

· 临床医学 ·

## 采用熔解曲线法进行RHD c.1227G>A基因检测研究

马玲\*,刘太香,薛敏

江苏省血液中心输血研究室,江苏 南京 210042

**[摘要]** 目的:建立用于RHD c.1227G>A基因检测的熔解曲线分析方法。方法:根据RHD c.1227G>A基因位点设计并合成序列特异性引物,在荧光定量PCR反应后对产物进行熔解曲线分析,根据熔解曲线峰值的差异进行基因检测结果判断,并与常规序列特异性引物PCR(PCR-sequence specific primer, PCR-SSP)RHD c.1227G>A基因分型方法进行比较;对与血清学结果不一致的标本进行测序分析。结果:在87例血清学初筛为RhD阴性表型的标本中,采用熔解曲线分析法,检测出16例含有RHD c.1227G>A,占比18.4%;与常规PCR-SSP分型结果一致。对1例与血清学吸收放散结果不一致的标本进行RHD exon 9测序分析,证实均为1227A纯合子。熔解曲线分析法的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和总符合率均为100%,约登指数为1.0。结论:成功建立用于红细胞RHD c.1227G>A基因分型的熔解曲线分析方法,可以高效、快速地进行RHD c.1227G>A基因检测研究。

**[关键词]** 熔解曲线;RHD基因;RHD c.1227G>A

**[中图分类号]** R446.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2021)10-1542-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20211023

Rh血型系统因其复杂多态性及临床重要性而备受关注,其中RhD抗原免疫原性最强,相应的抗D是导致胎儿新生儿严重溶血的最主要抗体,因而RhD阴性孕妇妊娠及血液安全管理需格外重视<sup>[1]</sup>。RhD抗原存在诸多的变异型,根据红细胞膜上D抗原表达的数目和性质,大致可分为弱D、部分D以及东亚人群常见的Del型等。各种RhD变异型基因背景机制不一,免疫原性也不相同,尤其是Del表型的检测及个体RhD抗原免疫应答情况值得重视。Del表型最初由Okubo等<sup>[2]</sup>报道,其D抗原表达非常弱,每个红细胞膜上D抗原拷贝数低于200个<sup>[3]</sup>,常规血清学检测不出,需要通过吸收放散技术才能检测到。有调查发现东亚人群中初筛为RhD阴性者中17%~30%为Del型,其中约98%的分子遗传背景为RHD基因 exon 9 c.1227G>A同义突变(RHD\*01EL.01)<sup>[4]</sup>,因此该型又被称为亚洲型DEL血型(Asia type DEL血型)。有研究报道在亚洲型DEL孕妇中,均未发现抗D抗体产生,因此提议,Del型孕

妇可以免去孕期频繁的抗体筛查和抗D免疫球蛋白注射<sup>[5-6]</sup>,这一理论如果获得推广应用无疑有良好的社会效益。因而,研究第一步,建立RHD c.1227G>A基因位点高效、便捷的检测方法十分必要。

常规Del表型的血清学检测是通过吸收放散的方法,该操作步骤较繁琐,对检测人员的手法和经验有一定要求,易导致差错。随着DEL型分子机制的阐明,血型基因检测方法的发展为DEL型鉴定提供了新的技术手段。本研究旨在建立用于检测RHD c.1227G>A基因分型的熔解曲线分析法,该方法基于单核苷酸熔解温度差异而形成不同形态熔解曲线,具有较高的敏感性,可以检测出单个碱基的差异,同时避免了常规PCR方法后续上样、电泳、成像等操作,缩短了检测时间,且减少了PCR产物交叉污染的可能性,现报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 样本来源

2018年10月—2020年1月于本中心进行产前检查的孕妇87例,年龄21~41岁,中位年龄29岁;RhD初筛试验结果均为阴性,采外周静脉EDTA抗凝血约3 mL;经本人知情同意,且研究经本中心伦

