

研究工作

Hb D Punjab 基因的鉴定 ——DNA 扩增在异常血红蛋白研究中的应用

曾溢滔 黄淑帧 周霞娣 朱 皓 陈美珏

(上海市儿童医院医学遗传研究室)

李厚钧 李惠武 李 力 赵贤宁 邢发理 常 莉

(兰州军区乌鲁木齐总医院医学遗传室)

焦春堂 唐治贵 陈崇远

(重庆市第二人民医院)

提 要

本文应用作者设计的寡核苷酸引物和探针,通过聚合酶链反应(PCR)扩增 β 珠蛋白 DNA 序列,并通过限制酶 EcoRI 酶谱分析或寡核苷酸杂交,快速鉴定 Hb D Punjab 基因。应用这种技术先后对汉、藏、哈萨克等 3 个民族 4 个家系的 Hb D Punjab 基因进行了鉴定。

关键词 血红蛋白,基因,聚合酶链反应,限制性内切酶

血红蛋白 D 旁遮普(Hb D Punjab)是一种血红蛋白 β 链变型($\beta_{121}[\text{GH4}]\text{Glu} \rightarrow \text{Gln}$),最先发现于美国洛杉矶一白人家庭中^[1]。以后在世界许多地区相继发现了这种血红蛋白,以印度西北部的旁遮普邦发生率最高(1.41%),因此称为血红蛋白 D Punjab。我国以新疆地区最常见。占当地异常血红蛋白总数的 55.6%^[2]。

Hb D Punjab 的鉴定可以通过血红蛋白化学结构分析^[1,3]或基因图谱分析^[4],但操作比较复杂而且费时。本文报道应用作者自己设计的寡核苷酸引物,通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction,简称 PCR)进行 DNA 序列的体外扩增,快速鉴定 Hb D Punjab 基因。

材 料 和 方 法

4 例 Hb D Punjab 携带者异常血红蛋白均

经化学结构分析或基因图谱分析鉴定^[2,4]。其中 1 例来自重庆,汉族;3 例来自新疆,分别为汉、藏和哈萨克族。2 例正常对照分别为汉族和哈萨克族。

DNA 的 PCR 扩增按前文^[5]方法进行。用于扩增目的 DNA 的寡核苷酸引物 D₁ 和 D₂ 的序列分别为:5'-AACGTGCTGGTCTGTGTGCT-3' 和 5'-AAATTGGACAGCAAGAAAGC-3'。目的 DNA 的扩增在 100 μ l 反应混合物中进行,内含:1 μ g 基因组 DNA,67 mmol/L Tris·HCl (pH8.8),6.7 mmol/L MgCl₂,6.7 μ mol/L EDTA,16.6 mmol/L (NH₄)₂SO₄,10 mmol/L 巯基乙醇,10% 二甲亚砜,每对引物(α_1 和 α_2 , β_1 和 β_2) 0.1 μ mol/L,每种 dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP) 1.5 mmol/L。PCR 反应混合物在 95 $^{\circ}$ C 水浴中加热 7 min 使

DNA 变性后,置 45°C 水浴孵育 30 sec 使引物与目的序列退火,然后加入 2 单位 Taq DNA 聚合酶,置 63°C 中 1.5min,使引物延伸,完成第一个 DNA 合成周期。以后的反应周期按照 90°C 30 sec (变性),45°C 30 sec (退火),63°C 1.5 min (延伸)。循此进行 30 个周期,在第 15 周期追加 Taq DNA 聚合酶 2 单位。反应在最后一次 63°C 引物延伸后终止,置冰箱中保存。

扩增 DNA 的限制酶酶谱分析按照前文^[5]方法。扩增产物经限制性内切酶 Eco RI 消化后,作 3% 的 NuSieve 琼脂糖凝胶电泳分析。

扩增 DNA 的寡核苷酸杂交按先前介绍的方法^[6]。用作杂交的正常(N)和突变(M)寡核苷酸探针的序列分别为 5'-GGGTGAATTC TTTGCCAAA-3' 和 5'-TTTGGCAAACAATT CACCC-3'。

