

应用 mRNA/PCR 技术研究中国人常见的一种 β -地中海贫血基因(IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T)的剪接缺陷*

黄淑帧 任兆瑞 曾溢滔

(上海市儿童医院上海医学遗传研究所, 上海 200040)

曾凡一 G. P. Rodgers A. N. Schechter

(美国国立糖尿病、肾脏和消化疾病研究所, MD20892)

摘 要

应用扩增 cDNA 的直接序列测定, 分析了中国人一种常见的 β -地中海贫血突变类型(IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T)的转录产物和 mRNA 的剪接缺陷, 结果表明这一突变基因除了导致 β -珠蛋白 mRNA 的加工错误外, 仍然产生少量正常剪接加工的 mRNA. 从而导致 β^+ 地中海贫血. 本文报道的方法为在转录水平上研究基因的表达, 以及为遗传性疾病的分子缺陷提供简便和灵敏的新途径.

关键词: 地中海贫血, mRNA, 聚合酶链反应, 剪接缺陷

β -地中海贫血(简称 β -地贫)是一组以血红蛋白 β -珠蛋白肽链的合成减少(β^+)或缺乏(β^0)为特征的遗传性血液疾患^[1], 对该病的分子生物学研究表明, 引起 β -地贫的分子缺陷具有相当异质性^[2], 至今已确定了 110 多种不同的突变类型^[3]. 一般而言, β^+ -地贫是由于 β -珠蛋白基因的转录或加工异常, 或者由于 β -珠蛋白 mRNA 的不稳定性, 而 β^0 -地贫则是因为 β -珠蛋白基因的突变产生终止密码子, 或者发生基因的部分缺失, 或者 mRNA 的剪接异常所致^[2]. 在这些众多的 β -地贫突变中, β -珠蛋白基因第二内含子(IVS-II)中第 654 位核苷酸 C $\rightarrow$ T 突变是中国人最常见的 β -地贫突变类型之一^[4-6]. 美国 Johns. Hopkins 医学院的一个研究小组曾应用短暂表达细胞系统和 RNA S1-核酸酶谱测定技术对这一突变基因的转录产物进行了分析, 发现 IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T 突变由于 RNA 剪切的缺陷而产生异常的 β -珠蛋白 mRNA, 但没有检测到正常加工的 mRNA, 因而导致 β^0 -地中海贫血^[7].

近来, β -珠蛋白基因 IVS-II 区域突变已引起人们普遍的兴趣, 因为已有证据表明, 这一插

本文 1991 年 3 月 9 日收到, 1991 年 6 月 20 日收到修改稿.

* 本工作部分受美国 NIH 科学基金 HLB-29623 和中国国家 863 高技术项目资助.

入顺序在基因的调控和表达中起着重要的作用^[2]. 为了进一步探讨这一中国人常见的 IVS-II nt. 645 突变的剪接缺陷, 我们应用新近建立和发展的网织红细胞 mRNA 的 cDNA 拷贝的 PCR 扩增和扩增 cDNA 片段直接测序技术^[8], 分析了突变型 mRNA 转录产物. 研究表明这一突变并不是像先前报道的那样, 完全取消了正常的 RNA 加工^[7], 而是仍然产生正常加工的 β -珠蛋白 mRNA. 因此在转录水平上, IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T 突变应该导致 β^+ 地中海贫血.

一、材料和方法

1. 受检者 病人为浙江省籍的 2 岁男孩, 其血色素约为 4.0g/dl, 红细胞 $2.30 \times 10^{12}/L$, HbA₂ 0.03, HbF 0.22. 患儿的双亲均为 β -地贫杂合子, 父亲的 HbA₂ 含量为 0.057, HbF 为 0.037. 母亲的 HbA₂ 含量为 0.054, HbF 为 0.044. PCR 扩增 β -珠蛋白基因 DNA 与中国人特有的等位基因特异性寡核苷酸 (Allele-Specific Oligonucleotide, 简称 ASO) 探针的点杂交的结果^[4] 表明, 患儿为 IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T 突变的纯合子, 父母亲为这一突变的杂合子.

