

导致血红蛋白 P-*Nilotic* 的 β - δ 杂合基因的研究

刘敬忠

T. HARANA, T. H. J. HUISMAN

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

(Medical College of Georgia, Augusta, Ga. 30912, USA)

提 要

本文通过基因克隆和测定 DNA 顺序, 证明导致血红蛋白变异体 P-*Nilotic* 的 β - δ 杂合基因的不等交换发生在 β 珠蛋白基因第 275 位碱基与 330 位碱基之间长 54bp 的 DNA 片段上。即第 31 与 50 编码子之间。因此, 该杂合基因的第一外显子和第一内含子源于 β 基因, 而第二、三外显子和第二内含子源于 δ 基因。这些结果支持关于第二个内含子影响 β 珠蛋白基因表达水平的观察^[11]。

引 言

血红蛋白 P-*Nilotic* 是一种具有特殊非 α 链的异常血红蛋白。其第 1—22 残基与 β 珠蛋白链相同, 第 50—146 残基与 δ 珠蛋白链相同^[1]。它与血红蛋白 Lepore 正好相反, 后者第 1—22 残基是 δ 链, 50—146 残基是 β 链^[2]。这种异常血红蛋白主要在东亚维多利亚湖周围人群中发现。Hb P-*Nilotic* 约占 20% 的杂合子无临床症状^[3,4]。蛋白质结构分析资料表明, 该种非 α 链是一种 β - δ 杂合基因的产物。其不等交换可能发生在第一外显子, 第一内含子或部分第二外显子中。这种不等交换使 β 基因簇内诸基因排列为: 5'- ϵ -Gr-Ar- $\phi\beta$ - δ - $\beta\delta$ - β -3'。类似的一种异常血红蛋白 Hb Miyada (1—12 残基是 β 链, 22—146 残基是 δ 链) 是一个类似的 $\beta\delta$ 杂合基因的产物^[5,6]。

研究这些 $\beta\delta$ 杂合血红蛋白有助于基因表达的研究。这两种杂合 Hb 合成速率介于 β 链与 δ 链合成速率之间。本文通过基因克隆及测定 DNA 顺序, 证明 Hb P-*Nilotic* 基因的 IVS-1 源于 β 基因, 而 Hb Miyada 基因的 IVS-1 源于 δ 基因。除 IVS-1 不同外, 这两个杂合基因都具有 β 基因的启动子及第一外显子, 都具有 δ 基因的第二、第三外显子及第二内

含子 (IVS-2)。

材 料 和 方 法

血液样品 取自肯尼亚一成年 Hb P-*Nilotic* 杂合子。样品冷藏空运到美国乔治亚医学院。该异常血红蛋白的鉴定见前文^[7]。

提取 DNA 采用 Poncz 等方法^[8]从白细胞中提取 DNA。

基因克隆 用 Xba I 彻底酶解该 DNA, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收 16—20kb 片段并纯化之。与经 Xba I 酶解的 Charon 35 载体 DNA 连接, 体外包装, 转染宿主菌 *E. coli* K 802 细胞。用 β -IVS-2 及 δ -IVS-2 做为探针筛选含 δ 基因、 β - δ 杂合基因及 β 基因的阳性克隆。

次级克隆 含 P-*Nilotic* 基因的 18kb 片段的重组噬菌体 DNA, 经 Pst I 酶解, 纯化出含该基因的 3.8 kb 片段, 重组进质粒载体 pAT 153。转化宿主菌 *E. coli*, HB 101。具有四环素抗性的菌落再用 δ -IVS-2 和 β -IVS-2 两种 ³²P 标记的探针杂交筛选。

DNA 顺序测定 用 Mst II 酶解含 3.8kb 片段的重组质粒 DNA。经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 回收其中 90bp 的片段。用 DNA 聚合酶 I 大片段将其末端修饰成平末端, 进而

重组到 M 13 mp 10 的 Sma I 位点^[9]。提取含 90bp 的重组 M 13 的单链 DNA 做模板,用双脱氧末端终止法测 DNA 顺序^[10]。

结 果

图 1 示出 β 和 δ 珠蛋白基因第一外显子、

IVS-1 及部分第二外显子 DNA 顺序的详细比较。从以往蛋白质结构资料推测,导致 Hb P-Nilotic 的 β - δ 杂合基因的不等交换发生在 β 基因第 22 编码子与 δ 基因第 50 编码子之间,即第 117 位与 330 位碱基之间。

