

转铁蛋白分型及其基因频率分布

郭尧君 李辛晖

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

朱海珍¹⁾ 沈子威

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 用固相 pH 梯度 (pH 5.05~ 5.60) 等电聚焦技术对随机抽取的 188 名北京地区健康汉族人的血清转铁蛋白 (Tf) 进行分型调查, 并统计基因频率, 检出了在中国还未见报道的 Tf^{C3} 基因. 其表型分别是: Tf^{C1} , Tf^{C2} , Tf^{C1C2} , Tf^{C1C3} , Tf^{C1Dchi} , Tf^{C2Dchi} . $Tf^{C1} = 0.7420$, $Tf^{C2} = 0.2420$, $Tf^{C3} = 0.0027$, $Tf^{Dchi} = 0.0133$, 符合 Hardy-Weinberg 定律, 并与其他已见报道的汉族 Tf 基因频率大致相符.

关键词 转铁蛋白, 基因频率, 固相 pH 梯度等电聚焦

转铁蛋白 (transferrin, Tf) 又称为铁传递蛋白, 是一类能结合并运输铁的糖蛋白, 广泛分布于脊椎动物的细胞与体液中. 在 Tf 的 N 端与 C 端各有一个金属离子结合部位, 其主要功能是将肠道吸收的铁与血红蛋白分解的铁运至需铁或贮铁细胞. Tf 还有抗感染能力, 可与细菌竞争铁原子, 抑制其生长与繁殖. Tf 又是一种具有高度遗传多态性的蛋白质, 在个人识别与亲子鉴定中具有重要意义. 1957 年, Smithies^[1]应用淀粉凝胶电泳首次发现了 Tf 的遗传多态性 Tf^B , Tf^C 和 Tf^D , 由三个共显性基因 Tf^B , Tf^C 和 Tf^D 决定. 1964 年, Kirk 等发现了 Tf^{Dchi} . 借助聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦技术, Kuhl^[2]于 1978 年发现 Tf 的杂和性主要存在于 Tf^C 型中, 并将其进一步分为 Tf^{C1} , Tf^{C2} 和 Tf^{C1C2} , 由两个等位基因 Tf^{C1} 与 Tf^{C2} 决定. 1979 年, 他们又发现了 Tf^{C3} 基因^[3]. 此后, 新的基因 (Tf^{C4} , Tf^{C5} 等) 不断被发现^[4].

近年来, 国内的一些学者曾用传统的载体两性电解质等电聚焦技术 (CA IEF) 对不同地区的人群做过 Tf 基因频率的调查^[5-7], 采用的范围都是 pH 5~ 7, 但只检出了常见的 Tf^{C1} 与 Tf^{C2} 两种表现型. 1982 年, Bjellquist 等^[8]建立了固相 pH 梯度等电聚焦技术 (IPG IEF). 由于在制胶时就形成了 pH 梯度, 所以

pH 梯度在电泳过程中保持稳定, 克服了阴极漂移且导电性好、缓冲能力强、分辨率高, 受样品中盐离子浓度影响小, 明显优于传统的等电聚焦. 郭尧君等^[9]于 1994 年在国内介绍了该技术, 并成功地将其应用于人血清 Gc 蛋白亚型的分析^[10], pH 范围 4.4~ 5.4, 分离距离为 12.5 cm. 用固相 pH 梯度等电聚焦技术对血清 Tf 蛋白亚型进行分型研究, 国内还未见报道. 在此基础上, 本实验分析 Tf 蛋白亚型时采用了大小相同但更窄的 pH 范围 5.05~ 5.60, 进一步提高了分辨率.

1 材料与方法

1.1 样品

随机抽取 188 名无亲缘关系的北京地区健康汉族人不抗凝全血, 分离血清-20℃保存.

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器: 瑞典 Pharmacia Biotech 公司 2117 Multiphor II 电泳系统及梯度凝胶灌胶附件.

1.2.2 试剂: PrePAGmix (29.1% 丙烯酰胺/0.9% 甲叉双丙烯酰胺) 和 Immobiline pK 3.6, pK 4.6, pK 6.2, pK 9.3 (1989 年过期) 均由 Pharmacia LKB 公司赠送. 固定液: 20%

¹⁾ 清华大学生物科学与技术系 91 级学生.

