

论著·临床研究

## 逆转录-PCR-变性梯度凝胶电泳法检测 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因缺陷女性携带者

陈小文<sup>1</sup>, 李长钢<sup>2</sup>, 岳丽杰<sup>1</sup>, 张氏<sup>1</sup>, 陈运生<sup>3</sup>, 麦惠容<sup>2</sup>, 王纓<sup>2</sup>, 李成荣<sup>1</sup>

(1. 深圳市儿童医院儿科研究所; 2. 深圳市儿童医院血液科; 3. 深圳市儿童医院检验科, 广东 深圳 518026)

**[摘要]** 目的 探讨应用逆转录-PCR-变性梯度凝胶电泳法(RT-PCR-DGGE)对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)基因缺陷女性携带者人群进行分子诊断的可行性。方法 对54例G6PD基因缺陷可疑携带女性的血液标本,应用外周血提取总RNA并逆转录成cDNA;针对已报道的中国人17种突变位点,以cDNA为模版,分段设计6对DGGE引物,PCR扩增、DGGE筛查分型,必要时进行测序验证。结果 54例可疑标本共检出1例1024C/T、20例1376G/T、12例1388G/A,共检出杂合突变标本33例,总检出率为61.1%。结论 RT-PCR-DGGE对G6PD基因缺陷女性携带者人群具有较高的检出率,具有临床诊断意义。[中国当代儿科杂志,2009,11(8):613-616]

**[关键词]** 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;基因;变性梯度凝胶电泳;女性

**[中图分类号]** R394.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)08-0613-04

### Genetic diagnosis for female carriers of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency by RT-PCR-DGGE

CHEN Xiao-Wen, LI Chang-Gang, YUE Li-Jie, ZHANG Min, CHEN Yun-Sheng, MAI Hui-Rong, WANG Ying, LI Chen-Rong. Lab of Molecular Hematology, Shenzhen Institute of Pediatrics, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Li C-G, Email: licg6336@sina.com)

**Abstract: Objective** To study the feasibility of genetic diagnosis for female carriers of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency by reverse transcriptase-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (RT-PCR-DGGE). **Methods** Blood samples were collected from suspected 54 female carriers of G6PD deficiency. Total RNAs of peripheral blood were prepared and reverse-transcribed into cDNA. Design of 6 primer pairs for DGGE was based on 17 mutation sites of G6PD cDNA described in the Chinese population. Mutations in the coding region of G6PD gene were screened and genotyped by combination of PCR-DGGE and DNA sequencing. **Results** One case of 1024C/T, 20 cases of 1376G/T and 12 cases of 1388G/A were detected in the 54 samples. The total detection rate was 66.1% (33/54). **Conclusions** Heterozygous mutation rate in female carriers of G6PD deficiency detected by RT-PCR-DGGE is high. RT-PCR-DGGE is value of clinical diagnosis for G6PD-deficiency female carriers.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (8):613-616]

**Key words:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Gene; Denaturing gradient gel electrophoresis; Female

红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症,是全球最常见的遗传性溶血性疾病。它是导致多种药物性溶血、蚕豆病、新生儿黄疸、某些感染性溶血及非球形细胞溶血性贫血的遗传基础。目前,临床上筛查和诊断G6PD缺乏的方法主要有高铁血红蛋白还原试验、荧光斑点试验、G6PD/6PGD比值法、硝基四氮唑蓝(NBT)定量法、WHO标准定量法等,这些方法普遍存在对G6PD基因缺陷女性携带者人群

检出率偏低等缺陷,使部分患者不能早期诊断<sup>[1,2]</sup>。我们曾采用逆转录-PCR-变性梯度凝胶电泳法(reverse transcriptase-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RT-PCR-DGGE)对G6PD缺乏症的分子诊断进行了研究探讨,取得了一些进展<sup>[3]</sup>。因此,我们运用该法对临床可疑G6PD基因缺陷女性携带者进行了研究。

[收稿日期]2009-05-08;[修回日期]2009-06-20

[基金项目]深圳市科技计划项目(200601004)。

[作者简介]陈小文,男,硕士,助理研究员。主攻方向:分子血液肿瘤学。

[通讯作者]李长钢,男,主任医师,深圳市儿童医院血液科,邮编:518026。

# 1 材料与方法

## 1.1 标本来源

G6PD 定量比值法测试 G6PD 比值为 1.0 ~ 1.25 的女性 G6PD 基因缺陷携带者可疑标本 54 例,均来自 2006 年 10 月至 2008 年 11 月间我院门诊及住院女性 G6PD 缺陷症可疑患儿及 G6PD 缺乏患者母亲,年龄 4 个月至 36 岁。