**[基金项目]** 江苏省输血协会英科新创科研基金(JS2018014)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: mlinsmile@hotmail.com

理委员会批准。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

IgG/IgM型抗D试剂(Sanquin公司,荷兰);IgG型抗D试剂(上海血液生物医药有限责任公司);基因组DNA提取试剂盒(北京原平皓生物公司);2×Taq PCR Mix(南京博尔迪生物科技有限公司);SYBR Green Master(Roche,瑞士);人类红细胞RhD基因分型试剂盒(PCR-SSP)(天津秀鹏生物技术);Labofuge 400R低温高速离心机(Heraeus公司德国);ND-100-Spectrophotometer DNA定量分析仪(NanoDrop公司美国);Alphalmager HP凝胶成像系统、ABI 7300扩增仪(Applied Biosystem公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 血清学试验

采用间接抗人球试验的方法,使用3~4种不同克隆的IgG或IgM/IgG型抗D试剂进行RhD阴性确认。对于结果为阴性的样本进行吸收放散试验,检测是否为Del型。具体操作步骤参考文献方法<sup>[7]</sup>并略为修改,吸收用试剂为IgG/IgM型抗D与IgG型抗D试剂混合使用,吸收时间为1 h。

### 1.2.2 引物设计

查找GenBank数据库中RHD基因序列(序列号为NG007494),针对1227A特异性位点,应用Primer 5引物设计软件进行扩增引物设计。经过预实验,优化后的引物序列参见表1。另采用引物β-actin作为内参序列<sup>[8]</sup>。

表1 荧光定量PCR所用引物

基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
1227A	F:GACCAAGTTTCTGGAAA	140
	R:ATGCTCCTTACTCCATTTT	
β-actin	F:GCG CCG TTC CGA AAG TT	137
	R:CGG CGG ATC GGC AAA	

### 1.2.3 基因组DNA提取

离心吸取孕妇白膜层细胞,按照DNA提取试剂盒操作要求提取基因组DNA,采用ND-100-Spectrophotometer DNA定量分析仪测定DNA含量与纯度,样品-20℃保存待用。

### 1.2.4 熔解曲线分析

采用荧光定量PCR分别扩增RHD exon 9 c.1227G>A及β-actin(作为内参)。PCR总体积为20 μL,引物浓度为300 nmol/L,调整DNA模板含量约为50 ng(可以低至至少1 ng),2×SYBR Green mix 10 μL。PCR条件为:50℃温育2 min,95℃预变性

10 min,之后95℃变性15 s,60℃退火延伸1 min共40个循环。所有反应均设3个复孔,并以水为模板设空白对照。PCR反应结束后,使用仪器默认的熔解曲线分析程序(95℃15 s,60℃1 min,95℃15 s,60℃15 s)进行分析,期间连续监测荧光信号,根据熔解温度(melting temperature, T<sub>m</sub>)值的差异进行基因分型。

### 1.2.5 对比研究

采用商品化RHD阴性鉴定基因检测试剂盒(PCR-SSP法)对上述标本进行同步检测,严格按说明书操作。PCR反应条件为:96℃2 min,随后96℃20 s,68℃60 s,5个循环;96℃20 s,65℃50 s,72℃45 s,10个循环;96℃20 s,62℃50 s,72℃45 s,15个循环;72℃5 min,最后4℃保存。PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶中电泳(100 V,30 min),用凝胶成像系统分析结果。

### 1.2.6 RHD基因测序

参考文献方法<sup>[9]</sup>,对RHD外显子9进行测序分析,PCR总体积为20 μL,引物浓度为200 nmol/L,PCR条件为:95℃5 min;95℃30 s,61℃30 s,72℃1 min,35个循环;72℃10 min,4℃保存。PCR产物经纯化后直接进行测序分析,测序引物同扩增引物。使用Sequencing Analysis 6和SeqScape v3.0软件进行测序图谱分析和序列比对。

