DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.015
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
778 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)09-0778-04

单细胞水平β地中海贫血诊断膜芯片检测技术的探讨

易 萍[1],李 力[1],邓 兵[3],朱前勇[1],周元国[2] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]妇产科;[2]分子生物学中心,重庆 400042;[3]重庆儿童医院,重庆 400014)

提 要:目的 对在单细胞水平β地中海贫血诊断膜芯片检测技术进行探讨。方法 采用15个碱基的随机引物对单个细胞的基因组进行引物延伸预扩增(Primer extension preamplification, PEP),取其产物5μl分别对β地中海贫血的目的基因片段进行巢式或半巢式扩增,然后采用反向斑点杂交(Reverse dot blot, RDB)技术检测β地贫突变型。结果 将这些技术应用于4例已经确定突变基因型的β地贫患者及1例正常女性,检测结果与预料的相符。结论 结合我们的实验结果,提示在单个细胞或微量DNA模板水平运用基因芯片技术进行遗传病检测是可行的,而且将来在胚胎植入前基因诊断和无创性产前诊断领域可能有一定的实用价值。

关键词:β地中海贫血;基因芯片;预扩增
中图法分类号:R394.2;R446.11;R556.61 文献标识码:A

The study of genechip technology for the diagnosis of β-thalassemia mutations from a single cell

YI Ping, LI Li, DENG Bing, ZHU Qian-yong, ZHOU Yuan-guo (Department of Obstetrics and Gynecology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of genechip technology for the diagnosis of β-thalassemia mutations from a single cell. Methods The genome of an individual cell was amplified by primer extension preamplification (PEP) by the mixture of 15-base random oligonucleotides. The products(5 μl) from PEP were used to amplify the objective gene fraction of β-thalassemia gene by nested or semi-nested PCR, and then reverse dot blot hybridization method was applied for the diagnose of β-thalassemia mutations with specific oligonucleotide probes. Results The methods mentioned above were applied to 4 patients with β-thalassemia confirmed and 1 normal female successfully. The diagnostic results from a single cell were the same to the ones of the whole blood. Conclusion The method combining the genechip technology with PEP has a certain feasibility for the diagnosis of β-thalassemia mutations in a single cell and can be used in pre-implantation genetic diagnosis and noninvasive prenatal diagnosis.

Key words: β-thalassemia; genechip; preamplification

β地中海贫血是一组由于β珠蛋白基因突变而导致β珠蛋白肽链合成减少(β+)或缺乏(β-)为特征的遗传性血液病。β地中海贫血的分子基础主要为单碱基置换、小的缺失和插入,目前在世界范围内发现的此类突变达160余种,其中在中国发现的有21种。Saiki等[1]人提出采用PCR/反向斑点杂交(PCR/RDB)技术同时检测全血β地中海贫血基因突变位点技术,使β地中海贫血基因突变诊断取得了较大进展,操作相对简便及省时,已经在临床上开展[2,3]。

胚胎植入前诊断是近20年来辅助生殖技术与分子生物学技术的飞速发展而产生的一项新技术,它指在胚胎植入前对胚胎进行检测,确定胚胎正常后,再进行移植,从而阻断遗传病的发生[4]。近年来,利用孕妇外周血的胎儿细胞进行产前基因诊断是另一种具有潜力的非侵入性产前诊断方法。将这些技术应用于临床,那么建立一种在单个细胞或微量DNA模板水平进行准确、简单的诊断方法具有非常重要意义。因此我们对在单个细胞水平的β地中海贫血诊断检测技术进行探讨,试验此技术的可行性,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

200μl PCR专用薄壁反应管(美国QSP产品),15个碱基的随机引物以及β地中海贫血的内外引物序列,见表1,由大连宝

作者简介:易 萍(1979-),男,江西省萍乡市人,医师,主要从事产前诊断方面的研究。电话:(023)68757196

收稿日期:2002-09-06;修回日期:2003-01-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生物有限公司合成, DNA 聚合酶(EXTaq™)及 PCR 相关试剂(TaKaRa 产品), β 地中海贫血常见 8 种突变的等位特异性寡核苷酸(Allele specific oligonucleiotide, ASO)探针(重庆儿童医院惠赠), 基因扩增仪(PTC-100, MJ)。

