

云南阿昌族 G6PD 基因突变 G487A 在 DF213 中的表达

杨银峰^{1*}, 朱月春^{1*}, 李鸿钧², 李治纲¹, 吕会茹¹
李丹怡¹, 崔映波¹, 冯维杨¹, 余果宇¹, 黄尤光¹

(1. 昆明医学院生化教研室, 昆明 650031; 2. 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650018)

摘要: 为获得阿昌族 G6PD^{WT} 和 G6PD^{G487A} 重组蛋白, 研究 G6PD^{G487A} 的结构和功能改变, 从云南省德宏州梁河县杞木寨乡湾中村阿昌族聚集地的 G6PD 缺陷家系先证者和正常阿昌族个体全血提取 RNA, 经 RT-巢式 PCR 得 cDNA, 将 cDNA 克隆至 pMD18-T simple 载体中并测序; 错配碱基经定点突变修复后, 目的基因亚克隆至 pThioHis(A)载体, 构建了阿昌族 G6PD 基因野生型和 G487A 突变型原核表达载体: pThioHis(A)-AChang-G6PD^{WT} 和 pThioHis(A)-AChang-G6PD^{G487A}。用重组质粒转化 *E.coli* Competent Cells DF213 (G6PD deficiency), 经 IPTG 诱导 G6PD 表达, 10% SDS-PAGE 电泳检测表达蛋白和紫外 340 nm 定量测定 G6PD 活性的分析表明, pThioHis(A)-AChang-G6PD^{WT} 和 pThioHis(A)-AChang-G6PD^{G487A} 在 DF213 中成功表达, 分子量约为 59 kDa。IPTG 诱导 0、3、6、9、和 12 h 后, G6PD 活性逐渐增高, G6PD 基因 WT 表达的酶活性约是 G487A 的 20~25 倍。表达载体的构建以及 G6PD cDNA 在 DF213 中成功表达, 为重组酶 G6PD^{G487A} 的进一步研究奠定了基础。

关键词: 阿昌族; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 基因; 表达载体

中图分类号: Q786

0 引言

G6PD (EC 1.1.1.49) 是磷酸戊糖途径的限速酶, 催化 6-磷酸葡萄糖生成 6-磷酸葡萄糖酸内酯, 同时生成 NADPH。NADPH 不仅是体内多种物质合成的供氢体, 也可维持谷胱甘肽的还原状态, 保护红细胞免遭破坏^[1]。G6PD 缺陷是人类最常见的遗传缺陷病之一^[2], 世界范围内患病人数超过 4 亿多, 患者常常在服用蚕豆、药物或感染等诱因的作用下产生急性溶血, 新生儿常伴有核黄疸, 带来严重后果^[3]。G6PD 基因位于 Xq2.8, 全长 18.5 kb, 有 13 个外显子, 其 cDNA 为 1 548 bp。基因点突变是引起 G6PD 缺陷的主要原因, 并且具有民族和种族异质性的特点。至今, 世界范围内已发现 G6PD 基因突变 150 多种^[4]。我国已报道的 21 种突变来自于汉族、傣族、白族、基诺族和彝族等民族^[5]。今天, 人们普遍接受 G6PD 缺陷高发是疟疾阳性选择的结果这一观点^[6]。云南省德宏州梁河县杞木寨是阿昌族聚居地, 也是疟疾高发流行区, 研究这一地区阿昌族 G6PD 缺陷的发病及其特征, 不仅对我国群体遗传学、人类学、民族渊源和变迁有重要意义, 还可指导疟疾的治疗用药。我们首次对这一阿昌族群体进行 G6PD 缺陷的研究, 发现 G6PD 基因 G487A 突变高发 (数据将另文报道),

G6PD 基因 cDNA 487G→A, 则 163 位氨基酸由甘氨酸 (Gly) 变为丝氨酸 (Ser) 后酶活性降低。鉴于目前国内外对 G487A 突变引起 G6PD 缺陷的机理、突变酶的动力学特征及结构研究较少, 我们构建了阿昌族 G6PD 的 cDNA 野生型和 G487A 突变型表达载体并在 DF213 中成功表达, 为进一步研究 G487A 突变酶的结构和功能改变及其与临床表型的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

云南省德宏州梁河县杞木寨乡湾中村阿昌族聚居地的一个 G6PD 缺陷家系成员五人和正常无关阿昌族个体五人, 五代均系阿昌族。先证者: 女, 14 岁, 曾于 2 岁半时进食蚕豆后发生急性溶血, 皮肤黄染, 病史资料显示: Hb: 58 g/L; RBC:

收稿日期: 2007-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30460049)

通讯作者: 朱月春, 电话: (0871)5338911,

E-mail: yzh399@yahoo.com

* 共同第一作者

2.5×10¹² / L; 输血后逐渐缓解。

1.1.2 菌种及质粒

JM109 购自 TaKaRa 公司, G6PD 缺陷菌株 DF213 由 Yale University 的 *E.coli* Stock Centre 赠送。载体 pMD18-T simple 和 pMD19-T simple 购自 TaKaRa 公司, pThioHis (A) 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 试剂