## 1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行数据分析,计数资料采用例数和构成比进行统计描述,并通过配对χ<sup>2</sup>检验比较熔解曲线法与PCR-SSP法结果的差异;采用灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、符合率和约登指数等指标对熔解曲线法进行评判。P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清学结果

87例标本中,RhD确认试验结果阳性者6例;对其余81例标本进行RhD吸收放散试验,结果为阳性者共15例。

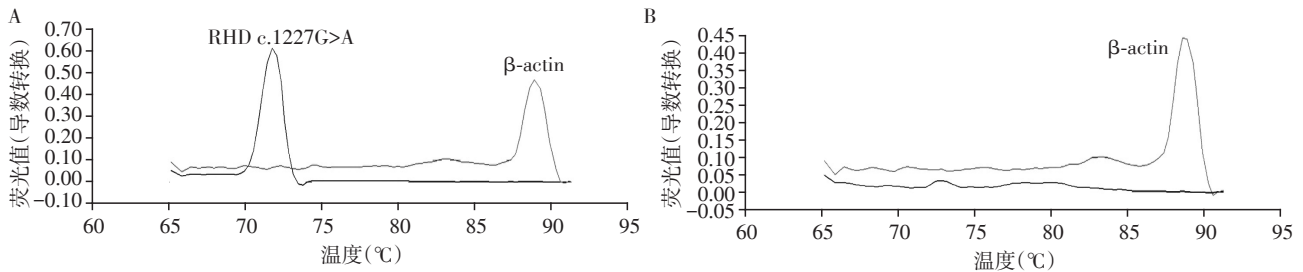
### 2.2 熔解曲线分析

对全部87例样本分别进行RHD exon 9 c.1227G>A及β-actin荧光定量PCR扩增,并对扩增产物进行熔解曲线分析。前者的T<sub>m</sub>值约为73℃,后者约为88℃,扩增阳性者分别在相应位置处出现单一峰型。在空白对照结果为阴性的前提下,两种熔解峰均出现时,判定为RHD exon 9 c.1227G>A阳

性;只有β-actin峰时,判定为RHD exon 9 c.1227G>A阴性;无β-actin峰时,判为试验无效(图1)。共计16例样本检测出含有RHD c.1227G>A(占比18.4%)。

### 2.3 熔解曲线法与PCR-SSP方法比较

87例样本同步采用商品化RHD阴性鉴定基因检测试剂盒(PCR-SSP法)进行检测,将熔解曲线法结果与之比较,结果一致,相同的16例样本均含有



A: RHD exon 9 c.1227G>A(+); B: RHD exon 9 c.1227G>A(-)。

图1 RHD c.1227G>A及β-actin基因扩增的熔解曲线

RHD c.1227G>A( $\chi^2=0.038, P=0.845$ )。

### 2.4 测序结果

对1例吸收放散试验结果为阴性,基因检测结果为阳性的样本进行RHD外显子9测序分析,证实含有c.1227G>A(图2)。

### 2.5 方法学评价

统计结果显示,采用熔解曲线分析法检测RHD c.1227G>A位点的灵敏度为100%,特异度为100%,阳性预测值为100%,阴性预测值为100%,约登指数为1.0,总符合率达100%。

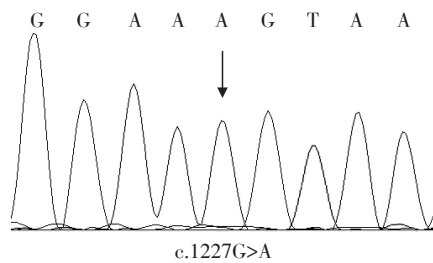


图2 某样本RHD exon 9测序结果

## 3 讨论

亚洲型DEL血型的分子遗传背景为RHD基因exon 9存在c.1227G>A同义突变,由于1227位为exon 9 3'端最后1位碱基,该突变虽未导致氨基酸的变化,但可能影响mRNA的正常拼接或拼接效率,导致RHD基因表达水平降低,这也一定程度上解释了为何Del表型RhD抗原表位没有变化,但抗原数量却明显减少<sup>[10]</sup>。用于Del血型检测的吸收放散试验并未常规用于临床检测,因此Del表型个体一直被当成RhD阴性对待。Del表型个体,尤其是亚洲型DEL的检测及个体RhD抗原免疫应答情况值得

