

中国人凝血因子VIII基因中Hind III/p114.12的RFLP研究

曹 扬 邱信芳 薛京伦

复旦大学遗传学研究所 上海 200433

摘要 本文对22个正常人样品,用限制性内切酶图谱技术进行了VIII因子基因内Hind III/p114.12的RFLP研究。结果表明在中国上海地区人群中,VIII因子的内含子19处存在多态性的HindIII位点,等位片段2.6kb和2.7kb的频率分别为31%和69%。

关键词 人; VIII因子; 限制性内切酶图谱技术

THE STUDY OF HIND III RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM IN COATING FACTOR VIII GENE BY USING P114.12 PROBE

Cao Yang, qiu Xingfang, Xue Jinglun

Institute of Genetics, Fudan University Shanghai 200433

Abstract By using restriction mapping technique, we here studied intragenic restriction fragment length polymorphism of factor VIII gene. The result showed that p114.12 probe which included exon 17 and 18 gave polymorphic Hind III site in intron 19 in Chinese population. The allele fragments were 2.6kb and 2.7 kb, with frequencies 31% and 69% respectively.

key words human; factor VIII; restriction mapping technique

血友病A是由于缺乏凝血因子VIII而导致的1种X连锁隐性遗传病。其发病率在男性中为万分之一⁽¹⁾,是最常见的遗传性凝血障碍疾病。目前尚无有效的治疗方法,只能靠替代疗法暂时缓解症状,因此通过对携带者的检测和产前诊断杜绝这种患儿的出生,对优生优育工作有重要意义。用生化方法检测携带者,常常因其与正常人的数据范围相重叠而无法做出准确的判断。运用重组DNA技术中的限制性内切酶片段长度多态

性(简称RFLP)分析,可对携带者进行检测,同时也可对胎儿进行产前诊断。至今,国外用VIII因子探针在VIII因子基因内已发现了5个多态性位点,它们是BclI、BglI、XbaI、Hind III和MspI⁽²⁻⁶⁾。其中Bcl I与Hind III、Msp I在白种人中呈高度连锁不平衡。而国内对VIII因子基因内RFLP位点的研究报道很少,目前只有沈岩报道过Bcl I位点的研究⁽⁷⁾。本文报道了用含17、18外显子的基因组探针(长0.65kb),检测到19内含子中的Hind III多态性位点,在所研究的上海地区个体样品中,其2.6kb与2.7kb等位片

* 本课题由上海市科学技术发展基金 78631004 资助

段的频率为31%和69%。

材料和方法

1. 材料

1.1 人白细胞浓缩液, 由上海市中心血站提供

1.2 p114.12探针购自美国ATCC(American Type Culture Collection), 插入片段是0.65kb的含VIII因子17,18外显子的基因组片段, 插入位点是PUC12载体的Stu I/Sca I酶切位点。

1.3 Hind III内切酶: 美国New England Biolabs.公司产品。

1.4 硝酸纤维素膜: Schleicher & Schuell公司产品。

1.5 α -³²P-ATP: 英国Amersham公司, 3000 Ci/mmol。

2. 方法

2.1 DNA的提取和限制性内切酶消化

将所采集到的白细胞浓缩液按本室常规方法抽提白细胞DNA。然后按1 μ g DNA对3U酶的比例, 用Hind III消化10 μ g人白细胞DNA。

2.2 消化样品的电泳和Southern转移

将消化后的DNA在0.8%琼脂糖上电泳20h, 电压为1.5V/cm胶。然后进行Southern印迹转移, 24h后将转移好的膜置80℃烘2h。

2.3 探针标记、Southern杂交和放射自显影

用缺口平移法(Nick Translation)标记全长3.0kb的P114.12探针, 然后与Southern转移膜上的DNA杂交。用同位素标记的探针比活为 8×10^7 cpm/ μ g DNA杂交液放射性强度为 2×10^6 cpm/ml。42℃杂交48h, 洗膜, 压片, -40℃放射自显影8d。冲片后, 即得限制性内切酶图谱。

结果和讨论

在所分析的22个个体样品中, 男性12名, 女性10名, 总的X染色体数为32条。其中有22条X染色体的杂交片段为2.7kb, 占69%; 而另10条X染色体的杂交片段为2.6kb, 占31%(见表1)。在女性中预期的杂合频率为 $2 \times 0.31 \times 0.69 = 43\%$ 。在分析的样品中, 发现有1个女性样品在该位点是杂合的, 从图1中可看到她的2.6/2.7kb条带并存(Lane 5)。由此可见, 在中国上海地区人群中也存在Hind III位点的多态性, 且多态性频率31%/69%与白种人中的30%/70%接近。