2. 方法 用 VRC (Vanadyl Ribonucleoside Complex, 简称 VRC) 方法, 从患儿和其双亲的外周血网织红细胞中分离总 RNA^[9, 10]. 所获 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 取 0.1 — 0.5 μ g RNA 通过反转录酶反应合成 cDNA, 随即按文献 [8] 的方法在 Perkin-Elmer Cetus DNA 热循环仪中用特异于外显子部分序列的 PCR 引物 A 和 B (表 1) 引导扩增 β -珠蛋白 cDNA 从外显子 II 的 nt. 125 到外显子 III 的 nt. 72 共 181bp 片段. 其步骤简述如下: 5 μ l cDNA 样品与 2.5 μ l 反应缓冲液, 2 μ l 的 10mmol/L dNTP (Sigma 产品), 0.5 μ l [α -³²P] dCTP (Amersham 产品, 800 Ci/mmol), 0.5 μ l Taq 聚合酶 (Perkin-Elmer Cetus 产品), 用双蒸水调节 PCR 反应总体积至 25 μ l. PCR 循环在 94°C 变性 1.5min, 55°C 退火 2min, 72°C 延伸 1.5min 的条件下进行 30 个周期.

随后, PCR 产物用特异于 β -珠蛋白 cDNA 序列的寡核苷酸探针 (19-mer) 杂交进行检测. 并在 TBE 缓冲液中进行 3% NuSieve 琼脂糖 (FMC 产品) 凝胶电泳 (80V, 1h). 用溴化乙锭染色后在紫外灯下观察扩增的 cDNA 片段^[11]. 切出扩增的 β -珠蛋白 cDNA 区带, 用液体闪烁计数定量测定每一区带中掺入的放射性 dCTP.

在另一组实验中, 用低融点琼脂糖凝胶纯化扩增的 β -珠蛋白 cDNA 片段, 然后按改良的直接测序法^[12] 测定其核苷酸顺序, 所用的 5' 和 3' 的测序引物分别是相应于外显子 II 的 20-nt. 序列 (EII 20-nt.) 和外显子 III 的 21nt. 序列 (EIII 21-nt.) (见表 1).

表 1 扩增引物和测序引物

引 物	序 列
A	5'CGGTGCCTTTAGTGATGGC3'
B	5'AGCCTGCACTGGTGGGGTGAA3'
EII	5'GAACTTCAGGGGCAATAATC3'
EIII	5'TGCCCAGGAGCTTAACCCAGA3'

二、结 果

用特异的寡核苷酸探针来检测 PCR 产物, 显示出很强的杂交信号, 表明 PCR 扩增是专

一的。患儿的扩增 cDNA 经过琼脂凝胶电泳后,观察到两条异常长的主要区带,长度分别为 254bp 和 290bp 左右。有意义的是,与早先的报道^[7]不同,我们还发现患儿仍具有少量正常长度(181bp)扩增 cDNA(图 1),而双亲的 PCR 产物经电泳分离后,也显示出三条扩增的 cDNA 区带,其中一条主要的区带为正常长度(181bp),另二条次要的区带均较正常区带为长,分别为 254bp 和 290bp 左右。患儿和双亲的这三种不同长度的扩增 cDNA 的比率经测定计算后列于表 2。

表 2 内含子-II (IVS-II) nt. 654 C → T 突变病人的正常和异常珠蛋白 mRNA 的比率

受检者	正常 mRNA(%) (181bp)	异常 mRNA (%) (254bp 290bp)		Total
正常人	100.0			
父亲	72.3	10.8	16.9	27.7
患儿	15.2	62.8	22.0	84.8
母亲	78.9	9.5	11.6	21.1

患儿扩增 cDNA 的直接序列测定结果表明,181bp 的片段具有正常的核苷酸序列。而 254bp 的片段则包含了一个插入于外显子 II 和外显子 III 之间的额外的核苷酸序列,它起源于原来 IVS-II nt. 580 至 nt. 652 之间的序列(图 2),长度约 290 bp 的 PCR 产物则同时具有正常的 181bp 和异常的 254bp 二种不同的序列。

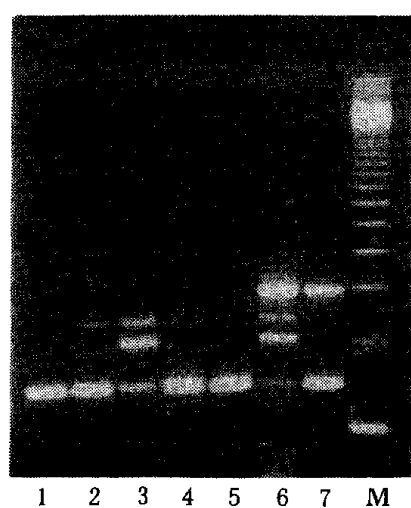


图 1 Nusieve 琼脂糖凝胶电泳分析 β -珠蛋白 mRNA 的 PCR 产物

(1—5 —— 应用 β -珠蛋白引物扩增, 6, 7 —— 应用 α 和 β -珠蛋白引物同时扩增。(1, 5, 7 —— 正常人, 2 —— 父亲, 3, 6 —— 患儿, 4 —— 母亲, M —— 123bp 梯状 DNA 标记)