DNA 提取试剂盒购自 Gentra 公司, RNA 提取试剂盒购自 Molecular Research Center, INC 公司; *LA Taq*TM DNA Polymerase、Pyrobest DNA Polymerase、M-MLV、Ligation Kit、Agarose Gel DNA Purification Kit、a MiniBEST Plasmid Purification Kit、DNA A-Tailing Kit 以及 *EcoR* I、*Xho* I、*Kpn* I、*Sac* I 和 *Nde* I 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 G6PD 缺陷的确诊

NBT (Nitroblue tetrazolium, 四氮唑兰) 纸片

法筛查结合紫外法在 340 nm 定量测定 G6PD 活性^[9]。1 U 定义为每 mg Hb 在 1 min 还原 NADP⁺ 生成 1 nmol NADPH 的酶量。

1.2.2 引物的设计与合成

据 GenBank 中 (NM_000402) 人 G6PD 基因序列, 用 DNASTar 设计克隆和表达所需引物 (表 1), 并由 TaKaRa (大连) 公司合成。

1.2.3 DNA 和 Total RNA 的提取

取静脉血经 EDTA 抗凝后分两份, 其一用于提取 DNA, 其二储存于 TRI Reagent BD, 用于提取总 RNA, 均按试剂盒说明操作。

1.2.4 PCR 扩增 G6PD 缺陷者的 G6PD 基因外显子

外显子 2-13 的扩增方法参照文献^[7], 外显子 6 的 PCR 条件是 94℃ 2 min, 94℃ 30 s→60℃ 30 s→72℃ 1 min, 共 30 个循环, 然后 72℃ 10 min 延伸。外显子 2-13 的 PCR 产物经 Agarose Gel DNA Purification Kit 回收纯化后, 用 ABI PRISMTM 3730XL DNA Sequencer 进行双向测序。

Table 1 Primers of AChang people G6PD cDNA clonig and expression

Primers	Sequences of primers
RT-Nest PCR	R1: 5'-CTCGAGAGTAGCAGCAGCGAGGGGCG-3' F1: 5'-GAATTCGCGGAGGGGCGACGACGACGAA-3' F: 5'-ATGAATTCATGGCAGAGCAGGTGGC-3' R: 5'-AGCTCGAGTCAGAGCTTGTGGGGTTCA-3'
Sequencing	M13-47: 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' RV-M: 5'-GAGCGATAACAATTTACACAGG-3' F2: 5'-CTGGAACCGCATCATCGTGGAGAA-3'
Site-mutation	F01: 5'-GTACCTGGACGACCCACGGTGCCCCG C-3' R01: 5'-CCGCTCGAGTCAGAGCTTGTGGGGTTACCCACTT GTAGGTGCCTCATACTGGAACCCACTCT C-3' R02: 5'-CCGTGGGGTTCGTCACAGTACCCTTTGGTG-3' R03: 5'-AAA ATACGCCAGGCCTCACGGAGCTCGTCGC-3'
Sub-cloning	F02: 5'-CATATGATGGCAGAGCAGGTGGC-3'

1.2.5 RT-巢式 PCR 获取 G6PD cDNA

RNA 65℃ 5 min 变性后, 使用 M-MLV 反转录酶, 以特异性下游引物 (表 1-R1) 为反转录引物, 42℃ 30 min 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 用 *LA Taq*TM DNA Polymerase, F1/R1 引物 (表 1), 经 94℃ 10 min, 94℃ 30 s→55℃ 30 s→72℃ 1.5 min, 共 30 个循环, 然后 72℃ 10 min 延伸。再以 PCR 产物为模板, 引物 F/R (表 1) 进行二次 PCR, 回收纯化 PCR 产物, 琼脂

糖凝胶电泳鉴定。

1.2.6 cDNA 的克隆及鉴定

用 Ligation Kit 连接 PCR 产物与 pMD18-T simple, 转化 *E.coli* Competent Cells JM109, 涂布平板过夜培养菌体后, 各挑选 3~4 个菌落, 用 a MiniBEST Plasmid Purification Kit 提取质粒, *EcoR* I / *Xho* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测。对阳性克隆用引物 M13-47、RV-M 和 F (表 1) 测序, 拼接后与 Genebank (Accession NM_000402)

的人正常 cDNA 序列比对。

1.2.7 定点突变修复错配碱基

利用定点突变技术将阳性克隆中可引起 G6PD 蛋白氨基酸改变的错配碱基进行修复 (除 G487A 外)。WT 错配碱基的修复: 以 G487A-3 质粒为模板, F2/R02 和 F01/R03 为引物进行 PCR, 得产物 I 和 II; 再以产物 I 和 II 为模板, F2/R03 为引物再次 PCR, 得产物 III, 纯化后经 *Sac* I 酶切得 Insert DNA-1。同时, *Sac* I 酶切 WT-2 质粒, 得 Vector DNA-1, 连接 Insert DNA-1 和 Vector DNA-1, 转化 JM109 并过夜培养, 挑取单菌落, 以 F01/M13-47 为引物进行 PCR 扩增以检测插入片段, 对阳性克隆测序。G487A 错配碱基的修复: 以 G487A-3 质粒为模板, F01/ R01 引物进行 PCR, *Kpn* I/*Xho* I 酶切 PCR 产物得 Insert DNA-2。同时, *Kpn* I/*Xho* I 酶切 G487A-3 质粒得 Vector

DNA-2。连接 Insert DNA-2 和 Vector DNA-2, 转化 JM109 并培养菌体。挑取单菌落, 以 F01/M13-47 为引物进行 PCR 检测插入片段, 对阳性克隆测序。

