

# Gd(-)台湾-客家型部分基因 克隆化分离和鉴定

许卫明\* 华小云 陈路明 杜传书

(医学遗传学教研室)

**提 要** 从两例葡萄糖-6-磷酸脱氢酶变异型——台湾客家型 [Gd(-)Taiwan-Hakka] 患者基因组 DNA 中,回收经 EcoR I 完全酶解的 3~5 kb 片段,与载体  $\lambda$ gt 10 插入重组,用 SMR 10 单菌种系统制备包装提取物,对重组的  $\lambda$ gt 10 进行体外包装,构建成两个基因组基因文库。用  $^{32}\text{P}$  标记的 G 6 PD cDNA 成功地从文库中初选出 12 个阳性克隆,挑选其中 4 个阳性克隆再次杂交予以证实,提取其中 2 个克隆 DNA,经限制酶酶切电泳及斑点杂交鉴定,分离到该变异型基因的插入片段,并将其克隆到 M 13 mp 19 噬菌体,完成 Gd(-)Taiwan-Hakka 型部份基因克隆化分离与鉴定,为 DNA 序列分析寻找突变部位打下基础。

**关键词** 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶变异型;载体  $\lambda$ gt 10; SMR 10 系统;体外包装;基因克隆;基因亚克隆

**中图分类号** Q343; Q55

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(简称 G6PD)缺乏症为我国华南地区一种最常见的遗传病,发病率高,广东省为 5%~10%,是导致蚕豆病,药物性溶血,新生儿黄疸,慢性非球形细胞溶血性贫血的主要原因之一。G6PD 存在多种变异型,目前全世界已报道 G6PD 变异型超过 400 种。国内杜传书共报道 14 种新变异型,据查广东省有变异型达 31 种,其中 Gd(-)Taiwan-Hakka 型发生率最高,占 11.3%<sup>[1,2]</sup>,华小云<sup>[3]</sup>曾报道广东兴梅地区该变异型与蚕豆病有关。1986 年 Persico 和 Takizawa 相继分离到 G6PD cDNA 克隆,G6PD 缺乏症的研究从生化鉴定水平进入到基因水平,一些变异型基因突变的性质被阐明。如 G6PD A<sup>-</sup>为 G<sup>202</sup>→A, A<sup>376</sup>→G<sup>[4]</sup>;G6PD Mediterranean C<sup>563</sup>→T<sup>[5,6]</sup>。目前,国内 G6PD 变异型基因研究尚属空白,而众多变异型为了解中国人 G6PD 基因突变提供良好的条件。因此,作者选择广东地区常见的 Gd(-)Taiwan-Hakka 型,在国内首次构建

2 例该变异型基因部份克隆,分离到基因插入的片段,为研究该变异型基因的改变打下基础。

## 材 料 与 方 法

### 病例来源

两例男性 G6PD 缺乏症患者(何××,时××)来自中山医科大学附属第一医院产科遗传咨询门诊,经本室生化鉴定均为 Gd(-)Taiwan-Hakka 型。

### 材 料

噬菌体  $\lambda$ gt10 由中山大学生物工程中心提供;SMR 10 [E.coli c-1 $\alpha$  ( $\lambda$  COS 2 $\Delta$  B xis1 red 3 gamma 210 cIts 857 nin 5 Sam 7)/ $\lambda$ ] 由广东省微生物研究所提供;M 13 mp 19 RF DNA 由华美生物公司提供; $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP,  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP 由北京福瑞公司提供;G6PD cDNA (PGd-T-5 B)由英国皇家研究生院 Luzzatto 教授惠赠;限制酶, T<sub>4</sub> DNA 连接酶由华美生物

\* 博士研究生

公司提供;硝酸纤维素膜。

### 实验方法

1. G6PD 变异型生化鉴定 取外周静脉血 10 ml, 肝素抗凝, 溶血后离心, 沉淀的白细胞抽提 DNA, 溶血液按 WHO 标准方法<sup>[7]</sup>进行 G6PD 部份纯化, 最后得到的酶液经透析后进行变异型鉴定, 鉴定指标为酶活性, 电泳迁移率, 脱氧葡萄糖-6-磷酸钠盐 (2dG6DP) 利用率, 脱氨基辅酶 II (D-NADP) 利用率, 半乳糖 6 磷酸利用率 (Gal-6-P), 热稳定性, G6P 米氏常数 (KmG6P)。