在进行 Pst I 酶解片段的次级克隆时,3.8

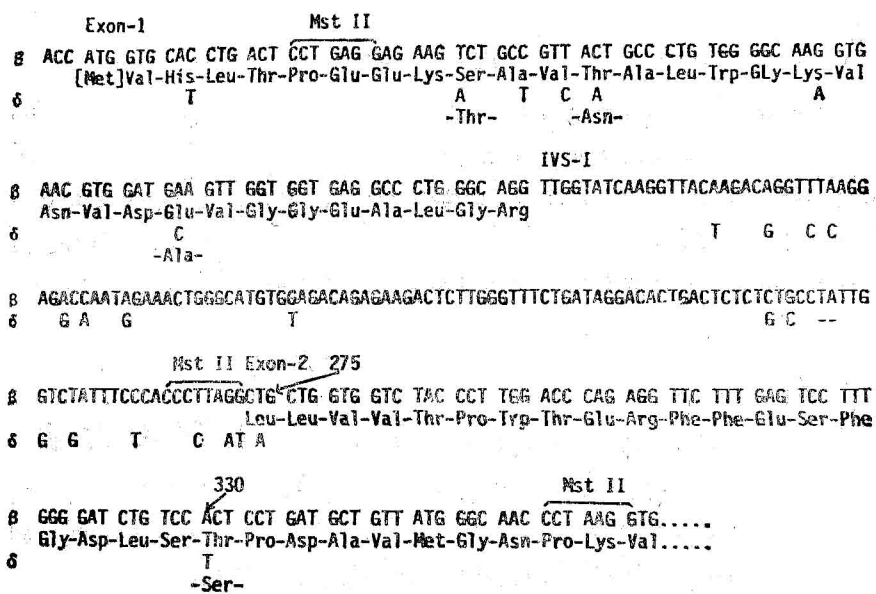


图 1 β 基因和 δ 基因部分序列的比较以及血红蛋白 β 链与 δ 链的比较

kb 片段包含 β - δ 杂合基因, 4.4 kb 片段含 β 基因, 而 2.3kb 片段含 δ 基因 (杂交图谱略)。筛选到含 3.8kb 片段的重组 pAT 质粒的克隆,用 Mst II 酶解其 DNA, 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, EB 染色后, 其分离图谱见于图 2。从图 2 A 与 B 可见, 含杂合基因与含正常 β 基因的质粒 DNA 一样, 经 Mst II 酶解, 都产生 201, 117 及 90bp 长的片段。说明该杂合基因至少到 IVS-1 与第二外显子交界处的 Mst II 位点为止, 与 β 基因具有完全相同的顺序。因为如图 1 所示, δ 基因不存在这一 Mst II 位点。于是, 不等交换发生的范围被缩小到此 Mst II 位点与第 50 编码子即第 330 位碱基之间。90bp 长的 Mst II 片段恰好包含这一区段。我们分离纯化了图 2A 中 90 bp DNA 区带, 克隆进 M 13 mp 10, 并测得重组 M13 的 90 bp 长片段的顺序, 结果见图 3。可见, 导致 P-Nilotic

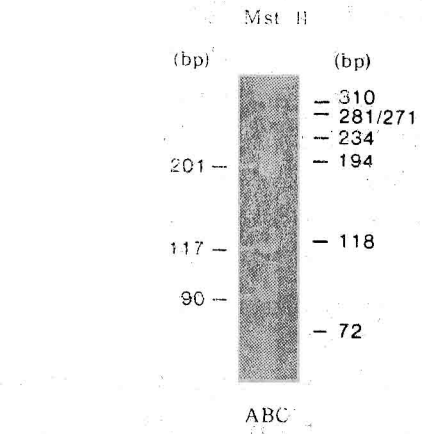


图 2 含 3.8 kb 片段的重组质粒, 经 Mst II 酶解后的电泳分离图谱
凝胶为 6% 聚丙烯酰胺
A: pAT-P-Nilotic DNA B: pAT- β A (正常 β 基因) DNA C: ϕ X-174 DNA-Hae III 酶解物。

β - δ 杂合基因的不等交换发生在第二外显子 5' 端第 275—330 位碱基之间。

