

壮族新生儿胎儿血红蛋白中G γ 与A γ 比值 测定及其异常者基因图谱分析

敖朝晖 陈松森 贾佩臣 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

王荣新 黄有文 查丹玉

(解放军第三〇三医院)

Huisman, T.H.J. Kutlar, F.

(美国佐治亚医学院细胞及分子生物学系)

摘要 本文叙述聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定449例广西壮族新生儿脐带血中G γ /A γ 比值, 其中部分采用HPLC方法进行比较分析。结果显示低G γ 值(20—48%)和高G γ 值(81—85%)比例相同, 占2.45%。对其中两例低G γ 值和两例高G γ 值者的染色体DNA进行基因图谱分析, 确定其基因型分别为-G $\dot{A}\gamma$ -/-G γ -A γ -, -G γ -AG γ -A γ -/-G γ -A γ -。

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶电泳 胎儿血红蛋白G γ /A γ 比值 基因图

人类珠蛋白基因包括 α 和 β 基因簇, β 基因定位于11号染色体短臂上^[1,2], 它们以5'- ϵ -G γ -A γ - ϕ β - δ - β -3'的顺序排列, 该基因随着个体发育而由5'→3'依次表达和关闭。这种表达呈现高度的组织特异性和发育阶段的特异性, 一般具有两个开关, 即从胚胎到胎儿的开关和从胎儿到成人的开关, 前者只发生在 β 珠蛋白基因簇, 于胚胎早期出现。在蛋白水平上表现为由主要合成 ζ 和 ϵ 链转为合成 α 及 γ 链; β 链开始合成^[3,4]。到胚胎32—36周时 β 链合成率升高而 γ 链下降, 出生时 β 链的合成约占非 α 链总量的20%^[5]。出生后 β 链合成急速增高, γ 链的合成则急剧下降。半年后 γ 链合成仅占1~2%。 γ 链分为G γ 和A γ 两种, 它们的区别是前者第136位为甘氨酸(Gly), 而后者为丙氨酸(Ala)^[6]。它们起源于同一基因, 后经重组而衍化为不等位基因^[7]。据报道, 出生时G γ 和A γ 比值一般在7:3左右^[8,9,10], 部分新生儿G γ /A γ 值远离此值, 而出生时该比值与其基因型有关。现有资料表明新生儿HbF的G γ 值分布具有一定种族差异^[11]。本文系用聚丙烯酰胺凝胶电泳法对广西449例壮族新生儿脐带血G γ /A γ 比值进行了测定并对部分G γ 比值异常者(大于80%或小于50%)进行了基因图谱分析, 并确定了其基因型。

材 料 和 方 法

一、血样来源 来自广西南宁市及武鸣、绥水和邕宁等郊县, 用ACD抗凝, 无菌收集, 0~4℃运输, 大部分样品于一周, 少数于10~14天到达本实验室。

1988年3月7日收到初稿, 1988年10月13日收到修改稿。

二、G γ /A γ 比值测定 按[12][13]文献方法,以含有尿素、Triton X-100,冰醋酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)方法分离肽链。用0.09%的丽春红 2R(0.09%丽春红 2R,1.34%三氯醋酸,1.34%磺基水杨酸)染色8小时。以5%冰醋酸脱色至本底清白,然后在岛津CS-920高速薄层扫描仪500nm波长处扫描。其中59例脐带血送美国佐治亚医学院 Huisman 实验室,用高效液相层析法(HPLC)进行 G γ /A γ 比值测定。

三、DNA 的提取及基因图谱分析 按文献[14]和[15]方法从脐带血分离白细胞,提取DNA。按[16]方法进行基因图谱分析。用 α -³²P标记的 γ -IVS-II为探针(456bp, BamHI/Pru II)进行分子杂交后放射自显影。

结 果

为了进行分析比较,我们将449例壮族新生儿脐血中 G γ 值(G γ /G γ + A γ)分为三个区间:

Table 1 Distribution of G γ value of Hb F in Zhuang nationality

	G γ value (%)		
	20—48	50—80	81—85
Number	11	427	11
G $\bar{\gamma}$ x value	38.64	70.04	82.47
SD	9.59	4.14	1.54
%	2.45	95.10	2.45