收稿日期: 1996-11-04, 修回日期: 1997-02-25

TCA; 脱色液: 乙醇: 冰乙酸: 水= 4. 5: 1: 4. 5; 染色液: 0. 1% 考马斯亮蓝 R250 于脱色液中; 保存液: 8. 7% 甘油于脱色液中.

1. 3 制胶

参照郭尧君^[10]的方法用梯度凝胶灌胶模具灌制 $T=5\%$, $C=3\%$, pH 5. 05~ 5. 60 的 125 mm × 260 mm × 0. 5 mm 凝胶, 洗胶方法改为: 双蒸水洗胶 6 次, 每次 10 min.

表 1 pH 5. 05~ 5. 60 固相 pH 梯度凝胶配方			
	重液 pH 5. 05	轻液 pH 5. 60	
Immobiline pK 3. 6	111. 18 μl	39. 24 μl	
pK 4. 6	517. 80 μl	517. 80 μl	
pK 6. 2	517. 80 μl	517. 80 μl	
pK 9. 3	22. 32 μl	104. 16 μl	
丙烯酰胺/ 甲叉双丙烯酰胺	1. 5 ml	1. 5 ml	
87% 甘油	2. 5 ml	—	
双蒸水	3. 83 ml	6. 32 ml	
TEMED	7 μl	7 μl	
40% 过硫酸铵	10 μl	10 μl	

1. 4 等电聚焦

取血清与 0. 001 mol/ L FeCl₃ 按 10: 3 比例混合, 在 37 ℃ 保温 2 h. 用双蒸水稀释 2 倍, 距阴极 1. 5 cm 处直接滴加 5 μl 样品于胶面. 电极条用双蒸水浸湿. 循环水温 10 ℃, 电极间距 11. 5 cm. 电泳参数见表 2. 电泳 1 结束后, 移近电极, 使间距为 4 cm.

表 2 电泳参数				
	电压/ V	电流/ mA	功率/ W	时间/ h
预电泳	500	5	5	1. 5
电泳 1	3500	8	10	13. 5
2	3500	8	10	3. 0

1. 5 染色与判型

室温固定 0. 5 h, 60 ℃ 染色 4 min. 室温脱色 3 次, 每次 0. 5 h, 第 4 次脱色过夜. 保存液中浸泡 0. 5 h. 用玻璃纸覆盖, 凉干. 并按 Kuhl 法^[3]对 Tf 谱带分型.

2 结 果

Tf 判型结果及基因频率分布分别见图 1 与表 3. 经 Hardy-Weinberg 吻合度检验, 观察值与期望值无显著差异. $df=2$, $0. 5<P<0. 75$. 将所得结果与其他地区群体调查结果相比较列于表 4.

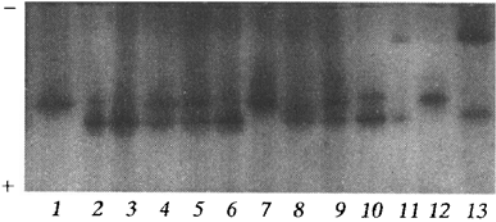


图 1 pH 5. 05~ 5. 60 的 Tf 蛋白 IPG IEF 图谱
1, 7, 12: TfC₂; 2, 3, 6: TfC₁; 4, 5, 9, 10: TfC₁C₂; 8: TfC₁C₃; 11, 13: TfC₁Dchi.

表 3 北京地区部分汉族人 Tf 亚型及基因频率分布						
表型	个数	观察频率	期望频率	期望值	χ^2	基因频率
C1	101	0. 5372	0. 5510	103. 59	0. 0624	Tf ^{C1} = 0. 7420
C2	9	0. 0479	0. 0590	11. 09	0. 4534	Tf ^{C2} = 0. 2420
C1C3	1	0. 0053	0. 0040	0. 75	0. 0625	Tf ^{C3} = 0. 0027
C1Dchi	4	0. 0213	0. 0200	3. 76	0. 0225	Tf ^{Dchi} = 0. 0133
C2Dchi	1	0. 0053	0. 0065	1. 22	0. 0400	
C1C2	72	0. 3830	0. 3595	67. 59	0. 2775	
总计	188	1	1	188	0. 9183	

