

## 云南傣族中所见的 G6PD 突变型<sup>①</sup>

蒋玮莹 杜传书

(中山医科大学医学遗传学研究室, 广州 510089)

**摘要** 利用错配碱基 PCR/酶切法, 在云南傣族中发现 nt1388 G→A, nt1376 G→T 和 nt392G→T G6PD 基因突变型。其中主要为 1388 突变(18/23)。此 3 种突变也见于华南地区的汉族中, 而有别于非中国人的突变型。提示傣族与汉族可能有同一民族渊源。利用 PCR-SSCP 方法在不同外显子中发现 3 例未知突变, 待进一步 DNA 序列测定定型。

**关键词** 基因突变, 葡萄糖 6 磷酸脱氢酶缺乏症, G6PD 突变型, 聚合酶链反应

## G6PD Mutations Found Among Dai People in Yunnan Province

Jiang Weiyang Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

**Abstract** By using mis-matched PCR followed by endonuclease digestion, G6PD gene mutations nt1388G→A, nt1376G→T, and nt392G→T were found among Dai national minority in Yunnan Province. Among these mutations, 18 out of 23 were nt1388G→A mutation. These three types of mutation were also found in Han people in the southern China, and never reported in other ethnic groups worldwide. It implied that the Han and Dai people perhaps had the same ethnic origin. Mutations of three undefined cases were identified in different exons by PCR-SSCP method. The exact mutation point will be detected by DNA sequencing under further investigation.

**Key words** Gene mutation, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD mutant, PCR

葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD E. C. 1. 1. 1. 49) 是存在于多种生物细胞中的一种看家酶。在人类由于 G6PD 基因突变所引起的红细胞 G6PD 缺乏症是一组涉及全球约 4 亿人的遗传性溶血性疾病。G6PD 具有各种突变型, 至 1996 年, 已从 DNA 水平鉴定的基因突变型有 78 种, 在我国汉族中已报道的突变型有 12 种, 均为点突变。G6PD 缺乏症呈全球性、多民族分布。G6PD 缺乏症在我国西南和华南地区的少数民族中发病率较高, 我们曾调查了云南傣族患病率为 16.6%。本文应用错配碱基 PCR/酶切法, 对 24 例傣族 G6PD 缺乏症患者进行了突变型分析, 现将结果报道如下。

### 1 材 料 和 方 法

#### 1.1 研究对象

收集了经县级以上医院确诊为“蚕豆病”或“药物性溶血”的 24 例傣族男性患者及 2 例傣族女性携带者的静脉血。被检者分别来自云南省芒市、瑞丽及盈江县的 18 个乡镇。取样前再次通过“G6PD 四氮唑蓝定性法”<sup>(1)</sup>证实研究对象均患有 G6PD 缺乏症。

<sup>①</sup>国家自然科学基金资助的项目。

## 1.2 PCR 反应

1.2.1 PCR 扩增引物 错配引物设计参照张建国等<sup>(2)</sup>, 其中检测 nt1388 突变的 5'端引物改为 E1113L(见表 1), 3'端引物为: 1388R 5'GTGCA GCAGT GGGGT GAACA TA 3'。扩增片段长度为 278bp, *NdeI* 酶切后为 256bp 和 22bp。256bp 片段可观察到。

1.2.2 基因组 DNA 提取 取静脉血 5ml, ACD 抗凝, 低渗溶血, 蛋白酶 K 消化, 酚-氯仿抽提。

1.2.3 PCR 反应体系 10×PCR 反应缓冲液 3.0μl, 2mmol/L dNTPs 3.0μl, 上下游引物各 20.0 pmol/L, 模板 DNA 0.4~1.0μg, 去离子双蒸水补足至总体积 30.0μl。

1.2.4 PCR 反应 PCR 循环仪为 Perkin-Elmer PC-1 型。PCR 反应采用热启动法, 97℃变性 10 分钟后, 在 85℃下加 1.5U GDTaq 酶(加拿大产品)。循环条件为: 94℃变性 30 秒, 退火时间 45 秒, 退火温度根据 T<sub>m</sub> 值计算(58℃~68℃)。72℃延伸 1 分钟, 共 35 个循环, 72℃保温 7 分钟, 置 4℃保存。