1.2.8 cDNA 的亚克隆

分别以修复错配碱基后的 WT 和 G487A 质粒为模板, F02/R 为引物, 用 Pyrobest DNA Polymerase 扩增 cDNA; 产物经 DNA A-Tailing Kit 处理后与 pMD19-T simple 连接, 转化 JM109、培养菌体。挑选单菌落, *Nde* I/*Xho* I 酶切质粒 DNA; 对阳性克隆测序。用 *Nde* I/*Xho* I 对序列正确的质粒及 pThioHis (A) 载体进行酶切, 连接, 转化 JM109、培养菌体。挑选单菌落, *Nde* I/*Xho* I 酶切和测序检测, 阳性即为构建的表达载体: pThioHis(A)-AChang-G6PD^{WT} 和 pThioHis (A)-AChang-G6PD^{G487A} (图 1)。

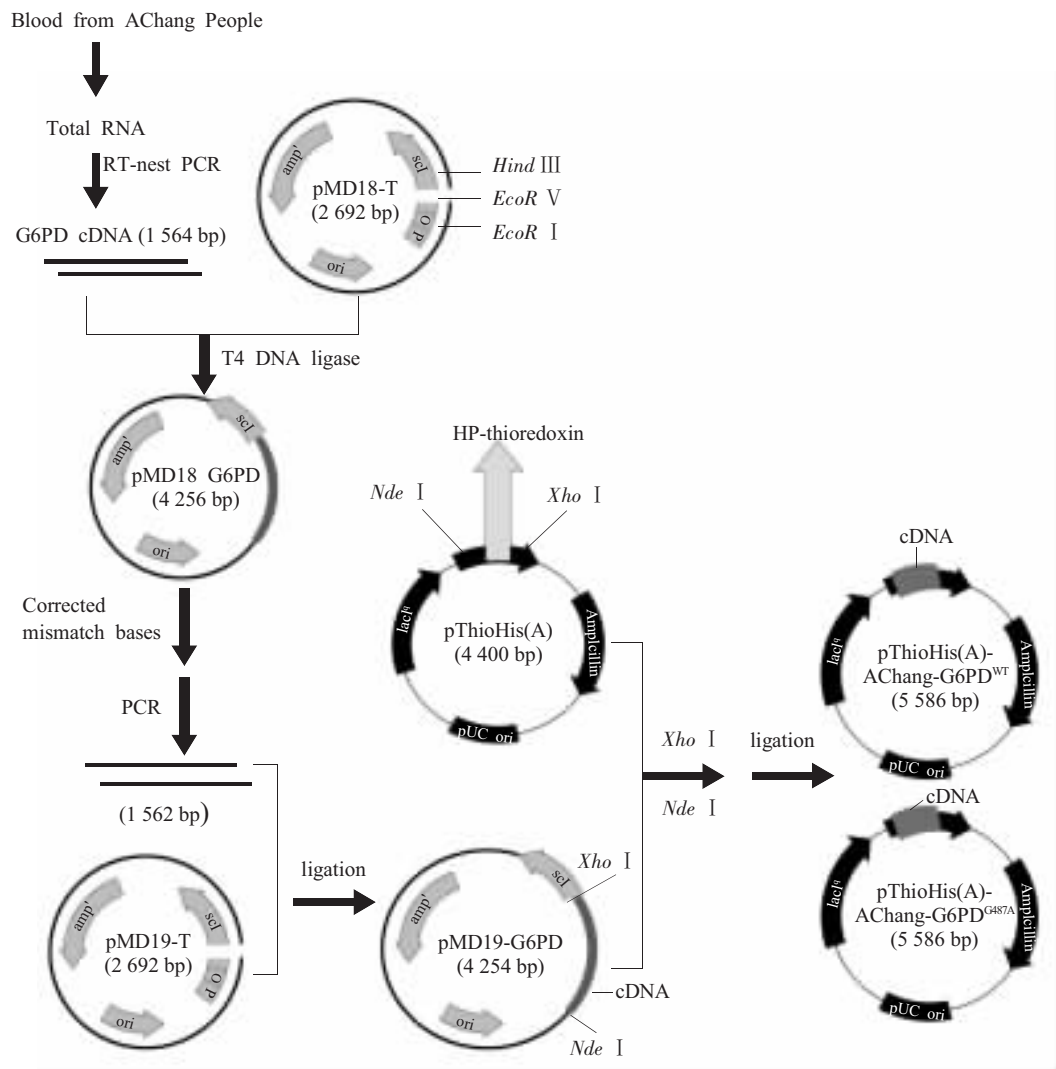


Fig.1 Construction of AChang people G6PD cDNA expression vector

1.2.9 G6PD^{WT} 和 G6PD^{G487A} 在 DF213 的表达

用含 WT 和 G487A cDNA 的重组子转染 G6PD 缺陷菌株 DF213, 过夜培养, 经 1 nmol IPTG 诱导 0、3、6、9 和 12 h 后, 超声破菌, 4°C 6 000 r/min 离心 15 min, 10% SDS-PAGE 检测上清和沉淀中表达蛋白。同时, 通过测 340 nm 的吸光度得 NADPH 的产量推算 G6PD 活性^[8]。1 U 定义为每 mg 蛋白在 1 min 还原 NADP⁺ 生成 1 nmol NADPH 的酶量。总蛋白定量按 Bradford 法进行^[9]。