## 1.2 G6PD/6PGD 比值测定

采用广州市米基医疗器械有限公司生产的改良 G6PD 定量比值法试剂盒,检测方法按试剂盒说明书进行。G6PD 基因缺陷携带者可疑标本选择标准:原方法 G6PD/6PGD 比值 < 1.00 为缺乏,比值 > 1.00 为正常,但结合临床实践及本课题组前期有关研究,比值为 1.00 ~ 1.25 可疑标本中包含许多杂合子,因此本研究选取比值为 1.00 ~ 1.25 标本作为研究对象。

## 1.3 DNA 和 RNA 提取及 cDNA 的制备

外周血 3 ~ 4 mL,使用 QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood

Mini Kit (德国 QIAGEN 公司)抽提总 RNA, QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit 抽提基因组 DNA,紫外分光光度计测定浓度和纯度。1 μg 总 RNA 使用禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶(大连宝生物工程有限公司)逆转录获取 cDNA。所有方法按说明书进行。

## 1.4 PCR

(1)全长 cDNA 编码区扩增:参照 mRNA 碱基序列(基因库登录号:BC000337)设计引物。上游引物:5'-GAAGCGCAGACAGCGTCATGGCAGA-3',下游引物:5'-TGCCCAGGGCTCAGAGCTTGT-3',由上海生工或大连宝生物公司合成。(2)巢式或半巢式 PCR:应用软件 WinMelt<sup>™</sup> 2.0 自行设计 6 对引物,设计的突变检测范围涵盖国内已发现的所有 17 种突变位点(6 对引物的检测范围几乎包含了整个编码区,同时通过软件分析理论上也可以检出许多国内未报道甚至全新的突变位点)<sup>[1,2,4]</sup>,其中每对引物中有一条的 5'端加上 40 个只含 GC 碱基的片段(GC clamp,GC 夹)(表 1)。PCR 扩增在 PTC-200 Peltier 热循环仪(美国 MJ Research<sup>™</sup> 公司)上进行。

表 1 G6PD 基因 PCR-DGGE 的引物序列

引物对	包含的检测突变位点	引物序列
1F/R	A95G	5'-GGGATCCTGCGGGAAGAGCTTT-3'/GC 夹-5'-GAAGGCCATCCCGAACAGC-3'
2F/R	G392T	5'-GCGTGCCCGCAACTCCTATG-3'/GC 夹-5'-CTCGTGAATGTTCTTGGTGAC-3'
3F/R	G487A, A493G, T517C, C519T, C592T	5'-CACCAAGAACATTCACGAGTC-3'/GC 夹-5'-CCTGTTGGCAAATCTCAGCAC-3'
4F/R	A835G, A835T, G871A	GC 夹-5'-CGCGGGGCTATTTCGATGAATTT-3'/5'-CCCAGGACCACATTTGTTG-3'
5F/R	C1004T, C1024T	5'-AGGGCGAGGCCACAAA-3'/GC 夹-5'-GCCGACGCGCAGGATGAA-3'
6F/R	C1360T, G1376T, G1381A, C1387T, G1388A	5'-GTCGGAGCTGGACCTGACCTA-3'/GC 夹-5'-GGGGCCTCGGCTGCCATA-3'

注:GC 夹序列为:5'-GCCCCGCCCCGCCCCCTGCCCGCGCCCCGCGCCCCCGC-3'

## 1.5 变性梯度凝胶电泳(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% 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°C, 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<sup>™</sup> 基因突变检测系统(美国 BIO-RAD 公司),GDS800 凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司)。主要试剂为丙烯酰胺、双丙烯酰胺、去离子甲酰胺和尿素(美国 AMRESCO 公司)。

## 1.6 DNA 测序分析

对在 DGGE 分析中发现的有异常条带的样本

进行测序(测序由上海生工或大连宝生物完成)。参照基因库中 mRNA 序列判断每一变异,并经基因组 DNA 扩增测序再验证。

## 1.7 统计学分析

用基因计数法统计基因突变检出率。

# 2 结果

## 2.1 DGGE 筛查结果及测序验证

对 54 例上述 G6PD 缺陷症可疑女性标本,6 对引物采用同样的 PCR 扩增参数和 DGGE 电泳条件,其中引物对 5F/R 成功检测到 1 例杂合子,引物对 6F/R 成功检测到 32 例杂合子,代表性 DGGE 电泳图见图 1。由于杂合子在 DGGE 电泳中显示为 4 条

