

the apparent Michaelis-constant (K_m) and the maximum initial response velocity v_m for urease in the immobilized bacteria membrane were determined. The biosensor was relatively sta-

ble for 45 days.

Key words *Corynebacterium glutamicum*, urea, urease, microbial sensor

Gc、Pi 蛋白亚型的快速微量电泳分析

郭尧君 李辛晖

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

黄力力 喻忠义

(公安部第二研究所, 北京 100038)

摘要 用快速微量等电聚焦技术对 190 名北京地区汉族健康人血清 Gc 蛋白亚型、Pi 蛋白亚型进行分型鉴定和基因频率调查。上样量为 1.5 μ l, 电泳和染色各 0.5 h。Gc^{1F} = 0.4891, Gc^{1S} = 0.2432, Gc² = 0.2678, 观察值与期望值吻合良好, ($\sum X^2 = 1.404$, $0.7 < P < 0.8$)。Pi^{M1} = 0.7542, Pi^{M2} = 0.1808, Pi^{M3} = 0.0650, 观察值与期望值吻合也良好, ($\sum X^2 = 1.1233$, $0.7 < P < 0.8$)。

关键词 等电聚焦, 基因频率, Gc 蛋白亚型, Pi 蛋白亚型

型特异成分 (group-specific component, Gc) 又称维生素 D 结合蛋白 (VDBP), 是存在于人血清中的一组生物活性相同、结构相似的 α_2 球蛋白。1977 年, Constans 等^[1]用等电聚焦技术将 Gc 分成 Gc1F, Gc1S, Gc2, Gc2-1F, Gc2-1S, Gc1F-1S 六种表型, 这六种表型由复等位基因 Gc^{1F}, Gc^{1S}, Gc² 控制^[2~4]。Gc 的遗传标记在个体识别及群体进化遗传理论上具有重要意义。

α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -antitrypsin) 是存在于人血清中的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂 (protein inhibitor, Pi)。1965 年, Axelsson 等^[5]与 Fagerhol 等^[6]分别用琼脂糖凝胶电泳技术与酸性淀粉凝胶电泳技术发现并证实了 Pi 的遗传多态性。1974 年, Allen^[7]首次将等电聚焦技术应用于 Pi 分型。至 1989 年已发现 70 多个共显性人血清 Pi 等位基因^[8]。Pi^M 是出现频率较高的等位基因, 被广泛地应用于个体识别、法庭科学及医疗诊断等领域。

用等电聚焦技术对人血清 Gc、Pi 蛋白亚型进行分型鉴定已有不少尝试, 但以往的常规等电聚焦电泳时间长达 3 h^[9,10]。固相 pH 梯度等

电聚焦虽然具有超高分辨率, 但电泳时间更长^[11], 且二者花费较大。本实验旨在摸索快速、微量、简便、经济的方法。

1 材料与方法

1.1 样品

血样采自北京地区健康汉族人 (相互无亲缘关系者) 未抗凝全血。分离血清, -20℃ 保存一个月。

1.2 试剂

1.2.1 凝胶介质: 29.1% 丙烯酰胺和 0.9% N, N'-甲叉双丙烯酰胺为 LKB 公司 1987 年产品。Pharmalyte pH4.5~5.4, pH4.2~4.9 和 PhastGel 4.0~6.5 为 Pharmacia Biotech 公司产品。

1.2.2 Gc 抗血清 (Incstar 公司); 固定液: 20% 三氯醋酸; Gc 染色液: 0.2% 考马斯亮蓝 R250 于 Gc 脱色液中; Pi 染色液: 0.02% 考马斯亮蓝 R350 于 Pi 脱色液中; Gc 脱色液: 甲醇: 冰乙酸: 水 = 4: 1: 5 (体积比);

Pi 脱色液: 甲醇: 冰乙酸: 水=3:1:6 (体积比)。

1.3 灌制凝胶

按郭尧君^[12]法组装小型灌胶模具, 每次灌制两块 55 mm×45 mm×0.5 mm 的凝胶。裁两块宽 65 mm, 长分别为 95 mm 和 110 mm 的玻璃板, 在 95 mm 的玻璃板两个长边上分别贴上两层宽 5 mm, 厚 0.25 mm 的 DYMO 带。在 110 mm 的玻璃板上放上一张支持膜 (Gc 电泳用国产投影胶片, Pi 电泳用 Pharmacia Biotech 公司的 GelBond PAG film), 盖上 95 mm 玻璃板, 两边分别用夹子夹紧。

