

论著 · 临床研究

STR 遗传标记在广西地区血友病 A 携带者诊断中的应用

周峻荔¹ 韦红英¹ 吴华² 胡艳玲² 梁伟玲¹

(1. 广西医科大学第一附属医院儿科, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学
医学科学实验中心, 广西 南宁 530021)

〔摘要〕 **目的** 建立理想的 STR 遗传标记体系,对广西地区血友病 A 携带者进行快速简便的基因诊断。**方法** 选取广西地区 10 个血友病 A 家系作为研究对象,运用荧光 PCR 联合毛细管电泳的方法,对家系成员中 FⅧ基因内外具有高度遗传性的 3 个 STR 位点 F8Int13、DXS1073、DXS9901 进行等位基因分型,评估该体系用于家系中血友病 A 携带者的诊断效率,并对待检者进行携带者诊查。**结果** 10 个血友病 A 家系中,11 例肯定女性携带者均含有与相应先证者完全一致的 3 个 STR 等位基因(F8Int13、DXS1073、DXS9901)片段长度;在待检的 8 例女性中,5 例检出 3 个 STR 等位基因片段与相应家系中先证者完全相同,被诊断为血友病 A 携带者。**结论** 联合应用 3 个 STR 位点 F8Int13、DXS1073、DXS9901 进行遗传分析能够快速检出血友病 A 携带者,给血友病 A 产前诊断提供可靠的依据。
[中国当代儿科杂志,2012,14(12):951-955]

〔关键词〕 短串联重复序列;血友病 A;基因分型;携带者
〔中图分类号〕 R554+.1 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2012)12-0951-05

Application of STR genetic marker system in the detection of hemophilia A carriers in Guangxi, China

ZHOU Jun-Li, WEI Hong-Ying, WU Hua, HU Yan-Ling, LIANG Wei-Ling. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Wei H-Y, Email: lzwwhy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To establish a fast and simple genetic diagnosis technique based on a reliable, short tandem repeat (STR) genetic marker system for the detection of hemophilia A carriers in Guangxi, China. **Methods** Fluorescent PCR and capillary electrophoresis were used for allele genotyping at three intragenic/extragenic STR loci (F8Int13, DXS1073, and DXS9901) of FVIII gene in the members of 10 hemophilia A families in Guangxi, so as to evaluate the diagnostic efficiency of the STR genetic marker system for detection of hemophilia A carriers. Then the STR genetic marker system was used to detect hemophilia A carriers among examinees. **Results** In the 10 hemophilia A families, 11 confirmed female carriers had the same allele fragment lengths at the three STR loci (F8Int13, DXS1073, and DXS9901) as the probands. Of the 8 females examined, 5 had allele fragments at the three STR loci (F8Int13, DXS1073, and DXS9901) which were identical to those of the probands, and thus they were diagnosed as hemophilia A carriers. **Conclusions** Genetic analysis at the three STR loci (F8Int13, DXS1073, and DXS9901) can be used to detect hemophilia A carriers rapidly and provide reliable basis for prenatal diagnosis of hemophilia A.
[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(12):951-955]

Key words: Short tandem repeats; Hemophilia A; Genotyping; Carrier

血友病 A 是最常见的遗传性出血性疾病之一,为 X 连锁隐性遗传,即女性传递、男性发病,男性患病率约为 1/5000^[1],该病主要由于凝血因子Ⅷ(FⅧ)基因缺陷而引起血浆内 FⅧ含量不足或功能缺陷,导致凝血功能障碍。临床上根据患者新鲜血浆所含因子Ⅷ:C 活性水平的高低,将血友病 A 分为重型(<1%)、中型(1%~5%)、轻型(>5%~25%)及亚临床型(>25%~45%)^[2]。目前尚无有效根治措施,只能采用输入凝血因子的终身替代疗法来控制病情,携带者诊查及产前诊断是有效降低本病发生率的首选措施。本研究选择 FⅧ基因内外的 3 个短串联重复序列(short tandem repeats, STR)基因位点作为遗传标记,运用荧光 PCR 联合毛细管电泳自动分型的方法对广西地区 10 个血友病 A 家系进行携

[收稿日期]2012-05-22;[修回日期]2012-07-22
[项目基金]广西科学基金项目(0728070)。
[作者简介]周峻荔,女,硕士研究生。
[通信作者]韦红英,副主任医师。

带者诊断,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

10 个无血缘关系的血友病 A 家系纳入本研究,各家系成员资料见表 1。个体 3 代均为广西人群,民族为汉族或壮族。静脉血标本采集经广西医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准,并获得受试者知情同意。