研究;故本研究旨在建立高效、便捷的RHD c.1227G>A等位基因检测方法。

本研究首先对于RhD抗原确认结果为阴性的样本进行吸收放散试验,该操作步骤较为繁琐,对检测人员的手法和经验有一定要求,操作不当易产生错误结果。本次试验血清学检测出15例Del表型,另有1例标本经荧光定量PCR熔解曲线分析及PCR-SSP的方法表明为亚洲型DEL,后经测序方法证实。该样本血清学方法漏检可能原因是样本保存时间过长或吸收方法试验操作不熟练,因样本量不足,未进行血清学重复验证。

血清学方法只能检测出Del表型,并不能明确其分子机制。现已知导致Del表型的等位基因已超过17个,如RHD(IVS3+1A)、RHD c.3G>A、RHD c.1227G>A等<sup>[11]</sup>。对于中国人最常见的RHD c.1227G>A检测,常用的检测手段为PCR-SSP法,但该方法的不足之处在于PCR结束后,需开盖上样、电泳、成像等操作,耗时较长,且增加了产物交叉污染的风险;而熔解曲线分析法是一种PCR后产物分析技术,利用双链DNA在升温过程中,由于长度、GC含量等因素而产生不同的解离特征,结合荧光检测,在闭管环境下,由仪器自动实现对单核苷酸多态性鉴别分析,避免人为判断误差,具有操作简单、结果判断直观等特点,现已广泛用于基因分型、甲基化检测等研究。熔解曲线分析技术可分为探针熔解曲线(probe melting curve)和荧光染料熔解曲线(fluorescent dye melting curve)两大类。Sun等<sup>[12]</sup>报道了一种荧光探针熔解曲线分析法,可同时检测RHD 1227G和RHD 1227A等位基因,该方法难点在于“锚定探针”和“检测探针”的合理设计,如何实现



高效率结合多种靶序列,产生多个可区分的熔点峰;由于该方法需要2种荧光标记探针,检测成本较高。

荧光染料熔解曲线法无需探针设计,操作简单且成本较低,因而本研究优先考虑采用此方法。根据RHD c.1227G>A基因位点设计并合成序列特异性引物, $\beta$ -actin作为内参,单一扩增目的基因,选用SYBR Green I染料法。SYBR Green I为非饱和型荧光染料,非特异性与双链DNA结合,操作简单,性价比高;虽然精准度较饱和染料稍低,但完全满足本实验要求。本次共对87例标本进行检测,其中16例含有RHD c.1227G>A等位基因,与商品化RHD阴性鉴定基因检测试剂盒(PCR-SSP法)结果一致,RHD c.1227G>A阳性率为18.4%;熔解曲线方法的灵敏度及特异度均为100%。