在 0.5 ml 凝胶贮液中加 0.15 ml Pharmalyte (Gc 用 pH4.5~5.4, Pi 用 pH4.2~4.9), 双蒸水定容至 3 ml。抽气, 加入新配制 40% 过硫酸铵 4.5 μ l, 灌胶, 37℃ 保温 1 h。胶在双蒸水中漂洗 8 次, 每次 1 min。将胶从中间剪开, 即成两块 55 mm×45 mm×0.5 mm 的凝胶。盖上塑料薄膜保护胶面, 4℃ 保湿。需灌制多块胶时, 按比例增加凝胶溶液量并相应改装模具大小。

1.4 等电聚焦

电泳使用 Pharmacia Biotech 公司的 PhastSystem 电泳仪。预电泳后, 在阴极侧用 2 mm×1 mm 的滤纸块加 1.5 μ l 血清, 加样结束后除去滤纸块, 电泳参数见表 1 与表 2。

1.5 染色和判型

Gc 蛋白亚型染色按郭尧君等^[11]方法作如下改进: 用 0.9% 生理盐水 1:1 稀释的 Gc 抗血清浸湿醋酸纤维素膜, 50℃ 生理盐水洗膜 4 次, 每次 15 min。根据 Constans 等^[1]提出的标准判定 Gc 亚型, 用第一届巴黎 Gc 系统国际研讨会采用的标准判定变异型^[13], 并用 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则作统计^[14]。

Pi 蛋白亚型染色在 PhastSystem 电泳仪的染色腔中进行。室温固定 5 min, 洗胶 2 min, 50℃ 染色 15 min, 50℃ 脱色 10 min。胶面上覆上玻璃纸晾干, 便可永久保存或制成幻灯片。Pi 亚型的判定根据 1978 年在法国鲁昂举行的国际 Pi 系统命名原则进行^[15]。

2 结果与讨论

人血清 Gc 的 pH4.5~5.4 和 pH4.0~6.5 的等电聚焦图谱分别见图 1 和图 2。对 190 份样品进行 Gc 亚型判定并经统计学计算, 卡方 $\sum X^2=1.404$, 自由度 $df=3$, 好适度 P 在

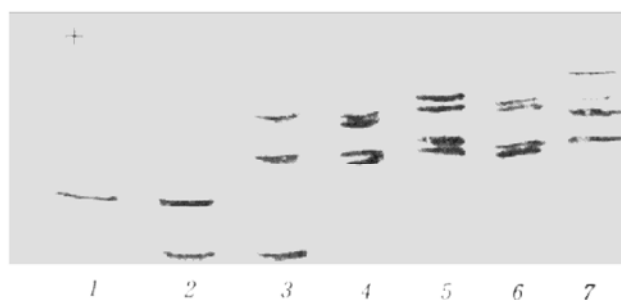


图 1 人血清 Gc 的 pH4.5~5.4 等电聚焦图谱
1: Gc2; 2: Gc2 的阴极侧变异; 3: Gc2-1F (2 阴极侧变异); 4 和 6: Gc1F-1S; 5 和 7: 不同的 Gc1F-1S (1S 阳极侧变异)。

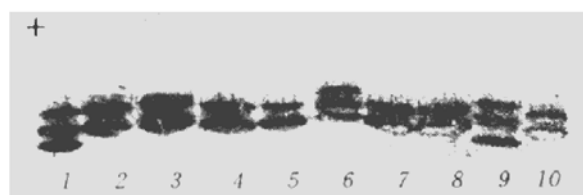


图 2 人血清 Gc 的 pH4.0~6.5 等电聚焦图谱
1: Gc2-1S; 2、4、5、7、8 和 10: Gc1S; 3: Gc1F-1S; 6: Gc1S 阳极侧变异; 9: Gc2-1F。

表 1 pH4.2~4.9 和 pH4.5~5.4 自制胶电泳参数

	U/V	I/mA	P/W	t/℃	V·h
预电泳	1000	3.0	3.5	12	75
加样	200	2.0	3.5	12	15
电泳	2000	5.0	3.5	12	510

表 2 PhastGel 4.0~6.5 商品胶电泳参数

	U/V	I/mA	P/W	t/℃	V·h
预电泳	1000	2.0	3.5	12	75
加样	200	2.0	3.5	12	15
电泳	2000	5.0	3.5	12	410

0.7 与 0.8 之间, 期望值与观察值吻合良好, 两者无显著差异, 群体符合 Hardy-Weinberg 定律 (表 3).