SD :standard deviation

G $\bar{\gamma}$:mean value of percentage of G γ

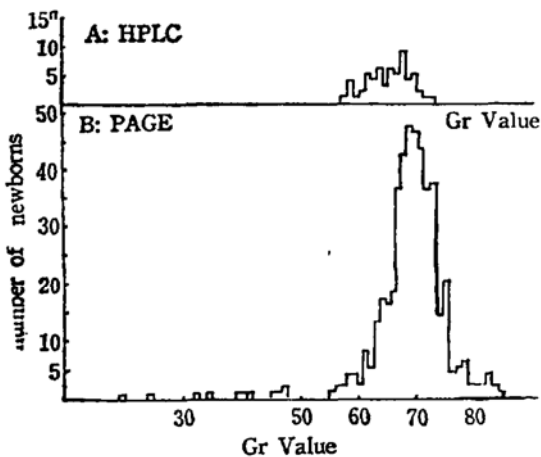


Fig 1 A, Distribution of G γ percentage of Hb F in 59 cases cord blood of Zhuang nationality in Guangxi (determined with HPLC)

B, Distribution of G γ percentage of Hb F in 449 Cases cord blood of Zhuang nationality in Guangxi (determined with PAGE)

低G γ 值区(20~48%)11例,占总数的2.45%,中间区(52~80%)427例,占总数的95.10%,高G γ 值区(81—85%)11例占2.45%。用HPLC方法分析59例中间区的脐带血,G γ 值在59—74%之间。Fig.1和Table 1中结果初步表明:壮族新生儿脐带血中低G γ 值和高G γ 值的例数相等,各占总例数的2.5%,呈正态分布。

为了比较不同胎龄,不同性别组之间G γ 值分布是否有差异,将被查的脐带血G γ 值按其胎龄和性别分为五组进行了方差分析(胎龄小于36周,36~38周,38—40周和大于40周各为一组,男婴和女婴为一组),结果表明各胎龄组和男婴与女婴之间G γ 值均无显著性差异,这似乎提示人体在该发育阶段基因开关转换的缓慢性,在出生前无明显变化,且此开关不受性别的影响。

新生儿No.350,352,354和433均为正常足月产健康者,他们的脐带血溶血液中G γ 值分别为81.3%,83%和40.3%,48.4%,前两例为高G γ 值,后两例属低G γ 值。从这四例G γ 值异常

者脐血中分离提取DNA, 用限制性内切酶 Bgl II, EcoR I, Pst I, Hind III, Xba I, Bgl I 等进行酶切, 然后进行电泳分离, 吸印转移, 用 α -³²P 标记的 γ -IVS-II 为探针进行分子杂交, 放射自显影。结果见 Table 2, Fig.2。

Table 2 The size(kb) of gene fragments identified in restriction endonucleases digests of DNA from the sample No.350,352,354,433 and from a normal control (γ IVS-I as probe)

Enzyme	control		350		352		354		433	
			Gy value:81.3		Gy value:83.4		Gy value:40.3		Gy value:48.4	
Bcl I	5	3					5	3	5	3
Bgl I	13		18	13	18	13	13	8	13	8
Bcl I	17						17	12	17	12
EcoR I	7.2	2.7	7.2	2.7 \uparrow	7.2	2.7 \uparrow	7.2	2.7 \downarrow	7.2	2.7 \downarrow
Hind III	8	3.5					8	3.5	8	3.5
Pst I	5.1,4.1,0.8		5.1,4.1,0.8		5.1,4.1,0.8		5.1,4.1,0.8		5.1,4.1,0.8	
Xba I	7.2,4.7,3.7		7.2,4.7,3.7		7.2,4.7,3.7		7.2,4.7,3.7		7.2,4.7,3.7	

