

地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)已配制扩增试剂的保存稳定性验证

张鑫*

(杭州迪安医学检验中心有限公司, 杭州 310012)

摘要:目的 验证厦门至善科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)已配制扩增试剂保存稳定性,指导实验室正确使用及保存已配制扩增试剂。**方法** 留取已报告的缺失型 α -地中海贫血样本、 β -地中海贫血样本、非缺失型 α -地中海贫血样本各3管,阴性样本2管。将厦门至善生物科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)按照试剂盒要求配制扩增试剂,并分装至八联管内,编号1、2、3、4、5,将1号管内试剂暂存2~8℃冰箱内,2、3、4、5管试剂暂存-20℃冰箱内,于试剂配制日期后的12 h、1 d、3 d、5 d、7 d分别对留取样本进行检测,记录分析结果。**结果** α -地中海贫血样本、 β -地中海贫血样本、缺失型 α -地中海贫血样本及阴性样本在使用编号1、2、3、4、5管扩增试剂进行检测后的结果与留样结果一致。**结论** 厦门至善科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)已配制扩增试剂于-20℃暂存一周、2~8℃暂存12 h,对样本检测结果无影响。

关键词: 缺失型 α -地中海贫血; β -地中海贫血; 非缺失型 α -地中海贫血; 荧光PCR; 熔解曲线法; 稳定性验证; 基因检测

0 引言

厦门至善科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)适用于 β -地中海贫血的体外临床辅助诊断,可以定性检测出中国人群常见的 β -珠蛋白基因21个位点的21种突变。缺失型 α -地中海贫血是人类最常见的常染色体隐性遗传病之一,其病因是 α -珠蛋白基因大片段缺失^[1]。 α -珠蛋白基因位于16号染色体上,每条16号染色体均包括1拷贝 $\alpha 2$ -珠蛋白基因和1拷贝 $\alpha 1$ -珠蛋白基因。东南亚缺失型同时缺失了 $\alpha 2$ -珠蛋白基因和 $\alpha 1$ -珠蛋白基因,缺失长度约为20 kb;左侧缺失型缺失了整个 $\alpha 2$ -珠蛋白基因,但保持 $\alpha 1$ -珠蛋白基因完整,缺失长度约为4.2 kb;右侧缺失型缺失了 $\alpha 2$ -珠蛋白基因的3'端和 $\alpha 1$ -珠蛋白基因的5'端,形成由 $\alpha 2$ -珠蛋白基因5'端和 $\alpha 1$ -珠蛋白基因3'端构成的融合基因,缺失片段约为3.7 kb。 α -地中海贫血(简称 α -地贫)是由于 α -珠蛋白基因突变导致珠蛋白肽链表达失衡而引起的单基因隐性遗传病^[2]。中国人群中常见的 α -珠蛋白突变类型除3种缺失型(- $\alpha 3.7$ /、- $\alpha 4.2$ /和-SEA/)外,还

包括3种非缺失型(c.369C>G, c.377T>C和c.427T>C),而非缺失型 α -地贫是导致临床上血红蛋白H病(HbH病)漏检的主要原因之一^[3]。本试剂盒可作为 α -地贫3种缺失型检测的补充,以满足临床对 α -地贫检测完整性的需要。

荧光PCR熔解曲线法是通过荧光PCR仪实时监测温度和荧光强度的变化生成熔解曲线,通过分析探针与靶序列形成杂交体的熔点温度(T_m 值),不同突变点有不同的熔解温度,据此计算野生型与突变型 T_m 值的差值(ΔT_m),即可判断突变位点^[4]。临床上已经应用于地中海基因产前诊断的检测^[5]。为了更好地指导实验人员正确使用及保存已配制的扩增试剂,根据实际工作需要,现对已配制扩增试剂的暂存稳定性进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

厦门至善生物科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法),测试基因组DNA浓度范围2~200 ng/ μ L,批号:23062801/

