

· 实验研究 ·

应用逆转录-聚合酶链反应方法检测
孕妇外周血中胎儿 ϵ/γ 血红蛋白基因

许锁 王滨有 陈飞 张琳 段稳铭

【摘要】目的 探索检测孕妇外周血中胎儿特异血红蛋白基因表达的方法。方法 提取孕妇全血 mRNA 经体外逆转录后,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法,应用 ϵ/γ 特异引物引导扩增胎儿特异血红蛋白基因片段,经琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统下观察。结果 在 7 名妊娠妇女中,6 名扩增出 ϵ/γ 基因片段,1 名为阴性。结论 应用 RT-PCR 方法可直接从孕妇全血中扩增出胎儿特异血红蛋白基因片段,孕妇全血中微量的胎儿 mRNA 已基本满足体外逆转录及扩增的要求。利用孕妇外周血进行的无创伤性产前诊断具有可行性。

【关键词】 逆转录-聚合酶链反应; ϵ/γ 血红蛋白基因; 孕妇

Expression of fetal ϵ and γ globin gene in maternal peripheral blood XU Tan*, WANG Bin-you, CHEN Fei, ZHANG Lin, DUAN Wen-ming. *Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【Abstract】 Objective Traditional prenatal diagnosis for congenital diseases were villus sampling and amniocentesis. These invasive diagnosis methods are not only technical complicated, but also harmful to mother or fetus. Fetus in its different gestational age has its different type of hemoglobin or different amount of hemoglobin, especially ϵ hemoglobin existing in the body of 10 weeks gestation fetal, however γ hemoglobin has its high amount before baby to be born. But ϵ and γ hemoglobin did not exist in the bodies of adults bodies. It is possible to use advanced molecular biological technique to extract the fetal hemoglobin gene from maternal peripheral blood. In articles from domestic and abroad, no report related to fetal hemoglobin extraction from maternal peripheral blood was found. We tried to use non-invasive method to detect fetal hemoglobin ϵ/γ gene from maternal peripheral blood by molecular biological technique. The purpose was to establish a convenient, sensitive and special method to be a basis of screening prenatal diseases in the population and lay a basis for family planning and clinical application. Methods Blood samples were collected and the fetal mRNA extracted from the pregnant women with the use of random primer. We used ultraviolet spectrophotometer to test the concentration and purity of extracted mRNA are suitable for reverse transcription. Reverse transcription of mRNA into cDNA was carried out and cDNA by PCR with the special ϵ/γ primer being used. Via 1.2% EB in agarose gel electrophoresis, we used "Gel Works System" to scan the electrophoresis image to detect ϵ/γ gene band. Results The peripheral blood of pregnant women was collected. With RT-PCR and agarose gel electrophoresis method, we detected ϵ/γ gene successfully in 7 samples with 6 positive and 1 negative. Conclusion This was the first time that we used non-invasive way to detect expression of fetal ϵ/γ gene in maternal blood to have found that this was a simple method to separate fetal cells from maternal blood, and could easily be accepted by pregnant women. Success of RT-PCR to detect fetal specific mRNA gave the hint that this method could be used in the field of prenatal diagnosis of hemoglobin disease, predicting fetal gender, predicting Rh blood type and single gene disease and be used widespread in prenatal diagnosis.

【Key words】 Reverse transcription-polymerase; Hemoglobin ϵ and γ gene; Pregnant women

1990 年, Bianch 等用流式细胞分离技术经转铁蛋白受体(CD71)标记,自孕妇外周血中分离出了胎儿红细胞,用引物进行扩增(PCR)检测出了 Y

染色体片段。并证明了其来源及其所含的胎儿球蛋白成分。随着分子生物学技术的发展和灵敏度的提高,无创伤性产前诊断技术已具备对某些遗传病进行诊断的可能^[1]。本实验利用高灵敏度的逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法,直接对孕妇全血中的胎儿 mRNA 进行体外逆转录和扩增,以期建立一种快速、有效的试验方法,为进一步的试验奠定基

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39970659)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学公共卫生学院流行病学教研室(许锁、王滨有、段稳铭) 哈尔滨市第一医院妇产科(陈飞、张琳)

础。

材料与amp;方法

一、样本来源

分别采集 7 名妊娠 8~32 周孕妇外周静脉血 5 ml,用枸橼酸-枸橼酸盐-葡萄糖抗凝,孕妇均为首次妊娠。样本由哈尔滨市第一医院妇产科提供。

二、方法

1. 孕妇血中 RNA 的分离:常规提取孕妇血 RNA,加入 TRIzol Reagent(Gibco BRL)和氯仿,以异丙醇沉淀 RNA,用乙醇洗脱后,终产物溶于 50 μl 0.01%的焦碳酸二乙酯(DEPC)水中,存于 -70℃ 备用。提取的 RNA 样本以 500 倍稀释后在紫外分光光度计(pharmacia biotech)上检测其浓度和纯度。其算式为:浓度(concentration)=($A_{\lambda 260}/A_{\lambda 320}$)×40,吸光度比值(abs ratio)=($A_{\lambda 260} - A_{\lambda 320}$)/($A_{\lambda 280} - A_{\lambda 320}$)