表 1　β 珠蛋白基因的内外引物序列

Tab 1　Sequence of the primers used for the amplification of β globin gene

β globin gene	primer	primer sequence	size of product(bp)
AB segment	Outer primer	F5′-GTACCGCTGTCATCACTTAGACCTCA-3′	
	(AB1)	R5′-AACATCAAGGGTCCCATAGACTCAC-3′	649
	Nested primer	R5′-TGCAGCTTGTCACAGTGCAGCTCACT-3′	602
	(AB2)	F5′-GTGTACACATATTGACCAAAA-3′	
CD segment	(CD1)	R5′-AGCACACAGACCAGCACGTT-3′	423
	Nested primer	F5′-GGGCAATAATGATACAAT-3′	
	(CD2)	R5′-GAGCTGTGGGAGGAAGAT-3′	275

1.2　β 地中海贫血常见突变诊断膜芯片的制备

将β 地中海贫血常见 8 种突变点的 ASO 探针手工点样于尼龙膜上, 80 ℃真空干烤 30 min, 在 254 nmUV 光源下以 60 J/cm^2 的强度下进行交联。

1.3　全血 DNA 抽提

采用 NP40 快速提取法抽提 DNA, 置 4 ℃冰箱备用。

1.4　全血 DNA 的 PCR 扩增体系

使用 PCR 分别扩增全血 DNA β 地中海贫血的四个目的片段, 验证引物的有效性。向 PCR 管分别加入各自的引物, 10× PCR 缓冲液 5 μl, 25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μl, 2.5 mmol/L dNTP 4 μl, DNA 聚合酶(5 U/μl)0.25 μl, 25 μmol/L AB1 引物或 CD1 引物各 1 μl, 2 μl 人血 DNA(1 μg), 最后加双蒸消毒水至 50 μl。混匀离心后, 置入基因扩增仪, 94 ℃预变性 5 min 后, 开始循环: 94 ℃、30 s, 55 ℃、30 s, 72 ℃、1 min, 循环 30 次, 最后 72 ℃延伸 10 min。5 μl 扩增产物和 DNA 分子质量标准 DL2000(TaKaRa), 溴化乙锭染色, 在 1%琼脂糖凝胶上电泳, 紫外透射仪下检查及拍照。

1.5　单个淋巴细胞提取[5]

抽取外周血, 淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, 采用显微操作法获得单个淋巴细胞。这些细胞用 PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCL, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$)洗涤 3 次, 从第 3 次洗涤细胞后的 PCR 缓冲液微滴中取出 2 μl, 作为阴性对照, 将单个细胞移入装有 10 μl 双蒸消毒水的 PCR 薄壁反应管中, 并迅速置入−20 ℃冰箱内。

1.6　单个淋巴细胞的 PEP 预扩增体系

将装有单个细胞的 PCR 管从−20 ℃冰箱取出, 融化后, 加上 50 μl 液状石蜡, 95 ℃热变性 30 min。参照 Zhang 等[6]的方法, 向样本 PCR 管加入 PCR 混合液(10× PCR 缓冲液)5 μl, 25 mmol/L $MgCl_2$ 5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2 μl, DNA 聚合酶(5 U/μl)0.8 μl, 330 μmol/L 15 个碱基随机引物 5 μl, 最后加双蒸消毒水至 50 μl。扩增程序为: 92 ℃、1 min, 37 ℃、2 min, 37 ℃逐渐升至 55 ℃(1 ℃/10 s), 55 ℃、4 min, 循环 50 次。

