

一个 α , β 地中海贫血复合家系 β 珠蛋白基因的进一步研究

刘敬忠 吴冠芸 王荣新*

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

摘要 前文^[1]曾报道广西一个 α , β 地中海贫血复合家系的血红蛋白组成及 α 珠蛋白基因分析结果, 并讨论了各成员可能的 β 珠蛋白基因结构情况。本文利用先进的PCR即基因扩增技术, 结合特异寡核苷酸探针斑点杂交及扩增后直接测定DNA序列的技术, 进一步研究并彻底搞清了该家系各成员的 β 珠蛋白基因结构情况。结果显示: 母亲及两个弟弟都是编码子41—42TTCT四个碱基缺失造成框架位移所致 β 地中海贫血的杂合子。父亲与先证者的 β 基因均属正常。前三个成员均为 α 地贫复合 β 地贫, 其 α 与 β 珠蛋白链合成的不均衡状态得到改善, 贫血症状也明显轻。

关键词: β 地中海贫血, β 珠蛋白基因, PCR, DNA测序

三年前, 我们曾报道广西一个方姓 α , β 地中海贫血复合家系的血红蛋白及 α 珠蛋白基因分析结果^[1], 并讨论了该家系五个成员可能的 β 珠蛋白基因状况。父亲为 α 地贫2杂合子(α -/ $\alpha\alpha$), 母亲为 α 地贫1杂合子(--/ $\alpha\alpha$), 先证者及其两个弟弟均为 α -地贫1和 α 地贫2双重杂合子(α -/--)。结合当时血液学资料及临床症状, 推测先证者两个 β 珠蛋白基因均正常, 父母及一个弟弟为 β 地贫杂合子, 另一弟弟可能为 β 地贫纯合子。两个弟弟由于两种地贫的复合, 使 α , β 两种珠蛋白链的合成同时受障碍, 因此二者仍基本处于一种均衡状态, 无HbH检出, 贫血症状很轻。可见, 这是一个非常令人感兴趣的家系。但该家系各成员 β 珠蛋白基因状况究竟如何? 前文的推测是否完全正确? 亟待证明。近年来发展起来的PCR技术结合特异寡核苷酸探针斑点杂交, 使有可能直接简便地分析出 β 珠蛋白基因的点突变^[2]。迄今, 已知有十种发生在 β 珠蛋白基因上的点突变导致中国人 β 地中海贫血^[3]。本文采用了一些先进实验技术, 如HPLC及Quik Sep, 测定血液学指标, PCR及直接测DNA顺序技术检测导致 β 地贫的基因突变, 进一步研究并彻底查清了该家系各成员的 β 珠蛋白基因, 肯定了前文的主要结论及推论, 并修订了两点推论。

材 料 和 方 法

一、血液学资料的测定 采用HPLC法。其中HbA₂值, 同时用Quik Sep(Iso Lab公司产品)测定。

*解放军303医院, 广西南宁市
收稿日期: 1989-03-15, 修回日期: 1989-05-05

二、DNA的制备, PCR,寡核苷酸引物及探针的合成、标记及斑点杂交等,均同另文^[3]。

三、PCR后直接测DNA顺序 用两对引物进行PCR,将 β 珠蛋白基因的两个DNA片段(700bp与580bp)同时扩增^[3]。经低融点琼脂糖凝胶电泳分离,回收纯化后做测序的模板DNA。测序用Sequenase Kit(United States Biochemicals公司产品)。测序方法按参考文献[4]进行,但退火步骤采用了更简化的方法,即将含模板DNA,未经末端标记³²P的引物及适当缓冲液的混合物10 μ L,93 $^{\circ}$ C下加热5分钟变性,立即插入冰浴中。以下标记及引物延伸终止等步骤按测序试剂盒生产厂家推荐的方法进行。

结 果 与 讨 论

将该家庭五个成员的DNA扩增后,先后与八种已知的中国人 β 地贫基因突变相应的特异寡核苷酸探针(即编码子41-42,17,IVS-II-654,-28,-29,编码子43,71-72及IVS-I-5突变^[3])杂交,只有41-42突变探针显示阳性结果。Fig.1示出母亲及两个弟弟为41-42突变(TTCT四个碱基缺失造成框架位移)杂合子,即 β^{41-42T}/β^A 。父亲及先证者DNA均不与上述任何突变探针杂交。由于前文^[1]推测父亲可能是 β 地贫杂合子,因此他可能携带一种不同于上述八种的突变。为了查找这种突变,我们将其 β 珠蛋白基因的两个DNA等位片段同时扩增^[3]后,直接测定其序列。共测定了从 β 珠蛋白基因启动子5'端至polyA的3'端之间共1300bp。结果,在所扩增的两个等位片段中都没有发现任何可导致 β 珠蛋白基因功能缺陷的变化;仅发现三个中性的多态性碱基突变(结果未示出)。

