

非连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 HbE 及 HbA₂

颜刚* 朱定尔 袁恬莹

(湖南医科大学分子生物学研究室,长沙)

提 要

应用非连续聚丙烯酰胺凝胶电泳成功地分离了 HbE 变异链 (β^E) 与 α 链、 δ 与 γ 链,测定了 20 例正常人溶血液 δ 链的含量 ($1.12 \pm 0.44\%$)。并对 1 例 HbE/ β^0 -地贫家系 4 位成员的 HbE 和 HbA₂ 含量进行了同时分别测定,其结果表明该方法稳定、可靠、易行。

前 言

血红蛋白 E (简称 HbE, $\alpha_2\beta_2^E$) 与 HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) 在电泳及层析中有极为相似的特性,一般的电泳及层析方法均不能使之有效地分离^[1]。甚至普通高压液相色谱、等电聚焦均不能将 HbE 和 HbA₂ 完全分离^[2,3]。为了研究 HbE 变异患者溶血液中 HbA₂ 的含量,推出了超窄固定 pH 等电聚焦(pH7.55—7.65)用于 HbE 与 HbA₂ 的分离^[4]。此外亦有人用反相高压液相色谱可使 β^E 及 δ 链分离^[5,6],从而分别测定 HbE 及 HbA₂ 的含量;但试剂、设备昂贵,使其应用受限。较为简便的珠蛋白链分离方法——尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳不能将变异链 β^E 与 α 链、 δ 与 γ 链分离^[7,8]。作者在原方法基础上加以改进,使 HbE 变异链 β^E 与 α 链、 δ 与 γ 链得以完全分离,并可进行定量分析。

材 料 与 方 法

1. 试剂 丙烯酰胺系浙江黄岩化工厂产品,尿素(分析纯)北京化工厂产品。TritonX-100及考马斯亮蓝 R250 系 Sigma 产品。

2. 样品 先证者(HbE/ β^0 -地贫患儿)家系(包括父、母、兄)共 4 人,先证者男性、3 岁、汉族,湖南长沙县人。1 例经一级结构分析确诊

的 HbE 患者,20 例正常人。上述成员静脉抽血 2ml,肝素抗凝、常规制备溶血液。用 DEAE-Sephadex A50 柱层析制备 HbA 及 HbF,醋酸纤维素薄膜电泳分离纯化碳酸酐酶作为标准品。

3. 方法: 血指数由电子血球计数仪 (Model S Plus II) 自动分析。DE52 纤维素微量柱层析法测定 HbA₂ 或 (HbE + HbA₂) 含量^[9]。

非连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称 DPAGE)根据其丙烯酰胺的浓度梯度(12% 及 7.5%)^[1],先后制备凝胶,待成胶后 2 小时即可进行预电泳,各样孔加样 10—15 μ g, 11mA 恒电流电泳。考马斯亮蓝 R250 染色,凝胶背景脱色后用岛津薄层扫描仪 (CS-910) 于 560nm 处进行透射光密度扫描,测定后计算区带的百分含量。

结 果

1. 溶血液中 δ 链测定的重复性 取正常人、 β -地贫杂合子及纯合子三种不同 HbA₂ 水平的样品,同一凝胶板上每种样品平行点样 4—6 次,先后重复三块凝胶板。方差分析同一

* 研究生

样品平行及重复间的误差, P 值均大于 0.05, 无显著性差异。正常人、 β -地贫纯合子及杂合子的 δ 链结果分别为: $0.98 \pm 0.11\%$, $7.89 \pm 0.55\%$ 和 $2.40 \pm 0.39\%$ 。

2. δ 链的正常值 DPAGE 法测定 20 例正常人溶血液 δ 链结果同 DE52 纤维素微量柱层析法所测相应个体的 HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) 含量进行相关分析, 两法呈显著线性相关 ($r = 0.93$, $P < 0.001$) (图 1)。 δ 链含量乘以 2 的结果同微量柱层析法所测 HbA_2 水平接近, 因此 DPAGE 法所测 δ 链含量能较客观地反映外周溶血液中 HbA_2 水平, 并求得 δ 链正常值范围: $1.12 \pm 0.44\%$ (95% 可信限)(表 1)。