\downarrow Intensity decreased

\uparrow Intensity increased

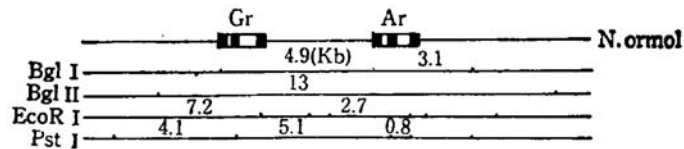
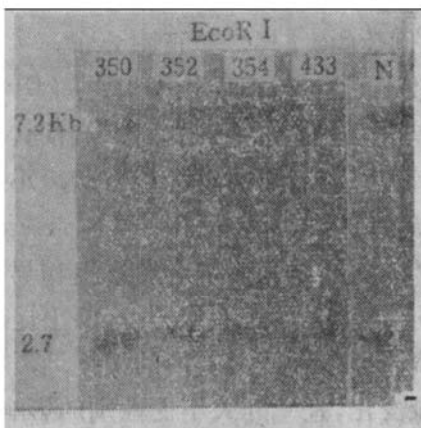
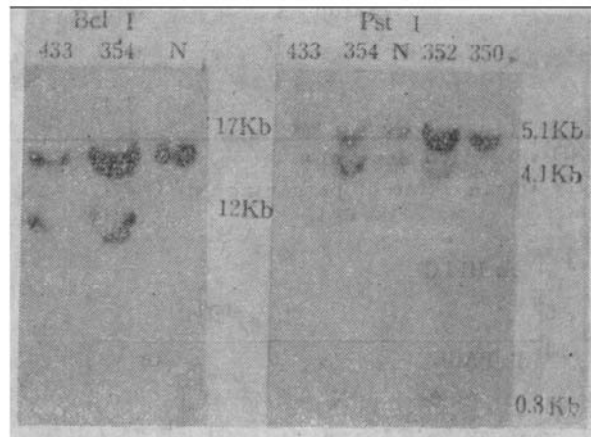
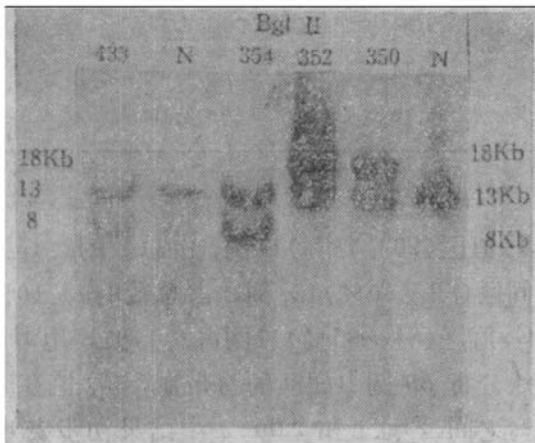


Fig.2 DNA fragments (Kb) obtained with restriction endonucleases Bgl I, Bcl I, Pst I and EcoR I and hybridized with γ IVS-I Probe. N is normal control.

讨 论

本实验结果表明, 壮族新生儿 HbF 中 G γ 值基本呈正态分布, 这与 Huisman^[11] 和朱芝芳^[10] 分别分析的美国黑人和中国维吾尔族新生儿 HbF 中 G γ 值偏高者较多不同, 而与北京汉族新生儿 HbF 中 G γ 值分布相接近^[17]。此结果提示, 出生时 HbF 中 G γ 值的分布有种族差异。至于我国各民族新生儿之间 HbF 中 G γ 值的分布特点及其血缘关系有待进一步分析比较才能阐明。

新生儿 No. 350, 352, G γ 值分别为 81.3% 和 83.4% 从其脐带血中分离提取的 DNA 用三种限制性内切酶 Bgl II, EcoR I, Pst I 酶切后, 以³²P 标记的 γ IVS- II 为探针进行分子杂交, 放射自显影。对 Bgl II, 除有正常所有片段外, 还出现一条 18Kb 片段, 说明其中一条 11 号染色体的 γ 基因区插入了 5kb 长的片段, 该组为 γ 基因插入型的杂合子。Pst I 酶切后得三条与正常者相同的区带, 即 5.1kb, 4.1kb 及 0.8kb, 说明该插入是一精确的 5kb 长的 γ 基因重复单位。同时从放射自显影图可见 5.1Kb 片段显影密度显著加强, 表明了插入的只能是 G γ 样基因。以 EcoR I 酶切后的杂交显影区带与正常者片段大小一致, 但显影密度有差别, 切自正常 A γ 基因区 5' 端的 2.7kb 片段的显影密度加强, 这又提示了插入的 γ 基因应该具有 A γ 基因 5' 核苷酸序列。综合黄种人中存在有不等交换而形成 -GA γ - 杂合基因^[18], 故认为 No. 350, 352 的基因型应确定为 -G γ -AG γ -A γ /-G γ -A γ 。