* 通信作者:张鑫,研究方向为试剂保存稳定性。E-mail: 13796329243@163.com

23071101/23062601。厦门至善生物科技股份有限公司研制的 Lab-Aid 824s 血液基因组 DNA 提取试剂，批号：23050801。

已检测留样样本：缺失型 α -地中海贫血样本、 β -地中海贫血样本、非缺失型 α -地中海贫血样本各 3 管、阴性样本 2 管。

厦门至善生物科技股份有限公司 Lab-Aid 824s 全自动 DNA 提取仪和上海宏石医疗科技有限公司 SLAN-96S 全自动定量 PCR 仪。

1.2 地中海贫血基因检测方法

第 1 天：取 β -地中海基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）、缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）、非缺失型 α -地中海基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）各一盒，试剂批号：23062801/23071101/23062601。按照试剂盒说明书要求进行配制，各配制 10 人份，将 10 人份试剂平均分装成两组 5 人份试剂，两组试剂分别编号①和②，将编号①组试剂放入 2~8 °C 冷藏冰箱暂存 12 h，到达暂存时间后将编号①组试剂进行扩增，记录结果。将编号②组试剂放入 -20 °C 冷冻冰箱暂存 7 d^[6]。

第 3 天：取 β -地中海基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）、缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）、非缺失型 α -地中海基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）各一盒，试剂批号：23062801/23071101/23062601。按照试剂盒说明书要求进行配制，各配制 5 人份，将该组试剂编号③，放入 -20 °C 冷冻冰箱暂存 5 d。

第 5 天：取 β -地中海基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）、缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）、非缺失型 α -地中海基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）各 1 盒，试剂批号：23062801/23071101/23062601。按照试剂盒说明书要求进行配制，各配制 5 人份，将该组试剂编号④，放入 -20 °C 冷冻冰箱暂存 3 d。

第 7 天：取 β -地中海基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）、缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）、非缺失型 α -地中海基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）各 1 盒，试剂批号：23062801/23071101/23062601。按照试剂盒说明书要求进行配制，各配制 5 人份，将该组试剂编号⑤，放入 -20 °C 冷冻冰箱暂存 1 d。

第 8 天：将编号②、③、④、⑤组试剂从冷冻冰箱中取出，室温复温待用。使用厦门至善生物科技股份有限公司 Lab-Aid 824s 全自动 DNA 提取仪对留取样本进行核酸提取，使用编号②、③、④、⑤组试剂分别进行扩增，记录结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 储存条件结果

已配制的扩增试剂在不同储存条件下（2~8 °C 冷藏 12 h，-20 °C 冷冻至多 7 d）表现一致，对检测结果无明显影响；所有试剂组检测结果均与历史报告一致，表明不同储存条件下试剂稳定性较好，适合在不同时间、温度下使用，见表 1。

表 1 储存条件汇总表

试剂组	储存条件	储存时间	对检测结果影响
①组	2~8 °C 冷藏	12 h	无影响
②组	-20 °C 冷冻	7 d	无影响
③组	-20 °C 冷冻	5 d	无影响
④组	-20 °C 冷冻	3 d	无影响
⑤组	-20 °C 冷冻	1 d	无影响

2.2 非缺失型 α -地中海贫血检测结果

对于非缺失型 α -地中海贫血样本，检测结果与历史报告完全一致，包括 CS 纯合突变、QS 杂合突变样本均得

到正确识别，阴性样本没有检出任何覆盖突变。该结果能证实试剂盒对特定突变位点灵敏性、特异性，说明其能准确检测出已知突变，并避免假阳性结果，见表 2。

表 2 非缺失型 α -地中海贫血检测结果

样本类型	已报告结果	本次检测结果
阳性样本 1	CS 纯合突变($\alpha\alpha T/\alpha\alpha T$)	CS 纯合突变($\alpha\alpha T/\alpha\alpha T$)
阳性样本 2	QS 杂合突变($\alpha\alpha T/\alpha\alpha$)	QS 杂合突变($\alpha\alpha T/\alpha\alpha$)
阳性样本 3	CS 杂合突变($\alpha\alpha T/\alpha\alpha$)	CS 杂合突变($\alpha\alpha T/\alpha\alpha$)
阴性样本 1、2	未检出覆盖突变	未检出覆盖突变

2.3 缺失型 α -地中海贫血检测结果

缺失型 α -地中海贫血样本检测结果与已报告结果一致,包括 $-\alpha 3.7$ 、 $--SEA$ 突变阳性样本均被正确识别,阴性样本未检出任何突变,结果能验证该试剂盒在检测各种缺失型突变时的可靠性,见表3。

2.4 β -地中海贫血检测结果

对于 β -地中海贫血样本,试剂盒成功检测到IVS-II-654、CD41-42、CD17杂合突变样本,且结果与历史报告一致;阴性样本未检出任何突变,该结果可验证试剂盒检测准确性,能准确区分阳性、阴性样本,见表4。