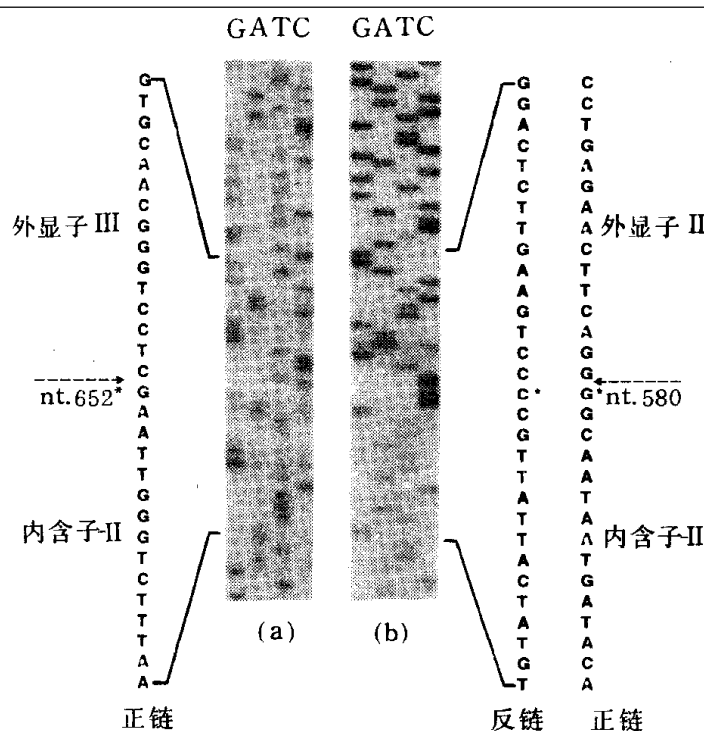


图 2 异常扩增 cDNA 片段(254bp) 的直接序列测定
(a) 用测序引物 EII, (b) 用测序引物 EIII)

三、讨 论

β -IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T 是一种常见的 β -地贫基因,主要分布在中国^[4-6]. 先前的研究已表明在 nt. 654 位上出现的这一单个碱基取代产生了一个新的 G—T 二核苷酸,它联同旁侧的核苷酸序列构成了一个明显的 5'端供位样剪切位点,从而导致 RNA 加工发生错误,出现 β -地中海贫血的表现型^[7]. 类似的 RNA 剪切缺陷也见于另二种在地中海地区人群中发现的 IVS-II 突变,它们分别位于 nt. 705 和 nt. 745^[13,14]. 一些早先的研究曾应用合适的载体将克隆的基因转入培养的细胞系统和 RNA S-1 核酸酶谱以及引物延伸技术来分析这些 β -地贫突变基因的转录产物的表达^[7,13,15],资料表明这些 IVS-II 序列中的单个碱基变化会激活位于 nt. 579 上的隐匿的受位剪切位点,从而形成了加工错误的 RNA,在外显子 II 和外显子 III 之间插入了一个源于 IVS-II 部分序列的额外的外显子. 然而在 IVS-II nt. 745 突变仍产生少量正常加工的 mRNA^[15],相反,在 IVS-II nt. 654 突变,即使延长曝光,仍检测不到正常的 mRNA^[7]. 至于 IVS-II nt. 705 突变,应用同样的实验方法则不能明确其是否产生正常的 β -珠蛋白 mRNA^[13]. 这样就存在一个问题:这些位于 IVS-II 的 β -地贫突变虽然具有类似的剪切模式,但为什么转录产物的表达会有差异. 我们认为,可能是传统的分析基因转录产物的方法不够灵敏.

本文则报道了另一种方法,即直接定量测定和序列分析 PCR 扩增网织红细胞 mRNA 的 cDNA 拷贝来观察 IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T 突变基因的转录. 正如本文“结果”中所述,IVS-II nt. 654 突变纯合子病人不仅主要产生了一种加工异常的 mRNA. 而且确实也产生少部分(含量约 15%)但有意义的正常珠蛋白 mRNA. 对异常的扩增 cDNA (254bp) 的序列分析表明,由 IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T 突变所形成的新的供位样剪切位点的确与 IVS-II 3'端正常的受位位点相拼接,而位于 IVS-II nt. 579 的内部隐匿的受位位点也的确与 IVS-II 5'端正常的供位位点相拼接. 结果,在外显子 II 和外显子 III 之间插入了一个由 73bp 长的核苷酸顺序组成的额外的外显子(图 3). 在这个额外的外显子中,第 17 个密码子(TAA)是一个无义密码子.