1.7　单个淋巴细胞的目的片段的巢式或半巢式 PCR 及标记

取 PEP 产物 5 μl/份作为模板, 分别巢式扩增β 地中海贫血的两个目的片段。反应体系中第一轮 PCR 体系, 除模板 DNA 不同外, 其它反应成分与全血 PCR 相应的扩增体系相同。扩增条件为, 94 ℃预变性 5 min 后, 开始循环: 94 ℃、30 s, 62 ℃、90 s, 循环 30 次, 最后 72 ℃延伸 10 min。第二轮循环取第一轮产物 2 μl 作为模板, 引物则加 AB2 与 CD2 引物各 1 μl, 0.3 μl 生物素标记的 dUTP, 其余的反应成分与第一轮循环相同。反应条件为: 95 ℃预变性 5 min, 开始循环, 94 ℃、30 s, 55 ℃、1 min, 72 ℃、1 min 循环 30 次, 72 ℃、10 min。取 5 μl 扩增产物, 在 2%琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色, 在紫外透射仪下检查及拍照。

1.8　杂交、洗膜与检测

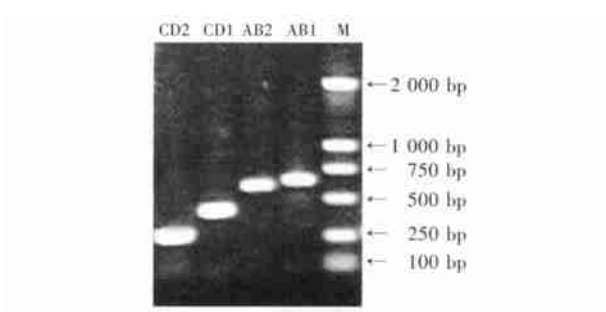
于 15 ml 的塑料管中加 12 ml 溶液 1(2× SSC, 0.1% SDS), 将膜芯片浸入, 加上述两种巢式 PCR 产物各 45 μl。加盖后在 10 ℃水浴加热 10 min, 然后在 40 ℃水浴中振摇 6 h。继将膜芯片转入 42 ℃水浴预热的 30 ml 溶液 2(0.5× SSC, 0.1% SDS)中振摇 10 min, 将膜芯片再转入 20 ml 的溶液 1(内含 5 μl 辣根过氧化物酶连链霉抗生物素蛋白, Roche)中, 在室温振摇 15～30 min。取出膜芯片在溶液 1 和溶液 3(0.1 mol/L 柠檬酸钠)中各洗膜 10 min 两次。然后将膜芯片浸入 5 ml 显色液(含 2 mg/ml 四甲基联苯胺 0.25 ml 和 3% H_2O_2 10 μl, 用溶液 3 配制)中, 室温下避光保持 10～20 min。阳性结果为蓝紫色斑点。

为了实验的可行性, 应用以上方法用于已经确定突变基因型的 4 例β 地中海贫血患者及 1 例正常女性(经过他们同意后采血)进行基因诊断。这 4 例患者突变基因型分别为: β17(A→T)/N; IVS-II-654(C→T)/β17(A→T); β41-42(-CTTT)/N; β-28(A→G)/N。

2　结果

2.1　全血 DNA 试验

全血 DNA 样本 PCR 均能扩增出β 地中海贫血的四个目的片段的电泳带, 见图 1。



Lane M: Size marker of DL2000

图 1　全血 DNA 的β 地中海贫血 PCR 扩增产物电泳

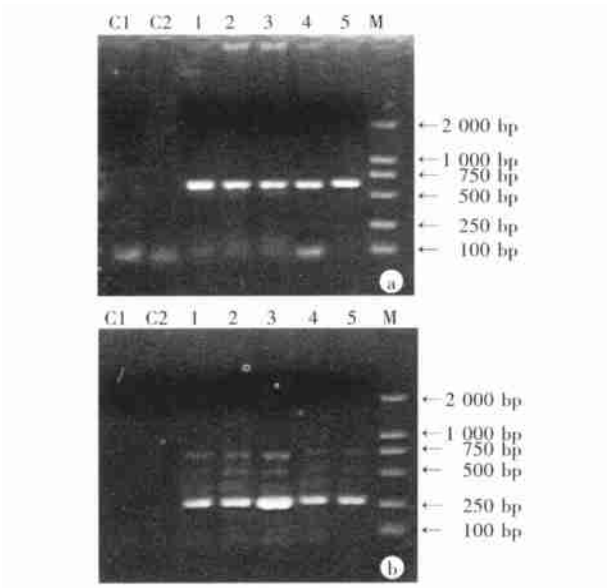
Fig 1　Amplification of four destination fragments of β-thalassaemia gene from the whole blood