王霓等<sup>[13]</sup>建立了RHD c.1227G>A荧光染料熔解曲线分型方法,设计2条特异性引物和1条通用引物,产物RHD 1227A和RHD 1227G的熔解曲线分别为75℃和77℃,根据结果可鉴别出RHD 1227A<sup>+</sup>/G<sup>-</sup>、1227A<sup>-</sup>/G<sup>+</sup>、1227A<sup>+</sup>/G<sup>+</sup>及1227A<sup>-</sup>/G<sup>-</sup>4种基因型。不过该方法仅能分析Del型标本是否存在RHD 1227G和1227A位点,对于RHD 1227A<sup>+</sup>/G<sup>-</sup>的标本无法得知其是RHD 1227A/1227A,还是RHD1227A/d,同样也无法区分RHD 1227G/1227G和1227G/d,若需进行区分,还需进一步RHD合子型检测。本研究建立的方法与之相比,目的不同,因而研究手段更为简单直接。本研究旨在检测出是否存在RHD c.1227G>A等位基因,而并不关注RHD 1227G的存在与否。由于RHD c.1227G>A是亚洲型DEL血型的分子遗传背景,其RhD抗原表位没有发生变化,该基因型个体是否会对RhD抗原免疫产生抗D抗体值得研究。Xu等<sup>[5]</sup>研究发现,808例RhD阴性孕妇中,178例为DEL型,其中94%存在c.1227G>A突变,均未产生抗D抗体。Shao等<sup>[6]</sup>也同样发现,199例RhD阴性孕妇中,22.1%为DEL型,均为c.1227G>A突变且未产生抗D抗体。因此提议,该Del型孕妇可以免去孕期频繁的抗体筛查和抗D免疫球蛋白注射。因此本研究目的在于对RhD初筛阴性的孕妇进行RHD c.1227G>A检测,该位点检出意味着为亚洲型DEL,因此不会产生抗D抗体,无论样本是纯合子、杂合子,或者合并其他RHD变异型情况,该等位基因的检出具有重要指向意义。

综上所述,本研究建立了一种RHD c.1227G>A

基因检测的熔解曲线分析方法,该方法简单直接,可以高效、快速地进行RHD c.1227G>A等位基因检测,在RhD阴性孕妇筛查中具有较大的应用价值。

#### [参考文献]

- [1] 李丽. 76例Rh阴性孕妇妊娠结局分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2012,32(10):1439-1441
- [2] OKUBO Y, YAMAGUCHI H, TOMITA T, et al. A D variant, Del? [J]. *Transfusion*, 1984, 24(6): 542
- [3] HASEKURA H, OTA M, ITO S, et al. Flow cytometric studies of the D antigen of various Rh phenotypes with particular reference to Du and Del [J]. *Transfusion*, 1990, 30(3): 236-238
- [4] KWON D H, SANDLER S G, FLEGEL W A. DEL phenotype [J]. *Immunohematology*, 2017, 33(3): 125-132
- [5] XU W, ZHU M, WANG B L, et al. Prospective evaluation of a transfusion policy of RhD-Positive red blood cells into DEL patients in China [J]. *Transfus Med Hemother*, 2015, 42(1): 15-21
- [6] SHAO C P, XU H, XU Q, et al. Antenatal Rh prophylaxis is unnecessary for "Asia type" DEL women [J]. *Transfus Clin Biol*, 2010, 17(4): 260-264
- [7] 陈秉宇, 谢一唯, 沈健. Del血型鉴定实验标准操作规程[M]//桂嵘. 输血相容性检测及疑难病例分析. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 312-314
- [8] CHAN K C, DING C, GEROVASSILI A, et al. Hyper-methylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis [J]. *Clin Chem*, 2006, 52(12): 2211-2218
- [9] YAN L, WU J, ZHU F, et al. Molecular basis of D variants in Chinese persons [J]. *Transfusion*, 2007, 47(3): 471-477
- [10] SHAO C P, MAAS J H, SU Y Q, et al. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese [J]. *Vox Sang*, 2002, 83(2): 156-161
- [11] WANG M, WANG B L, XU W, et al. Anti-D alloimmunisation in pregnant women with DEL phenotype in China [J]. *Transfus Med*, 2015, 25(3): 163-169
- [12] SUN C F, LIU J P, CHEN D P, et al. Use of real time PCR for rapid detection of Del phenotype in Taiwan [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2008, 38(3): 258-263
- [13] 王霓, 周世航, 邵林楠, 等. 熔解曲线分析法用于RHD 1227G>A基因分型的实验研究[J]. *中国输血杂志*, 2018, 31(9): 953-956

[收稿日期] 2021-04-29