2. Gd(-)Taiwan-Hakka 型部份基因克隆构建 ①基因组 DNA 酶解片段组制备: 从白细胞常规提取 DNA, 每例患者各取 50 μg DNA, EcoR I 完全酶解, 酚/氯仿抽提 1 次, 乙醇沉淀, 抽干, 溶于 500 μl TE 溶液。然后置入含 1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA 的 10%~40% 蔗糖梯度顶部, Beckman 离心机 32 000 rpm, 15℃, 16 小时, 分部收集, 每管约 0.5 ml, 乙醇沉淀, 溶于 50 μl TE 溶液, 琼脂糖电泳检查, 取 3~5 kb 片段备用。②λgt 10 DNA 制备: 平板扩增抽提法收集噬菌体, CsCl 密度梯度离心, Beckman 离心机 30 000 rpm, 15℃, 1 小时, 收集噬菌体带, 透析, 透析后加入 20 mmol/L EDTA, 蛋白酶 k (50 μg/ml), 0.5% SDS, 65℃, 1 小时, 等体积酚, 酚/氯仿, 氯仿各抽提 1 次, 乙醇沉淀, 抽干, 溶于 TE 溶液。取 10 μg λgt 10 DNA, EcoR I 消化约 1 小时, 取 1 μg 标本琼脂糖电泳检查酶解是否完全。③基因组 DNA EcoR I 片段与载体臂连接: 取基因组 DNA EcoR I 3~5 kb 片段与载体臂按 9:1, 3:1, 3:2 比例连接, 加 T4 DNA 连接酶 2 单位, 反应体积控制在 15 μl, 14℃ 过夜, 电泳检查连接效果。④包装蛋白制备: 按 Rosenberg 推荐的方法<sup>[8]</sup>制备 SMR10 单菌种系统包装蛋白并进行滴度测定。确定包装物效价后进行重组体进行包装。⑤阳性克隆的筛选与鉴定: 原位转移基因文库 DNA 至硝酸纤维素膜, 变性中和处理后, 置 80℃ 烘烤 2 小

时, 预杂交 4 小时, 用 α-<sup>32</sup>P-dCTP 标记 G6PD<sup>S</sup>DNA (pGd-T-5B) 杂交, 杂交液成份: 25 m mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5×SSC, 5×Denhard't, ssDNA (50 μg/ml), 50% Formamide, 42℃, 杂交过夜, 次日洗膜, 2×SSC+0.1%SDS 30 分钟 2 次, 0.1 SSC+0.1% SDS (55℃) 30 分钟 2 次, 自显影, 取杂交阳性克隆平板扩增法收集噬菌体, CsCl 密度梯度离心纯化, 提取 DNA, 斑点杂交证实 DNA 中含 G6PD 基因, EcoR I 酶解重组 DNA, 回收插入片段。⑥M 13 次级克隆: 将电泳分离回收的插入片段, 与 EcoR I 酶解的 M 13 mp 19 RF DNA 连接, 转染 E. coli JM 103, 挑取无色噬菌斑, 制备成单链模板 DNA, 斑点杂交和琼脂糖电泳鉴定是否有插入片段。

## 结 果

### 两例 Gd(-)Taiwan-Hakka 型生化鉴定

Gd(-)Taiwan-Hakka 型是 McCurdy (1970)<sup>[9]</sup>对台湾省籍旅美华侨检查后报告的。该变异型酶动力学特征为酶活性严重缺乏, 电泳快速, D-NADP 利用率增加, KmG6P 降低, 热稳定性正常或轻度不稳定。本实验 2 例 G6PD 缺乏症生化指标鉴定结果见表 1, 各项测定指标均与 Gd(-)Taiwan-Hakka 型相符。

### Gd(-)Taiwan-Hakka 型部份基因文库构建

1. 基因组 DNA EcoR I 酶解片段分离与载体鉴定 分部收集超速离心分离后的基因组 DNA EcoR I 酶解片段, 经琼脂糖电泳检查 EcoR I 完全酶解的基因组 DNA 呈梯度分布, 取 3~5 kb DNA 与载体连接, 载体 λgt10 则用 EcoR I, BamH I, Hind III, Xho I 等限制性内切酶作酶谱分析, 结果表明载体 λgt 10 酶切位点献与文报道一致。

2. 包装物效价与重组体包装 采用 SmR 10 单菌种系统自行制备包装提取物, 包装反应后, 未加 DNA 空包装组包装滴度为零, 加入未经酶切的野生型 λgt 10 DNA, 反复测定包

