

# 血红蛋白 F-新疆 [ $\Lambda\gamma^T25(B7)Gly-Arg$ ]

## ——一种新的慢速不稳定胎儿血红蛋白变异体

胡怀钰\* 马梅荪

(新疆医学院生物学教研室, 乌鲁木齐)

### 摘 要

本文报告一种新的胎儿血红蛋白变异体。先证者为一健康汉族女性新生儿。变异体含量占全部Hb的7.7%。醋酸薄膜电泳 (pH8.6) 显示变异体区带稍慢于HbD组, 但比HbA<sub>2</sub>快。分离的变异体的热变性曲线显示其沉淀速度较HbA和HbF为快, 说明它属于不稳定Hb。通过DEAE-纤维素柱层析, 去除血红素、CM-纤维素柱层析、TPCK-胰蛋白酶消化、滤纸指纹图谱分析、氨基酸组成分析和微量顺序测定等手段, 变异体被确定为 $\Lambda\gamma^T25(B7)Gly \rightarrow Arg$ , 根据发现地, 命名为Hb F-新疆。

关键词: Hb F-新疆, 不稳定 Hb,  $\gamma$ -链变异体。

### 前 言

近年来, 国内在人血红蛋白的一级结构分析方面做了不少工作, 发现了一些新的异常血红蛋白。但迄今所报道的, 基本限于 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的变异体, 很少 $\gamma$ 链变异体。

作者于1984年6月至10月在乌鲁木齐市对965例汉族新生儿脐带血进行了异常血红蛋白病筛选, 检出两例不同的慢速Hb变异体。其中一例的变异特点为 $\Lambda\gamma^T25(B7)Gly \rightarrow Arg$ 。这是一种尚未见报道的胎儿血红蛋白新变异体<sup>[1]</sup>, 按发现地命名为血红蛋白F新疆(Hb F-Xinjiang)。本文描述此变异体的一级结构分析。

### 材 料 和 方 法

脐带血收集于ACD保养液中。以常规方法制成Hb液, 进行醋酸纤维素薄膜电泳分析 (TEB缓冲液, pH8.6)。用区带比色法测定异常Hb。不稳定Hb含量的测定采用Huisman的

\* 研究生

本文于1985年11月22日收到

热变性方法。Hb变异体经 DEAE-纤维素柱层析<sup>[2]</sup>分离后,按 Johnson等<sup>[3]</sup>的方法测定热变性曲线。Heinz小体生成率的测定及G6PD检查均采用标准血液学方法。

用醋酸纤维素薄膜的尿素解离电泳法检查变异链的性质,用紫外分光光度计(岛津UV-365)测定变异体的紫外吸收光谱,并对新生儿进行随访。

分离的变异体用酸性丙酮法去除血红素。异常 $\gamma$ 链经Clegg氏法分离<sup>[4]</sup>后,用TPCK-胰蛋白酶消化,制成指纹图<sup>[5]</sup>。用茚三酮显色,并根据需要进行各种氨基酸特殊显色。 $\gamma$ TpX、 $\gamma$ Tp9、 $\gamma$ Tp15三个肽斑的洗脱物经5.7N盐酸水解后,用Hitachi 835-50型氨基酸自动分析仪测定其氨基酸组成。用Chang氏DABITC/PITC双偶合法测定上列肽段及 $\gamma$ Tp12的氨基酸顺序<sup>[6]</sup>。

## 结 果

### 一、理化性质

在碱性条件下,Hb变异体的区带稍慢于HbD组,但较HbA<sub>2</sub>为快(Fig.1)。HbX含量为7.7%,抗碱Hb53.3%,热不稳定Hb7.6%;Heinz小体生成率为61.8%;G6PD缺乏试验阴性。变异体的热变性曲线见Fig.2。