2. mRNA 的逆转录:试剂购于 PROMEGA 公司。方法:先将 RNA 样本置 70℃ 水浴 10 min。试剂与样本融化后置于冰上。按顺序加入 25 mmol/L MgCl₂、10× Buffer、10 mmol/L dNTP 混合物、RNA 酶抑制剂、随机六粒体核酸引物、模板 mRNA、AMV RT,用 0.01% DEPC 水补至总体积 20 μl,在 42℃ 孵育 60 min。然后将反应产物置于 PCR 仪中(PTC-100, MJ Research Inc, Watertown, MA.),99℃ 5 min,然后 4℃ 5 min。产物于 -70℃ 冷冻保存备用。

3. PCR 扩增胎儿特异血红蛋白基因 ε/γ 序列:寡核苷酸引物序列参照文献 [1],由上海生工生物工程公司合成。序列为 5'-GCAAGATGAATGTGG AAGA-3 (近端); 5'-CCCAGGAGCTTGAAGTTC-3 (远端)。按如下顺序加入试剂:无菌水 33.5 μl, 10× PCR 缓冲液 5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μl, 2 mmol/L dNTP 混合液 5 μl, 近端引物(20 μmol/L) 1 μl, 远端引物(20 μmol/L) 1 μl, Taq DNA 聚合酶 0.5 μl, 总量 50 μl。将试管放入微量离心机中离心数秒钟。热循环周期条件:变性 94℃ 60 s,退火 57℃ 120 s,延伸 72℃ 120 s,共 35 个循环,然后 72℃ 延伸 8 min,于 4℃ 条件下终止反应。

4. 琼脂糖凝胶电泳:取扩增产物 4 μl,与 2 μl 上样缓冲液混合,在含溴化乙锭(EB)的 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳,以 100 碱基对 Marker 为分子标尺(pharmacia biotech),用凝胶成像系统扫描成像 ε/γ

基因片段大小预计为 274 bp。每次扩增以标准阳性 mRNA 为对照(Amersham 公司),标准 mRNA 来源于兔球蛋白 mRNA,预计产生 383 bp 的 β 球蛋白基因片段。设立阴性对照。

结 果

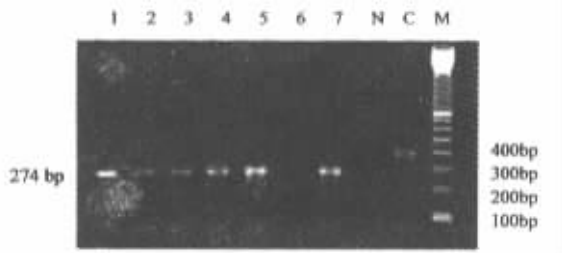
1. 孕妇外周血中 RNA 的提取:提取的 RNA 经用紫外分光光度计(Pharmacia, Ultrospec 2000)测定,高质量的 RNA 水溶液中的 Abs ratio 在 1.5~1.9 之间,结果显示所提取的 RNA 符合实验要求(表 1)。

表1 孕妇外周血 RNA 紫外分光光度计检测结果

样本	吸光度(A)			比值	浓度* (μg/ml)
	λ260	λ280	λ320		
1	0.072	0.035	0.001	2.008	2.8
2	0.072	0.038	-0.003	1.829	3.0
3	0.105	0.056	0.003	1.925	4.1
4	0.164	0.092	0.002	1.800	6.5
5	0.144	0.088	-0.001	1.629	5.8
6	0.046	0.023	-0.012	1.657	2.3
7	0.073	0.030	-0.015	1.956	3.5

* RNA 样本稀释 500 倍后的浓度

2. 孕妇外周血中胎儿 ε/γ 基因检测:采用 Promega 公司的逆转录试剂盒,先将 mRNA 逆转录为 cDNA,然后用 ε/γ 特异引物,经 PCR 扩增,成功地从孕妇外周血中检测到了胎儿 ε/γ 基因片段,片段大小为 274 bp,其中 2 号样品出现阴性,其余均为阳性(图 1)。



M: 分子量 Marker; C: 来源于兔球蛋白 mRNA 的 β 球蛋白基因(383 bp); N: 空白对照; 1~7 样本 ε/γ 基因

图1 孕妇外周血中胎儿 ε/γ 基因检测结果

讨 论

利用胎儿镜和胎盘穿刺可以获得胎儿的血样本来研究胎儿血红蛋白(Hb),对孕期 5 周的胎儿进行 Hb 检查, Hb GowerI(ζ₂ε₂)占总 Hb 的 42%, Hb GowerX(α₂ε₂)占 24%, Hb F(α₂γ₂)约占 Hb 总量的 30%。在 8 周胎龄时 Hb F 约占 Hb 总量的 90%,直