表 3 北京地区汉族群体 Gc 亚型分布及其基因频率

表型	观察值		期望值		X^2	基因频率
	N	%	N	%		
1F	41	22.40	43.77	23.92	0.1871	1F=0.4891
1S	12	6.56	10.82	5.91	0.1160	1S=0.2432
2	13	7.10	13.12	7.17	0.0011	2=0.2678
2-1F	52	28.42	47.95	26.20	0.3154	
2-1S	20	10.93	23.84	13.03	0.7373	
1F-1S	45	24.59	43.54	23.79	0.0474	
合计	183	100	183	100	1.404	

本实验检出三种 7 个 Gc 亚型稀有型, 占全部样品的 3.68%, 分别属于 Gc1S 阳极侧变异和 Gc2 阴极侧变异. 在计算正常亚型的基因频率时, 未将稀有变异型计算在内.

Gc 亚型在人群中的分布与种族、地域有关. 本结果与不同地区人种比较, 表明汉族人与亚洲高纬度地区的日本人、朝鲜人无显著差异, 而与欧洲、北美的白人、黑人存在显著差异^[11].

人血清 Pi 的 pH4.2~4.9 等电聚焦图谱见图 3. 对 177 份样品进行 Pi 亚型判定并经统计学计算, $\sum X^2=1.1233$, 自由度 $df=3$, 好适度 P 在 0.7 与 0.8 之间, 期望值与观察值吻合良好. 两者无显著差异, 群体符合 Hardy-

Weinberg 遗传定律 (表 4).

表 4 北京地区汉族人 (群体) Pi 亚型分布及其基因频率

表型	观察值		期望值		X^2	基因频率
	N	%	N	%		
M ₁	103	58.19	101	57.06	0.0514	M ₁ =0.7542
M ₂	8	4.52	6	3.39	0.5513	M ₂ =0.1808
M ₃	1	0.56	1	0.56	0.0090	M ₃ =0.0650
M ₁ M ₂	44	24.86	48	27.12	0.4202	
M ₁ M ₃	17	9.60	17	9.60	0.0094	
M ₂ M ₃	4	2.26	4	2.26	0.0010	
合计	177	100	177	100	1.1233	

表 5 为本文和文献 [9, 16~18] 报道结果的比较. 没有发现人种间 Pi 基因频率有规律性的明显差异. 但从表 6^[19,20]国内不同地区的调查结果可以看到纬度高的地区 Pi^{M₁} 频率高于纬度低的地区. 这提示 Pi 亚型的分布可能与地理

表 5 不同国家人群 Pi 基因频率的比较

国家	样本数	Pi ^{M₁}	Pi ^{M₂}	Pi ^{M₃}	其他	参考文献
中国	177	0.7542	0.1808	0.0650	0	本文
瑞典	1062	0.6940	0.1384	0.1139	0.0538	[9]
法国	163	0.6260	0.0920	0.1040	0.1780	[16]
美国	904	0.7240	0.1370	0.0950	0.0460	[17]
德国	347	0.6917	0.1686	0.0865	0.0532	[18]
芬兰	136	0.7900	0.1200	0.0800	0.1100	[16]

表 6 不同地区汉族 Pi 基因频率的比较

地区	样本数	Pi ^{M₁}	Pi ^{M₂}	Pi ^{M₃}	其他	参考文献
北京	177	0.7542	0.1808	0.0650	0	本文
郑州	191	0.7487	0.1623	0.0785	0.0104	[19]
成都	510	0.7049	0.2137	0.0667	0.0148	[20]
武汉	214	0.7009	0.2196	0.0724	0.0007	[19]
南宁	206	0.6820	0.2427	0.0704	0.0049	[19]
海口	227	0.6542	0.2709	0.0705	0.0004	[19]

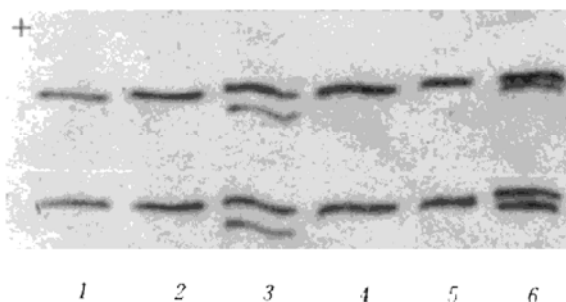


图 3 人血清 Pi 的 pH4.2~4.9 等电聚焦图谱

1、2、4 和 5: M₁; 3: M₁M₂; 6: M₁M₃.

