

• 遗传快报 •

一个 Hunter 综合征家系粘多糖电泳分析^①

宋光江^② 李桂信 季启清 孙安堂 宋兴军 杜克明 刘京升

(山东省泰山医学院生物教研室, 泰安 271000)

摘要 CT 所见肝脏肿大占据左右上腹, 纠正了既往把肝左叶当做脾大的结论; B 超发现前所没有报道的二尖瓣赘生物将给患者终生致残; 标准品 DS 行双向电泳, 首次发现其分离为 DS₁ 与 GS₂ 两个斑点; 杂合子、患者尿 GAG 均出现 DS₁ 斑点, 而正常人则不出现。实验显示, DS₁ 的出现在杂合子检出和患者确诊上有重要意义。

关键词 Hunter 综合征, 粘多糖, 双向电泳

An Electrophorenal Investigation of Glycosaminoglycans in Hunter Syndrome Family

Song Guangjiang Li Guixin Li Qiqing Sun Antang

Song Xingjun Du Keming Liu Jingsheng

(Biology Department, Taishan Medical College, Taian, Shandong 271000)

Hunter 综合征家系 (图 1), 已追踪 10 年⁽¹⁾, 其上、下 4 代共 10 名患者, 表型正常的女性也往往是杂合子。家系在扩大, 患者在增多。该遗传病连街坊邻居都望而生畏, 患儿母亲多次咨询, 盼求了解自身情况及如何避免患儿出生问题。鉴于此, 特对该家系患者、肯定杂合子的尿液进行电泳分析, 以试图检出杂合子。

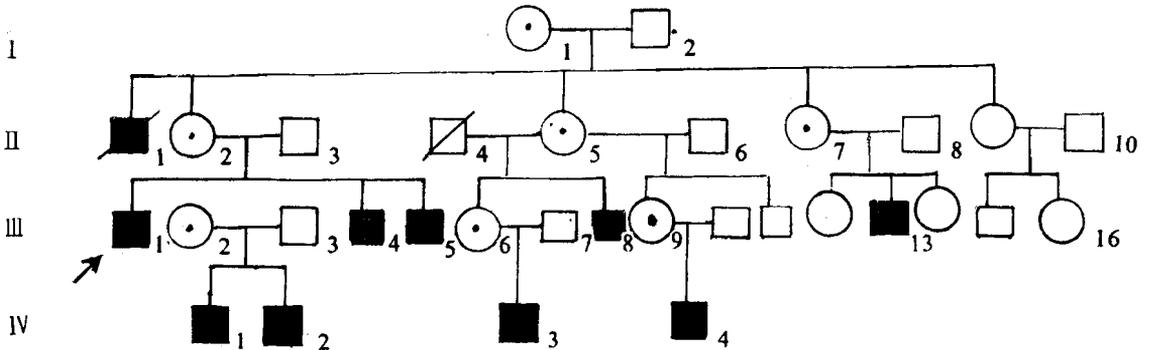


图 1 Hunter 综合征家系

1 材料与 方法

1.1 材料

①本课题由山东省计生委资助, 本工作已获国家计生委94年科技进步三等奖。

②宋光江, 男, 57岁, 副教授, 主要从事细胞遗传学研究。

1.1.1 体检 III-1、4、5、8、13, 分别为 26、22、20、23、14 岁, 其成年者身高均在 110cm 左右, 已丧失劳动能力。所有患者均神志清楚, 鸭行步态, 舟状头, 发粗硬, 蛙状突眼, 角膜透明, 听力减低。III-1、4、5、8 心尖 3/6 级吹风样收缩期杂音。CT 所见: III-4、5、13 头部脑回、脑室、脑沟结构正常, 肝大占据左右上腹, 将正常脾脏挤至左后方。B 超所见: III-4、5、13, 均见心脏二尖瓣前叶左房面赘生物, 其大小分别是: $1.3 \times 1.2\text{cm}$; $1.1 \times 1.0\text{cm}$; $0.5 \times 0.5\text{cm}$ 。

1.1.2 尿样 正常人尿取自 5—50 岁人晨尿, 该家系中取 6 例肯定杂合子 (II-2、5、7 和 III-2、6、9) 和 9 例患者 (III-1、4、5、8、13 和 IV-1、2、3、4) 晨尿。