结 果

用引物 D₁ 和 D₂ 引导扩增的正常人和 Hb D Punjab 病人扩增 DNA 在 2% 琼脂糖凝胶电泳上均呈单一的 144 bp DNA 区带。

正常对照的扩增 DNA 经限制酶 Eco RI

消化后,其 144 bp 序列被消化生成 104 bp 和 40bp 二个片段(图 1); Hb D Punjab 携带者的扩增 DNA 经 Eco RI 消化后,只有一半量被切成 104 bp 和 40 bp 片段,另一半不被 Eco RI 酶切而仍为 144 bp 片段(图 1)。

用 ³²P 标记 5' 端的寡核苷酸探针进行杂交, Hb D Punjab 携带者的扩增 DNA 既能和 Hb D Punjab 突变的探针(M)杂交,也能和正常的探针(N)杂交;而正常对照的扩增 DNA 只能和正常的探针(N)杂交,而不能和突变的探针(M)杂交(图 2)。

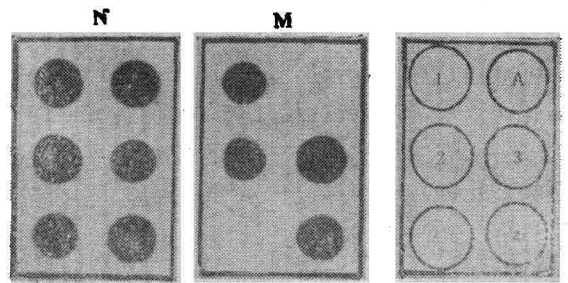


图 2 PCR 扩增 DNA 的寡核苷酸杂交分析
Fig. 2 Oligonucleotide hybridization of the amplified DNA

N: normal probe M: mutant probe
1-4: amplified DNA from 4 cases of Hb D-Punjab carriers
A: normal control sample

讨 论

本文作者设计的 DNA 扩增引物 D₁ 和 D₂ 分别相应于 β 珠蛋白基因的第 1355—1374 位和第 1498—1479 位的核苷酸序列。这组引物能特异地扩增 β 珠蛋白基因第 3 个外显子的大部分及其 3' 端共 144 bp 的 DNA 序列(图 3), 包含 β 珠蛋白基因的第 121 个密码子。

正常人 β 珠蛋白链第 121 位和 122 位的氨基酸是谷氨酸和苯丙氨酸,由这二个密码子构成的序列为 GAA TTC,这恰好是内切酶 Eco RI 的识别序列,因此由引物 D₁ 和 D₂ 引导扩增的正常的 144 bp DNA 序列,经 Eco RI 消化后便生成 40bp 和 104bp 二个片段(图 3)。在琼脂糖凝胶电泳上分离为二条区带(图 1)。Hb D

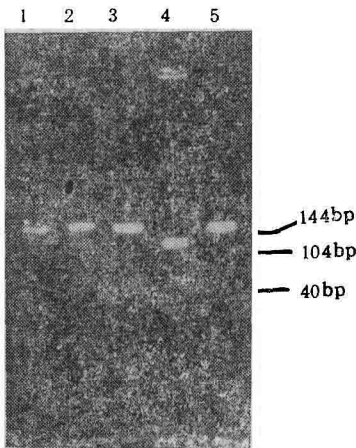


图 1 Eco RI 消化的扩增 DNA 的 NuSieve 凝胶电泳
Fig. 1 NuSieve agarose gel electrophoresis of amplified DNA after Eco RI digestion

1, 5: normal amplified DNA without Eco RI digestion 3: the amplified DNA from a Hb D-Punjab carrier without Eco RI digestion 2, 4: Hb D-Punjab carrier and normal amplified DNA respectively, after Eco RI digestion

