

· 实验研究 ·

中国人G6PD基因EcoR I 酶切位点研究*

许卫明 杜传书

(医学遗传学教研室)

提要 应用 DNA Southern 印迹杂交技术, 以 G6PD cDNA 为探针, 研究了 16 种限制酶的限制性片段长度多态, 结果表明除 EcoR I 外, 其余 15 种限制酶均无多态改变, 分析 39 例正常人与 38 例 G6PD 缺乏者 G6PD 基因 EcoR I 酶切位点时, 发现约 20% 的人出现 7.0 kb 的片段, 1 例 G6PD 患者出现 6.0 kb 片段, 国外并无类似报道, 并对这些片段来源及意义进行初步探讨。

关键词 葡萄糖 6 磷酸脱氢酶基因; 限制酶 EcoR I; DNA 琼脂糖电泳; 印迹杂交; 限制性片段长度多态

中图分类号 Q343; Q55

葡萄糖 6 磷酸脱氢酶 (简称 G 6 PD) 是红细胞戊糖旁路代谢的限速酶, 此酶缺乏在临床上与药物性溶血、新生儿黄疸、蚕豆病及慢性非球形细胞溶血性贫血密切相关。不同民族的发病率和基因频率差别较大, 许延康等对我国 7 个省 (自治区) 9 个民族的调查表明该病发病率在我国地理分布上呈南高北低趋势, 除回族外, 汉、苗、壮、傣、瑶、布依、京、黎等民族发病都是较高的。在这些人群中, 杜传书等至今鉴定中国人 G 6 PD 变异型共有 35 种^[1,2], 归属于至少 6 种以上 G 6 PD 基因点突变, 表明不同生化变异型可以有相同的点突变^[3,4]。1988 年 D'Urso^[5] 等报告 G 6 PD 基因 18 种限制酶的限制性片段长度多态 (RFLP), 发现仅 20% 的尼日利亚人无 Pst I 切点, 其余酶均无多态性。1988 年, 我们从国内引进含 G 6 PD 全长 cDNA 的质粒 PGD-T-5B 为探针, 对中国人 G 6 PD 基因 RFLP 进行研究, 包括 BamH I, Bgl II, BstE I, EcoR I, EcoR V, Hae III, Hind III, Hinf I, Kpn I, Msp I, Pst I; Pvu II, Rsa I, Taq I, Xba I, Xho I, 除 EcoR I 外, 其余的酶都未发现多态改变, 现将结果报告如下。

材料与方 法

对象 正常组 39 例, 经我室常规检查排除 G 6 PD 缺乏和地中海贫血, 病人组 38 例, 均为我室确诊 G 6 PD 缺乏, 按 WHO 推荐方法作变异型鉴定。

材料 正常组抽取 5 ml 静脉血, 肝素抗凝, 低渗全溶法提取外周血 DNA, 病人组抽取 10 ml 静脉血, 生理盐水洗涤后, 表层白细胞用于提取 DNA, 下层红细胞溶血后纯化酶蛋白作变异型鉴定。

方 法

1. 变异型鉴定 以 WHO 推荐方法对 G 6 PD 缺乏者, 分别测定下列指标: 酶活性, 电泳迁移率; 脱氧葡萄糖 6 磷酸钠盐利用率, 脱氨基辅酶 I 利用率, 半乳糖 6 磷酸利用率, 热稳定性, 葡萄糖 6 磷酸 (G 6 P) 米氏常数。

2. DNA Southern 印迹杂交 取 DNA 8 μg, 30 单位 EcoR I 酶解过夜, 置 0.8% 琼脂糖电泳分离, Southern 转移到硝酸纤维素膜。

3. 探针制备和分子杂交 含 G6PD cDNA 的重组质粒 PGD-T-5 B 由英国 Luzzatto 教授赠送, 重组质粒转化到 HB101 受体菌, 筛选, 扩增后提取质粒 DNA, cDNA 用 EcoR I 酶解, 电泳分离后透析袋回收, 用随机引物标记探针。杂交条件: 10% 硫酸葡聚糖, 5×SSC, 5×

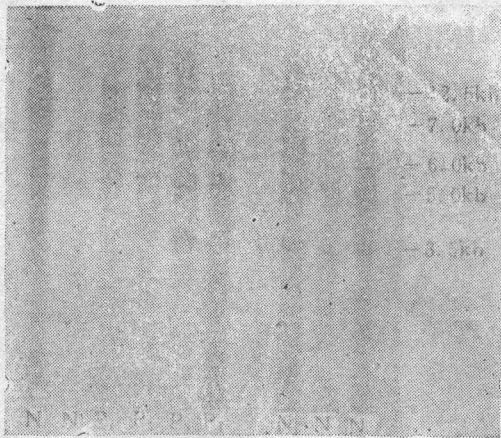
* 国家自然科学基金资助项目

Denhardt溶液, 50 μ g/ml鲑鱼精 DNA, 50%甲酰胺, 探针量为 2×10^7 cpm/ml, 42 $^{\circ}$ C 杂交18 h, 洗膜条件: $2 \times$ SSC, 0.1% SDS 30 min \times 2次, $0.1 \times$ SSC, 0.1% SDS 45 min \times 2次 (55 $^{\circ}$ C), 放射自显影。

