论著

文章编号:1000-5404(2008)03-0210-03

β-地中海贫血与先天性软骨发育不全诊断性基因芯片的构建

胡章雪[1],李 力[2],肖 梦[3],周元国[4],李华强[1],顾大勇[4],易 萍[2] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所儿科,[2]大坪医院野战外科研究所妇产科,[4]大坪医院野战外科研究所第七研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042,[3]基础医学部生物化学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 建立一种能同时快速、准确地检测β-地中海贫血与先天性软骨发育不全常见基因突变的技术。方法 将针对2种疾病常见突变的特异性氨基修饰寡核苷酸探针点样于醛基修饰的玻片上,制成基因芯片,对β-地中海贫血、先天性软骨发育不全的病例和正常样本进行基因诊断。结果 该基因芯片成功检测到相应的突变位点。结论 该芯片制作成本低,重复性好,特异性高,能满足临床标本检测的要求,具有良好的临床应用前景。

关键词:DNA芯片;基因芯片;β-地中海贫血;先天性软骨发育不全;生物素
中图法分类号:R318.04;R394-33;R556.610.4 文献标识码:A

DNA chip construction for β-thalassemia and achondroplasia

HU Zhang-xue[1], LI Li[2], XIAO Meng[3], ZHOU Yuan-guo[4], LI Hua-qiang[1], GU Da-yong[4], YI Ping[2] ([1]Department of Pediatrics, [2]Department of Gynecology and Obstetrics, [4]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 7, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042; [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To build a gene chip that is used to simultaneously detect the constant gene mutations of β-thalassemia and achondroplasia quickly and exactly. Methods Specific aminated oligonucleotide probes based on the constant gene mutations were fixed on the aldehyde modified glass. The gene chip was made. The blood sample from 3 children with β-thalassemia and from 3 children with achondroplasia and 6 normal subjects was used to diagnose β-thalassemia and achondroplasia by the gene chip. Results The gene chip successfully detected the certain mutations. Conclusion The low-cost chip is of well-repeated and high specificity in checking clinical samples.

Key words: DNA chip; microarray; β-thalassemia; achondroplasia; biotin

各种遗传病的基因诊断方法各不相同,因此,产前要实现多种遗传病的基因诊断不仅技术繁琐、耗时长,且受到临床标本量少的限制[1]。近十年快速发展的基因芯片技术为解决该问题提供了有力的支持,并且已在遗传病的基因诊断方面发挥出其独特优势[2]。β-地中海贫血(β-thalassemia)和先天性软骨发育不全(achondroplasia,ACH)均是最为常见的遗传性疾病,若能及时进行基因诊断,则对优生优育具有积极的指导作用。本研究拟构建能够同时检测这2种疾病的基因芯片,并采用临床标本对此芯片的重复性和特异性进行了验证,为探索这两类疾病的基因诊断方法提供了一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

共检测标本12例。其中β-地中海贫血3例(由重庆医科大学儿童医院儿科医学研究所提供的β-地中海贫血患儿基因组DNA标本),ACH 3例(随访重庆医科大学儿童医院临床诊断的ACH患儿全血标本2例,本所提供的ACH患儿全血标本1例)。正常对照标本6例(为本所提供无上述2种疾病的全血标本)。

1.2 血液基因组DNA抽提

采用改良酚-氯仿抽提法。500 μl血液与500 μl红细胞裂解液混匀,8 000 r/min离心30 s;1 ml冷PBS悬浮沉淀,8 000 r/min离心30 s重复1次;加裂解液450 μl、蛋白酶K至终浓度100 μg/ml,悬浮沉淀37 ℃过夜;平衡酚抽提2次后,氯仿/异戊醇抽提1次,加入45 μl 30 mol/L乙酸钠和2.5倍体积预冷的无水乙醇,混匀后可见絮状沉淀;置-20 ℃过夜。10 000 r/min离心15 min;以70%乙醇洗涤并离心1~2次,干燥沉淀并溶入100 μl TE缓冲液中,测定DNA浓度,-20 ℃保存。

1.3 PCR体系的优化

β-地中海贫血引物:上游5′-GTACGGCTGTCATCACT-

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2001CB510305)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2001CB510305)
作者简介:胡章雪,男,湖南省涟源县人,硕士,医师,主要从事围产医学、遗传疾病的基因诊断、新生儿医学等方面的研究。电话:(023)68757734,E-mail:huzx1@163.com
通信作者:李 力,电话:(023)68757920
收稿日期:2007-04-30;修回日期:2007-07-25

