

中国人 α 珠蛋白基因 $-\alpha^{3.7}$ 缺失亚型的研究

陈素琴,李洪义,陈争,段山,陈路明,田秋红,杜传书

(中山大学中山医学院医学遗传学教研室,广州 510089)

摘要: $-\alpha^{3.7}$ 是中国人常见的缺失型 α -地中海贫血-2。根据重组位点的不同, $-\alpha^{3.7}$ 可分为 $-\alpha^{3.7I}$ 型、 $-\alpha^{3.7II}$ 型和 $-\alpha^{3.7III}$ 型,并且亚型的种类和频率具有种族差异性。本研究在中国人群中用 PCR 基因分析方法检出具有 α 珠蛋白基因 $-\alpha^{3.7}$ 缺失的患者 56 例,然后用 *ApaI* 和 *BalI* 限制性内切酶进行分型。结果表明,在这 56 例具有 $-\alpha^{3.7}$ 缺失的患者中,有 54 例是 $-\alpha^{3.7I}$ 型,有 2 例是 $-\alpha^{3.7II}$ 型,尚未发现 $-\alpha^{3.7III}$ 型。此结果丰富了我国 α 地贫基因型谱的资料。

关键词: α 珠蛋白基因; α 地中海贫血; $-\alpha^{3.7}$

中图分类号: R556.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)06-0649-03

Detection and Analysis of the Sub-types of $-\alpha^{3.7}$ in Chinese

CHEN Su-Qin, LI Hong-Yi, CHEN Zheng, DUAN Shan,

CHEN Lu-Ming, TIAN Qiu-Hong, DU Chuan-Shu

(Department of Medical Genetics, Zhongshan Medical College, SunYat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: $-\alpha^{3.7}$ is a common deletional α -thalassemia-2 in China. According to different recombination sites, $-\alpha^{3.7}$ can be divided into $-\alpha^{3.7I}$, $-\alpha^{3.7II}$ and $-\alpha^{3.7III}$. The frequency and population distribution of these $-\alpha^{3.7}$ are quite different. In this study, we detected 56 patients among Chinese population of $-\alpha^{3.7}$ defect in alpha globin gene by PCR method, then the PCR product was digested by the restriction enzyme *ApaI* and *BalI*. The sub-typing result shows that in the 56 cases of $-\alpha^{3.7}$ defect, 54 out of 56 is $-\alpha^{3.7I}$, 2 out of 56 is $-\alpha^{3.7II}$ and none of $-\alpha^{3.7III}$ is detected. This result enriches the data about the alpha thalassemia genotypes of Chinese people.

Key words: α -globin gene; α -thalassemia; $-\alpha^{3.7}$

α 地中海贫血(简称 α 地贫)是由于 α 珠蛋白基因的缺失或缺陷,使 α 珠蛋白链的合成减少或完全不能合成而引起的遗传性溶血性疾病,具有高度遗传异质性。从基因改变的情况来分, α 地贫可分为缺失型和非缺失型(点突变)两大类^[1]。从单倍型来看,缺失型 α 地贫是由于一个 α 基因缺失(又称 α^+ 地贫或 α 地 2)或两个 α 基因缺失(α^0 地贫或 α 地 1)引起的。 α 地 1 中的一—^{SEA} 主要分布于东南亚地区。 α 地 2 中的两种主要缺失型($-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$)遍布全世界。—^{SEA}、 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$ 是我国最常见的 3

种基因缺失类型^[2,3],而 $-\alpha^{3.7}$ 至少具有 3 种亚型,而且并且各亚型的种类和频率具有种族差异性。本文报道我国 56 例具有 $-\alpha^{3.7}$ 缺失患者的亚型研究结果。

1 对象和方法

1.1 研究对象

来我校附一院妇产科进行初次产检的孕妇以及来我实验室检查的孕妇,经本实验室建立的中国人 α 地中海贫血 PCR 基因诊断分型方法(待发表)检出的 $-\alpha^{3.7}$ 标本 56 例(其基因型包括 —^{SEA}/ $-\alpha^{3.7}$

收稿日期: 2002-11-18; 修回日期: 2003-02-24

基金项目: 卫生部科研基金资助项目(94-1-103)[This Project was Supported by the Research Grant of the Ministry of Health]

作者简介: 陈素琴(1974-),女,福建省仙游县人,硕士学位,助教,专业方向: 遗传病的基因诊断与治疗。E-mail: chensuqin99@hotmail.com

通讯作者: 李洪义(1960-),男,副教授,硕士研究生导师,专业: 医学遗传学。Tel: 020-87330206, E-mail: tlihz@jun.edu.cn

20 例、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha 36$ 例)的亚型研究结果。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的抽提