条带,而正常标本则为1条条带,因此从图中可以一目了然地判断出哪些标本是杂合子,且基本可以判断这些杂合子分为3类,经测序验证这3类杂合子分别为1024 C/T、1376 G/T、1388 G/A,其代表性测序图谱见图2。经过测序校验后,对样本的DGGE电泳图谱进行带型分析(正常条带的位置以及4条条带相互之间的距离等)基本就能判断杂合子的类型。

### 2.2 各型杂合子的检出率

DGGE结合测序发现G6PD缺陷症可疑女性标本的各型杂合子的检出率:1024 C/T类为1.85% (1/54),1376 G/T类为37.0% (20/54),1388 G/A类为22.2% (12/54),总检出率分别为61.1%。

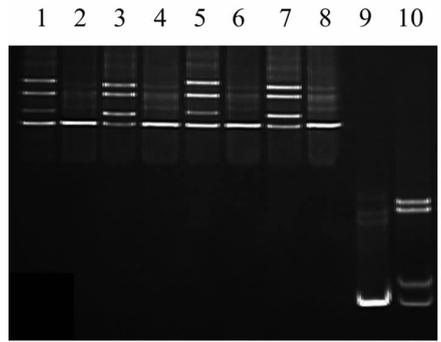


图1 3种杂合位点代表性DGGE电泳图 泳道1、5: 1376 G/T(杂合突变型);泳道3、7:1388 G/A(杂合突变型);泳道2、4、6、8:1376 G/G+1388 G/G(1376、1388位点均为野生型);泳道10:1024 C/T(杂合突变型);泳道9:1024 C/C(野生型)。注:泳道1~8为引物对6F/R扩增产物,泳道9、10为5F/R扩增产物。

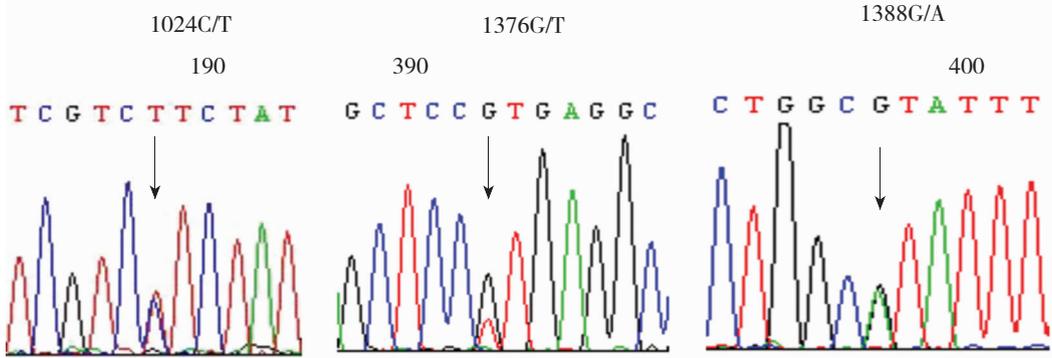


图2 3种杂合位点代表性测序图 杂合位点的位置在图的上方表示,箭头(↓)代表变异的碱基。各图箭头指示位点均显示该位点为两种碱基(两种颜色)的杂合子。

### 3 讨论

G6PD缺乏症是我国南方最常见的X连锁遗传病,在广东、广西、四川、贵州、云南等地区的发病率为4%~15%,有的地方甚至高达40%。轻度G6PD缺乏者(主要包括一些G6PD基因缺陷携带者)往往不为人注意,但可能在服用一些药物或吃蚕豆后会出现症状,而研究发现29%~52%的G6PD缺乏者在生后头几天发生溶血性黄疸,严重的会发展为新生儿核黄疸导致死亡或终生智力低下。G6PD缺乏症无特殊治疗,应及早确诊,从而采取一些措施预防G6PD缺乏症引起的新生儿黄疸、急性溶血等症状。

DGGE是近年来发展较快的一种基因突变检测方法,以其高敏感性、高检出率(甚至可高达100%)、重现性好等特点而受到普遍关注,以DGGE方法作为基因诊断工具的报道也日渐增多<sup>[5-9]</sup>。DGGE对异源双链(杂合突变型)DNA的检出具有尤其敏感的特点,使得其可以大大弥补常规方法对G6PD缺乏症杂合子检出率偏低的缺陷。考虑到以

