,北京:人民卫生出版社,1977,333-334.
- [3] 吴昌学,单可人,何燕,赵艳,齐晓岚,李毅,等. NBT 纸片定性法与 G-6-PD/6-PGD 比值法在大样本 G-6-PD 缺陷症筛查中的联合应用[J]. 临床血液学杂志,2007,20(5):155-157.
- [4] 杜晓晨,罗建明. G-6-PD 缺乏症杂合子检测方法的研究进展[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2007,12(2):92-94.
- [5] 蔡沧,潘莉珍,唐柳巧. 柳州市婚前体检人群红细胞 G-6-PD 缺的基因频率调查[J]. 中国优生与遗传杂志,1997,5(6):32-33.
- [6] 何建萍,何永蜀,李建梅,雷瑾,李霖华. 昆明地区儿童 G-6-PD 缺乏症临床检测[J]. 中国优生与遗传杂志,2004,12(3):119.
- [7] 祁绍荣,杨亚艳,何永蜀,明玲. 云南省保山市城区学龄前儿童葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症基因频率[J]. 中国优生与遗传杂志,2003,11(4):34.
- [8] 任锡麟,修瑾,何燕,吴昌学,齐晓岚,谢渊,等. 少数民族葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测[J]. 中国公共卫生,2004,20(6):672-673.
- [9] 冯彬彬,王红燕,李颂宜. 2320 例新生儿脐血 G-6-PD 筛查结果分析[J]. 南华大学学报医学版,2005,33(2):214-215.
- [10] 陈运生,蒋玮莹,李长钢,李成荣,孙玲玲,徐刚,等. G-6-PD 比值法检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变女性杂合子影响因素的研究[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(5):385-390.
- [11] 郑敏,罗建明. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变的研究进展[J]. 医学综述,2005,11(3):266-268.
- [12] 杜传书. 我国葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症研究 40 年的回顾和展望[J]. 中华血液学杂志,2000,21(4):174-175.
- [13] 张晓莉,府伟灵. 基因突变筛选检测技术[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2002,23(1):13-14.
- [14] 蔡望伟,周代锋,邝宇,蔡兰洁,周玉英. 用等位基因特异聚合酶链反应检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变[J]. 中华血液学杂志,2000,21(4):215-216.
- [15] Tchernitchko D, Lamorit J, Puv H, Robreau AM, Bogard C, Rosipal R, et al. Evaluation of mutation screening by heteroduplex analysis in acute intermittent porphyria; comparison with denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Clin Chim Acta, 1999, 279(1-2):133-143.
- [16] 蒋玮莹,陈路明,林群娣,耿茜,杜传书. 应用变性高效液相色谱技术筛查广东汉族及壮族 G-6-PD 基因变异型[J]. 中华医学遗传学杂志,2005,22(12):607-610.
- [17] 罗建明,李慕军,唐霞,梁徐. 变性高效液相联合测序及酶切检测广西葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的基因型[J]. 中华血液学杂志,2005,26(10):607-611.

(本文编辑:吉耕中)