2.2　单个淋巴细胞实验

5 例淋巴细胞经 PEP 和巢式或半巢式 PCR 扩增后产生 AB2 和 CD2 电泳带, 见图 2, 杂交后结果显示: 4 例β 地中海贫血及 1

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

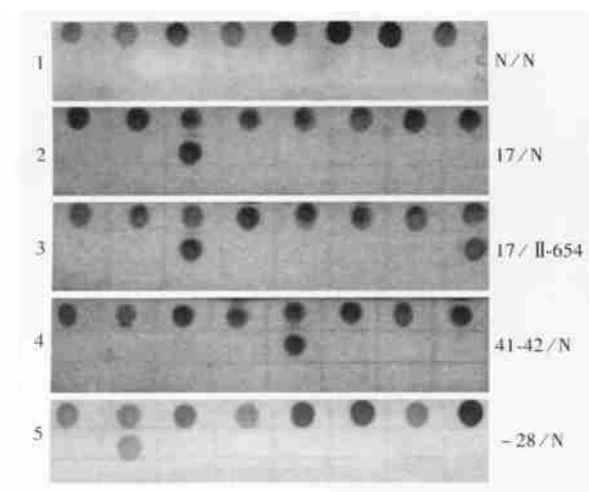
例正常女性，与预料的检测结果相符，见图3。



Lane C1: Negative control of distilled water; Lane C2: Negative control of PCR buffer solution used for washing a cell; Lanes 1～5: Amplified products of β-thalassemia samples; Lane M: Size marker of DL2000

图2 单细胞的巢式PCR产物电泳 a：AB2；b：CD2

Fig 2 Nested or semi-nested amplification of AB2(a) and CD2(b) from a single cell



For each strip, the normal ASOs are fixed in the upper row, and the mutant allele probes applied in the lower row. The β-thalassemia genotype of each sample is indicated on the right

图3 β地中海贫血常见突变诊断膜芯片的杂交结果

Fig 3 Detection of β-thalassaemia mutations by reverse dot blot

3 讨论

PCR技术的灵敏度已达到单细胞水平。但是该技术的一个局限之处是单个细胞仅能利用一次。而仅靠这一次的基因分析要对单细胞的多个基因作出诊断是不可能的。Zhang等[6]采用15个碱基的随机引物对单个细胞进行预扩增。这种随机引物在DNA聚合酶的作用下，经过多轮循环把原有的基因组拷贝数放大数十倍，随后从终产物中分别取出数小份作为模板再进行PCR，对多个基因或一个基因的多个位点进行分析，而且如果实验不理想或失败时可以利用PEP产物重复实验，提高了诊断的准确性。而且他们深入地研究PEP的效率，认为单个拷贝的单倍体细胞PEP后至少可使78%的基因组序列复制30倍以上。国内学者[7]采用10个碱基的随机引物进行预扩增，也取得了较好的扩增效果。

在辅助生殖医学领域，利用PEP技术行胚胎植入前基因诊断。对于植入前的胚胎而言，可用于分析的细胞数一般只有1、2个，利用PEP方法可使一个细胞用于基因诊断的DNA模板大大增多，从而扩大了诊断范围。在无创性产前诊断领域，也可以利用母体外周血中极少量的胎儿细胞，如胎儿有核红细胞，首先进行PEP，然后进行基因分析。