按我室常规酚/氯仿/异戊醇抽提法进行。

1.2.2 PCR 扩增体系

根据 Gap-PCR 的原理,一旦存在 $-\alpha^{3.7}$ 缺失,与缺失断裂点两侧翼序列互补的引物 P1 (5' TC-CTTTCCCTACCCAGAGCCAG 3') 和 P2 (5' TTCAGCAAACCTGCATTGAATCTG 3') 能扩增出约 2123bp 的片段。引物 P1、P2 在 GenBank (Accession NO. J00153) 的起始位置分别为 5758 和 11581 位点。

PCR 反应体积为 50 μ L, 内含 50mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 16.6mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.10mg/mL BSA, 4.0mmol/L MgCl_2 , 7.5% DMSO, 200 μ mol/L dNTPs, 引物 P1、P2 各 0.2 μ mol/L, Taq 酶 2U (Biostar), 人基因组 DNA 约 0.1~0.7 μ g。PCR 反应条件: 94 $^\circ\text{C}$ 3min; 94 $^\circ\text{C}$ 45s, 60 $^\circ\text{C}$ 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 2min, 35 循环; 最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10min。

1.2.3 PCR 产物的酶切

上述 PCR 产物按文献^[4]方法进行分型。若用 *Apa*I 酶切, $-\alpha^{3.7\text{I}}$ 型酶切成约 1589bp 与 534bp 两个片段; $-\alpha^{3.7\text{II}}$ 型酶切前后无变化; $-\alpha^{3.7\text{III}}$ 型酶切成约 1681bp 与 442bp 两个片段。若用 *Bal*I 酶切, $-\alpha^{3.7\text{I}}$ 型与 $-\alpha^{3.7\text{II}}$ 型都酶切成约 1767bp 与 356bp 的两个片段, 而 $-\alpha^{3.7\text{III}}$ 型酶切前后无变化。每个待检标本取 PCR 产物 8 μ L, 分别加入限制性内切酶 *Apa*I 1 μ L (10U/ μ L) 或 *Bal*I 2 μ L (2U/ μ L), 2 倍内切酶体积的相应酶切缓冲液及 BSA, 以 ddH₂O 补至 20 μ L 的反应总体积, 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 5h。65 $^\circ\text{C}$ 15min 终止反应。反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳 (60V 1h), 溴乙锭染色观察。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增结果

存在 $-\alpha^{3.7}$ 缺失的染色体, 引物 P1+P2 能扩增出约 2123bp 的片段; 无 $-\alpha^{3.7}$ 缺失的正常 16 号染色体, 由于普通的 Taq 酶无法扩增 5.8 kb 的片段 (引物 P1+P2 相距约为 5.8 kb), 无扩增产物。

2.2 PCR 产物酶切结果

对引物 P1+P2 扩增出的约 2123bp 片段分别用 *Apa*I、*Bal*I 限制性内切核酸酶酶切 (见图 1)。

在 56 条染色体中, 具有 $-\alpha^{3.7}$ 缺失的染色体有 54 条为 $-\alpha^{3.7\text{I}}$, 有 2 条为 $-\alpha^{3.7\text{II}}$, 未发现 $-\alpha^{3.7\text{III}}$ 。

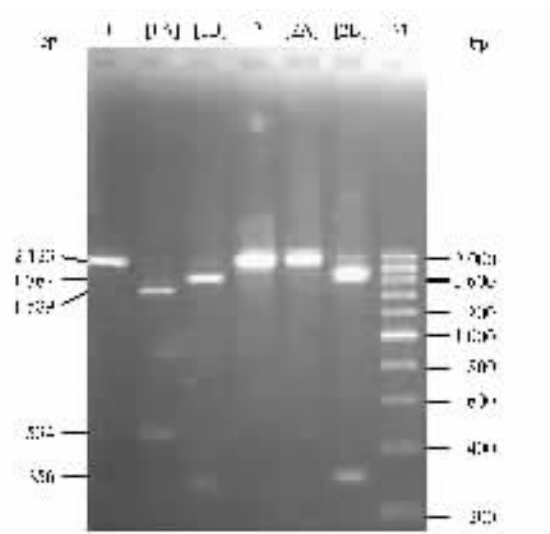


图 1 酶切法检测 $-\alpha^{3.7}$ 各亚型的结果

M: 200bp DNA ladder; 泳道 1、2 分别为酶切前的 $-\alpha^{3.7}$ PCR 产物, [1A][2A] 表示用 *Apa*I 酶切, [1B][2B] 表示用 *Bal*I 酶切; 标本 1 基因型为 $-\alpha^{3.7\text{I}}$; 标本 2 基因型为 $-\alpha^{3.7\text{II}}$ 。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of primer P1+P2 and restriction enzyme digestion of *Apa*I and *Bal*I for classifying $-\alpha^{3.7\text{I}}$, $-\alpha^{3.7\text{II}}$, $-\alpha^{3.7\text{III}}$

M is 200bp DNA ladder; [1A][2A] represents the PCR product digested by *Apa*I;

[1B][2B] represents the PCR product digested by *Bal*I;

Sample 1 is $-\alpha^{3.7\text{I}}$; Sample 2 is $-\alpha^{3.7\text{II}}$.