TAGACCTCA-3′，下游 5′-GCAGCTTGTCACAGTGCAGCTCACT-3′；ACH 引物：上游 5′-CGCTAACACCACCGACAA-3′，下游 5′-CCGAGACAGCTCCCATTT-3′。序列由上海申友生物技术公司合成，引物 5′端标记生物素。50 μl 反应体系中含 10 × PCR buffer 5 μl，引物各 1 μl，2.5 mmol/L dNTP 4 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μl，基因组 DNA 3 μl，DNA 聚合酶 5 U。反应条件：95 ℃ 8 min，然后 95 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min 循环 30 次，再 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后取 5 μl PCR 产物，经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增效果。

1.4　探针筛选

β-地中海贫血常见突变位点的探针用 Arraydesigner 2.0 软件设计，每个突变点均设计突变型和野生型探针；用 Omiga 2.0 软件进行探针间、探针与扩增片段间的互补性分析并将备选探针序列提交 GenBank 进行特异性分析。将设计好的探针用膜反向斑点杂交技术进行筛选，筛选出的探针序列为：CD41 – 42：5′-CCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTT-3′；CD41 – 42（m）：5′-CCCAGAGGTTGAGTCCTTTG-3′；CD17 5′-CTGTGGGGCAAGGTGAACG-3′；CD17（m）：5′-CTGTGGGGCTAGGTGAACG-3′；TATA28：5′-GCTGGGCATAAAAGTCAGGG-3′；TATA28（m）：5′-GCTGGGCATAGAAGTCAGGG-3′；ACH 探针参考文献[1]，G380R：5′-AGCTACGGGGTG-3′；G380R（m）：5′-AGCTACAGGGTG-3′。

1.5　芯片制作

3 × SSC 为点样液稀释探针，取醛基修饰玻片，用微量加液器取探针溶液点于玻片相应位置。将点好样的玻片移入湿盒中，20 ℃ 孵育 1 h。从湿盒中取出孵育后的玻片，置 20 ~ 37 ℃ 孵箱内过夜干燥。将过夜孵育后的玻片重新放置于湿盒中，放入 65 ℃ 水浴箱中再水合 4 h。取出玻片，50 ℃ 干燥，然后用 0.2% SDS 溶液清洗 1 min，再用去离子水清洗 2 遍，各 1 min。玻片放入硼酸盐溶液中（1.0 g $NaBH_4$ → 300 ml PBS + 100 ml 无水乙醇）孵育 5 min。用 0.2% SDS 液清洗 1 min，再用去离子水清洗 2 遍，各 1 min，于空气中干燥，室温保存。

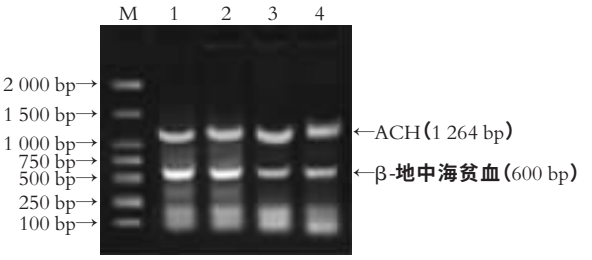
1.6　样本检测

①预杂交：在制备好的芯片 2 个点样区分别加 30 μl 预热至 60 ℃ 的预杂交液。轻轻盖上盖玻片，使预杂交液均匀覆盖在玻片上，将芯片放入湿盒中，在杂交炉中 68 ℃ 保温 2 h。②杂交：将 20 μl 生物素标记的 PCR 产物 95 ℃ 变性 5 min，立即冰浴 5 min。取出芯片，0.2% SDS 溶液洗涤后 37 ℃ 干燥。在芯片两侧各加 30 μl 杂交液、5 μl SABC 和 10 μl 变性的 PCR 产物，盖上盖玻片，将芯片放入湿盒中，在杂交炉中 48 ℃ 保温 4 h。③洗片：取出芯片，用 1 × SSC + 0.1% SDS 的漂洗液，20 ℃ 下漂洗 5 min，再用 0.1 × SSC + 0.1% SDS 的漂洗液，20 ℃ 下漂洗 5 min，然后室温下用 0.1 × SSC 漂洗。取出芯片，空气中干燥后置暗盒中保存。④显色：在芯片两侧各加 20 μl DAB，盖上盖玻片，使 DAB 均匀覆盖在玻片上，室温下静置 5 ~ 10 min。