2 结 果

2.1 G6PD 活性

家系成员五人的 NBT 纸片阳性; 先证者及父母 G6PD 活性分别为 0.515、0.932 和 3.078 nmol/(min·mg) Hb; 两个妹妹为 1.466 和 2.342。本实验室的正常值大于 5.5 nmol/(min·mg) Hb。

2.2 G487A 突变的证实

PCR 扩增家系成员 (图 2A) G6PD 基因外显

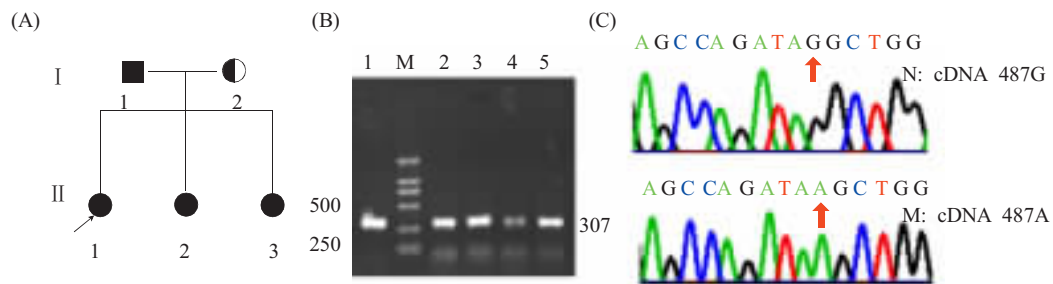


Fig.2 Identification of G6PD G487A mutation in AChang family. (A) Pedigree of AChang family. (B) PCR of exon 6 in G6PD gene. M: Marker DL2000; 1~5: Members of AChang family. (C) Sequencing of exon 6 from PCR product. N: Partial sequences of WT cDNA. M: Partial sequences of G487A mutation

子 2-13, 图 2 B 为外显子 6 的 PCR 扩增产物 307 bp; 回收纯化后的 PCR 产物经测序证实位于外显子 6 的 cDNA 487 位的 G→A, 导致 G6PD 163Gly→Ser (图 2C)。其余外显子均无碱基异常。

2.3 G6PD^{WT} 和 G6PD^{G487A} cDNA 的克隆及鉴定

从先证者和正常阿昌族个体的血总 RNA, 经 RT 巢式 PCR 后得 1 564 bp 的扩增产物 (包括 1 548 bp 的 cDNA 和内切酶位点, 图 3A)。将其与 2 692 bp 的 pMD18-T simple Vector 连接, *EcoR* I /*Xho* I 酶切转化菌 DNA, WT-2 克隆

(图 3B-2) 和 G487A-3 克隆为阳性重组体, 酶切得载体和目的基因片段 (图 3B-3)。测序结果与正常人 cDNA (GenBank accession No. NM_000402) 比对后, 发现 WT-2 克隆有三个碱基错配: 617 bp A→G (Glu 206→Gly)、904 bp A→G (Asn 302→Asp) 和 1 010 bp T→C (Phe 337→Ser) (图 4-1,2,3)。G487A-3 克隆有二个碱基错配: 976 bp C→A (Pro 326→Thr) 和 1 504 bp C→T (Gln 502→stop codon) (图 4-4,5)。

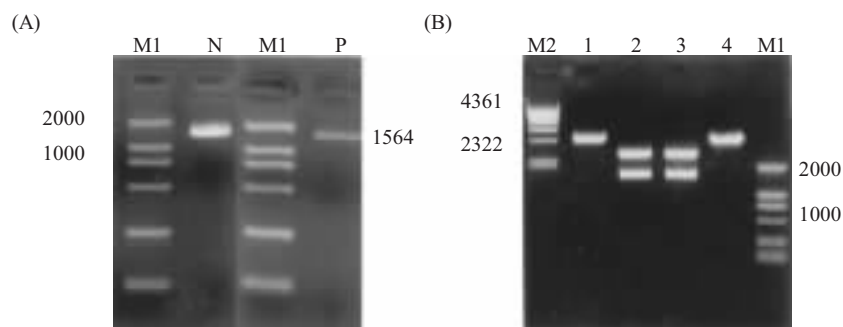


Fig.3 Cloning and identification of G6PD WT and G487A. (A) Amplification of G6PD cDNA with RT-nest PCR. N: Normal subject; P: Patient; M1: DNA Marker DL2.000. (B) Restriction digestion of recombinant DNA. 1, 4: Without restriction digestion; 2, 3: Digestion of *EcoR* I /*Xho* I; M2: λ -HindIII DNA Marker