表 1 10 个家系成员的基本资料

家系号	受检者			APTT(s)	FⅧ: C(%)	STR 位点的等位基因片段大小 (bp)						是否携带者
	编号	身份	年龄(岁)			F8Int13		DXS1073		DXS9901		
I	1	先证者	12	99.9	1.35	152		137		197		
	2	先证者舅舅	34	80.4	1.8	152		137		197		
	3 *	先证者母亲	36	35.4	55.8	152	152	137	125	197	211	是
	4 ▲	先证者妹妹	5	32.0	81.5	152	152	137	125	203	211	否
II	5	先证者	4	123.6	1.3	156		125		203		
	6 *	先证者母亲	30	35.5	59.3	156	150	125	123	203	199	是
	7 *	先证者姨妈	28	31.2	65.6	156	150	125	123	203	199	是
III	8	先证者	28	116.8	1.31	150		125		201		
	9	先证者弟弟	26	101.6	4.3	150		125		201		
	10 *	先证者母亲	50	35.8	57.6	150	150	125	125	201	195	是
	11 *	先证者女儿	5	37.6	70.0	150	150	125	123	201	203	是
IV	12	先证者	55	70.5	2.8	150		125		197		
	13	先证者弟弟	48	61.6	3	150		125		197		
	14 ▲	先证者妹妹 1	49	35.9	82.7	150	152	125	125	197	197	是
	15 ▲	先证者妹妹 2	53	37.7	62.4	150	152	125	125	197	197	是
V	16	先证者	7	103.9	4.1	152		125		195		
	17	先证者舅舅	28	149.3	0.98	152		125		195		
	18 *	先证者母亲	30	36.5	61.2	152	152	125	123	195	195	是
VI	19	先证者	29	52.7	9.4	148		137		215		
	20 *	先证者女儿	6	37.4	62.4	148	152	137	125	215	203	是
	21 ▲	先证者姨妈	38	37.5	55.9	148	152	137	125	213	213	否
VII	22	先证者	18	100.5	1.12	150		125		203		
	23 *,#	先证者母亲	35	36.9	52.9	150	148	125	125	203	203	是
	24 ▲	先证者妹妹	16	34.2	83.3	150	148	125	135	203	195	是
VIII	25	先证者	9	138.6	1.09	156		123		195		
	26 *,#	先证者母亲	35	33.7	51.8	156	152	123	125	195	199	是
	27 ▲	先证者姨妈	33	33.5	57.4	154	152	125	125	195	199	否
IX	28	先证者	22	110.1	1.22	148		123		195		
	29 *,#	先证者母亲	45	38.4	63.8	148	150	123	137	195	203	是
	30 ▲	先证者妹妹	19	41.8	44.4	148	150	123	123	195	203	是
X	31	先证者	7	103.6	1.97	150		125		195		
	32 *,#	先证者母亲	30	30.7	106.3	150	152	125	127	195	209	是
	33 ▲	先证者妹妹	5	37.5	78.5	150	150	125	135	195	203	是

注:▲表示血友病 A 携带待检者; * 表示血友病 A 肯定携带者; # 表示经直接基因测试确诊为血友病 A 女性携带者。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 运用血液 DNA 提取试剂盒 (Qiagen),按照试剂说明书的步骤提取,提取的 DNA 通过紫外可见分光光度计测定其浓度和含量。

1.2.2 引物合成及荧光标记 引物合成参见文献^[3],由上海生工合成。STR 位点的引物序列及荧光标记、产物长度见表 2。

1.2.3 PCR 反应体系 PCP 反应的总体积为 20 μ L,Mix 10 μ L,模板 1 μ L,上下游引物各取 0.4 μ L (引物浓度为 10 μ M),运用 ABI2720 进行 PCR 扩增。PCR 循环条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 5 min,共 30 个循环;72℃ 再延伸 5 min。

1.2.4 毛细管电泳 去离子甲酰胺、GeneScan-500[ROX]分子量标准物、PCR 混合产物按 9:0.6:0.6 的比例,混合均匀,离心,置 95℃ 变性 3 min,然后立即置冰上 10 min,运用 ABI3100 对 PCR 产物进行毛细管电泳。

1.2.5 DNA 基因分型 采用 GeneScan 软件及 Genotyper 软件进行 STR 基因分型^[4]。

2 结果

10 个血友病 A 家系中,11 例肯定女性携带者均含有与相应先证者完全一致的 3 个 STR 等位基因 (F8Int13、DXS1073、DXS9901) 片段长度,其中有 4 例经直接基因诊断确定为女性携带者。在待检的 8 例女性中,5 例检出 3 个 STR 等位基因片段与相应家系中先证者完全相同,被诊断为血友病 A 携带者,其他 3 例 STR 等位基因片段与先证者不完全相同,被判断为非血友病 A 携带者。见表 1。