2　结果

2.1　全血 DNA 序列 PCR 扩增结果

如图 1 所示：扩增产物长度为 600 bp 和 1 264 bp，包含 2 种遗传疾病需检测的突变位点，为符合实验设计的目的片段，其混合产物可用于芯片杂交的检测。

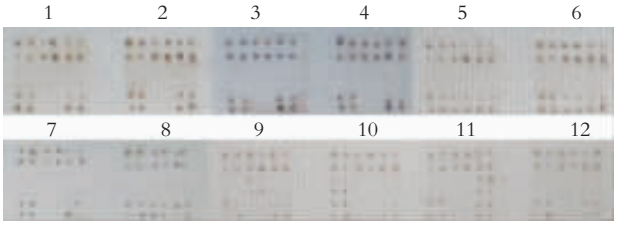


1 – 4：β-地中海贫血基因序列特异性片段与 ACH 基因序列特异性片段；M：DNA 标准（DL 2000）

图 1　全血 DNA PCR 扩增产物电泳图

2.2　临床样本的检测

如图 2 所示：标本 1、2、3、4、7、12 均只在正常探针点样点出现显色斑点，提示这些标本未携带 β-地中海贫血与 ACH 突变位点，而标本 5、6、8 则除正常探针点样点以外，还在 G380R 突变探针点样点处出现显色斑点，提示这些标本取自 ACH 患者；标本 9、10、11 则除正常探针点样点以外，还分别在 CD17、CD41 – 42、TATA28 突变探针点样点处出现显色斑点，提示这些标本为 β-地中海贫血患者，突变类型分别为 CD17、CD41 – 42、TATA28。



1 – 4，7，12：正常人；5，6，8：ACH 患者（G380R）；9 – 11：β-地中海贫血患者

图 2　玻璃芯片和不同临床样本杂交检测结果　（生物素）

3　讨论

如何快速有效的进行产前遗传病的筛查不仅一直是临床医学的重要研究内容，而且也是我国优生优育政策实施的有力保障，但是由于受检测技术、经费等多方面因素的影响，产前遗传病的筛查工作仍有相当大的难度。本研究以反应 β-地中海贫血和 ACH 的特征性基因的主要突变位点为探针，构建基因芯片并对此芯片进行了验证，为开展这两类疾病的基因芯片诊断提供了一定的实验数据和参考。

β-地中海贫血是一种常染色体隐性遗传病，在我国南方地区为最常见、危害最为严重的遗传性血液病之一。现代的分子病理学研究表明，β-地中海贫血是一组由于 β 珠蛋白基因突变导致 β 珠蛋白肽链合成减少或缺乏为特征的遗传性溶血性贫血[3]。导致我国 β-地中海贫血发生的突变基因共有二十多种，最常见的有 CD41 – 42（41.6%）、CD17（18%）、TATA28（8.0%）、CD71 – 72（+A）（3.9%）、TATA29（1.2%）等突变，这些突变位点集中在 1 段长约 600 bp 的碱基

链上[4]。ACH是由软骨内成骨缺陷所致的最常见的遗传性侏儒症,呈常染色体显性遗传,并具有完全外显性。已发现ACH存在3种基因突变,均位于成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3)的跨膜区,且以该基因的1 138位核苷酸的点突变为主[5]。目前,对β-地中海贫血和ACH尚无有效、特异性的治疗方法,应用基因诊断技术对高风险的胎儿进行产前诊断,预防重症患儿的出生是减少这类疾病发生的首要任务。但是,目前的诊断技术仅能单个逐项的进行基因诊断,β-地中海贫血的基因诊断多采用PCR-反向斑点杂交[4],ACH的基因诊断多采用PCR-限制性内切酶分析技术[6],要同时诊断这2种遗传病,需要多次采血,重复实验操作,实验时间长,成本高,手续繁琐,对实验室条件要求较高,不便于临床推广运用。本实验所采用的基因芯片技术有效地弥补了以上不足,为产前遗传病的大规模筛查提供了可能。

基因芯片又称DNA芯片、DNA微阵列,是近年来分子生物学及医学诊断技术的重要进展[7,8],该技术是通过把大量的寡核苷酸探针或cDNA固定在一块面积较小的硅片、玻片或尼龙膜上,通过与标记的待检核酸杂交而进行基因诊断或鉴定的技术。该技术可以一次性对大量序列进行检测和分析,其突出特点在于其高度的并行性、多样性、微型化和自动化。近年来,基因芯片被先后用于多种遗传病的检测,表明其在该领域的独特优势。本研究即为此技术为基础,制备了能同时检测β-地中海贫血和ACH的一款基因芯片,并采用这2种疾病患者的标本对此芯片进行验证。