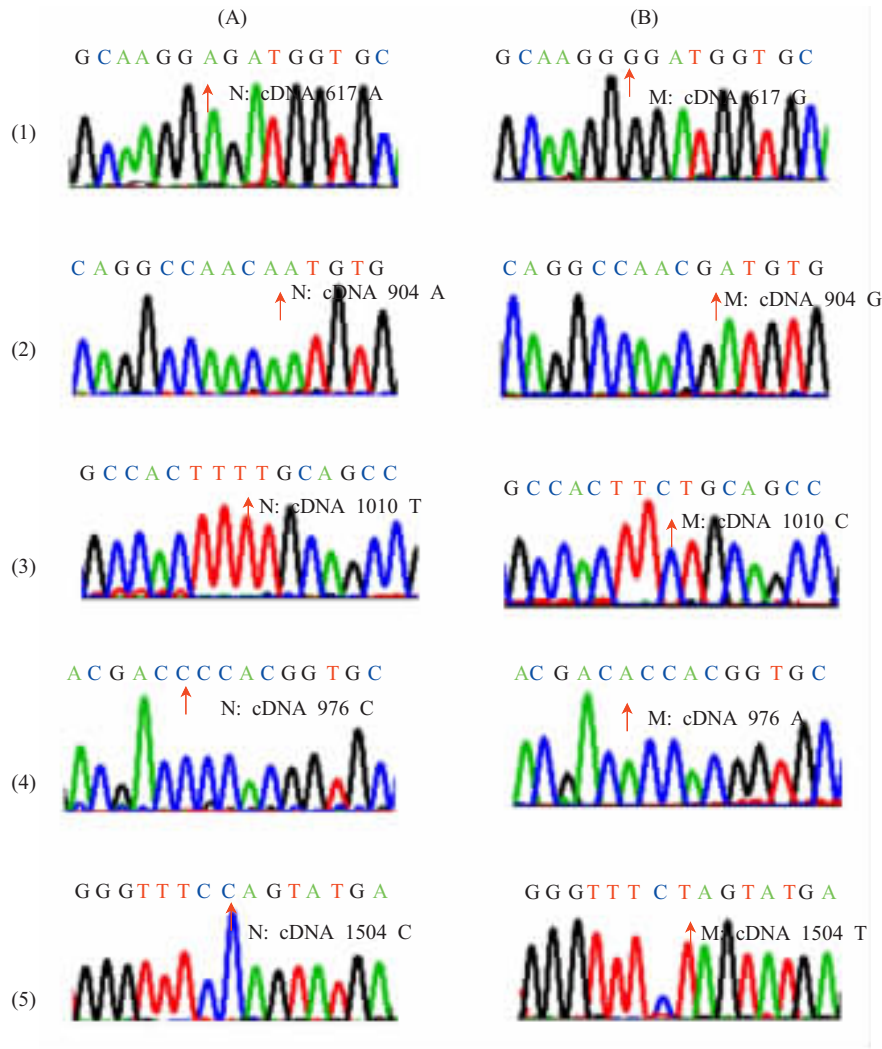


Fig.4 Mismatch bases of G6PD cDNA clonings. (A) Partial sequences of normal human G6PD cDNA. (B) Mismatch bases of cDNA clonings; 1~3: Mismatch bases of WT-2 cloning; 4, 5: Mismatch of bases of G487A-3

2.4 定点突变修复错配碱基

WT 错配碱基的修复: F2/R02 和 F01/R03 两对引物分别扩增 G487A-3 质粒, 得产物 I 和 II (图 5A-1、2 和 A-3、4)。再以 I 和 II 为模板, F2/R03 引物进行 PCR, 得产物 III 1 023 bp (图 5B-1、2)。回收纯化 III 经 *Sac* I 酶切得 Insert DNA-1 948 bp (图 5C-1)。连接 Insert DNA-1 与载体 DNA-1, 转化培养 JM109, 以 F01/M13-47 引物扩增单菌落 DNA, 阳性克隆 3 和 4 含 Insert DNA-1 (图 5D-3、4)。测序证明错配碱基 617 bp A→G、904 bp A→G 和 1 010 bp T→C 均已修复, 此质粒为 WT-3。G487A 错配碱基的修复: F01/R01 引物扩增 G487A-3 质粒得 596 bp 的产物 (图 5E-1、2), 经 *Kpn* I /*Xho* I 酶切得 583 bp 片段称 Insert DNA-2 (图 5F-1)。经 F01/M13-47 引物扩增, 阳性克隆

含 Insert DNA-2 (图 5G-1、3)。测序证明错配碱基 976 bp C→A 和 1504 bp C→T 已修复, 此质粒为 G487A-4。

2.5 cDNA 的亚克隆

以 WT-3 和 G418A-4 为模板, F02/R 为引物扩增 cDNA 得 1 562 bp 片段 (图 6A); 将其与 pMD19-T simple 连接、转化培养 JM109, 提取单菌落 DNA (图 6B-1、2), *Nde* I /*Xho* I 酶切得阳性克隆 (图 6C-1、2), 序列经测序证明。*Nde* I /*Xho* I 酶切阳性克隆 (图 6D-1) 和 pThioHis(A) (图 5D-2); 连接两者酶切片段、转化培养 JM109, 提取质粒 DNA (图 6E-1、2); 经 *Nde* I /*Xho* I 的再次酶切可知二者为构建的表达载体 (图 6F-1、2), 分别命名为 pThioHis(A)-AChang-G6PD^{WT}、pThioHis(A)-AChang-G6PD^{G487A}。