表 1 中国人中Hind III/p114.12的RFLP分布

等位片段	染色体数	发生频率
A ₁ = 2.6kb	10	31%
B ₂ = 2.7kb	22	69%
总计	32	100%

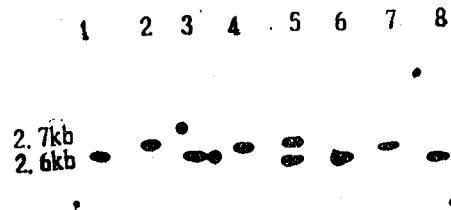


图 1 VIII因子基因组探针p114.12杂交得到的Hind III多态性片段图谱

人白细胞DNA经Hind III消化后, 与p114.12探针Southern杂交后得到的放射自显影图。其中Lane 5是1个多态性片段杂合的女性样品。

在Ahrens⁽⁵⁾的报道中, Hind III与Bcl I位点存在高度连锁不平衡, 2个位点在17、18外显子附近的位置以及p114.12探针的位置如图2所示。尽管Hind III的2个多态性片段长度接近(2.6kb和2.7kb), 需较长距离电泳才能区分清楚, 但在国内的实际情况下, 与Bcl I位点相比仍有其优越性。因为同样单位的Hind III比Bcl I价格要低得多。特别是对于群体中多态性的研究是有价

值的。

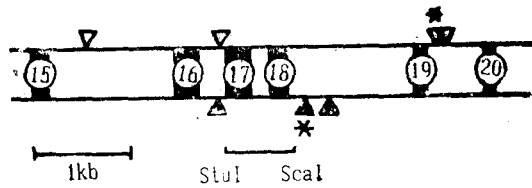


图 2 Hind III和Bcl I在17、18 外显子附近多态性位点及p114、12探针所在位置。

黑实框且数字标注处为外显子，空白框处为内含子。
△, HindIII位点; ▲, BclI位点; *, 多态性位点。图的下方为探针所在位置。

用于血友病 A 多态性研究的探针有 2 种: 1 种是与 VIII 因子基因紧密连锁的 DNA 片段(如 DX13, St14), 1 种是 VIII 因子基因内的 cDNA 或基因组 DNA。国内沈岩、曾溢滔等用 DX13、St14 对基因外 RFLP 位点进行了研究^(8,9)。基因外 RFLP 分析的缺点是可能发生该位点与 VIII 因子基因间的重组, 产生假阳性或假阴性结果, 从而造成误诊。本文所研究的位点是基因内的 RFLP, 故它可以克服上述缺点。在 VIII 因子 cDNA 克隆后, 更多的研究是集中于寻找基因内 RFLP 位点, 当然在基因内 RFLP 位点信息不够时, 可以用基因外 RFLP 提供补充信息, 协同分析。

目前作者正在对血友病 A 家系进行 Hind III/p114、12 RFLP 的分析, 以期对携带者进行基因诊断。

参 考 文 献

1. Antonarakis S.E, et al. The molecular basis of hemophilia A in man. *TIG* 1938, 4(8): 233.
2. Gitschier J, et al. Genetic mapping and diagnosis of hemophilia A achieved through a BclI polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 1985; 314: 738.
3. Antonarakis S.E, et al. Hemophilia A: Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Engl J Med* 1985; 313: 842.
4. Wion K.L, et al. A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of hemophilia A. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 4535.
5. Ahrens P, et al. A new Hine III restriction fragment length polymorphism in the hemophilia A locus. *Hum Genet* 1987; 76: 127.
6. Youssoufian H, et al. Msp I polymorphism in the 3' flanking region of the human factor VIII gene. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 6312.
7. 沈岩, 等. 凝血因子 VIII 基因内 BclI 多态性研究及其在甲型血友病产前基因诊断中的应用. *中国医学科学院学报* 1987; 9(6): 402.
8. 沈岩, 等. 中国人 DX13/BglIIRFLPs 研究与甲型血友病基因连锁分析. *中国医学科学院学报* 1988; 10(6): 389.
9. 曾溢滔, 等. 中国人凝血因子 VIII 基因多态性和血友病 A 的产前诊断. *上海医学* 1989; 2: 373.

(上接第22页)

7. Sugimura T, et al. Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* 1967; 216: 943.

8. Mavournin KH, et al. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. *Mutat Res* 1990; 239: 29.