分布有关。

Gc 亚型分析中, 如使用商品胶 (PhastGel 4.0~6.5) 由于 F、S 带间距较近, 仅可大致判定 Gc 亚型, 而 pH4.5~5.4 的自制胶, 由于 pH 范围窄, 分辨率高, 故可准确判定。自制胶用水漂洗与未漂洗相比, 前者电泳时电流较低, 电压上升较快, 电泳时间缩短。自制胶应在冰箱中放置 0.5 d 后使用, 以免电极下出现气泡, 但随凝胶在冰箱中放置时间的加长, 电压上升变慢, 电泳时间也加长。经观察在冰箱中放置一周的凝胶, 仍可成功进行电泳分型。

由于本文采用免疫固定法检测 Gc 亚型, 可使用国产投影胶片代替进口 GelBond PAG film, 实际花费仅是商品胶的 1/6。

与以往的常规等电聚焦及固相 pH 梯度等电聚焦技术相比, 本实验周期大大缩短, 上样量、所用试剂及抗血清均大大减少, 上样数可增加 5 倍, 分型不受实验条件变化的影响, 可以达到快速、微量、简便、经济的目的。

参 考 文 献

- 1 Constans J, Viau M. *Science*, 1977; **198**: 1070
- 2 Antonio A. *Journal of Forensic Sciences*, 1988; **33** (5): 1267
- 3 Budowie B. *Forensic Science International*, 1987; **33**: 187
- 4 Pflug W. *Electrophoresis*, 1988; **9**: 443
- 5 Axelsson V, Laurell C B. *Am J Hum Genet*, 1965; **17**: 466
- 6 Fagerhol M K, Braend M. *Science*, 1965; **149**: 986
- 7 Allen S. *Am J Clin Pathol*, 1974; **62**: 732
- 8 Cox-Wilson D. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: Mc Graw Hill, 1989: 2409
- 9 Hjalmarsson K. *Hum Hered*, 1988; **38**: 27
- 10 赵 渠, 吴梅筠. *中国法医学杂志*, 1987; **2** (2): 85

- 11 郭尧君, 郭 强, 黄力力等. *生物化学与生物物理进展*, 1994; **21** (4): 356
- 12 郭尧君. *生物化学与生物物理进展*, 1983; (3): 50
- 13 Constans J. *Hum Genet*, 1979; **48**: 143
- 14 李宝森, 胡庆宝. *遗传学*. 天津: 南开大学出版社, 1991: 469
- 15 Cox D W. *Hum Genet*, 1980; **53**: 429
- 16 Constans J. *Hum Genet*, 1980; **55**: 119
- 17 Dykes D D. *Hum Hered*, 1984; **34**: 308
- 18 Weidinger S. *Z Rechtsmed*, 1982; **88**: 203
- 19 Ying Q L. *Hum Genet*, 1985; **69**: 184
- 20 曹志敏, 吴梅筠. *遗传与疾病*, 1989; **64**: 235

Subtyping of Gc and Pi System by Rapid and Sensitive Isoelectrofocusing. Guo Yaojun, Li Xinhui (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*); Huang Lili, Yu Zhongyi (*Institute of Forensic Sciences, Beijing 100038, China*).

Abstract The distribution of Gc and Pi subtypes of 190 unrelated healthy donors in the Han population in Beijing were investigated by rapid and sensitive isoelectrofocusing. The running and developing time was half an hour each. Sample loading was 1.5 μ l Gc^{1F} is 0.4891, Gc^{1S} is 0.2432, Gc² is 0.2678. There is good agreement between the observed and the expected value ($\sum X^2=1.404$, $0.7 < P < 0.8$). Pi^{M₁} is 0.7542, Pi^{M₂} is 0.1808, Pi^{M₃} is 0.0650. The agreement is good as well ($\sum X^2=1.1233$, $0.7 < P < 0.8$).

Key words isoelectrofocusing, Gc subtypes, Pi subtypes, gene frequencies