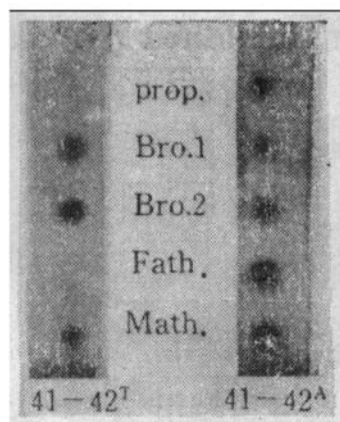


Fig.1 The autoradiograph of dot hybridization of amplified DNA of Fang's family with the oligo probes 41-42T and 41-42A

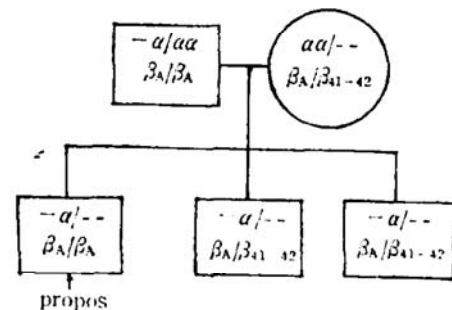


Fig.2 Pedigree of Fang's family

进而,我们用HPLC法重新测定父亲外周血血液学指标,结果如下:

Hb: 10.3g/dL; PCV: 0.328/L; RBC: $3.28 \times 10^{12}/L$;

MCV: 88fL; MCH: 31.4pg; MCHC: 35.5%;

HbA₂: 2.3% HbF: 0.2%。

用“Quik Sep”柱层析法测得其HbA₂为1.79%。两种方法测得的HbA₂值近似,都在正常值范围以内。这与上述特异寡核苷酸探针杂交及直接测定DNA序列所得的阴性结果一致。因而排除了父亲是 β 地贫杂合子的可能性。前文^[1]中对父亲HbA₂, HbF测定数值偏高,可

能与所用醋酸薄膜电泳方法误差较大,又未经其它测定方法检验校对有关。总之,本实验结果证明,前文^[1]关于父亲是 β 地贫杂合子,二弟是 β 地贫纯合子的推测是错误的。父亲的两个 β 珠蛋白基因都正常,二弟与大弟一样,系 β^{41-42T} 地贫杂合子复合 α 地贫双重杂合子($-a/--$)。

将方氏 α, β 地贫复合家系各成员的 α 及 β 珠蛋白基因分析结果综合示于Fig.2。先证者两个 β 珠蛋白基因都正常,由于缺失三个 α 珠蛋白基因($-a/--$),故 β 珠蛋白链的合成相对过剩,形成 β -四聚体,即HbH,显示出典型的HbH病贫血症状。其两个弟弟也都缺失三个 α 基因,但因都复合 β 地贫,即各只有一个正常 β 基因,因此其 α 链与 β 链的合成同时受障碍,水平都降低,而处于一种新的均衡状态,贫血症状明显减轻。该家系研究结果对地中海贫血的基因治疗研究提供了令人感兴趣的、有益的启示。

致谢 本所陈松森同志用Quik Sep柱测定HbA₂,美国乔治亚医学院细胞和分子生物学系Huisman教授协助用HPLC法测定有关血液学指标,一并致谢。本工作受国家863基金资助。

参 考 文 献

- [1] 张俊武等. 中国医学科学院学报, 1985, 7(5): 353.
- [2] Saiki RK et al. *Nature*, 1986, 324: 163.
- [3] Liu JZ et al. *Hemoglobin*, 1989, 13(6): 585.
- [4] Wong C et al. *Nature*, 1987, 330: 384.

Further Studies on β -Globin Genes of a Combined α -, and β -Thalassemic Family

Liu, Jing-zhong Wu, Guan-yun Wang, rong-xin*

(*Institute of Basic Medical Sciences, Beijing*)

(*303 Army Hospital, Nanning)

Abstract The hemoglobin composition and α -globin gene analysis on a family of combined α - and β -thalassemia were reported previously^[1]. Further studies on β -globin genes of the family have been performed by using PCR, dot hybridization and the direct DNA sequencing. The results show that both the propositus and his father have two normal β -globin genes. His mother is β -thalassemia heterozygote (β^A/β^{41-42}) combined α -thalassemia-1 ($--/aa$). Both of his brothers are β -thalassemia heterozygotes (β^A/β^{41-42}) combined HbH with deletion of three α -globin genes ($-a/--$). Thus, the uneven productions of α and β chains and the anemic syndromes are improved.

Key words: PCR(Polymerase Chain Reaction), Direct-DNA Sequencing, β -Thalassemia, β -globin Gene