$-\alpha^{3.7}$ 缺失 (又称右缺失) 主要是由于染色体的不均等交换而产生的。其交换机制^[3]如图 2 所示:

从以上不均等交换的机理中, 不难发现, $-\alpha^{3.7}$ 缺失可以从 Z2 框的 5 端 ($\alpha 2$ 全部缺失) 到 Z1 框的 3 端 ($\alpha 1$ 全部缺失) 之间很大范围内波动。其缺失类型及频率具有种族差异性, 到目前为止, 已确定了 3 种不同的缺失断裂点, 分为 3 种亚型: $-\alpha^{3.7\text{I}}$ 、 $-\alpha^{3.7\text{II}}$ 、 $-\alpha^{3.7\text{III}}$ ^[4]。这类分型是依据缺失断裂点不同导致 $\alpha 2$ 与 $\alpha 1$ 基因中原有酶切位点的缺失与否而分类的。由于 $-\alpha^{3.7}$ 缺失类型及频率具有种族差异性, 在已报道的文献中, 大多数人群 $-\alpha^{3.7}$ 缺失以 $-\alpha^{3.7\text{I}}$ 和 $-\alpha^{3.7\text{II}}$ 为主^[5~12], 只有在美拉尼西亚 (Melanesian)、玻利尼西亚 (Polynesian) 及巴布亚新几内亚的一个海上系船站 (an offshore island of Papua New Guinea) 人群中 $-\alpha^{3.7}$ 缺失以 $-\alpha^{3.7\text{III}}$ 型为主^[13,14]。因而有必要对我国的 $-\alpha^{3.7}$ 缺失类型作亚

型分析,确定 $-\alpha^{3.7I}$ 型、 $-\alpha^{3.7II}$ 型、 $-\alpha^{3.7III}$ 型的比例,从而明确中国人常见的 $-\alpha^{3.7}$ 缺失类型;另外,在我们所查阅的文献中,已报道的关于中国人 $-\alpha^{3.7}$ 基因诊断并未包括 $-\alpha^{3.7III}$ 亚型,因而对 $-\alpha^{3.7}$ 缺失类型作亚型研究的工作也有利于我们对现有的关于 $-\alpha^{3.7}$ 基因诊断文献的评价。

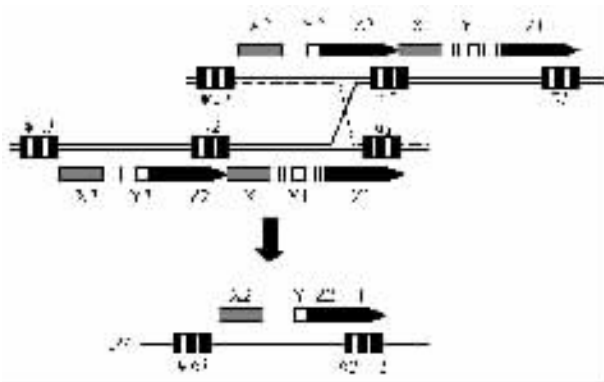


图2 染色体不均等交换导致 $-\alpha^{3.7}$ 产生的机制

Fig. 2 Schematic diagram to show how the $-\alpha^{3.7}$ haplotype produced by chromosomes crossing over

The duplicated XYZ box is arrangement contains the α genes and nonhomologous regions (I, II and III) are indicated.