新生儿 No. 354, 433 为低 G γ 值者 (G γ 值分别为 40.3% 和 48.4%), 从其脐带血分离提取 DNA 用七种限制性内切酶 Bgl I, Bgl II, Bcl I, EcoR I, Pst I, Hind III, Xba I 酶切后放射自显影, 所得结果见 Table 2。以酶切位点位于 γ 基因区两端的限制性内切酶 Bcl I 和 Bgl II 酶解后, 除得到与正常相同的区带外, 还得到一条缺失 5Kb 的 DNA 区带。而以酶切位点处于 G γ 及 A γ 基因区的限制内切酶 EcoR I, Hind III, Xba I, Pst I, Bgl I 酶切时, 均得与正常相同区带。说明缺失部分正好是 5kb 的 γ 基因重复单位 (duplication)^[17], 否则应出现异常区带。值得注意的是 EcoR I 酶切后显示: 切自 A γ 基因 5' 的 2.7kb 片段显影密度较切自 G γ 基因 5' 的 7.8kb 片段的显影密度降低, 提示缺失部分包含 A γ 基因 5' 端或是 A γ 基因。如果认为缺失的 5Kb 片段是 A γ 基因, 则与蛋白水平测得的低 G γ 结果相矛盾。但是由于 G γ 和 A γ 基因的高度同源性^[7,19], 容易在减数分裂时进行不等位交换, 并且在 γ 基因 5' 端前 0.5Kb 及第二内含子前三分之二处为交换热点, 故有杂合基因 -GA γ - 存在的可能性。实际上 -GA γ -, -AG γ - 等杂合基因均有发现^{[18] [20,21]}, 故认为该两例壮族低 G γ 值者的 γ 基因缺失后形成 -GA γ - 杂合基因。其 γ 基因型为 -GA γ /-G γ -A γ 。

参 考 文 献

- [1] Eurro, C., et al., *Nature.*, (1983), 305, 638.
- [2] Morton, C., et al., *Am. J. Hum. Genet.*, (1984), 36, 576.
- [3] Pataryas, H. A., *Blood.*, (1972), 39, 688.
- [4] Huisman, T. H. J., *Am. Association Clin. Chem.*, (1984), 1, 1.
- [5] Kazazian, H. H. Jr., *Ann. NY. Acad. Sci.*, (1974), 241, 691.
- [6] Schroeder, W. A., et al., *PNAS*, (1968), 60, 537.
- [7] Shen, S. H. et al., *Cell*, (1981), 26, 191.

- [8] Huisman, T. H. J., *Am. J. Hematol.*, (1983) , 14, 133.
 [9] 曾溢滔等, 《科学通报》, (1982), 27, 1208.
 [10] 朱芝芳等, 《中国医学科学院学报》, (1986) , 8, 445.
 [11] Huisman, T. H. J., *Nature.*, (1977) ,265, 63.
 [12] Alter, B. P., *Blood.*, (1979) , 54, 1159.
 [13] Efremov, G. D., et al, *Hemoglobin.*, (1981) , 5, 637.
 [14] Poncy, M., et al, *Hemoglobin.*, (1982) , 6, 27.
 [15] 吴冠芸等, 《中国医学科学院学报》, (1983) , 5, 27.
 [16] Sukumaran, P. K., et al, *Nucleic Acid Res.*, (1983) , 11, 4635.
 [17] Zhu, Z. F., et al., *Hemoglobin.*, (1987) , 11, 123.
 [18] Harano, T., et al., *Am. J. Hematol.*, (1985) , 19, 349.
 [19] Jerry, L., et al., *Cell*, (1980) , 21, 627.
 [20] Harano, T., et al., *FEBS Letters.*, (1985) , 190, 45.
 [22] Zheng, Y. T., et al., *Am. J. Hematol.*, (1985) , 18, 235.

G γ /A γ Ratio of Fetal Hemoglobin of Newborns in Guangxi Autonomous Region and Gene Mapping Analyses of Abnormal Cases

¹Ao Zhao-hui ¹Chen Song-sen ¹Jia Pei-chen ¹Liang Zhi-chuan

²Wang Rong-xin ²Zha Dan-yu ²Huang You-wen

³Huisman, T.H.J. ³Kutlar, F.

(¹*Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

(²*303 Army Hospital, Nanning*)

(³*Medical College of Georgia, Augusta, U.S.A*)

Abstract G γ /A γ ratio of fetal hemoglobin in 449 cord blood samples of newborns of Zhuang nationality of Guangxi, Autonomous Region were determined by polyacrylamide electrophoresis and 59 samples were determined by HPLC for comparison. The results showed that the percentage of low G γ (20—48%) group and high G γ (81—85%) group are the same, each accounts for 2.5% of the total.

The genotypes of the two low G γ cases were identified by gene mapping as -GA γ -/-G γ -A γ and those of the two high G γ cases as -G γ -AG γ -A γ -/-G γ -A γ -.

Key words: Fetal hemoglobin Ratio of G γ to A γ Gene mapping PAGE
HPLC