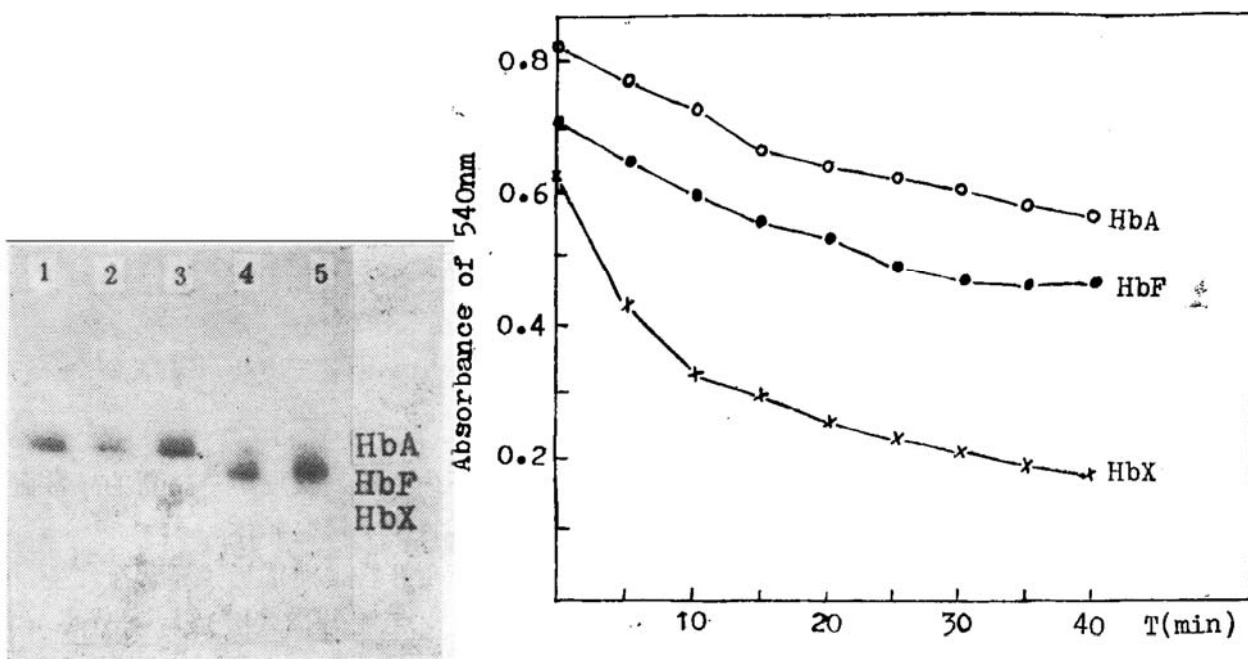


Fig.1 Cellulose acetate electrophoresis of the hemolysates.

1. Father, 2. Mother, 3. Normal adult, 4. Propositus, 5. Normal newborn baby

Fig.2 Heat denaturation curves of the variant Hb, Hb A and Hb F.

### 二、变异链性质确定

(1) 只在新生儿脐带血中检出Hb变异体,未在双亲血中检出。

(2) 出生后婴儿血液中异常 Hb 的含量, 逐渐减少, 生后一个月为 7.0%; 三个月为 3.6%。

(3) Hb 变异体的紫外吸收光谱曲线显示在 288nm 处存在 HbF 特有的“色氨酸凹”(Tryptophan notch)。

(4) 尿素解离电泳证实变异体非  $\alpha$  链。

综上所述, 变异体应属于  $\gamma$  链异常。

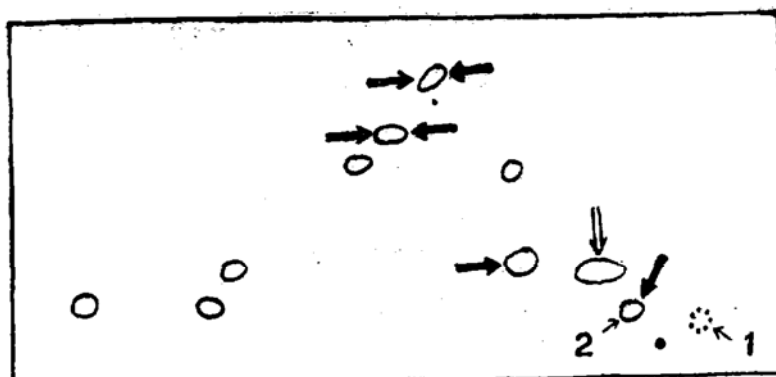


Fig. 3 Fingerprint of the abnormal  $\gamma$  chain.

1.  $\gamma$ Tp3(missing)                    ↑: Arg positive  
2. new peptide( $\gamma$ TpX)                    ⇨: Trp positive

### 三、一级结构分析

异常  $\gamma$  链的指纹图谱(Fig. 3)显示正常  $\gamma$ Tp3( $\gamma$ 18—30)斑点消失, 在它的左方, 层析迁移率稍高处出现一新斑点 ( $\gamma$ TpX)。

此肽斑的氨基酸组成 (Table 1) 与  $\gamma$ Tp3 的理论值差别甚大。经测定, 异常肽斑的氨基酸顺序为 Val-Asn-Val-Glu-Asp-Ala-Gly-Arg(Fig. 4)。除最后的 Arg 外, 其余七个氨基酸残基与  $\gamma$ Tp3 的前半段( $\gamma$ 18—24)顺序相符, 说明  $\gamma$ 25 的 Gly 为 Arg 所取代, 并在此被切断。关于

Table 1 Amino acid compositions of  $\gamma$ TpX,  $\gamma$ Tp9 and  $\gamma$ Tp15 of the variant  $\gamma$  chain