表 1 扩增 10 个外显子用于 PCR-SSCP 分析的引物

外显子	引物代号	序列	片段(bp)	T <sub>m</sub> 值(℃)	复性温度(℃)
2	E2L	5'-TGTC A CCCTG GTGTG AGA-3'	303	56	59
	E2R	5'-GCCCT GCAAT TAGTT GGAA-3'			
3~4	E34L	5'-AGGAT GATGT ATGTA GGTCG-3'	378	63	60
	E34R	5'-CCGAA GCTGG CCATG CTGGG-3'			
5	E5L	5'-ACACA CGGAC TCAAA GAGAG-3'	362	62	60
	E5R	5'-CCCGG ACACG CTCAT AGAGT-3'			
6	E67L	5'-AGCTG TGATC CTCCT CCCC-3'	385	67	64
	E6R	5'-GGCCA GGTGA GGCTC CTGAG TA-3'			
8	E8L	5'-TTGGG GTCCC CATGC CCTTG-3'	132	66	62
	E8R	5'-TGCCT CGTCA CAGAT GGGCC-3'			
9~10	E910L	5'-TCCCT GCACC CCAAC TCAAC-3'	685	66	60
	E910R	5'-CACCA TGTGG AGTCC CCCC-3'			
11	E1113	5'-ACTCC ACATG GTGGC AGGCA GTG-3	170	63	61
	E11R	5'-CATAG CCCAC AGGTA TGC-3'			
12	E12L	5'-GCATA CCTGT GGGCT ATG-3'	244	59	60
	E12R	5'-ATGAG GTAGC TCCAC CCTCA-3'			

## 1.3 酶切与电泳

取 PCR 产物 5μl, 加限制性内切酶 5U 及相应缓冲液。使用的内切酶为: *XhoI*(1376G→T 简称 1376 突变, 下同), *NdeI*(1388G→A), *BstEII* (392C→T), *MboII* (1024C→T), *SphI*(95A→G), *PstI*(592C→T), *AvaII* (493A→G), *AluI*(487G→A), *CfoI*(1360C→T), 酶解时间为 2~5 小时。

根据酶切片大小配制 8~12% 的聚丙烯酰胺凝胶(29:1)。将酶切产物 5μl 与 1μl 上样液混合后上样。选用 1kb 或 123bp ladder 作为 DNA 分子量标准。20cm×20cm×1mm 垂直板电泳, 恒压 180V, 电泳时间根据分离片段大小及凝胶浓度来定, 揭胶, 银染。参见杨明等<sup>(3)</sup> 判断结果。

## 1.4 PCR-SSCP 分析

取 8~10μl PCR 产物, 加等量 SSCP 变性剂, 置沸水中变性 10 分钟后, 立即置冰浴中 10 分钟后上样。制备 6~8% 聚丙烯酰胺凝胶(49:1), 0.5×TBE 缓冲液, 电压 80~140V, 室温下或 4℃电泳 6~16 小时。揭胶, 银染。

## 2 结果与讨论

本实验共检测了 27 例标本, 其中 24 例傣族 G6PD 缺乏症男性患者, 2 例女性携带者。分别检出 1376 G→T 突变 5 例, 1388 G→A 突变 17 例及 392 G→T 突变 1 例(图 1、2)。用第 6 外显子错配引物扩增, *AluI* 酶切分析, 发现 4 号标本在 120 bp 处多 1 条带, 但与 487 G→A 突变不符, 故定为未知突变。此外, 19 号标本经 PCR-SSCP

分析, 发现有单链快泳带, 12 号标本又多 1 条单链电泳带, 均定为未知突变, 待测序后证实是否为新的突变。

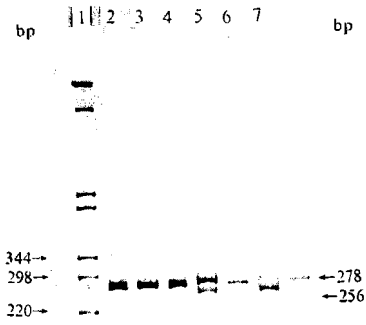


图 1 1388 突变的 *NdeI* 酶切图谱  
 1. 1kb Ladder 标准; 2. 正常未经酶切对照; 3. 正常酶切对照; 4. 1388 突变携带者未酶切对照; 5. 1388 突变携带者经 *NdeI* 酶切, 出现 278bp、22bp 和 256bp 3 个片段; 6. 1388 突变未酶切对照; 7. 1388 突变经 *NdeI* 酶切, 278bp 片段被切成 22bp 和 256bp 两个片段。