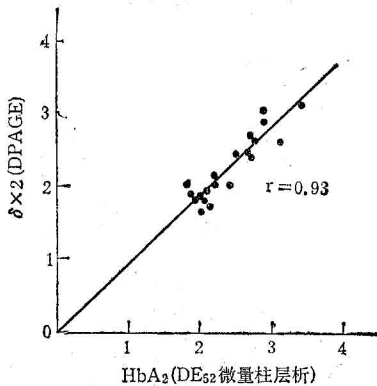


图 1 DPAGE 法所测 δ 链含量与 DE52 微量柱层析法测定的 HbA_2 含量的相关比较

表 1 正常人溶血液 HbA_2 及 δ 链含量

No.	HbA_2 (%)	δ (%)	No.	HbA_2 (%)	δ (%)
1	2.05	0.91	11	3.08	1.28
2	2.40	0.99	12	2.71	1.32
3	1.84	1.00	13	2.91	1.50
4	1.91	0.93	14	2.01	0.83
5	2.70	1.20	15	2.67	1.23
6	2.20	1.01	16	2.50	1.20
7	1.94	0.90	17	2.02	0.90
8	2.08	0.96	18	3.39	1.54
9	2.93	1.40	19	2.76	1.29
10	2.22	1.06	20	2.08	0.86

$\bar{x} \pm SD$: HbA_2 : $2.42 \pm 0.44\%$; δ : $1.12 \pm 0.22\%$

3. 变异链 β^E 、 δ 链的分离及 HbE 、 HbA_2 含量的测定 以纯化 HbF ($\alpha_2\gamma_2$) 及 HbA ($\alpha_2\beta_2$) 作对照, 提供 α 、 β 、 G_γ 和 A_γ 链的参考位置。经一

级结构分析证明的 HbE ($\alpha_2\beta_2^E$) 样品作为变异链 β^E 在电泳中的定位标准。由图 2 所示: 先证者溶血液中无正常 β 链存在, 变异链 β^E 与 α 链、 δ 与 G_γ 链均能有效分离, 且 δ 、 G_γ 及 A_γ 链含量增加。因此推论先证者溶血液中有 HbE ($\alpha_2\beta_2^E$)、 HbF ($\alpha_2\gamma_2$) 及 HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$), 而无 HbA ($\alpha_2\beta_2$), 确系 HbE/β^0 -地贫。除母亲及先证者外, 家系其他成员中既有正常 β 链又有变异链 β^E (表 2), 且无明显贫血, 则可诊断为 HbE 杂合子。先证者的母亲虽无 β^E 链(即无 HbE), 但有轻度贫血及 HbA_2 升高, 加上平均血红蛋白浓度及含量 (MCHC 及 MCH) 有所降低, 并结合先证者的表现型属 β^0 -地贫, 则母亲应属 β -地贫杂合子。

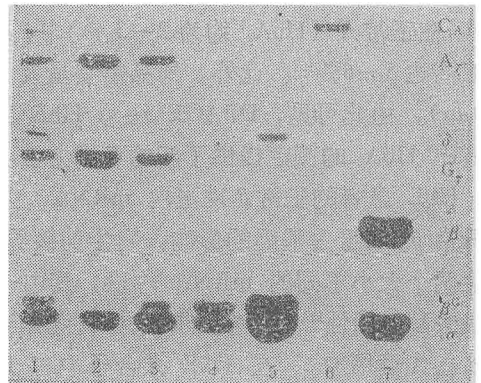


图 2 HbE/β^0 -地贫溶血液的 DPAGE 图谱

(1) HbE/β^0 -地贫复合杂合子(先证者) (2) 纯化 HbF (3) $\text{HbE} + \text{HbF}$ (4) 已知的 HbE (5) 纯化 $\text{HbE} + \text{HbA}_2$ (6) 碳酸酐酶 (CA) (7) 纯化 HbA

讨 论

自尿素、Triton 聚丙烯酰胺凝胶方法建立以来, 在地贫的产前诊断、珠蛋白链含量分析及新生儿 $\alpha\gamma/\alpha\gamma$ 比测定中已得到较广泛的应用^[7,8,11]。有人在原方法的基础上加以改进, 主要是加大电压, 缩短了电泳时间, 且能较好地分离 $\alpha\gamma$ 与 δ 链^[12]。但未见该法用于 HbE 变异链 β^E 与 α 链分离, 测定的报道。鉴于近年来对 HbE 及 HbA_2 的研究, 已证明它们的等电点 (pI) 分别为 7.603 和 7.607, 仅相差 0.004pH 单位^[4], 直接分离两者困难较多。由此, 本实验引