结果与讨论

G6PD cDNA/EcoR I 杂交图谱

基因组DNA经 EcoR I 酶切后, 用G6PD cDNA杂交, 分别产生12.5kb, 5.0kb, 3.5kb 3个片段, 其中12.5kb包含外显子1和2, 5.0kb包含外显子7至13, 3.5kb包含外显子3至6。实验中我们观察到不管是正常人组还是病人组, 除了有12.5、5.0和3.5kb片段, 有部份标本出现7.0kb这一新片段, 在正常人占12.8%, 在病人组中占28.9%, 合计占20.7%, 值得注意的是有1例病人则出现6.0kb片段(附图)。



附图 G6PD cDNA/EcoR I 杂交图
N代表正常人, P代表G6PD缺乏症患者

G6PD 基因 RFLP 改变

目前资料表明G6PD基因位点很多的限制性内切酶不具有多态改变, 仅有极少数的酶在一些民族中可能出现切点的变化, 这些切点改变往往与基因突变密切相关。例如, 第1116位密码子的同义突变导致22%尼日利亚人外显子5的 Pst I 切点消失, Vulliamy^[6]报道 G6PD Ilesha第466位密码子的错义突变导致Hinf I 酶切时出现一1.6kb的新片段, Yoshida^[7]发现第

376位密码子突变使G6PD A(+)多一个Fok I 切点。我们的结果与国外报道相似, 所研究的大部份限制酶并无多态改变。然而, 在研究 EcoR I 多态时, 发现所研究的群体, 有部份人出现7.0kb, 且频率较高, 这一现象国外无类似报道。目前仍不清楚这一片段的来源, 推测可能有以下原因: ①Martini等(1986)在研究G6PD基因结构时, 发现在G6PD基因下游约40kb处有一“Gdx”基因。该基因曾被Persico等(1981)误认为是G6PD基因, 它不仅与G6PD基因呈连锁关系, 而且部份序列与G6PD mRNA 3'端同源, 所以此片段可能源于Gdx基因^[8,9]。②中国人群中G6PD基因可能存在一些同义突变, 造成酶切位点增加或消失。杜传书近来报道中国人至少有6种以上点突变存在^[4,10,11], 有别于国外报道, 其中C3突变是导致多态的中性突变, 表明点突变不一定造成氨基酸改变, 因此需进一步阐明基因突变与酶切位点之间关系。我们的G6PD基因位点RFLP研究表明它提供DNA多态信息量是极为有限, 在连锁分析和提示基因突变方面的应用受到限制, 需采用其它方法, 例如DNA测序, 来鉴定基因是否有突变存在。

参考文献

1. Du CS, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants and their frequency in Guangdong, China. Hum Genet 1988;80: 385
2. Du CS, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among three national minorities in Hainan Island, China. Gene Geography 1988; 2:71
3. 许卫明. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的基因研究. 国外医学(遗传学分册) 1990;13:177
4. 杜传书. 遗传性红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症. 中山医科大学学报 1992; 13:1
5. D'Urso M, et al. An extensive search for RFLP in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase locus has revealed a silent mutation in the coding sequence. Am J

- Hum Genet 1988; 42:735
6. Vulliamy TJ, et al. Diverse point mutation in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:5171
 7. Yoshida A, et al. RFLP of the X chromosome-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase locus in Blacks. Am J Hum Genet 1988; 42:872
 8. Martini G, et al. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose-6-phosphate dehydrogenase. EMBO J 1986; 5:1849
 9. Persico M, et al. cDNA sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in PBR 322. Nature 1981; 294:778
 10. Chiu DTY, et al. Two commonly occurring nucleotide base substitutions in Chinese G6PD variants. Biochem Biophys Res Comm 1991; 180:988
 11. Chao L, et al. A to G substitution identified in exon 2 of the G6PD gene among G6PD deficient Chinese. Nucleic Acids Res 1991; 19:6056
(1992-11-03收稿 1992-12-19修回)

THE STUDY OF *EcoR* I SITE IN G6PD GENE FROM CHINESE

Xu Weiming Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics)

The restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of sixteen restriction endonucleases in G6PD gene were identified by using Southern blotting. Fifteen endonucleases were found no changes except for *EcoR* I. The results of 39 cases of normal individuals and 38 cases of G6PD deficient for G6PD gene digested by *EcoR* I showed that 20% individuals revealed 7.0 kb band, one G6PD deficient was 6.0 kb band, which were different from the abroad reports. The origin and significance for these fragments were discussed in this paper.

Key words G6PD gene; restriction endonuclease *EcoR* I; DNA agarose electrophoresis; Southern blotting; restriction fragment length polymorphism