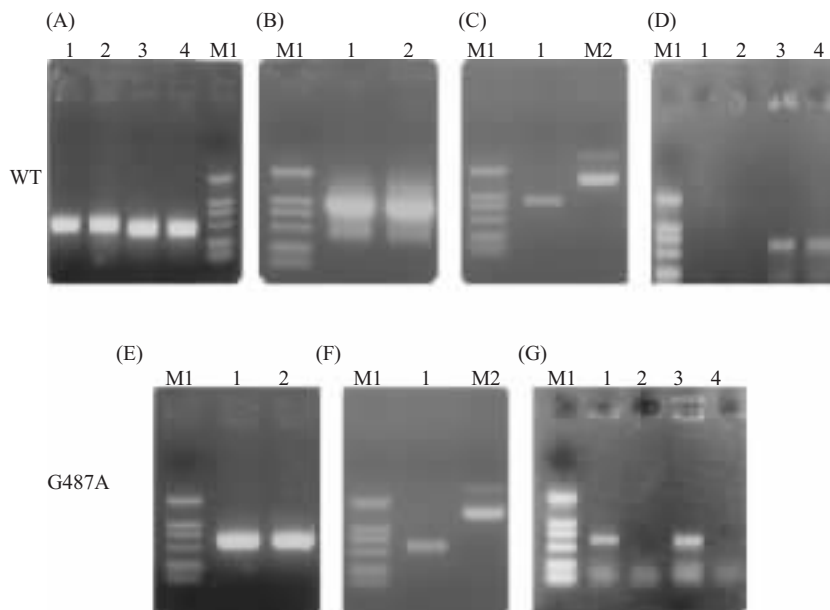


Fig.5 Mismatch bases in cDNAs were corrected by site-mutation. (A) Fragments I (1,2) and II (3,4) were obtained by amplification plasmid G487A-2 with F2/R02 and F01/R03, respectively; (B) Fragments III (1,2) were obtained by amplification I and II with F2/R03; (C) Insert DNA-1(1) was obtained by *Sac* I digestion Fragments III; (D) Positive recombinants (3,4) were identified after ligation Insert DNA-1 and vector; (E) Fragments IV (1,2) were obtained by amplification plasmid G487A-2 with F01/R01; (F) Insert DNA-2(1) was obtained by *Kpn* I/*Xho* I digestion fragments IV; (G) Positive recombinants(1,3) were identified after ligation Insert DNA-2 and vector

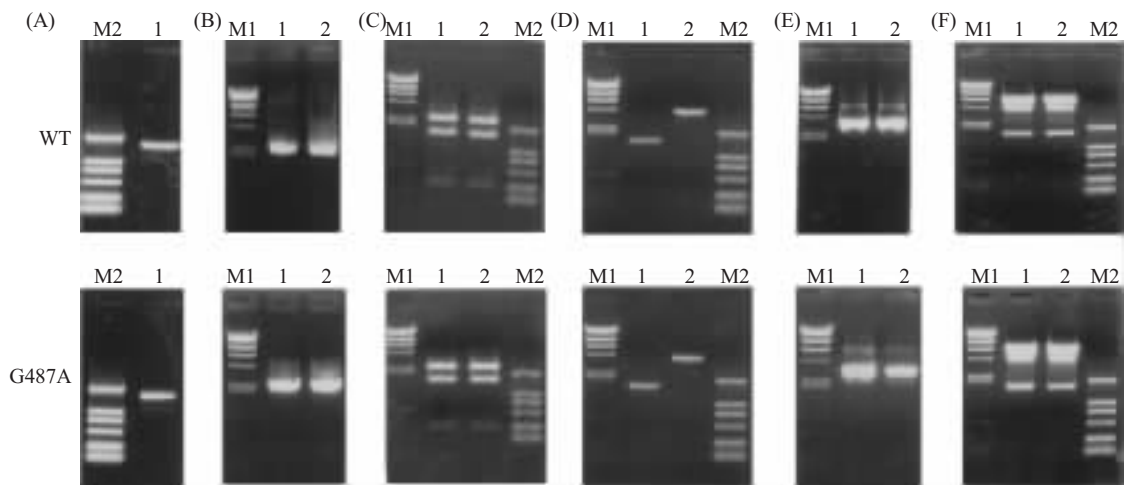


Fig.6 Sub-cloning of G6PD WT and G487A. (A) cDNAs were obtained by amplification plasmid WT-3 and G487A-3 with F2/R02, respectively; (B) Ligation and identification of cDNA and pMD19-T simple (B1,2); (C) The recombinants were digested with *Nde* I/*Xho* I (C1,2); (D) Positive recombinants and pThioHis(A) were digested with *Nde* I/*Xho* I, respectively (D1 and D2); (E) Recombinants were obtained by Ligation of cDNA and pThioHis(A) (E1,2); (F) cDNAs were obtained again by digestion positive recombinants with *Nde* I/*Xho* I (F1,2)

2.6 G6PD^{WT} 和 G6PD^{G487A} 在 DF213 的表达

经 10% SDS-PAGE 检测表达的 G6PD 蛋白, 分子量约为 59 kDa (图 7A); IPTG 诱导 0、3、6、9 和 12 小时后, G6PD 活性呈增加趋势, G6PD^{WT}

在 73.3~355.7 nmol/min·mg 之间, 而 G6PD^{G487A} 活性在 2.7~32.5 nmol/min·mg, 前者约是后者的 20~25 倍 (图 7B)。其结果为 $m \pm s$, 来自于三次独立实验。