本研究应用家系 I 进行说明,家系情况见表 3。编号 1、2 均为血友病 A,编号 3、4 分别为先证者的母亲和妹妹,其中编号 3 为该家系中血友病 A 肯定携带者,编号 4 为待检者。STR 遗传标记分析提示:编号 3 带有和编号 1、2 同样的等位基因片断,证实其为血友病 A 肯定携带者;编号 4 未带有和编号 1、2 同样的等位基因片断,可以初步判断先证者的妹妹为非血友病 A 携带者,见图 1~2。

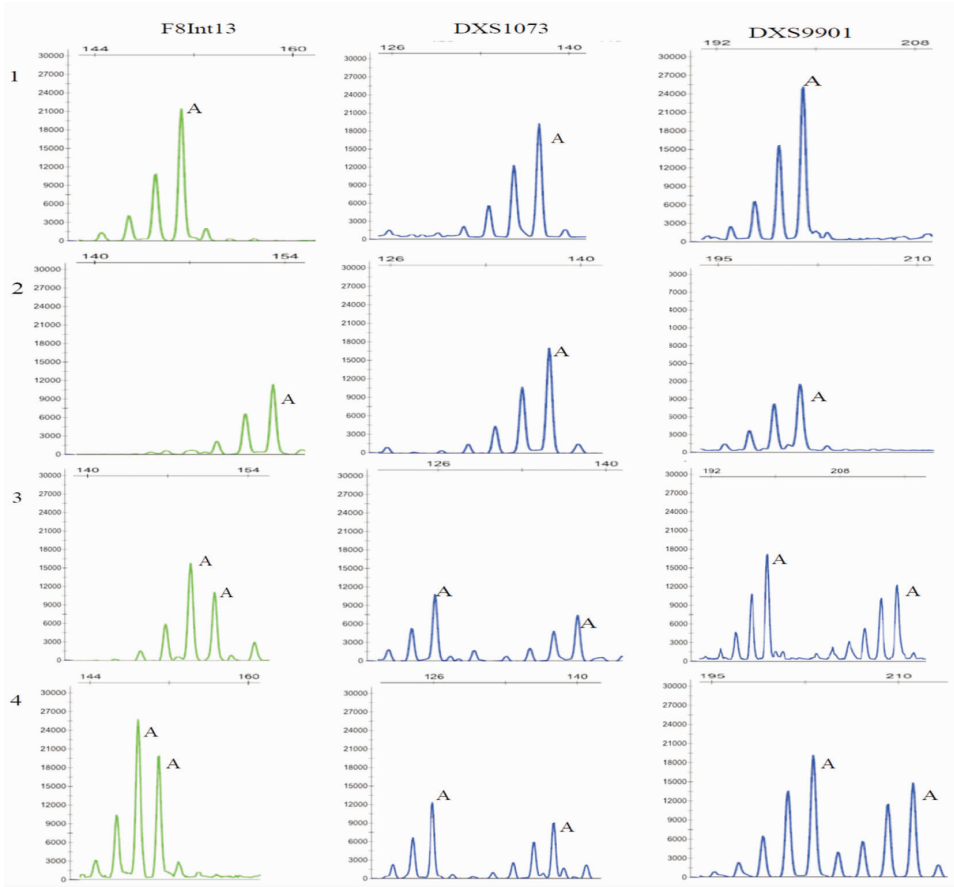


图1 血友病 A 家系 I 3 个位点 (F8Int13,DXS1073,DXS9901) 的毛细管电泳图 横轴表示的是等位基因片段长度,纵轴表示的是荧光的敏感度,图中字母 A 代表等位基因对应的波峰,单个 A 表示的是纯合子,两个 A 表示的是杂合子,其他波峰为 stuffer 峰或杂峰。1 为先证者,2 为先证者舅舅 (血友病 A 患者),3 为先证者母亲,4 为先证者妹妹。

表 2 各位点的引物序列及荧光标记

STR 位点	引物序列及荧光标记	产物长度 (bp)
F8Int13	5'-AATAAGTTTGTGTGAATCCCATTTGC-3'	152 ~ 168
	5'-(HEX) GCCTAGAGAATGCCAAAGTAACACA-3'	
	5'-ATGCCCTCTCCGAGTTATTACA-3'	
DXS1073	5'-(6-FAM) ATTGCTGGCCTTTGAAACAC-3'	120 ~ 138
	5'-GACCAGTCCTCCCTTCTGTT-3'	
	5'-(6-FAM) GTGTGGAGTGAAAGGGACAG-3'	