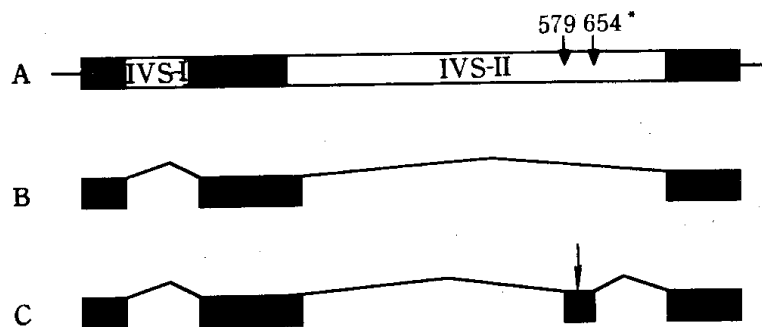


图3 内含子-II (IVS-II) nt. 654 突变的转录产物的加工图

(A. β -珠蛋白基因: * 代表 IVS-II nt. 654 位置. $\downarrow$ 代表 IVS-II nt. 579 内部隐匿的 3'端受位剪切点, B. 正常 mRNA 剪接产物, C. IVS-II nt. 654 突变 mRNA 的剪接产物. $\downarrow$ 表示外显子 II 和外显子 III 之间插入的一个额外外显子)

有趣的是, 290bp 的扩增 cDNA 片段是由正常的 181bp 和异常的 254bp 的序列组成(图 4), 这提示了这样一种可能性: 在 PCR 扩增时, 由于形成了杂合双链导致部分单链 DNA 的环状突出 (looping), 影响了电泳的迁移^[16]. 所有这些资料表明 IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T 突变基因并没有完全消除正常 β -珠蛋白 mRNA 的产生, 虽然我们还未证实这一突变基因所产生的少部分

	扩增片段长度	正常	654突变型
181bp	181bp	100.0 %	15.2 %
181bp			
254bp	254bp	--	62.8 %
254bp			
254bp	290bp	--	22.0 %
181bp			

图 4 3 种扩增 cDNA 的示意图

(注意: 由 181bp 与 254bp 的 PCR 产物形成的杂合双链,
导致 DNA 环状突出,影响到电泳迁移)

正常加工的 β -珠蛋白 mRNA 是否能翻译成 β -珠蛋白链,但从转录意义上说,IVS-II nt. 654 C $\rightarrow$ T 毫无疑问应划为 β^+ -地中海贫血而不是 β^0 -地中海贫血。

本文所述的这一方法具有灵敏和简便的优点,如前所述,过去所沿用的研究基因表达的方法存在着一些主要困难,它们过于繁琐、费时,需用克隆的基因,合适的载体和细胞培养系统等。此外,由于不够灵敏以致不能检测到少量的 mRNA 转录体,应用本文的方法,我们几乎可以检查和测定突变基因的任何 mRNA 转录,即使它的含量很低,整个过程在几天之内即可完成。这一方法的另一优点是重复性好。如果选用其它合适的扩增引物来引导 β -珠蛋白 cDNA 的扩增,我们可以获得相同的结果,因此,这一新方法为在转录水平上研究基因的表达提供了一条简便和有效的途径。

参 考 文 献

- [1] Weatherall, D. J. & Clegg, J. B., *The Thalassemia Syndromes*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1981.
- [2] Kazazian, H. H. Jr. & Boehm, C. D., *Blood*, **72** (1988), 1107.
- [3] Kutler, A., *Hemoglobin*, **14** (1990), 661.
- [4] Huang, S. Z. et al., *Hum. Genet.*, **84** (1990), 129.
- [5] Zhang, J. Z. et al., *ibid.*, **78** (1988), 37.
- [6] Liu, J. Z. et al., *Hemoglobin*, **13** (1989), 585.
- [7] Cheng, T. C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, **81** (1984), 2821.
- [8] Huang, S. Z. et al., *Blood*, **76** (Suppl. 1990), 62a.
- [9] Lizardi, P. M., *Methods in Enzymology*, **69** (1983), 24.
- [10] Davis, L. G. et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, New York, 1986.
- [11] Zeng, Y. T. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, **44** (1989), 886.
- [12] Erlich, H. A., *PCR Technology*, Stockton Press, New York, 1989.
- [13] Dobkin, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80** (1983), 1184.
- [14] Orkin, S. H. et al., *Nature*, **296** (1982), 627.
- [15] Treisman, R. et al., *ibid.*, **302** (1983), 591.
- [16] Cai, S. P. et al., *Blood*, **76** (Suppl. 1990), 56a.