关于中国人群中 $-\alpha^{3.7}$ 缺失类型,曾有台湾、香港学者做过研究^[12,15~18],但他们的研究对象仅限于血红蛋白 HbH 病患者。而我们的研究对象包括所有具有 α 珠蛋白基因 $-\alpha^{3.7}$ 缺失的患者(患者的基因型包括 $-\alpha^{SEA}/-\alpha^{3.7}$ 20 例、 $-\alpha^{3.7}/\alpha$ 36 例),而且这些患者主要来自广东地区。我们的研究表明,中国人群中 $-\alpha^{3.7}$ 缺失以 $-\alpha^{3.7I}$ 型为主;也存在着少量 $-\alpha^{3.7II}$ 型。这与已报道的关于中国人(台湾、香港等) $-\alpha^{3.7}$ 缺失亚型的研究结果一致。究竟中国人群中是否存在 $-\alpha^{3.7III}$ 型,有待于进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] Higgs DR, Vickers MA, Wilkie A O M, Jarman A P, Weatherall DL, Pretorius LM. A review of molecular genetics of the human α globin gene cluster [J]. *Blood*, 1989, 73: 1081~1104.
- [2] Zeng Y T, Huang S Z, Chen M J. The types and distribution of α -thalassemia-2 in China [J]. *Hemoglobin*, 1988, 12: 455~458.
- [3] CHEN Jian, SUN Qiong, CHEN Mei-Jue, REN Zhao-Rui, HUANG Shu-Zhen. An analysis of α -globins in 124 cases with HbH disease [J]. *Shanghai Medical Science*, 1999, 22(2): 83~86.

陈 坚, 孙 琼, 陈美珏, 任兆瑞, 黄淑帆. 124 例 HbH 患者 α

珠蛋白基因的分析 [J]. *上海医学*, 1999, 22(2): 83~86.

- [4] Higgs DR, Hill AVS, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB. Independent recombination events between the duplicated human α globin genes; implication for their concerted evolution [J]. *Nucleic Acid Research*, 1984, 12(18): 6965~6977.
- [5] Martinez G, Ferreira R, Hernandez A, Di-Rienzo A, Felicetti L, Colombo B. Molecular characterization of HbH disease in the Cuban population [J]. *Hum Genet*, 1986, 72(4): 318~319.
- [6] Di-Rienzo A, Novelletto A, Aliquo MC, Bianco I, Tagarelli A, Branati C, Colombo B, Felicetti L. Molecular basis for HbH disease in Italy: Geographical distribution of deletional and nondeletional alpha-thalassemia haplotypes [J]. *Am J Hum Genet*, 1986, 39(5): 631~639.
- [7] Hundrieser J, Sanguansermisri T, Papp T, Flatz G. Alpha-thalassemia in northern Thailand; Frequency of deletional types characterized at DNA level [J]. *Hum Hered*, 1988; 38(4): 211~215.
- [8] Dod C, Labie D, Rochette J. Types of alpha thalassemia in South-east Asia refugees [J]. *Ann Genet*, 1988, 31(4): 201~204.
- [9] Hundrieser J, Sanguansermisri T, Flatz S D, Kuhnau W, Pape M, Papp T, Flatz G. Frequency of deletional types of alpha-thalassemia in Kampuchea [J]. *Ann Genet*, 1988, 31(4): 205~210.
- [10] Novelletto A, Hafez M, Di-Rienzo A. Frequency of deletional types of alpha-thalassemia in Egypt [J]. *Hum Genet*, 1989, 81(3): 211~213.
- [11] Martinez G, Ferreira R, Hernandez A. Frequency of the -alpha 3.7 thalassemia deletion in the non-white Cuban population [J]. *Gene-Geogr*, 1990, 4(2): 65~69.
- [12] Liu T C, Chiou S S, Lin S F, Chen T P. Molecular basis and hematological characterization of HbH disease in Southeast Asia [J]. *Am J Hematol*, 1994, 45(4): 293~297.
- [13] Hill AV, Bowden DK, Trent RJ, Higgs DR, Oppenheimer S L, Thein S L, Mickleson KN, Weatherall DJ, Clegg JB. Melanesians and Polynesians share a unique alpha-thalassemia mutation [J]. *Am J Hum Genet*, 1985, 37(3): 571~580.
- [14] Yenchitsomanus P, Summers K M, Board P G, Bhatia K K, Jones G L, Johnston K, Nurse G T. Alpha-thalassemia in Papua New Guinea [J]. *Hum Genet*, 1986, 74(4): 432~437.
- [15] Peng H W, Han S H, Chow T Y, Ho C H, Ching K N, Chiang B N. The molecular basis of HbH disease in Taiwan [J]. *Hum Genet*, 1988, 78(2): 137~139.
- [16] Chan V V, Chan T K, Todd D. Different forms of HbH disease in the Chinese [J]. *Hemoglobin*, 1988, 12(5-6): 499~507.
- [17] Chang J G, Liu T C, Perng L I, Chiou S S. Rapid molecular characterization of HbH disease in Chinese by polymerase chain reaction [J]. *Ann Hematol*, 1994, 68(1): 33~37.
- [18] Chen T P, Liu S F, Chang J G, Tsao C J, Lin T C, Chiou S S, Liu H W. Molecular characterization of HbH disease by polymerase chain reaction [J]. *Acta-Haematol*, 1993, 90(4): 177~181.