尽管基因芯片技术已经取得了长足的发展，得到世人的瞩目，美国Affymetrix公司研制出可检测1 000种人类SNPs的基因芯片，我国联合基因公司也研制出地中海贫血诊断芯片，但由于存在着许多难以解决的问题，例如重复性差、检测灵敏度较低、技术成本昂贵、复杂等问题，目前这些较高密度微型芯片仍不能在临床中推广应用。反向斑点杂交技术是将一系列针对基因突变的ASO探针固定在尼龙膜条上，用此膜条与扩增的目的基因片段杂交，一次即可筛查样品中多种突变并确诊其基因型。β地中海贫血多种突变诊断膜条实际上是一种以尼龙膜为载体的低密度芯片，在临床中已得到较广泛的应用。因此本实验采用β地中海贫血多种突变膜芯片，其主要目的是试验单个细胞或微量DNA模板水平的β地中海贫血多种突变同时诊断的可行性。我们使用PEP技术对单个细胞或微量模板进行预扩增，用其扩增产物进行目的片段的扩增与标记，然后进行杂交和检测，将这些技术应用于4例β地中海贫血及1例正常女性，其结果与全血的检测结果相符。值得一提的是，如果对每一小份PEP产物设计更多的引物，那么可以扩增更多的基因片段，同时结合我们的实验结果，可以提示在单个细胞或微量DNA模板水平运用基因芯片检测技术进行诊断是可行的，而且随着基因芯片尤其芯片实验室的发展与成熟，在胚胎植入前基因诊断和无创性产前诊断领域开展芯片检测技术为期不远。

参考文献：

[1] Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, *et al*. Genetic analysis of amplified

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(16): 6230.
[2] 张基增, 徐湘民, 马维芳, 等. 用反向斑点杂交快速检测中国人β-地中海贫血基因突变[J]. 第一军医大学学报, 1993, 13(1): 1—4.
[3] 廖　灿, 徐湘民, 黄以宁, 等. 反向斑点杂交法用于产前诊断β-地中海贫血 60 例分析[J]. 中华妇产科杂志, 1996, 31(6): 348—350.
[4] 吴　刚, 伦玉兰. 中国优生科学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2000. 623—714.
[5] Hashiba T, Sueoka K, Kurashima M, *et al*. Accurate mutliplex polymerase chain reaction assay for gender determination from a single cell[J]. Gynecol Obstet Invest, 2000, 49: 217—220.
[6] Zhang L, Cui X, Schmitt K, *et al*. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 5847—5851.
[7] 马锦琪, 纪亚忠, 盛　毅, 等. 单细胞引物延伸预扩增分析多个基因[J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(5): 391—394.

（编辑　郭建秀）

（上接 777 页）

境障碍患者治疗前 P300 波幅低, 与 Blackwood 等[5] 发现抑郁组 P3 波幅显著低于对照组报道一致。

3.2　5-HT 对 P300 电位的影响

P300 电位是脑内不同部位神经细胞电活动的综合场电位, 受多种神经递质系统的调控, 主要包括多巴胺、去甲肾上腺素、5-HT、γ-氨基丁酸(GABA)和某些神经肽等。例如苯二氮卓类药物的应用, 能促进 GABA 的抑制作用, 引起 P300 潜伏期延长或波幅降低; 而新一代抗抑郁药 5-HT 再摄取抑制剂(SSRI)的研发进一步证实抑郁障碍和中枢神经介质 5-HT 降低有关。Ito 等[6] 已证明阿尔茨莫病型痴呆病人的 P300 潜伏期延长、波幅极大地降低, 脑脊液中 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA, 5-HT 代谢产物)降低, P300 波幅与 5-HIAA 浓度间有很显著的相关性, 说明 5-HT 系统能调节阿尔茨莫病人的 P300。阿尔茨莫病人尸解发现海马中乙酰胆碱转移酶和 5-HT 与 5-HIAA 浓度降低, 也支持这种观点[7]。2000 年, Paul Greengard 博士已发现生物体的警觉、情绪状态是通过多巴胺、去甲肾上腺素、5-HT 等慢速突触传递方式实现的, 这种慢速突触传递可以对控制语言、运动和感觉的快速突触传递加以调控。这一重大发现揭示了精神情感智商对智力智商的影响和作用, 同时也解释了抑郁障碍患者 P300 变化的可能机制。