表3 缺失型 α -地中海贫血检测结果

样本类型	已报告结果	本次检测结果
阳性样本1	$\alpha\alpha/-\alpha 3.7$	$\alpha\alpha/-\alpha 3.7$
阳性样本2	$\alpha\alpha/--SEA$	$\alpha\alpha/--SEA$
阳性样本3	$--SEA/-\alpha 3.7$	$--SEA/-\alpha 3.7$
阴性样本1、2	未检出覆盖突变	未检出覆盖突变

表4 β -地中海贫血检测结果

样本类型	已报告结果	本次检测结果
阳性样本1	IVS-II-654 杂合突变	IVS-II-654 杂合突变
阳性样本2	CD41-42 杂合突变	CD41-42 杂合突变
阳性样本3	CD17 杂合突变	CD17 杂合突变
阴性样本1、2	未检出覆盖突变	未检出覆盖突变

注:1.所有试剂组(①~⑤组)在三类地中海贫血检测中,阳性样本与阴性样本的检测结果均与历史报告完全一致;2.不同储存条件(冷藏/冷冻)和保存时间(12 h~7 d)对检测结果均无影响;3.阴性样本均未检出试剂盒覆盖的突变类型。

3 讨论与结论

地中海贫血是一种常见的遗传性血红蛋白异常疾病,通常由 α -珠蛋白或 β -珠蛋白基因的突变引起。这些突变导致血红蛋白的合成不足,进而引发贫血、乏力、黄疸等一系列临床症状。该病的严重程度可根据突变类型和携带的基因拷贝数而有所不同,轻型患者可能只有轻度贫血,而重型患者则可能面临严重的贫血和器官损害^[7]。地中海贫血不仅影响患者的生活质量,还可能对心脏、肝脏和脾脏等重要器官造成长远损害。随着分子生物学技术的飞速发展,基因检测已成为地中海贫血诊断、筛查的主要手段。通过对血样中基因突变的检测,可以准确确定是否存在地中海贫血的相关突变,从而帮助医生为患者提供个性化的治疗方案。荧光PCR熔解曲线法作为一种新兴的分子诊断技术,因其高灵敏度、准确性和快速性,已被广泛应用于地中海贫血的分子诊断中。这种方法不仅能够高效地检测出多种 α -珠蛋白或 β -珠蛋白基因的突变,还能够精准区分不同类型的基因变异,为临床提供有力的支持。此外,荧光PCR熔解曲线法的优势在于其操作简便、无需过多的实验操作步骤,使得实验室工作人员能够在较短的时间内获得诊断结果。这一技术的应用,极大地提高了地中海贫血筛查的效率,尤其在高风险区域如地中海沿岸、东南亚及中东地区,对于早期发现和干预具有重要意义。

荧光PCR熔解曲线法基因检测技术对地中海基因诊断的时候,其本身具有简便快捷和正确敏感的特点^[8]。厦门至善科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)临床试验共验证1156例人基因DNA样本,结果表明对比GAP-PCR方法,至善地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)的临床灵敏度为100%、临床特异性为100%、符合率为100%^[9]。

本实验通过5组实验验证厦门至善科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)已配制扩增试剂于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暂存一周、 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暂存12 h,对样本检测结果无影响。 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件是常见的短期储存条件,本次实验结果表明,在这种条件下保存12 h后的试剂,其扩增性能、检测准确性并未受到影响,对于需快速使用试剂的实验室而言,冷藏12 h能提供足够的灵活性,使实验室能在较短时间内完成基因检测,且不会影响结果准确性。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件适用于需较长时间保存的试剂^[10]。本实验结果表明,在这种条件下保存7 d后的试剂,检测结果仍然稳定,表明即使在较长时间内储存,试剂也能保持其稳定性,确保在日常实验中不因储存时间延长而影响检测质量^[11]。每组实验15例实验数据的分析参照中国合格评定国家认可委员会(CNAS)制定的CNAS-GL039《分子诊断检验程序性能验证指南》^[12]。厦门至善