DNA为模板针对覆盖全长范围突变位点需要至少12对的DGGE引物对,对基因诊断而言,引物量大,很难一次同时进行分析;而且作为X连锁基因,由于女性存在X染色体随机失活的原因,G6PD基因的mRNA更能体现突变基因与临床症状(即蛋白表达)的对应关系,因此,本研究选择mRNA作为起始研究模板,进行RT-PCR-DGGE分析。

研究结果显示,利用此方法在54例G6PD缺陷症可疑女性标本中成功检出33例杂合突变,具体分为3种基因型,总检出率为61.1%。尽管61.1%的突变检出率从数字上看有点偏低,但考虑到这一部分标本常被临床误判为正常标本而被漏检的前提,我们认为该方法对于G6PD基因缺陷女性携带者的检出还是具有较高的临床应用价值。当然,作为临床应用,其引物设计参数及实验条件可能需要进一步完善。对于其他未检出突变21例(38.9%)可疑标本,我们分析可能存在如下几种情形:①参与基因表达调控的非编码区序列变异,造成G6PD基因表达下调从而使酶的总活性下降;②内含子变异造成mRNA非正常剪切从而使酶的活性丧失或下调;③

引物设计及实验条件等原因造成的国内未报道的某些突变位点不能检出,这种情况可通过对此类标本基因编码区全片段测序确认后,再通过调整引物或实验条件来摸索改善;④由于个体差异(不同的遗传背景)造成 G6PD 基因正常的标本酶活性偏低。

通过观察电泳图谱,我们发现该方法对于杂合子突变的结果非常容易判读,扩增后电泳出现 4 条带的即为杂合子。正常对照的电泳结果为 1 条带,但罕见的女性纯合子突变者也为 1 条带,但与正常对照条相比较,其电泳行为,即电泳条带位置不一样。在实验中往往会设计正常对照,另外实验中非杂合子的单一条带绝大部分往往就是正常对照条带。因此从灵敏度的角度来看,该方法也显示其临床应用上的价值,可以在一定程度上填补 G6PD 缺陷症可疑女性标本诊断方面的空白。另外,作为基因诊断方法,该方法也可以在一定程度上弥补酶学检测的 G6PD /6GPD 比值定量法等受贫血、感染等因素的影响而可能存在的误诊现象。

综上所述,我们认为,该方法可作为对 G6PD 缺陷症可疑女性对象的一种新的检验方法,但需得到临床进一步的扩大验证和再优化,使其成为 G6PD 缺乏症临床诊断的理想临床诊断方法。

[参 考 文 献]

[1] 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.  
[2] 朱平. 临床分子遗传学[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2002, 250-273.  
[3] 陈小文,岳丽杰,李长钢,张民,陈运生,李成荣. 逆转录-PCR-变性梯度凝胶电泳法检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(9):1048-1051.  
[4] Jiang W, Yu G, Liu P, Geng Q, Chen L, Lin Q, et al. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population[J]. Hum Genet, 2006, 119(5):463-478.  
[5] K rkk  J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Ala-Kokko L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations; comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(4):1681-1685.  
[6] van der Hout AH, van den Ouweland AM, van der Luijt RB, Gille HJ, Bodmer D, Br uggenwirth H, et al. A DGGE system for comprehensive mutation screening of BRCA1 and BRCA2: application in a Dutch cancer clinic setting[J]. Hum Mutat, 2006, 27(7):654-666.  
[7] Anukam KC, Reid G. Organisms associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequence[J]. Afr Health Sci, 2007, 7(2):68-72.  
[8] Rendtorff ND, Bjerregaard B, Fr odin M, Kjaergaard S, Hove H, Skovby F, et al. Analysis of 65 tuberous sclerosis complex (TSC) patients by TSC2 DGGE, TSC1/TSC2 MLPA, and TSC1 long-range PCR sequencing, and report of 28 novel mutations[J]. Hum Mutat, 2005, 26(4):374-383.  
[9] Lacerra G, Fiorito M, Musollino G, Di Noce F, Esposito M, Nigro V, et al. Sequence variations of the alpha-globin genes; scanning of high CG content genes with DHPLC and DG-DGGE[J]. Hum Mutat, 2004, 24(4):338-349.

(本文编辑:邓芳明)

· 消息 ·

## 欢迎订阅《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、社区医师园地、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊2009年起改为月刊,每月15日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价12元,全年144元。邮发代号:国内 42-188;国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免审稿费,审稿周期3~6周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008  
电话:0731-84327402 传真:0731-84327922 Email:ddek7402@163.com  
网址: [http:// www. cjcp. org](http://www.cjcp.org)