表1 两例台湾-客家型酶动力学改变

G6PD变异型	酶活性	电泳迁移率	KmG6P	2dG6P	Gal6P	D-NADP	热稳定性
B型(正常)	100	100±1.6	54±12	3.0±1.9	2.3±1.6	57.3±8.5	66-99
台湾-客家型	3.9±3.3	108±5.7	22±9.5	21.8±3.7	12.2±3.6	150.8±17.9	40.9±16.4
何××	0	107.4	24.14	14.8	8.0	133.0	61.5
时××	0.2	116.7	23.9	15.8	7.6	125.7	58.2

装滴度, 均稳定在  $10^7$  pfu/ $\mu$ g DNA, 达到包装要求后, 对重组体包装并测定滴度, 结果见表2。

3. 基因文库筛选  $\alpha^{32}\text{P}$  标记的 G6PD表2 G6PD 台湾-客家型 DNA 与  $\lambda$ gt10 DNA 连接包装滴度试验 (pfu/ $\mu$ g)

$\lambda$ gt10:DNA ( $\mu$ g/ $\mu$ g)	何××			时××			对照
	9:1	3:1	3:2	9:1	3:1	3:2	2:0
C600	$5.6 \times 10^3$	$4.3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$9.5 \times 10^3$	$1.7 \times 10^4$
C600 hfLA	$1.2 \times 10^3$	$9 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	$3.4 \times 10^3$	$9 \times 10^2$	$1.3 \times 10^3$	$1 \times 10^2$
重组体比例(%)	21.4	20.8	20	16.5	18	13.6	0.5
杂交阳性克隆(个)	0	6	2	1	1	2	0

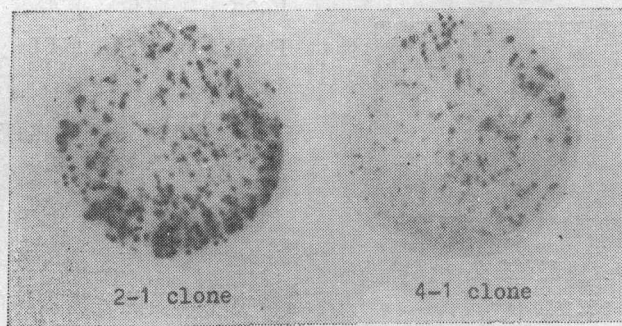


图1 显示第2次杂交后其中的2-1和4-1克隆

cDNA 筛选所构建的2个基因文库。除第1号皿外, 其余5个皿均有杂交信号, 分别命名2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6; 3-1, 3-2; 4-1; 5-1; 6-1; 6-2克隆, 从这12个阳性克隆中挑出4个克隆(2-1, 2-2, 2-3和4-1), 扩增后再次用  $\alpha^{32}\text{P}$  G6PD cDNA 原位杂交, 印证该4个克隆均为阳性克隆, 见图1。

4. 重组克隆鉴定 2-1和4-1克隆扩增后提取重组体DNA, EcoR I 酶解, 琼脂糖电

泳, 见2-1克隆含1.8 kb的插入片段, 4-1克隆含1.3 kb的插入片段, 见图2, 斑点杂交显示重组体DNA含有Gd(-)Taiwan-Hakka型基因。

5. M13次级克隆构建 琼脂糖电泳分离, 回收上述两个片段, 连接到M13mp19RF DNA EcoR I 克隆位点, 重组体转染JM103宿主菌, 取无色噬菌斑制备单链模板DNA进行鉴定, 琼脂糖电泳显示有插入片段的克隆DNA电泳

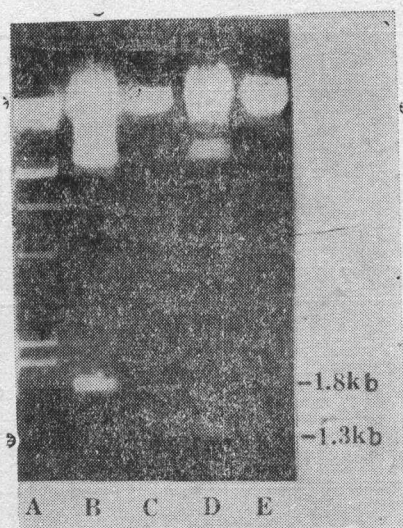


图2 重组克隆插入片段电泳

- A  $\lambda$  DNA/Hind III  
 B 2-1 克隆/EcoR I (显示 1.8 kb 插入片段)  
 C 2-1 克隆对照  
 D 4-1 克隆/EcoR I (显示 1.3 kb 插入片段)  
 E 4-1 克隆对照