3.3　综合治疗对恶劣心境障碍患者 P300 的影响

结果证明恶劣心境障碍患者以放松治疗和口服 SSRI(百忧解)8 周末, 不仅临床症状改善, SDS、HAMD 总分降低, 而且 P300 潜伏期与波幅和治疗前比较, 亦达到显著性水平。说明恶劣心境障碍这一类轻型抑郁和重型与双相抑郁一样, 其情绪障碍仍和 5-HT 密切, 同样可影响患者的认知功能; 但只要及时识别、正规治疗, 情绪低落和认知障碍是能恢复正常的。

3.4　关于对抑郁障碍者 P300 研究的不同发现

有报道事件相关电位与抑郁症的临床分型有关, 如精神症性抑郁组的 P300 波幅显著较低[8]。有自杀企图的抑郁患者的 P3 波幅显著减小[9]。重型抑郁组 P3 潜伏期较对照组显著延长, 而非典型抑郁组与对照组无显著区别[8]。Johnson 等[10] 报道具有高度正性或负性情感值的刺激较中性刺激所引出的 P300 波幅大。这些研究的发现可能系条件差异所致。尚未见有关恶劣心境障碍患者 P3 的系统研究报道, 尚需进一步探索。

3.5　本研究所引发的思考

恶劣心境障碍, 虽属轻型抑郁、不伴精神病性障碍、社会功能无严重受损, 但其抑郁的核心症状持久, 使患者长期消极应付日前的生活、学习和工作, 有的甚至因躯体化症状辞离良好的工作、环境, 整天苦心奔波于大小医院。可见这种轻型抑郁正像其病程一样持续地困扰着病人, 并使他们的社会功能长期受到不同程度的影响, 其中部分病人也可因反复出现自杀观念发生自杀行为。实际上在其中部分患者系轻度抑郁还是重型抑郁, 一时无明确界限, 甚至这两种抑郁可共存于一个病人。为此要呼吁同道们, 应更加重视这类占抑郁障碍比例最大的恶劣心境障碍的研究。

关键词: 恶劣心境障碍; 听觉 P300
中图法分类号: R395.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 张明园. 二十一世纪中国精神医学的思考[J]. 上海精神医学, 1999, 12(1): 1—2.
[2] 许又新. 抑郁症诊断的变迁[J]. 上海精神医学, 1999, 11(2): 121—123.
[3] 高宗思, 宋和凤, 王云生, 等. 正常人听觉事件相关电位中 P300 与智商关系的研究[J]. 临床脑电学杂志, 2000, 9(3): 144—146.
[4] 江开达. 心境障碍[A]. 见: 郝　伟. 精神病学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 107—117.
[5] Blackwood D H, Whaylley L J, Christie J E, *et al*. Changes in auditory P300 event-related potential in schizophrenia and depression[J]. Br J Psychiatry, 1987, 150: 154—160.
[6] Ito J, Yamao S, Fukkda H, *et al*. The P300 event-related potentials in demenlia of the Alzheimer type. Correlations between P300 and monoamine metabolites[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1990, 77(3): 174—178.
[7] Meador K J, Loring D W, Hendrix N, *et al*. Synergistic anticholinergic and antiserotonergic effects in human[J]. J Clin Experimental Newro-psychology, 1995, 17(4): 611—621.
[8] Pierson A, Ragot R, Van-Hooff J, *et al*. Heterogeneity of information-processing alterations according to dimensions of depression: an event-related potentials study[J]. Biological Psychiatry, 1996, 40(2): 98—115.
[9] Hansenne M, Pitchot W, Gonzalez-Moreno A, *et al*. Suicidal behavior in depressive disorder: an event-related potential study[J]. Biological Psychiatry, 1996, 40(2): 116—122.
[10] Johnson V S. The relationship between menstrual phase and the P3 component of ERPs[J]. Psychophysiology, 1991, 4(28): 400—408.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net