表 3 家系 I 相关成员的 APTT 值及 FVIII 活性

编号	家系成员	APTT	FVIII 活性 (%)
1	先证者	99.9	1.35
2	先证者舅舅	80.4	1.8
3	先证者母亲	35.4	55.8
4	先证者妹妹	32.0	81.5

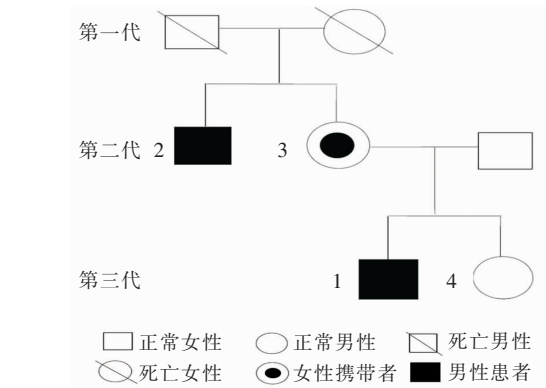


图 2 血友病 A 家系 I 的遗传图谱 1 为先证者,2 为先证者舅舅,3 为先证者母亲,4 为先证者妹妹。

3 讨论

FVIII 基因位于染色体 Xq28 上,长约 186 kb,包含 26 个外显子及 25 个内含子,结构庞大复杂,且突变类型多,70% ~ 80% 血友病 A 的 FVIII 基因突变具有显著的遗传异质性^[2],几乎每一不同的家系都有自己独特的突变类型,运用直接基因诊断检测突变类型相当繁琐、耗时,诊断费用昂贵,目前对于在能提供先证者 DNA 样本和完整家系的前提下,国内外学者多通过分析 DNA 遗传标记的多态性来估计该家系中被检查者患病的可能性,即连锁分析。

STR 在人群中分布广泛,因其多态性好,突变率低,种属特异性高而倍受学者们的青睐,近年来成为血友病 A 连锁分析中最常用的遗传标记^[3,5-6]。国内外学者研究均发现,FVIII 基因中内含子 13 (CA)_n 含有较为理想的多态信息量^[7],是迄今为止所含信息量最大的位点,Lalloz 等^[8]报道其多态信息量达 69%。位于 FVIII 基因外的 DXS9901 和 DXS1073 两个位点在中国汉族人群中也有较高的杂合率,上海

瑞金医院选用 DXS15、DXS9901、G6PD、DXS1073、DXS1108 和 F8 Int13 等数个多态性位点,运用多重荧光 PCR 的方法,已成功应用于血友病 A 的携带者和产前诊断^[3]。

STR 存在地区和民族差异性,研究中应根据不同人群的实际情况选择杂合率较高的一些标志物联合检测,以提高检出率和可靠性。由于壮族和汉族为广西地区最大的 2 个民族,在既往的研究中,本研究课题组对广西地区正常人群(汉族和壮族)FVIII 基因内外的 5 个 X-STR 位点(F8Int22、F8Int13、DXS1073、DXS1108、DXS9901)进行长度多态性分析,结果示 5 个 STR 位点的杂合率分别为 42%、56%、57%、40%、78%,多态信息量分别为 0.43、0.59、0.59、0.42、0.82,个体识别能力分别为 0.658、0.819、0.824、0.665、0.945,由此可见,F8Int13、DXS1073、DXS9901 这 3 个 STR 位点在广西地区汉族和壮族两大人群的杂合率较高,且 PIC 均大于 0.5,为高度信息量位点^[9],此外三个个体识别能力(DP)均达 0.8 以上,根据联合个体识别能力(TDP)公式:TDP = 1-(1-DP1)(1-DP2) … (1-DPn)^[10],3 个 STR 位点累计个体识别能力为 0.9824。由于 F8Int13、DXS1073、DXS9901 这 3 个 STR 位点具有较高的遗传性,且联合个体识别能力高,可入选为广西地区血友病 A 家系连锁分析的遗传标记位点。

本研究运用了荧光 PCR 的方法,将这 3 个入选的 STR 位点(F8Int13、DXS1073、DXS9901)作为遗传标记联合应用于 10 个血友病 A 家系进行连锁分析,结果所有肯定女性携带者均被检出;8 例待检者中,5 例被诊断为血友病 A 携带者,3 例被判断为非血友病 A 携带者。提示联合应用适合本土的 STR 遗传标记体系能够快速检出血友病 A 携带者,并为下一步血友病 A 产前诊断提供了可靠的遗传信息。