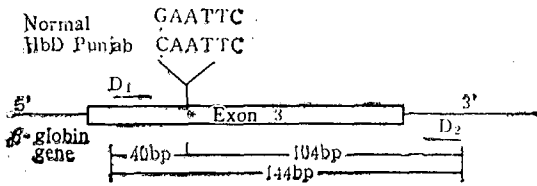


图3 用引物 D₁ 和 D₂ 扩增的 144bp DNA 片段模式图
Fig. 3 Schematic representation of 144bp DNA fragment amplified with primers D₁ and D₂

The amplified DNA spans the greater part of exo 3 and the 3' intronic sequence of the β -globin gene. (*) indicates the Eco RI recognition site

Punjab 的 β 链第 121 位的谷氨酸替换为谷氨酰胺 (β_{121} [GH 4] Glu \rightarrow Gln), 其 β 珠蛋白基因的第 121 位密码子的碱基从 GAA 变为 CAA (β_{121} GAA \rightarrow CAA)。这就改变了内切酶 Eco RI 的识别序列。因此, 扩增生成的 DNA 序列就不被 Eco RI 消化而仍为 144 bp 片段。图 1 示明 Hb D Punjab 病人的扩增 DNA 经 Eco RI 消化后, 有一半量的 DNA 不被 Eco RI 酶切而仍为 144 bp, 表明他们是 Hb D Punjab 基因携带者, 这和基因图谱分析结果^[4]相符合。

β 链第 121 位氨基酸发生替代生成的异常血红蛋白除 Hb D Punjab 外, 还有 Hb O Arab (β_{121} [GH4] Glu \rightarrow Lys)^[7] 和 Hb Beograd (β_{121} [GH 4] Glu \rightarrow Val)^[8]。它们和 Hb D Punjab 一样都丢失了相同的 Eco RI 切点, 因此用引物 D₁ 和 D₂ 扩增生成的 144 bp DNA 序列同样不能被 Eco RI 消化。为了鉴别 Hb D Punjab 基因, 我们进一步用相应于正常和 Hb D Punjab 突变 DNA 序列的寡核苷酸作探针与扩增的 DNA 进行杂交, 结果病人的扩增

DNA 能同时与正常和突变的寡核苷酸探针杂交, 证明病人是 Hb D Punjab 基因的携带者。

关于 Hb D Punjab 的起源问题一直吸引人们的兴趣, 并提出了不同的假说: 英国学者 Lehmann^[9] 提出 Hb D Punjab 起源于蒙古族的假说, 而李厚钧^[2] 则认为 Hb D Punjab 基因不是起源于蒙古族, 而可能源于中亚地区。要弄清 Hb D Punjab 基因的起源及其漂移和分布, 了解各民族间的关系, 特别是我国西北地区和印度次大陆及中亚、南亚人群之间的关系, 还需要对 Hb D Punjab 进行更大规模的筛查和鉴定。

应用 PCR 扩增 DNA 技术可使目的 DNA 序列在 1.5 小时内扩增几百万倍, 因此 0.1 μ g 的基因组 DNA 便足够分析, 大大提高了 DNA 诊断的灵敏度。通过扩增 DNA 的 Eco RI 消化产物电泳分析来检测 Hb D Punjab, 可以在 5 小时内完成。如果采用干血纸片 DNA 分析^[9], 更大大简化标本的采集和运送, 有利于大规模的筛查和鉴定, 以弄清 Hb D Punjab 的起源、漂移和民族迁移的关系。