表 4 不同群体 Tf 亚型基因频率分布比较

地区	数目	Tf ^{C1}	Tf ^{C2}	Tf ^{C3}	Tf ^{Dchi}	其他	文献
北京	188	0.7420	0.2420	0.0027	0.0133	—	
成都	461	0.7418	0.2310	—	0.0260	0.0010	[5]
广东	258	0.7539	0.2112	—	0.0217	0.0078	[6]
日本	800	0.7463	0.2444	—	0.0063	0.0030	[11]
泰国	60	0.7000	0.2833	—	0.0083	0.0083	[12]
美国 (白人)	947	0.7750	0.1630	0.0560	—	0.0060	[13]
(黑人)	194	0.8420	0.1190	0.0080	—	0.0310	[13]
(印地安人)	398	0.8390	0.0540	0.0060	—	0.1010	[13]
德国	1108	0.7872	0.1365	0.0675	—	0.0088	[14]
意大利	858	0.7640	0.1783	0.0530	—	0.0047	[15]

3 讨 论

Tf 基因由两部分构成，分别与 Tf 蛋白的两个结构域相对应，由一个编码单结构域蛋白的结构基因在进化过程中重复融合而形成。Tf 基因序列中单个核苷酸突变会导致某个氨基酸被取代，从而引起各种表型差异。如 TfC 的 277 位 Asp 被 Gly 取代后成为 Tfd1，TfC 的 300 位 His 被 Arg 取代后成为 Tfdchi。糖组分的变异可能导致 Tf 的结构变异^[11]。Tf 常以三种状态存在：Fe₂Tf (结合两个铁原子)，Fe₁Tf (结合一个铁原子)，apoTf (未结合铁原子)，它们的等电点分别在 5.0~ 5.2，5.4 ~ 5.6，5.9~ 6.5 之间^[3, 4, 16]。采用 FeCl₃ 处理后，Fe₁Tf 的含量明显增加，并在电泳过程中保持稳定，电泳带型最为清晰。而 apoTf 与 Fe₂Tf 含量较少，且 Fe₂Tf 在向等电点迁移过程中逐渐丢失所结合的第二个铁原子，染色后仅给出较弱的带。我们采用 pH 5.05~ 5.60 的 IPG IEF 技术，电泳后 Fe₁Tf 出现在 pH 5.4 附近，染色后谱带清晰。在 IPG IEF 中，由于灌胶时即形成 pH 梯度，因此胶灌得是否成功直接影响 Tf 的电泳行为。本实验检出的 TfC1C3 型在三次重复实验中均表现出同样的结果，同时重复的其他样本也依然表现出相同表型，由此证明这个 TfC1C3 型确实存

在。

琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳仅能给出 Tfb, Tfc 和 Tfd 等普通表型。IPG IEF 分辨率可达 0.001pH，电泳谱带清晰，重复性好，可检出 Tf 的多种亚型。C1 与 C3 带仅相距约 0.015pH，只有这样高分辨率的电泳才能将它们清晰的分开。本实验采用的凝胶分离距离为 12.5 cm，pH 范围 5.05~ 5.60，达到了 0.044 pH/cm，故能检出 Tf^{C3}。

由表 4 可见 Tf^C 基因普遍存在于各群体中，且其基因频率在大多数群体中高于 0.95。其中，Tf^{C1} 频率最高，约大于 0.7；Tf^{C3} 频率较低，均小于 0.1。亚洲人的 Tf^{C2} 基因频率较高，大于 0.2；而 Tf^{C3} 一般被认为是具有欧洲血统人的特有标记，在亚洲人中极其少见，过去仅在印度人中有过报道^[8]。谭明等^[5] 曾经报道过的 Tf^{C4} 基因没有被检出，但其在美洲印第安人中分布较典型。本实验检出 5 个含有 Tf^{Dchi} 基因的个体，Tfdchi 是亚洲人中最常见的基因变异体，尚未在其他人群中发现。可见 Tf 基因分布有明显种族与地理差异。

参 考 文 献

1

Smithes O. Variation in human serum β-globulins. Nature, 1957, **180**: 1482~ 1483

2

Kuhnl P, Spielmann W. Transferrin: Evidence for two common subtypes of the Tf^C allele. Hum Genet, 1978, **43**: 91~ 95

3 Kuhn P, Spielmann W. A third common allele in the transferrin system, Tf^{C3}, detected by isoelectric focusing. *Hum Genet*, 1979, **50**: 193~ 198

4 Constans J, Kuhn P, Viau M *et al.* A new procedure for the determination of Tf^C subtypes by isoelectric focusing. *Hum Genet*, 1980, **55**: 111~ 114