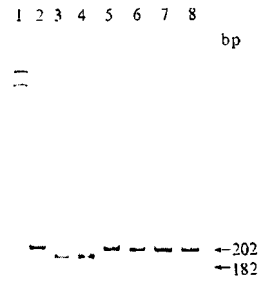


图 2 392 突变的 *BstEII* 酶切图谱  
 1. 1kb Ladder 标准; 2. 正常未酶切对照; 3~4. 正常酶切对照, 202bp 片段被 *BstEII* 切成 182bp 及 20bp 片段(20bp 片段已出胶); 5~8. 为 392 突变, *BstEII* 酶切点消失, 202bp 片段经酶切后仍为 202bp 片段。

基因突变时, 单个碱基的突变可出现不同的单链构象。进行中性聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 这种不同的单链构象可改变电泳迁移率。在筛查各外显子后, 可对有改变的外显子测序以发现未知突变。这是目前 G6PD 基因突变型鉴定的捷径。本文用此法筛查出 23 例已知突变, 初步确定 3 例未知突变所在的外显子。本文首次在傣族中发现 G6PD 基因 nt1376 G→T、nt1388 G→A 及 nt392 G→T 3 种突变型, 在这 3 种 G6PD 基因突变中, 1388 和 1376 突变是中国人及华裔最常见的两种突变<sup>(2,4,5,6)</sup>。同时也见于东南亚的老挝、越南及新加坡人, 但目前尚未在白人及黑人中发现。说明这两种突变可能源于共同的祖先, 华人与东南亚人种密切相关。傣族居住区与东南亚国家接壤, 边民通婚, 故对傣族 G6PD 基因突变型的研究有助于了解东南亚国家人种与我国人种之间的关系。杨明等曾在贵州汉族、仡佬族、水族等民族中发现这两种突变型<sup>(3)</sup>, 现又在傣族中发现, 提示这些民族可能具有基因交流或出于同一渊源。

本实验检出傣族人中的 G6PD 突变型的构成比为: 1376 突变 20.8%(5/24), 1388 突变 62.5%(15/24), 392 突变 4.2%(1/24)(其中有一家系为 1388 突变, 两兄弟及母亲仅取 1 例计算, 故傣族经统计的总例数为 24 例), 未知突变 12.5%(3/24)。虽例数较少, 但可大致看出 1388 和 1376 突变为傣族多见的 G6PD 基因突变型。傣族中 1376 突变占 20.8%, 低于台湾人(50%), 但与广东(28%)、广西(25%)及新加坡人(24%)接近<sup>(4-6)</sup>; 傣族中 1388 突变占 62.5%, 高于广东(27.8%)、广西(16.1%)、新加坡(21%)及台湾人(21.3%)。这或可说明, 最初迁入傣族聚居地区的居民可能较多具有 1388 突变, 经过长期的隔离繁殖, 形成现在的高频率 1388 突变。

### 参 考 文 献

- 1 杜传书, 芮琳. 筛选红细胞葡萄糖 6 磷酸脱氢酶缺乏症的四氮唑蓝纸片法. 新医学, 1981, 12: 86
- 2 Chang-J G, Chiou-S S, Perng-L I, et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency by natural and amplification created restriction sites: Five mutations account for most G6PD deficiency in Taiwan. Blood, 1992, 80: 1079
- 3 杨明, 杜传书. 贵州省黔西县葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变型研究. 中华血液学杂志, 1996, 17(4): 188
- 4 杜传书, 曹乐冬, 赵崇义等. 中国人中所见的六种葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因的点突变. 中华血液学杂志, 1993, 14: 95
- 5 谢建生, 龙桂芳, 蒋南华等. 两种常见葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测及临床分析. 中华血液学杂志, 1995, 16: 179
- 6 Yang C C, Hung Y M, Tan L K, et al. Study of the common southern Chinese glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Singapore and Taiwan. Clin. Biochem. Revs., 1993, 14: 281

1996-09-09 收稿, 1996-12-20 修回.