迁移率慢于对照的无插入片段载体 DNA, 同时斑点杂交显示这些克隆含 G6PD 基因, 见图 3。

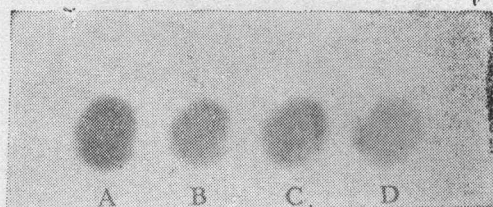


图3 M13 亚克隆斑点杂交

- A, B 2-1 亚克隆  
 C, D 4-1 亚克隆

## 讨 论

### 载体 $\lambda$ gt 10 克隆变异型基因

$\lambda$ gt 10 为直链双链 DNA 克隆载体, 大小为 43 kb, 用于克隆小于 7 kb 的 EcoR I 酶解片段, 是基因文库构建常用的载体, 选择这一载体作为 G6PD 变异型克隆构建载体是因为  $\lambda$ gt 10 具有下述优点: ①克隆效率高, 载体易于制备。②重组体易和非重组体区别, 筛选重组体的一对宿主菌为 C 600 和其突变体 C 600

hfl A, 非重组体  $\lambda$ gt 10 是  $CI^+$  (阻遏物基因), 在 C 600 形成混浊斑, 在带有高频溶源突变的 C 600 hfl A 中, 非重组体因形成稳定的溶源状态而看不见噬菌斑, 当外源性 DNA 片段插入到  $\lambda$ gt 10 EcoR I 位点后,  $CI$  基因失活, 形成  $CI^-$  噬菌体, 重组体在 C 600 hfl A 不呈溶源状态而看见清亮噬菌斑。所以从 C 600 hfl A 可计算重组体数目。Martini<sup>[10]</sup> 研究 G6PD 基因发现该基因共有 13 个外显子和 12 个内含子, EcoR I 的切点位于内含子中, EcoR I 酶解基因组 DNA 时, 产生 11 kb, 5 kb 和 3.5 kb, 其中 11 kb 片段包含外显子 1 和 2, 5 kb 片段包含外显子 7 至 13, 3.5 kb 包含外显子 3 至 6。目前研究资料表明除 G6PD A(-) 型基因突变发生在外显子 1 外, 其余 G6PD 变异型基因突变都发生在外显子 3 至 13。因此, 我们选择可能包含外显子 3 至 13 的 3~5 kb EcoR I 酶解片段为待克隆片段, 实验结果证明我们克隆到该变异型基因, 虽然初步鉴定的两个克隆插入片段长度短于预计长度, 推测可能由于下述原因所致: ①该变异型未知的突变影响 EcoR I 酶切位点改变, ②国人 G6PD 基因位点 EcoR I 可能存在 RFLP。目前其他克隆尚在鉴定之中。

### SMR 10 单菌种系统制备包装提取物

SMR 10 单菌种系统制备包装提取物是近年使用的新技术, 具有操作简便, 容易制备, 快捷省时, 包装滴度高等优点, SMR 10 为携带突变基因的  $\lambda$  噬菌体的溶源菌, 带有 3 个突变基因  $CI_{ts} 857$ ,  $Sam 7$  和  $red 3$ , 溶源菌 SMR 10 的  $\lambda$  噬菌体基因编码所有外壳蛋白, 但其基因组 DNA 缺失包装起始区 COS 段, 这种无 COS 段的 DNA 不能被包装, 所以有效防止内源 DNA 的包装, 因而提供完全的入噬菌体外壳蛋白供体外包装, 在整个制备过程中, 细胞保持不破裂, 包装时从液氮中取出, 冻触裂释放出外壳蛋白, 加入完整或重组 DNA, 即可装配成有感染活性的噬菌体。本实验用 SMR 10 制备的包装蛋白获得滴度为  $10^7$  pfu/ $\mu$ g DNA, 包装重组 DNA 后测得滴度为  $10^3 \sim 10^4$ , 重组

体在 C 600 hfL A 宿主菌中清亮斑达  $10^3$ 。除包装物效价外, DNA 与载体连接比例也是影响包装效率的一个重要因素, 理论上, 载体片段与待接片段的摩尔比应为 2:1, 由于某些 DNA 分子可能缺少粘端, 参予连接反应的末端有效浓度低于理论值。因而, 按照 DNA 与载体之比, 设计 9:1, 3:1, 3:2 三种比例进行连接。结果最适合的连接比例是 3:1~3:2。本实验由于未用碱性磷酸酯酶处理载体 DNA, 致使载体片段自身连接而出现较多非重组体。