STR 连锁分析用于血友病 A 的携带者诊断具有简单、快速、经济等优势,然而,本法的应用受到特定家系条件的限制。其适用范围包括:(1)肯定女性携带者家系中携带者的诊断。所谓肯定女性携带者,是指父亲为血友病 A,或 ≥2 个儿子为血友病 A,或一个儿子患病,并且有其他男性亲属为血友病 A 的女性。(2)联合直接测序法对可疑女性携带者家系中携带者的诊断。所谓可疑女性携带者,即有一个儿子患病,其他家庭成员正常,或其家系中有血友病 A 的女性^[4]。首先对先证者及其母亲进行直接基因诊断,在确定母亲为肯定女性携带者后可用 STR 连锁分析进行家系中携带者诊断。(3)同样的诊断程序,不仅可以应用于判断携带者,也可应用于

产前诊断。值得注意的是,由于重型血友病 A 中约 40% ~ 50% 患者为 FⅧ中内含子 22 或内含子 1 倒位所致^[11-12],STR 连锁分析并不适用于此类患者家系的携带者诊断或产前诊断。

不可否认,随着科学实验技术的飞速发展和迅速普及,直接测序、基因芯片技术等直接基因诊断的“短处”会越来越淡化,直接基因诊断有着更广阔的应用和发展空间。利用 STR 遗传标记间接诊断血友病 A 携带者的方法虽然在适用人群上有一定的局限性,但是由于其低成本、便捷、易操作等优点,较适用于经济或实验室欠发达的地区。根据 2010 年“血友病的诊断和治疗专家共识”,对于内含子 22 和 1 倒位均为阴性的家系,主要通过对联合 FⅧ基因内外多态性位点进行遗传连锁分析,最后对血友病 A 家系女性成员作携带者或产前基因诊断^[13];另外,采用荧光标记 STR 遗传位点连锁分析联合直接基因测序检测突变位点的方法进行血友病 A 携带者的诊断及产前诊断也被认为是目前血友病 A 的主流预防措施^[14]。可见间接基因诊断仍旧为血友病 A 携带者诊断和产前诊断体系中的构成部分,仍然有较高的实际应用价值。

本研究建立的 STR 遗传标记连锁分析体系,通过增加受试家系,必要时基因测序进一步验证其有效性等深入研究后,相信能为广西地区血友病 A 的高危家庭提供遗传咨询,甚至应用于产前诊断。

[参 考 文 献]

[1] 邵宗鸿,杨天楹. 中国血友病患率与八个地区生存率调查

[J]. 中华血液学杂志,1992,13(9):461-463.

[2] 杨仁池,王鸿利. 血友病[M]. 上海:上海科学技术出版社,2007: 1-20.

[3] Fang Y, Wang XF, Dai J, Wang HL. A rapid multicolor polymerase chain reaction for genetic counselling in Chinese haemophilia A families[J]. Haemophilia, 2006, 12(1): 62-67.

[4] 侯一平,刘雅诚. 法医 DNA 分型[M]. 北京:科学出版社,2007: 274-284.

[5] 朱春江,龙桂芳. 微卫星及在血友病甲基因诊断中的研究进展[J]. 华夏医学,2006,19(3):595-597.

[6] Liang Y, Zhao Y, Yan M, Fan XP, Xiao B, Liu JZ. Prenatal diagnosis of haemophilia A in China[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(7): 664-667.

[7] Lalloz MR, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham EG. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene[J]. Lancet, 1991, 338(8761): 207-211.

[8] Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene[J]. Br Haematol, 1994, 86(4): 804-809.

[9] 吕宝忠. 多态信息量(PIC)等于杂合度吗? [J]. 遗传,1994,16(4):31-33.

[10] 李彩霞,凌凤俊,涂政,郑秀芬. 犬的三个 STR 基因座遗传多态性[J]. 动物医学进展,2002,23(5):80-81.

[11] Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A[J]. Nat Genet, 1993, 5(3): 236-241.

[12] Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Iannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A[J]. Blood, 2002, 99(1): 168-174.

[13] 丁秋兰,王学锋,王鸿利,孙竞,华宝来,吴竞生,等. 血友病诊断和治疗的专家共识[J]. 临床血液学杂志,2010,23(1):49-53.

[14] Dai J, Lu Y, Ding Q, Wang H, Xi X, Wang X. The status of carrier and prenatal diagnosis of haemophilia in China [J]. Haemophilia, 2012, 18(2): 235-240.

(本文编辑:邓芳明)