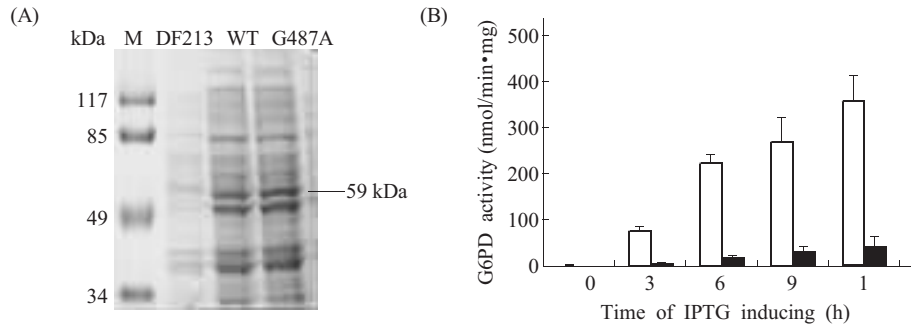


Fig.7 Expression of G6PD^{WT} and G6PD^{G487A} in DF213. (A) G6PD expressions were checked by 10% SDS-PAGE after IPTG inducing 12 h; (B) G6PD activities were assayed after IPTG inducing 0, 3, 6, 9 and 12 h. These results represent three independent experiments with $m \pm s$

3 讨 论

Vulliamy 首先报道两例 G6PD Mahidol G487A (Gly 163 Ser) 突变, 发生在 G6PD 基因外显子 6, 在东南亚某些地区此突变可达 15%^[10]。在缅甸的疟疾高发区, G487A 突变占 G6PD 突变的 91.3% (73/80)^[11]。泰国不同地区的 G487A 突变在 8%~17.2%^[12,13]。我国已发现的 18 例 G6PD Mahidol 均在云南, 包括汉族 7 例、白族 7 例和傣族 4 例^[14,15]。云南省德宏州梁河县杞木寨湾乡中村阿昌族的 G6PD 缺陷以 G487A 为最主要突变 (数据将另文报道), 这与我国其他民族以 G1388A 和 G1376T 为主要突变的报道明显不同^[16]。

G6PD Mahidol 突变位于基因外显子 6 的第二个碱基 G→A (在 cDNA 的 487 位), 导致酶蛋白的 163 Gly→Ser。G6PD 163 Gly 的保守分数约为 0.7, 临床分类可为 I 型或 III 型, 即酶活性可为重度或轻度缺陷^[7], 机理尚不清楚。G6PD 163 Gly 紧接 β 片层 E (Trp₁₆₄-Asn₁₆₅-Arg₁₆₆-Leu₁₆₇-Ileu₁₆₈-Val₁₆₉) 的起始端^[18], 而 E 片层接近辅酶 NADP⁺ 结合位点^[19], 推测可能 163 Gly 变成 Ser 后, 通过影响 G6PD 与 NADP⁺ 的结合, 而使酶活性降低。与此相反, Tang 等认为 163 Gly 靠近底物 G6P 结合位点, 当 Gly 变成 Ser 后, 通过影响 G6PD 与 G6P 的结合来降低酶活性^[20], 这有待于进一步从结构上进行分析。可以推测当 Ser 较大的 R 基团 (HO-CH₂-) 取代了 Gly 的 R 基团 (H-) 后, 极性增加和空间位阻加大, 可影响 β 片层 E 的形成与稳定, 进而影响与 NADP⁺ 或 G6P 的结合, 最终面向活性中心的保守区极性增加, 可能影响酶的活性位点 198~206 九肽 (Arg-Ile-Asp-His-Tyr-Leu-Gly-

Lys-Glu) 的空间构象^[18]。

阿昌族先证者的 G6PD 活性为正常阿昌族的 9.3% 并伴有溶血发生, 属临床分类的 II 型, 基因突变为 G487A。而我国已报道的 18 例 G6PD G487A 均属临床 III 型 (即酶活性为正常的 10%~60%, 无溶血发生)^[14,15]。可见, G487A 突变具有临床表型的多样性。为了进一步理解 G6PD^{G487} 突变发生机制及其结构、功能与临床表型的关系, 以及突变酶的动力学特征, 也为了明确为什么 G487A 突变在阿昌族群体中被选择保留下来, 我们从阿昌族先证者和正常阿昌族个体的全血 RNA 调取 G6PD cDNA, 克隆到 pMD18-T simple 载体, 在 PCR 引物中引入 *Nde* I / *Xho* I 酶切位点, 切除 pThioHis(A) 载体中的标签蛋白约 150 个氨基酸, 构建成 G6PD “native protein” 表达载体 pThioHis(A)-AChang-G6PD^{WT} 和 pThioHis(A)-AChang-G6PD^{G487A}。同时, 选用 G6PD 缺陷的 *E.coli* DF213 作为表达菌株, 排除了内源性 G6PD 的干扰, 因 G6PD 基因为看家基因, 在所有组织和细胞中表达。所得表达蛋白是重组 “native protein”, 对进行重组酶 G6PD^{G487A} 的分离纯化、动力学参数和功能研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J*, 1995,14(21):5209~5215
- [2] Beutler E. G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev*, 1996,10(1):45~52
- [3] Sodeinde O. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Clin Haematol*, 1992,5(2):367~382
- [4] Kotaka M, Gover S, Vandeputte-Rutten L, Au SW, Lam VM,