本实验结果表明用  $\lambda$ gt 10 为载体, SMR10 单菌种制备包装蛋白来构建 G6PD 变异型基因克隆, 具有方便, 快捷和易于构建等特点, 为研究 G6PD 变异型基因序列和表达提供必要的前提。

#### 参 考 文 献

1. Du CS, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency 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. 华小云, 等. 中国人葡萄糖 6 磷酸脱氢酶变异型研究 I. 广东兴梅地区所见 Gd(-) 台湾-客家型. *中华血液学杂志* 1984;5(1):38
4. Hirono A, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human G6PD variant A(-). *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:3951
5. Vulliamy T J, et al. Diverse point mutations 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
6. De Vita G, et al. Two point mutation are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. *Am J Hum Genet* 1989;44:233
7. WHO Scientific Group. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *WHO Techn Rep Ser*, 1967:366
8. Rosenberg S M, et al. Improved in vitro packaging of coliphage Lamda DNA: a one-strain system free from endogenous phage. *Gene* 1985;38:165
9. McCurdy P R, et al. Further studies on glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Chinese subjects. *J Lab Clin Med* 1970;75:788
10. Martini G D, et al. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J* 1986;5:1849

(1991-07-12收稿 1992-04-11修回)

# THE CLONING ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PARTIAL GENE FROM GLUCOSE-6- PHOSPHATE DEHYDROGENASE VARIANTS—TAIWAN-HAKKA

Xu Weiming      Hua Xiaoyun      Chen Luming  
Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics)

The genomic DNA was prepared from two cases of glucose-6- phosphate dehydrogenase variants—Gd(-)Taiwan-Hakka subjects. Fractions of genomic DNA complete digested with EcoR I and ligated into  $\lambda$ gt10 EcoR I site. The recombinant phages were packaged in vitro to generate two genomic libraries. Twelve positive clones were obtained by screening of libraries with  $^{32}\text{P}$  radiolabeled G6PD cDNA. Four of them were verified by further hybridization with the probe. Phage DNA was prepared from two clones. The inserted DNA fragments originally from libraries were isolated, identified, and subcloned into M13 vectors for sequencing. This is the first time to finish gene libraries construction of Gd(-)Taiwan-Hakka in China, which is necessary for identification of mutation in G6PD deficiency.

**Key words** G6PD variants; vector  $\lambda$ gt10; SMR 10 system; in vitro packaging; gene cloning; gene subcloning

· 简 报 ·

## 烫伤应激小鼠 NK 活性血浆 MDA 水平及 红细胞 SOD 含量变化的初步观察\*

吴伟康 袁海风 罗汉川 潘伟雄 沈剑刚 侯 旭

(病理生理学教研室)

**关键词** 天然杀伤细胞; 应激; 丙二醛 (MDA); 超氧化物歧化酶 (SOD);

**中图分类号** R363·123

为探讨应激对免疫机能的影响, 本工作从自由基角度观察了烫伤应激小鼠 NK 活性的变化。CBA/N 小鼠体重 23~25 g, 配对设计, 分应激组  $n=6$ , 对照组  $n=6$ , Ⅰ°烫伤作为应激源。结果 ( $\bar{x} \pm s$ ) 如下: ①NK 活性 ( $^{125}\text{I-UdR}$  释放率%): 对照组  $38.3 \pm 1.8$ , 应激组  $23.1 \pm 1.8$ ,  $t=14.66$ ,  $P<0.001$ 。②血浆 MDA 浓度 (nmol/ml): 对照组  $7.42 \pm 3.7$ , 应激组  $8.70 \pm 3.0$ ,  $t=2.988$ ,  $P<0.05$ 。③红细

SOD 含量 ( $\mu\text{g/ml RBC}$ ), 对照组  $120.77 \pm 66.58$ , 应激组  $252.62 \pm 47.90$ ,  $t=4.176$ ,  $P<0.01$ 。上述结果表明: 烫伤应激引起 MDA 显著增加, MDA 具有非特异性免疫抑制作用, 本实验 NK 活性的受抑可能与此有关。红细胞 SOD 含量的增加可能是针对血浆 MDA 增加的一种保护性代偿反应, 它与 NK 之间的关系有待进一步探讨。

\*中山医科大学科研基金资助项目