参 考 文 献

- 1 Baglioni C. *Biochim Biophys Acta*, 1962; 59: 437
- 2 李厚钧等. 遗传学报, 1987; 14: 225
- 3 梁植权等. 遗传学报, 1982; 9: 228
- 4 Zeng Y T et al. *Hemoglobin*, 1986; 10: 87
- 5 黄淑顿等. 上海医学, 1988; 11: 559
- 6 黄淑顿等. 遗传学报, 1989; 6: 475
- 7 Baglioni C, Lehmann H. *Nature*, 1962; 196: 229
- 8 Efremov C D et al. *Biochim Biophys Acta*, 1973; 328: 81
- 9 Lehmann H, Huntsman R G. *Man's haemoglobins*. North-Holland: Amsterdam, 1974: 310

[本文于 1988 年 11 月 2 日收到]

IDENTIFICATION OF Hb D-PUNJAB: AN APPLICATION OF DNA AMPLIFICATION ON STUDY OF ABNORMAL HEMOGLOBINS

Zeng Yitao Huang Shuzhen Zhou Xiadi Zhu Hao Chen Meijue
(Laboratory of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital)

Li Houjun Li Huiwu Li Li Zhao Xianning Xing Fali Chang Li
(Ulumuqi Military General Hospital)

Jiao Chuntang Tang Zhigui Chen Congyuan
(Chongqing Second People's Hospital)

ABSTRACT

Hemoglobin D-Punjab is a common Hb variant in China. This paper describes a new way—Eco RI mapping of the amplified β -globin DNA, for identification of Hb D-Punjab gene. The primers for PCR were designed and synthesized to enzymatically amplify an 144bp fragment which contained an Eco RI recognition site. So the D-Punjab gene could be easily detected by Eco RI digestion of the amplified sequences on agarose gel electrophoresis owing to a single base change on codon 121. Four Hb DPunjab families from Han, Tibet and Kasak nationalities were analysed by this simple method. The results were also confirmed by oligonucleotide hybridization technique.

Key words hemoglobin, gene, polymerase chain reaction, restriction endonuclease

科技消息

一种快速、简便纯化 DNA 的新方法——介绍 GeneClean kit

DNA 的传统纯化方法无非是苯酚抽提,乙醇沉淀以及用 RNaseA 除去小分子的 RNA。这些方法不足之处是操作复杂、耗时,有时不得不使用低熔点的琼脂糖凝胶。近来,国外许多分子生物学实验室都用美国加利福尼亚一个生物制品公司生产的“GeneClean” kit。此 kit 能快速从普通琼脂糖凝胶中得到高纯度的 DNA,并具有脱盐,除去小分子 RNA 和蛋白质等许多优点。对于在 DNA 样品中残留的有机溶剂如:苯酚、氯仿、乙醚有特殊的效果,特别适于小片断质粒 DNA 的制备(mini preparation)、缺口平移、末端标记等,可去除没有结合的核苷酸,它可以在 20 分钟之内完成全部过程。一个完整的 kit 可纯化 100—200 个 DNA 样品,对于分子生物学工作者是一种非常有用的 kit。

下面简单介绍具体用法:

在紫外长波长下切下琼脂糖电泳后的 DNA 条带,加 2 到 3 个体积的 NaI 溶液,45°C—55°C 水浴 5 分钟,可以观察到琼脂糖溶解的过程。如果 DNA 并不在琼脂糖胶中,直接加 2—3 倍体积的 NaI 溶液,室温 5 分钟,然后加一种叫“Glassmilk”的白色悬浊液,一般加 5 μ l 的“Glassmilk”可纯化溶液中大约含有 5 μ g 或者少于 5 μ g 的 DNA,混匀后放进冰中保持 5 分钟,在 Eppendorf 离心机中离心 5 秒钟,弃去上清,白色的沉淀用“New wash”(一种洗 Glassmilk 的溶液),洗 3 次,一般用 200—1000 μ l 是足够的了。最后加 30—50 μ l Tris-EDTA 缓冲液 pH8.0,悬浮白色沉淀,45°C—55°C 5 分钟,离心 30 秒钟,小心地取出上清液,大约 80% 以上的 DNA 能被洗脱出来。

【乌鲁木齐市中国科学院新疆化学所,郭晓慧】