

用错配 PCR 技术检测中国人 β -地中海贫血基因突变

徐湘民 马维芳 宋兰林 张基增

(第一军医大学分子生物学实验室, 广州 510515)

关键词 多聚酶链式反应 (PCR), β -地中海贫血, 基因诊断

β -地中海贫血 (β -地贫) 的分子基础主要为点突变, 目前中国 β -地贫人群中已发现 16 种点突变。我们在基因频率调查的基础上, 发现我国南方 95% 以上的 β -地贫由 5 种点突变所致^[1], 它们是: codon 41-42 (-CTTT) 缺失突变, IVS-2 nt 654 (C $\rightarrow$ T) 突变, codon 17 (A $\rightarrow$ T) 突变, -28 (A $\rightarrow$ G) 突变和 codon 71-72(+A) 移码突变。这些突变均不引起限制性酶切位点改变。作者设计了 5 种针对上述突变的单碱基错配引物, 即在互补于邻近点突变区域的 PCR 引物中, 在 3' 端附近人为引入一个与模板错配的碱基, 旨在使 PCR 扩增序列产生等位基因特异性限制酶位点, 并可借此

人工酶切 RFLP 区分正常和突变等位基因。 β -地贫病例和正常对照总 DNA, 按本室常规方法从白细胞中提取。被检 DNA 先用此错配引物和与之配对的另一完全互补于模板的引物进行 PCR, 扩增出特异 β -珠蛋白基因片段后, 直接用某一限制酶消化, 接着用凝胶电泳分析消化产物即可确诊样品的基因型。PCR 反应条件: 25 μ l 总体积中含 0.5 μ g 基因组 DNA, 50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 0.1% Triton X-100, 2.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L 4 种 dNTP, 0.5 μ mol/L 各种引物, 和 1.25 U Taq 聚合酶 (Promega), 加 20 μ l 矿物油防止蒸发。扩增反应在 Eppendorf 热

表 1 用于错配 PCR 技术的引物和人工酶切 RFLP 分析结果

引物(正、负链)	序列(5' $\rightarrow$ 3')	位 置	限制酶	扩增及消化 DNA 片段(bp)
China1(+)	GTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCA	-129--104	EcoRI	123; 102 和 21
AR-28(-)	TAGATGGCTCTGCCCTGAATT	-27--7		
PCO ₃ (+)	ACACAAGTGTGTTCACTAGC	+14--33	NheI	110; 87 和 23
AR17(-)	CAACTTCATCCACGTTTCAGCT	+103--123		
XM93(+)	ACTCTCTCTGCCTATTGGTC	+236--255	HincII	93; 89; 70 和 19
AR41-42(-)	ACAGATCCCCAAAGGAGTCAA	+303--322		
AR71-72(+)	AGAAAGTGCTCGGTGCCCTTA	+377--397	DdeI	98; 70; 51; 28 和 18
China2(-)	TGCAGCTTGTCACAGTGAGCTCACT	+448--473		
China3(+)	GTGTACACATATTGACCAAA	+952--971	MaeIII	221; 196 和 25
AR654(-)	TTATATGCAGAAATATTGCTGTT	+1150--1172		

注: AR 引物系列后的数字示被检突变代号。黑点所示的位置为人为引入的错配碱基。AR71-72/China2 扩增序列 (97bp) 中, 除有一个等位基因特异性 DdeI 切点 (距 5' 端 18 bp) 外, 还存在另一个该酶切点 (距 3' 端 28 bp), 故有 4 个酶解片段。

循环仪上进行 30 个周期: 93°C 变性 50s, 57°C 退火 30s, 70°C 延伸 30s, 最后一次循环的延伸反应 5 min。取 5—10 μ l 扩增产物按厂家

(Boehringer Mannheim 和 Promega) 提供的条

收稿日期: 1992-06-15

件于 20 μ l 总体积中进行限制酶消化,反应时间 3h 至过夜。消化液点于 12% PAG 上电泳, E. B. 染色,紫外灯下观察结果。本文所用引物及分析结果见表 1。作者共分析 30 例上述 5 种突变的纯合子、杂合子,及 5 例正常 DNA 样品,并产前诊断了 3 例 β -地贫高危妊娠胎儿,其结果与 ASO 法对照完全一致。此项技术不需要标记探针及引物,且免去了杂交步骤的繁琐

操作,对中国人 β -地贫的点突变检出率在 95% 以上,为 β -地贫的基因分析及产前诊断的进一步普及提供了一种新的简捷途径。同时也适用于其它由已知点突变所致遗传病及其类似病理基因的检测。

参 考 文 献

- 1 Zhang J Z, Cai S P, Kan Y W. *Ann NY Acad Sci*, 1990; 612: 264

中国眼镜蛇血清白蛋白的部分氨基酸序列

沈海法 邵靖宇

(浙江医科大学生化教研室,杭州310006)

B. HAVSTEEN

(联邦德国基尔大学生化系)

关键词 蛇,血清白蛋白,氨基酸序列

中国眼镜蛇血清白蛋白是一种酸性蛋白,等电点 4.1 ± 0.1 ,分子量 70500。它能和同源的蛇神经毒素和心脏毒素结合。生理条件下,白蛋白和¹²⁵I-神经毒素分子结合比为 $1:8 \pm 1$ 。白蛋白的存在可使小鼠对蛇毒的耐受性成倍提高,并显著抑制心脏毒素的溶血作用。对白蛋白氨基酸序列的研究有助于白蛋白-毒素作用机理的研究,并揭示眼镜蛇的自我解毒功能。

我们用 TPCK-胰蛋白酶(序列分析级)处理纯化的白蛋白,高效液相反相层析提取含量最高的 4 条小分子多肽,并用氨基酸序列仪测其序列,得如下结果:

- 1 H-TSSTGTISPF VHPNAEEAXQ AFQND RD (S)
30
VL AQYIFXL(S)R-OH ($pI = 4.60$)
- 2 H-LASQISATDF GAITLT LVTQ TVPATLEDL
30
(K)-OH ($pI = 3.86$)
- 3 H-HVDDQHSTIR-OH ($pI = 6.94$)
- 4 H-NHPELSK-OH ($pI = 7.50$)

蛇血清白蛋白的胰蛋白酶水解产物经 FPLC 分离纯化得分子量分别为 60000 和 40000

的两水解片段,它们对¹²⁵I-神经毒素的结合力分别为白蛋白的 127.8% 和 30.6%。

实验结果显示,已知序列的 4 条小分子多肽链有其共同特点,极性氨基酸含量很高,且均不含半胱氨酸残基。由于蛋白质多肽链内二硫键的存在有利于白蛋白分子形成特定的构象,如特异地结合神经毒素和心脏毒素,因此,这些小肽可能位于蛇血清白蛋白分子表面的极性结构域中,它们对维持白蛋白的水溶性起一定的作用。由于分子量为 60000 的酶解片段对神经毒素的结合力高于白蛋白分子,推测在白蛋白分子上切除部分肽段后,又露出一毒素结合位点或原有的结合位点与毒素的亲合力提高,而经酶解脱落的小肽对白蛋白与毒素的特异性结合影响较小。在水性溶液中,这些结构部位较易成为蛋白酶作用的对象。

肽链 1 的氨基酸序列与哺乳动物血清白蛋白(BSA、HSA)存在同源性,而肽链 2,3,4 与上述蛋白均无同源性。对蛇血清白蛋白的结构测定可反映蛇类与其它动物在进化上的联系。