Amino acid	$\gamma$ TpX( $\gamma$ 18-25)	$\gamma$ Tp3	$\gamma$ Tp9	$\gamma$ Tp15
AsX	2.06(2)*	(2)	1.11(1)	
Thr		(1)	1.97(2)	4.26(1)
Ser			0.93(1)	3.20(3)
Glu	1.47(1)	(2)		
Gly	0.99(2)	(3)	1.25(1)	2.33(0)
Ala	0.97(1)	(1)	1.14(1)	2.22(3)
Val	1.62(2)	(2)	0.79(1)	1.10(2)
Met				1.01(1)
Ile				2.11(0)
Leu		(1)	2.16(2)	2.67(1)
Lys			0.65(1)	0.64(0)
Arg	0.88(0)	(1)		0.46(1)

\* Values in parentheses are the expected values of a normal  $A_{\gamma}T$  chain.

$\gamma$ 26—30 肽段的去向, 经对指纹图全部肽斑进行精氨酸特殊显色, 发现除  $\gamma$ TpX、 $\gamma$ Tp4 和  $\gamma$ Tp15 (均含精氨酸) 外,  $\gamma$ Tp12 斑点处, 也呈阳性反应 ( $\gamma$ Tp12 应为阴性)。经用双偶合法对此  $\gamma$ Tp12 肽斑进行氨基酸顺序测定, 并与正常  $\gamma$ Tp12 的顺序加以比较, 发现前者呈现  $\gamma$ 26—30 (Glu-Thr-Leu-Gly-Arg) 与  $\gamma$ Tp12 的叠加顺序, 这说明被切下的  $\gamma$ 26—30 肽段移位于  $\gamma$ Tp12

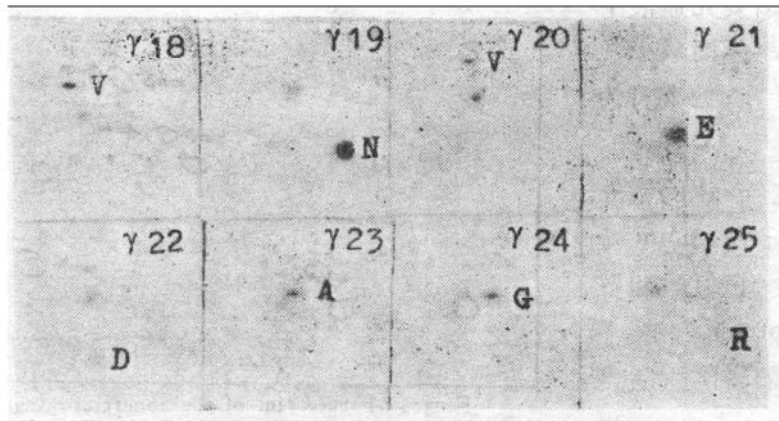


Fig. 4 Amino acid sequence analysis of  $\gamma$ TpX.

处，与之重叠。

异常  $\gamma$  链  $\gamma$ Tp9 的氨基酸分析及顺序测定均显示  $\gamma$ 75 位的氨基酸残基为 Thr。

$\gamma$ Tp15 的氨基酸组成分析未能得出理想结果，顺序测定呈现  $\gamma$ Tp15 和  $\gamma$ Tp2 的叠加顺序，说明  $\gamma$ Tp2 移位于  $\gamma$ Tp15 斑点处。但第 4 步偶合的结果是 Ala 和 Thr，说明  $\gamma$ 136 位 ( $\gamma$ Tp15 的第 4 个氨基酸) 是 Ala。Trp 特殊显色显示除  $\gamma$ Tp4 和  $\gamma$ Tp14 外， $\gamma$ Tp15 斑点也呈阳性反应，说明  $\gamma$ Tp2 确实与  $\gamma$ Tp15 位于同一斑点处。

从而，本例 Hb 变异体的变异特点为  $\gamma$ 25(B7)Gly  $\rightarrow$  Arg; 75(E19)Thr; 136(H14)Ala，或表示为  $\Delta\gamma$ T25(B7)Gly  $\rightarrow$  Arg。因为本变异体系首次发现，故命名为血红蛋白 F-新疆 (Hb F-Xinjiang)。

## 讨 论

Hb F-新疆 含量为 7.7%，符合 Brennan 等<sup>[7]</sup> 提出的  $\Delta\gamma$  变异体含量约为 12.5% 或 5% 的观点。先证者热不稳定 Hb 含量、Heinz 小体生成率高于正常值，提示变异体不稳定。纯化的变异体热变性速度较 HbA 和 F 为快，充分证明变异体为不稳定 Hb。