到胎儿出生前在子宫内的生命时期,这种 Hb 都占主导地位。由于胎儿 Hb 主要为 Hb F ($\alpha_2\gamma_2$),成人 Hb 则主要为 Hb A ($\alpha_2\beta_2$),故 γ 球蛋白是胎儿有核红细胞的标记,而 β 球蛋白则为成人红细胞的标记。Bishchoff 等^[2]则设计针对 γ 球蛋白 cDNA 的引物,用 PCR 技术制备针对 γ 球蛋白的探针,利用荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术来鉴别出胎儿有核红细胞。

Bianchi 等^[3]用流式细胞分离技术获得的少量胎儿红细胞,经全血定量 PCR(qPCR),以评估不同样本中的胎儿红细胞的数目,确定孕期孕妇体内胎儿红细胞的生理数量。 Y 染色体可作为胎儿红细胞的标志。在 90 例孕妇怀有 46XY 胎儿的外周血中,每 16 ml 血液中有核红细胞的平均数量约为 19 个(范围 1~91 个)。在异常妊娠时,母血中胎儿细胞的数量增多,这可能与异常妊娠时的胎盘屏障、血管的改变或绒毛水肿有关。当母亲有先兆子痫或胎儿患有非整倍体病时,母血循环中胎儿细胞的数量增加^[4]。

RT-PCR 方法是一种极为敏感的检测方法,能将甚至是单一细胞的 mRNA 经逆转录后在几个小时内扩增百万倍。 ϵ/γ Hb 基因序列,具有扩增相对容易、特异性高、使用的样本量少及易为孕妇所接受的特点。在检测的 7 例样本中,有 1 例出现了阴性,估计与血样过少有关(约 3 ml),也可能是孕妇全血中的胎儿有核红细胞数目过少或是胎儿红细胞遭受母体免疫系统破坏所致。虽然有些母体细胞也可产生 γ 球蛋白^[5],但实际上,一般在母血中所发现的 γ 球蛋白阳性细胞都是胎儿红细胞。孕妇外周血中胎儿红细胞的相对含量和绝对含量都极少,提取工作困难。大约每毫升孕妇外周血中含有 1 个胎儿红细胞。正常情况下胎儿细胞经过胎盘屏障到达母体血液后,部分细胞会被母体的免疫系统破坏,在胎盘的母体/胎儿界面存在“新陈代谢”,胎儿细胞不断地裂解。在胎儿的发育过程中还存在与发育相关的程序性细胞死亡。由于胎儿细胞数目稀少,给提取及转录过程造成困难。

防止 RNA 酶的污染和抑制 RNA 酶的活性是实验成败的关键。通常在反应体系中加入人胎盘 RNA 酶抑制剂,以阻止 mRNA 的降解。我们在合成第一链反应时反复摸索最适条件,以得到较好的实验结果。

随着 PCR 和分离胎儿细胞技术的发展,已可对部分遗传的常染色体异常进行诊断。Lo 等^[6]用妊娠早、中期孕妇外周血作 Y 染色体序列分析的结果,发现 7 例男胎有 6 例预测正确,6 例女胎有 5 例预测正确。Camaschella 等^[7]1990 年利用母血标本诊断胎儿 Hb Lepore Boston 病,首次证明了用非创伤性手段进行遗传病的产前诊断是可行的。1991 年 Price 等^[8]使用 TIR-FITC 抗体及 GPA-PE 抗体经多参数流式细胞仪从 10 孕周的高危孕妇外周血中分离出胎儿有核红细胞,首次成功地作出了胎儿非整倍体病的产前诊断。

目前自孕妇血中提取胎儿 DNA 和 mRNA 的技术已成熟,mRNA 包含着胎儿 DNA 表达的全部信息。利用 mRNA 的体外逆转录及 DNA 扩增技术,再加上对一定的操作技术和策略的改进与提高,可能实现对胎儿性别、Rh 血型及某些遗传病的诊断。

参 考 文 献

- 1 Furukawa T, Zitni G, Leppig K, et al. Coexpression of γ and β globin mRNA in cells containing a single human β globin locus: results from studies using single-cell reverse transcription polymerase chain reaction. *Blood*, 1994, 5:1412-1419.
- 2 Bishchoff FZ, Lewis DE, Nguyen D, et al. Fetal cells in maternal blood: more efficacious FISH analysis by using gamma globin mRNA to identify fetal cells after flow-sorting. *Am J Hum Genet*, 1995, 59:33.
- 3 Bianchi DW, Shuber AP, DeMaria MA, et al. Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 171:922-926.
- 4 Elias S, Price J, Dockter M, et al. First trimester diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet*, 1992, 340:1033.
- 5 Pembrey ME, Weatherall DJ, Clegg JB. Maternal synthesis of haemoglobin F in pregnancy. *Lancet*, 1973, 1:1350-1354.
- 6 Lo YMD, Patel P, Baiget CN, et al. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using polymerase chain reaction. *Hum Genet*, 1993, 90:483-488.
- 7 Camaschella C, Alfano A, Gottardi E, et al. Prenatal diagnosis of fetal haemoglobin Lopore boston disease on maternal peripheral blood. *Blood*, 1990, 75:2102-2106.
- 8 Price J, Elias S, Wathtel SS, et al. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol*, 1991, 165:1731-1737.

(收稿日期:2002-01-05)

(本文编辑:尹廉)