5 谭明, 吴梅筠. 成都地区汉族群体 Tf 亚型基因频率的调查. *遗传与疾病*, 1988, **5**: 233~ 235

6 郭大伟, 郭景元. 广东地区人群血清转铁蛋白遗传多态现象及其法医学应用 初步探讨. *法医学杂志*, 1989, **5**: 1~ 3

7 喻忠义, 黄力力, 许博博等. 血痕 Tf 亚型检测及北京地区基因频率分布调查. *中国法医学杂志*, 1993, **8**: 77 ~ 79

8 Bjellqvist B, EK K, Righetti P G *et al.* Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, 1982, **6**: 317~ 319

9 郭尧君, 郭强. 目前最高分辨率的电泳——固相 pH 梯度等电聚焦. *生物化学与生物物理进展*, 1994, **21**: 143~ 146

10 郭尧君, 郭强, 黄力力等. 用固相 pH 梯度等电聚焦分析 Gc 蛋白亚型. *生物化学与生物物理进展*, 1994, **21**: 356~ 359

11 Yuasa I, Saneshige Y, Suenaga K *et al.* Transferrin variants in Japan and New Zealand. *Hum Hered*, 1987, **37**: 20~ 25

12 Kamboh M I, Kirk R L. Distribution of transferrin subtypes in Asian, Pacific and Australian Aboriginal Populations. *Hum Hered*, 1983, **33**: 237~ 243

13 Dykes D D, Defurio C M, Polesky H F. Transferrin subtypes in US Amerindians, Whites and Blacks using thirlayer agarose gels. *Electrophoresis*, 1982, **3**: 162~ 164

14 Weidinger S, Cleve H, Schwarzfischer F *et al.* Transferrin subtypes and variants in Germany. *Hum Genet*, 1984, **66**: 356~ 360

15 Pascali V L, Ranalletta D, Auconi P. Improved typing of

human serum transferrin by isoelectric focusing. *Hum Genet*, 1982, **61**: 39~ 41

16 Gorg A, Weser J, Westermeier R *et al.* Isoelectric focusing with immobilized pH gradients for the analysis of transferrin subtypes and variants. *Hum Genet*, 1983, **64**: 222~ 226

Subtyping of Transferrin and Distribution of Gene Frequencies. GUO Yaojun, LI Xinhui (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*); ZHU Haizhen, SHEN Ziwei (*Department of Biological Sciences and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China*).

Abstract Six phenotypes TfC1, TfC2, TfC1C2, TfC1C3, TfC1Dchi and TfC2Dchi were detected by isoelectric focusing with immobilized pH gradients in pH 5.05~ 5.60. Tf^{C3} has never been revealed in the Han population before. The Gene frequencies are as follows: Tf^{C1}= 0.7420, Tf^{C2}= 0.2420, Tf^{C3}= 0.0027, Tf^{Dchi}= 0.0133. There is a good agreement between the observed and expected values corresponding to the Hardy-Weinberg equilibrium. The allele frequencies for Tf^{C1}, Tf^{C2} and Tf^{Dchi} are quite similar to those previously reported.

Key words transferrin, gene frequencies, immobilized pH gradients isoelectric focusing

产朊假丝酵母细胞壁 33 ku 蛋白的功能研究*

张西平 张楚瑜 王鄂生
(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要 通过胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶对产朊假丝酵母 *Candida utilis* 细胞壁的酶解, 发现一种分子质量为 33 ku 的酵母细胞壁主要结构蛋白. 研究显示, 在细胞壁上这种蛋白质与细胞壁绝大多数蛋白质成分不同, 它不被胰蛋白酶水解, 但对枯草杆菌蛋白酶的作用敏感. 33 ku 蛋白存在于酵母菌整个对数生长期的细胞壁中, 特别是在对数早期细胞壁中, 它是唯一的对胰蛋白酶作用不敏感的蛋白质成分. 实验证明, 该蛋白质对维系酵母细胞壁骨架成分葡聚糖的相互连接和细胞壁的完整结构, 具有重要作用, 是一种重要的酵母细胞壁嵌合蛋白.

关键词 产朊假丝酵母, 细胞壁蛋白质, 蛋白酶酶解

* 国家自然科学基金资助项目 (39500074). 收稿日期: 1996-12-17, 修回日期: 1997-03-02