将 Hb 变异体分离后测定其各组分的热变性曲线与传统的直接测定溶血液相比，前者更为准确可靠。特别是在变异体含量较少，而且热不稳定 Hb 含量高出正常值范围不多时，这一优点更为明显。因为变异体和对照 HbA 和 HbF 是同一次柱层析所得样品，各成分间对比性强，溶剂一致。

根据 Perutz 血红蛋白亚单位的三维结构模型，B7 是一个内部但又可见的位置，由非极性残基占据。在  $\gamma$  链，B7 位是 Gly，被 Arg 取代后，由于胍基的强亲水性，其侧链可能伸向分子外侧，从而使 B-螺旋段变形，导致分子不稳定。

B7 位的变异体已发现过两种，HbG-Taiwan Ami [ $\beta$ 25(B7)Gly  $\rightarrow$  Arg]<sup>[8]</sup> 的变异类似 Hb F-新疆，可惜至今未见关于其分子稳定性的报道。Hb Shenyang 的变异为  $\alpha$ 26(B7)Ala  $\rightarrow$  Glu<sup>[9]</sup>，也是不稳定血红蛋白。

我们在分析 Hb F-乌鲁木齐的一级结构时， $\gamma$ Tp2 未在指纹图上显现。但在分析 Hb F-新疆时，发现  $\gamma$ Tp2 与  $\gamma$ Tp15 相混，位于同一斑点处，经重复 Hb F-乌鲁木齐的结构分析，结果  $\gamma$ Tp15 与  $\gamma$ Tp2 也发生复叠。同一样品在两次分析中结果不同，说明非结构异常所致，原因有待阐

明。但这不影响对Hb F-新疆的性质 ( $A\gamma^T25(B7)Gly\rightarrow Arg$ )所做的结论。

关于HbF的紫外特异吸收光谱, 一般认为与 $\gamma130$ 位的Trp有关, “色氨酸凹”在289.8nm处。Sacker等<sup>[10]</sup>报道在289nm处, 而Fuyuno等<sup>[11]</sup>认为在290nm处, 本文测定结果在288nm处。结果不同的原因尚未弄清楚。

#### 致 谢:

承新疆医学院第一附属医院产科的助产士同志们提供采血方便, 药学系陈坚先生帮助测定紫外吸收光谱, 生物学教研室郭卉同志辅助进行DEAE-纤维素柱层析, 本文照片均由摄影室曲颂民同志拍摄, 特此一并致谢!

#### 参 考 文 献

- [1] International Hemoglobin Information Center (IHIC) (1984), *Hemoglobin*, 8, 243—300.
- [2] Abraham, E.C., et al. (1976—77), *Hemoglobin*, 1, 27—44.
- [3] Johnson, C.S., et al. (1983), *Hemoglobin*, 7, 125—140.
- [4] Clegg, J.B., et al. (1966), *J. Mol. Biol.*, 19, 91—108.
- [5] Baglioni, C. (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, 48, 392—396.
- [6] Chang, J.Y., et al. (1978), *FEBS Lett.*, 93, 205—214.
- [7] Brennan, S.O., et al. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 490, 452—455.
- [8] Blackwell, R.Q. and Liu, C.-S. (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30, 690—696.
- [9] Zeng, Y.-T., et al. (1982), *Hemoglobin*, 6, 625—628.
- [10] Sacker, L.S., et al. (1967), *Brit. Med. J.*, 3, 531—533.
- [11] Fuyuno, K., et al. (1981), *Hemoglobin*, 5, 139—151.

## Hb F-XINJIANG $A\gamma^T 25(B7)Gly\rightarrow Arg$ : A NEW SLOWLY MOVING UNSTABLE FETAL HEMOGLOBIN VARIANT

Hu, Huai-yu\*    Ma, Mei-sun

(Department of Biology, Xinjiang Medical College, Urumqi)

This report describes a new fetal hemoglobin variant. The propositus was a healthy Han ethnic newborn female. The variant amounts to 7.7% of the total hemoglobins. Its electrophoretic band is slightly slower than that of the Hb D group but faster than that of Hb A<sub>2</sub> on cellulose acetate strip at pH 8.6. The separated variant was denatured faster than Hb A and Hb F, showing that the variant is unstable. By means of [the following procedures, namely, DEAE-cellulose chromatography, deheming, CM-cellulose chromatography, tryptic digestion, paper fingerprinting, amino acid composition analysis and micro-sequence analysis, the variant was identified as  $A\gamma^T25(B7)Gly\rightarrow Arg$ . It has been named Hb F- Xinjiang after the name of the region where it was discovered.

**Key words:** Hb F- Xinjiang, Unstable Hb,  $\gamma$ -chain variant

\* Postgraduate