1.2 试剂

1.2.1 标准品粘多糖 (GAG) 溶液 DS (硫酸皮肤素)、HS (硫酸类肝素)、CS (硫酸软骨素) 为 Sigma 公司产品, HA (透明质酸) 为中国医学科学院基础医学研究所遗传室赠。以上样品分别用蒸馏水配成 1mg/ml , 置 4°C 保存。

1.2.2 0.05% 阿尔新蓝溶液 以含 50mmol/L 氯化镁和 50mmol/L 醋酸钠溶液配制, $\text{pH}5.8$ 。

1.2.3 4mol/L 氯化钠-甲醇混合液 用时按 4mol/L 氯化钠-甲醇为 2:1 混合。

1.2.4 0.02mol/L 碳酸钠溶液 将 1.06g 无水碳酸钠溶于 500ml 蒸馏水中。

1.2.5 第 I 向电泳缓冲液 按吡啶-醋酸-蒸馏水为 100:10:890 混合使用, $\text{pH}6.0$ 。

1.2.6 第 II 向电泳缓冲液 0.15mol/L 醋酸锌溶液, $\text{pH}5.8$ 。

1.2.7 洗脱液 含 500mmol/L 氯化镁和 500mmol/L 醋酸钠水溶液, $\text{pH}5.8$ 。

1.2.8 无水乙醇。

1.3 方法^(7,8)

1.3.1 GAG 提取和纯化 尿液经水浴沸腾 5 分钟, 以除去蛋白质。然后取尿液 2ml , 加入 20ml 阿尔新蓝溶液, 混匀, 室温静置数分钟, 离心 (3000r/m) 20 分钟, 弃上清液, 在沉淀物中加入 4mol/L 氯化钠-甲醇混合液 0.3ml , 振荡后加入 0.02mol/L 碳酸钠溶液 0.5ml , 静置 30 分钟, 离心, 吸取上清液 0.2ml , 加入无水乙醇 0.3ml 混匀, 室温静置后离心, 弃上清液, 将胶状沉淀物置 37°C 烘箱内干燥后取出, 加入三蒸水 $10\mu\text{l}$, 使纯化 GAG 溶解。

1.3.2 GAG 双向电泳 将醋酸纤维膜 (约 $8 \times 8\text{cm}$) 浸入第 I 向缓冲液中 30 分钟, 取出并平置于洁净的玻璃板 ($8.5 \times 8.5\text{cm}$) 上, 用滤纸吸干。分别吸取标准品 GAG 溶液 $1\mu\text{l}$ 或纯化 GAG $3\mu\text{l}$, 各点于薄膜一角, 距两邻边各 1cm 处。将载有薄膜的玻璃板固定于盛有第 I 向缓冲液的电泳槽内, 用滤纸搭桥, 平衡 5 分钟后电泳, 电压 7.5V/cm 。电泳 75 分钟后取下薄膜, 在室内通风处干燥。然后取上述薄膜于第 II 向缓冲液中, 待完全湿润后取出, 平置于玻璃板上, 吸去多余溶液, 将玻璃板转 90° 置第 II 向缓冲液的电泳槽内, 平衡后电泳 3 小时, 电压同上。电泳毕立即取薄膜入阿尔新蓝溶液中染色 5 分钟, 取出用洗脱液洗涤 3 次, 薄膜上则显现 GAG 组份的蓝色斑点。

2 结果

2.1 标准品粘多糖 DS、DS+HA+CS+HS 电泳

图 2、3 显示 DS 分离为 DS_1 、 DS_2 , 又经 DS 分别与 CS、HA、HS 混合电泳, 不仅显示第 II 向电泳处各 GAG 相对位置 (图 3), 而且在第 I 向处只有 DS_1 , 从而排除了其它 GAG 的掺杂。

2.2 正常人和杂合子尿 GAG 电泳

10 例正常人尿 GAG 电泳, 无 DS 出现, 仅在第 II 向电泳处留有 CS (或少量 HA) 斑点。6 例杂合子尿 GAG 电泳, 在第 I、II 向电泳处分别留有着色极淡的 DS_1 、 DS_2 斑点。