- Adams MJ. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP(+) binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005,61 (Pt5): 495~504
- [5] Jiang WY, Yu GL, Liu P, Geng Q, Chen LM, Lin QD, Ren XQ, Ye WH, He YS, Guo YB, Duan S, Wen J, Li HY, Qi Y, Jiang CG, Zheng YM, Liu C, Si E, Zhang Q, Tian QH, Du CS. Structure and function of glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population. *Hum Genet*, 2006,119(5):463~478
- [6] Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZ, Richter DJ, Schaffner SF, Gabriel SB, Platko JV, Patterson NJ. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature*, 2002,419(6909):832~837
- [7] Bruggen TV, Bautista JM, Petropoulou T, Boer MD, Zwieten RV, Gomez-Gallego F, Belohradsky BH, Hartwig NG, Stevens D, Mason PJ, Roos D. Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate dehydrogenase leads to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood*, 2002,100(3):1026~1030
- [8] Stanton RC, Seifter JL, Boxer DC, Zimmerman E, Cantley LC. Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. *J Biol Chem*, 1991,266 (19): 12442~12448
- [9] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976,72(3):248~254
- [10] Vulliamy TJ, Wanachiwanawint W, Mason PJ, Luzzatto L. G6PD Mahidol, a common deficient variant in South East Asia is caused by a (163)glycine-serine mutation. *Nucleic Acids Research*, 1989,17(4):5868
- [11] Matsuoka H, Wang J, Hirai M, Arai M, Yoshida S, Kobayashi T, Jalloh A, Lin F, Kawamoto F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Myanmar: G6PD Mahidol (487G>A) is the most common variant in the Myanmar population. *J Hum Genet*, 2004,49(10):544~547
- [12] Laosombat V, Sattayasevana B, Janejindamai W, Viprakasit V, Shirakawa T, Nishiyama K, Matsuo M. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in the south of Thailand and identification of a novel variant (G6PD Songklanagarind). *Blood Cells Mol Dis*, 2005,34(2):191~196
- [13] Nuchprayoon I, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. *Human Mutation*, 2002,19(2): 185~190
- [14] 杨昭庆, 褚嘉佑, 班贵宏, 黄小琴, 许绍斌, 李梅章. 云南籍 G6PD 缺乏症病例的基因型分析. *中华医学遗传学杂志*, 2001,18(4):259~263
- [15] 蒋玮莹, 杜传书, 陈路明, 国茹琴, 卢桂森, 段山, 林群娣. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 G487A 突变型研究. *中华血液学杂志*, 1999,20(10):518~520
- [16] Jiang WY, Chen LM, Lin QD, Geng Q, Du C. Denaturing high-performance liquid chromatography technique platform applied to screen G6PD deficient variants. *Clin J Mod Genet*, 2005,22(6):607~611
- [17] Cheng YS, Tang TK, Hwang MJ. Amino acid conservation and clinical severity of human glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. *J Biomed Sci*, 1999,6(2):106~114
- [18] Naylor CE, Rowland P, Basak AK, Gover S, Mason PJ, Bautista JM, Vulliamy TJ, Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. *Blood*, 1996,87(7):2974~2982
- [19] Au S, Gover S, Lam V, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 2000,8(3):293~303
- [20] Tang KT, Yeh CH, Huang CS, Huang MJ. Expression and biochemical characterization of human glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: A system to analyze normal and mutant enzymes. *Blood*, 1994,85(5):1436~1441

EXPRESSION OF G6PD GENE G487A MUTATION IN DF213 FROM ACHANG PEOPLE OF YUNNAN

YANG Yin-feng^{1*}, ZHU Yue-chun^{1*}, LI Hong-jun², LI Zhi-gang¹, LU Hui-ru¹, LI Dan-yi¹,
CHUN Ying-bo¹, FENG Wei-Yang¹, YU Guo-yu¹, HUANG You-guang¹

(1. Department of Biochemistry, Kunming Medical College, Kunming 650031, China;

2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650018, China)

Abstract: In order to get the recombinant protein of G6PD^{WT} and G6PD^{G487A} and study the changes on the structure and function of G6PD^{G487A} in AChang People, full-length cDNA coding human G6PD gene was obtained by RT-nest PCR from the proband of G6PD deficiency and normal subject in AChang people. G6PD cDNAs were cloned into pMD18-T simple vector and the mismatch bases were corrected by using the site-mutation technique; Then cDNA were sub-cloned into the expression vector pThioHis(A) and expressed in *E.coli* DF213 (G6PD deficiency). 10% SDS-PAGE electrophoresis analysis showed that the expressional G6PD native protein molecular mass was about 59 kDa. G6PD activity increased gradually after 0, 3, 6, 9 and 12 hours of IPTG induction by monitoring the rate of reduction of NADP⁺ to NADPH at 340 nm spectrophotometrically. G6PD^{WT} activity was about 20~25 times of G6PD^{G487A} activity. In conclusion, the prokaryotic expressional vectors, pThioHis(A)-AChang-G6PD^{WT} and pThioHis(A)-AChang-G6PD^{G487A}, are constructed and expressed in DF213 successfully. It will be helpful for further study of recombinant enzyme with G6PD^{G487A}.

Key Words: AChang people; Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Gene; Expressional vector

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (30460049)

Received: Jan 9, 2007

Corresponding author: ZHU Yue-chun, Tel: +86(871)-5338911, E-mail: yzh399@yahoo.com

* Two authors contribute equally