科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)实际验证结果均与已报告结果保持一致。

本次实验结果能有效指导各实验室更加合理、放心地使用厦门至善科技股份有限公司研制的地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)^[13]。在非缺失型 α -地中海贫血检测中,所有阳性样本均得到准确识别,阴性样本也未检出任何覆盖突变,表明该试剂盒对非缺失型突变具有高灵敏度、高特异性,能有效区分带有突变的样本与正常样本。对于缺失型 α -地中海贫血检测,所有阳性样本得到准确检测,且阴性样本结果与历史报告一致,表明试剂盒能准确检测不同类型缺失突变,且不会误判^[14]。对于 β -地中海贫血样本检测,试剂盒成功识别IVS-II-654、CD41-42、CD17等常见的 β -地中海贫血突变位点,所有阳性样本均与历史报告一致,阴性样本未检出任何突变,表明该试剂盒能有效检测 β -地中海贫血各类突变,保证检测准确性、可靠性^[15]。

综上所述,本研究说明已配制扩增试剂于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暂存一周、 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暂存12h,对样本检测结果无影响。本研究结果为实验室提供科学依据,确保试剂合理储存与使用,为临床、产前筛查提供更为可靠的技术支持。

参考文献

- [1] 刘贤明,王华庆,张会来,等.免疫组化和荧光定量PCR检测Bcl-2、Ki-67的表达对恶性淋巴瘤造血干细胞移植后复发风险预测的前瞻性研究[C]//第四届中国肿瘤学术大会暨第五届海峡两岸肿瘤学术会议教育集.天津:中国抗癌协会,2006:538-551.
- [2] 李林海. β -地中海贫血的分子杂交诊断技术及其进展[C]//中国人民解放军医学检验学会.第十届全国全军检验医学学术会议论文集.井冈山:中国人民解放军医学检验学会,2005.
- [3] 曹文静,王斌,徐慧珍,等.应用多重PCR及PCR/反向点杂交法诊断地中海贫血[C]//中华医学会检验分会.第五次全国中青年检验医学学术会议论文集.北京:中华医学会检验分会,2006.
- [4] 王姣,尤崇革.高分辨熔解曲线技术及应用新进展[J].兰州大学学报(医学版),2016,42(5):55-61.
- [5] 马占忠,范舒舒,徐静.荧光PCR熔解曲线技术在地中海贫血产前诊断中的应用[J].中国产前诊断杂志(电子版),2018,10(4):1-4.
- [6] 范荻,孙筱放. β -地中海贫血诱导多能干细胞株的建立[C]//中华医学会医学遗传学分会.第十四次全国医学遗传学学术会议论文集.北京:中华医学会医学遗传学分会,2015.
- [7] 肖奇志,周玉球,谢建红,等.基于实时荧光PCR的探针熔解曲线分析技术和反向点杂交技术应用于 β -地中海贫血基因诊断与产前诊断的对比研究[C]//中华医学会医学遗传学分会,中国遗传学会人类和医学遗传学委员会.第十二次全国医学遗传学学术会议论文集,2014:143-144.
- [8] 邓捷,庄广伦,彭文林,等.多重巢式PCR在 β 地中海贫血植入前遗传学诊断中的应用[C]//中华医学会.第八次全国妇产科学学术会议论文集.北京:中华医学会,2004.
- [9] 杨莎莎. β -地中海贫血病一例[C]//中国中西医结合学会医学影像专业委员会,福建省中西医结合学会医学影像分会.全国第十三次中西医结合影像学术研讨会全国中西医结合影像学研究进展学习班福建省第八次中西医结合影像学术研讨会论文集.2014.
- [10] 梁亮,赵林,田矛,等.香港型合并东南亚型缺失地中海贫血的筛查与鉴定[J].中国临床新医学,2020,13(10):982-985.
- [11] 曲守方,黄传峰,李丽莉,等.胚胎植入前地中海贫血检测试剂评价[J].分子诊断与治疗杂志,2022,14(3):373-378.
- [12] 中国合格评定国家认可委员会.分子诊断检验程序性能验证指南:CNAS-GL039[S].北京:中国标准出版社,2019.
- [13] 汪文明,马玲,周靖,等.自制复合质控品在 α 、 β -地中海贫血基因检测中的应用价值[J].检验医学与临床,2020,17(7):899-901+905.
- [14] 张文新,于婷,孙楠,等.地中海贫血基因检测试剂盒抽验质量分析[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(3):279-282+304.
- [15] 龙驹.广西南部地区人群 α 地中海贫血基因携带情况及热点突变检测范围探讨[J].广西医学,2020,42(4):457-460.