表2 HbE/ β^0 -地贫家系成员血液指数及 δ 和 β^E 链百分含量

样品	Hb%	MCH	MCHC	HbF(%)	HbA ₂ + HbE(%)	δ (%)	β^E (%)
父亲	14.3	24.0	26.3	2.1	27.35	2.24	13.75
母亲	10.1	18.5	25.2	1.9	5.16	2.48	
哥哥	11.1	22.1	26.6	3.9	25.39	2.23	14.96
先证者	4.5	16.7	24.7	22.1	59.19	3.64	29.14

入一大孔径聚丙烯酰胺凝胶及适当加大电压,改善了电泳系统的分辨率,使变异链 β^E 与 α 链、 δ 与 $G\gamma$ 链均得到分离。所测20例正常人溶血液 δ 链含量约等于DE52纤维素微量柱层析法所测HbA₂水平的一半,符合理论推算。在此基础上,以变异链 β^E 及 δ 链的相对百分含量乘以2即可求得HbE变异病人的HbE和HbA₂的含量。反相高压液相色谱对 δ 链的测定结果偏高,在正常人(HbA₂约为2—3%)中,其 δ 链值高达5—6%^[6]。此外,样品需要量大(约100 μ g)。由此可见,DPAGE法为HbE变异患者中HbA₂的测定提供了新的可靠方法。

HbE患者的正常 β 珠蛋白mRNA,由于受异常 β^E 珠蛋白基因的影响,发生剪接异常,产生两个大小不同的mRNA片段,其中一片断失去翻译活性^[43], β 链合成减少,变异链 β^E 及 δ 链代偿增加。在HbE杂合子中有HbA($\alpha_2\beta_2$)增高,也有HbE($\alpha_2\beta_2^E$)。而HbE/ β^0 地贫除上述异常外,其 β 珠蛋白基因本身还有异常,正常 β 链可完全没有表达如图2,从而激活 $\gamma \rightarrow$ 变异基因 β^E 转换通路, β^E 合成明显增加,

HbE就可高达50%以上,而且出生后几年内仍保持较高水平的HbF(22.1%)。另外,本方法能诊断和鉴别诊断纯HbA₂增高或 α^- 地贫合并HbE变异所致的低HbE^[44]。

参 考 文 献

- [1] Prozorova-Zamani, V. et al.: *Hemoglobin*, 1981, 5, 743.
- [2] Ou, C-N. et al.: *J. Chromato.*, 1983, 266, 197.
- [3] Basset, P.: *J. Chromato.*, 1982, 227, 267.
- [4] Bsisio, A. B. et al.: *J. Chromato.*, 1985, 330, 299.
- [5] Shelton, J. B. et al.: *J. Liquid. Chromato.*, 1984, 7, 1969.
- [6] Shroeder, W. A. et al.: *Hemoglobin*, 1986, 10, 253.
- [7] Alter, B. P. et al.: *Brit. J. Hemato.*, 1980, 44, 527.
- [8] Alter, B. P. et al.: *Hemoglobin*, 1981, 5, 357.
- [9] Huisman, T. H. J. et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, 1975, 86, 700.
- [10] 颜刚等:《生物化学杂志》,1988,(待发表)。
- [11] 朱芝芳等:《中国医学科学院学报》,1986,8,445。
- [12] 刘永明等:《江西医学院学报》,1987,27,14。
- [13] Bird, A. R. et al.: *Acta Hemato.*, 1984, 72, 135.
- [14] Sicard, D. et al.: *Human Genet.*, 1979, 50, 327.

[本文于1987年12月21日收到]

新书消息

《生物化学仪器指南》第一册《光谱仪器》简介

由郭尧君主编的《生物化学仪器指南》第一册《光谱仪器》于1988年8月由科学出版社出版。全书共分十章,包括紫外-可见-近红外分光光度计、荧光分光光度计、圆二色仪、红外分光光度计、激光喇曼光谱仪、原子吸收分光光度计、停流仪及快速反应动力学仪、时间分辨纳秒荧光计、流动式细胞光度计和显微分光光度计。书中分别介绍了每种仪器的简单原理、结构、种类、订货须知、安装要求、验收方法、附件配置以及应用范围。可供大专院校有关专业师生,科研单位和器材部门的工作人员,进出口公司的外贸工作人员参考。全书25.2万字。定价6.50元。如欲购买者可与本刊编辑部联系。外地请另寄邮费及包装费0.50元。