我们在前期工作中探讨了采用尼龙膜作为芯片载体,构建单细胞水平β-地中海贫血诊断膜芯片的诊断技术[9]。本研究在原有基础上对芯片载体进行了改进,采用以前醛基修饰玻片作为芯片载体,其目的在于玻片来源、运输和储存方便,制作成本低,重复性好,特异性高,退火效率高[10],然后是确定检测β-地中海贫血和ACH的探针,这是本研究的关键之一。由于这2种疾病的突变位点已比较明确,因此我们选择最为常见的CD41-42、CD17、TATA28来反应β-地中海贫血的主要突变位点,选择G380R来反应ACH的主要突变位点。我们认为,这些位点能够集中、全面的反应这2种疾病的主要突变,因此,保证了此后对患者标本的成功检测和验证。确定所需检测的突变位点后,我们进行探针序列的设计、特异性和互补性的比较,并且利用膜反向斑点杂交技术筛选探针。膜反向斑点杂交技术将多种探针固定在同一膜上,同时参与检测的样品DNA又互不干扰,故能一次性筛查出多种不同的序列,极大地提高了筛选出特异探针的准确性。即此,我们确定了点于玻片上的所有探针的序列。本研究的另一个关键地方是,建立恰当的反应条件使之在同一个PCR体系中扩增出β-地中海贫血的3种常见突变和ACH的G380R突变。对包含不同基因位点的多个片段进行扩增需要严格的条件,扩增片段越多,条件将越苛刻,我们经过多次实验,确定了反应条件,从而实现一次采血便可完成2种疾病基因诊断的实验室操作。在制备成芯片后,我们利用确诊为β-地中海贫血和ACH的标本各3例(另设6例正常对照)对芯片进行了验证。检测结果表明,芯片上β-地中海贫血和ACH的特异探针均检测到患者标本中的突变位点,而正常对照者在相应位点未出现相应结果。本研究表明,本芯片对于检测β-地中海贫血和ACH具有一定的可靠性和稳定性。

总之,本研究采用醛基玻璃为载体,用5′端生物素标记的引物,制备了能同时检测β-地中海贫血和ACH的一款基因芯片,该芯片具有较好的重复性和特异性,具备一定的临床应用前景,其诊断价值评价尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Shiang R, Thompson L M, Zhu Y Z, *et al*. Fielder TJ, Bocian M, Winokur ST, Wasmuth JJ. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia[J]. Cell, 1994,78(2):335-342.

[2] Kara P, Ozkan D, Erdem A, *et al*. Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology[J]. Clin Chim Acta, 2003, 336(1-2):57-64.

[3] Warunee T, Goonnapa F, Supan F. Application of maternal plasma DNA analysis for noninvasive prenatal diagnosis of Hb E-β-thalassemia [J]. Translational Research, 2007, 150(5):319-325.

[4] 李翠莲,杨跃煌,代宏剑. 应用PCR结合反向斑点杂交技术检测β-地中海贫血[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2007, 12(1):9-12.

[5] Li E, You M, Hristova K. FGFR3 dimer stabilization due to a single amino acid pathogenic mutation[J]. J Mol Biol, 2006, 356(3):600-612.

[6] 朱 斌,董秋明,黄兴华,等. 一个软骨发育不全家系成纤维细胞生长因子受体3基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20(5):373-375.

[7] Herrmann M, Durtschi J, Voelkerding K, *et al*. Instrument Comparison for DNA Genotyping by Amplicon Melting[J]. Journal of the Association for Laboratory Automation, 2006, 11(4):273-277.

[8] Cuzin M. DNA chips:a new tool for genetic analysis and diagnostics [J]. Transfus Clin Biol, 2001, 8(3):291-296.

[9] 易 萍,李 力,邓 兵,等. 单细胞水平β地中海贫血诊断膜芯片检测技术的探讨[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(9):778-781.

[10] Kermani B G. Modeling oligonucleotide probes for SNP genotyping assays using an adaptive neuro-fuzzy inference system[J]. Sens Actuators B Chem, 2007, 121(2):462-468.

(编辑 栾 嘉)