2.3 患者尿 GAG 电泳

9 例患者尿 GAG 电泳(图 4), 在第 I 向处留有一 DS_1 斑点, 第 II 向处 GAG 各斑点迁移率与标准品相同。

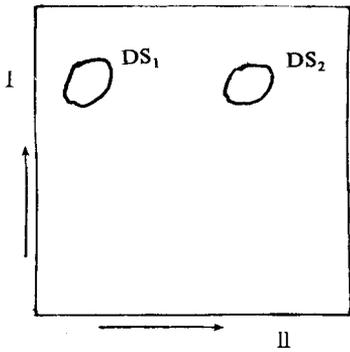


图 2 标准品粘多糖 DS 双向电泳

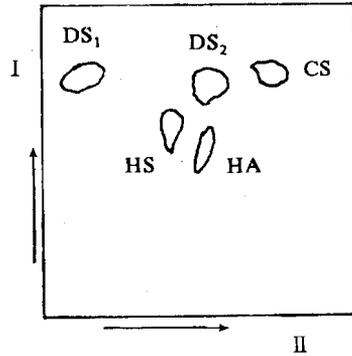


图 3 标准品 DS+HA+CS+HS 双向电泳

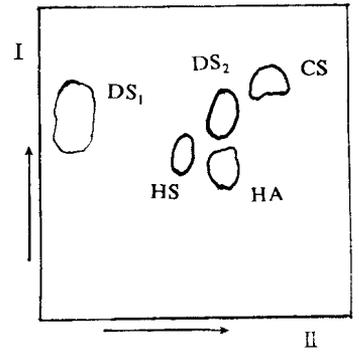


图 4 患者尿 GAG 双向电泳

3 讨 论

3.1 体检分析

长期以来, 本病“肝脾肿大”一说多有描述⁽²⁾。但 CT 所见肝大占据左右上腹, 脾脏正常, 既往体检所触及的“肝脾肿大”实为肝大的肝左叶; B 超扫描, 发现临床尚未报道的心脏内赘生物致患者终生残疾; CT 颅脑平扫, 脑室大小、形态、脑组织密度正常, 说明脑组织 GAG 沉积不显著, 与患者智力无显著变化一致。

3.2 电泳分析

DS 分离为 DS_1 和 DS_2 , 说明 DS 本身的不均一性。DS 由艾杜糖醛酸和半乳糖胺两个糖单位构成⁽³⁾, 但由于 DS 在多糖链合成后许多葡萄糖醛酸差向异构化而成为艾杜糖醛酸, 使糖醛酸出现了两种, 导致了 DS 本身的电荷密度差异而呈现不均一性, 从而使 DS 在两种不同缓冲液中电泳时发生分离; 正常人尿无 DS 出现, 仅有 CS (或还有极微量 HA), 结果与文献所报正常人尿 CS 占 90—100% 结果一致⁽⁴⁾; 肯定杂合子均出现 DS_1 和 DS_2 , 尽管电泳斑点着色极淡 (特别是 DS_2), 亦能显示杂合子酶活性偏低, 致使 GAG 代谢异常。我国李氏用琼脂糖凝胶电泳也发现杂合子尿中有 DS 出现⁽⁵⁾, 认为大多数杂合子酶活性仅为正常对照的 50%⁽⁶⁾; 患者尿 GAG 电泳, DS_1 明显可见。其它各斑点与标准品 DS+CS+HA+HS 电泳迁移率一致, 说明 DS、HS 降解完全受阻而致病。尿中也相应排出多量的 DS 与 HS⁽²⁾。

上述尿 GAG 电泳, 具有分辨率高, 操作简便, 省时、省费用等优点, 可适用于一般实验室。另外, 独居第 I 向处的 DS_1 斑点具有特异性, 其在杂合子检出及患者确诊上是一个有意义的指标。

参 考 文 献

- (1) 李桂信, 宋光江, 1989. 遗传, 11 (5): 32.
- (2) 谢大钊, 1983. 中华放射杂志, 17 (2): 129.
- (3) 顾天爵, 1993. 生物化学(第三版), 北京: 人民卫生出版社, 173—174.
- (4) 田梦玉, 1988. 西安医学院学报, 1 (2): 7.
- (5) 李上奎, 1988. 临床实验杂志, 6 (2): 7.
- (6) Zlotogora J, (史文艳译), 1988. 《国外医学》遗传学分册, 11 (3): 140.
- (7) Abeling NGGM, et al, 1974. Clin. Chim. Acta, 55: 297.
- (8) Whiteman P, et al, 1977. Clin. Chim. Acta, 79: 999.

本文于 1994 年 12 月 2 日收到。