维普资讯 http://www.cqvip.com

207-211

血小板无力症与GPⅢa基因表达

临床生物化学教研室 蒋纪恺
日本神户大学医学部 安永睦 足立昌司 菅野亘
吉田明宪 桑隆吉 山口延男

提 要 血小板无力症是遗传性出血性疾病，因血小板膜糖蛋白(GP)Ⅱb/Ⅲa基因异常造成GPⅡb/Ⅲa缺失，而使血小板缺乏凝聚能力。应用逆转录PCR(RT－PCR)技术，对一例血小板无力症患者进行基因表达分析表明GPⅢa的翻译水平异常，提示GPⅢamRNA未被翻译表达是GPⅢa缺失的原因之一。

关键词 血小板无力症;血小板糖蛋白GPⅢa;PCR
中图分类号 R558

血小板无力症(Glanzmann's thrombasthenia,GT)是Glanzmann在1918年提出的，以血小板凝聚，血块退缩异常为特征，临床上表现为出血时间明显延长的遗传性疾病。临床生化学检查为血小板糖蛋白GPⅡb和Ⅲa缺如或显著减少。近年来分子生物学的飞速发展，继GPⅡb，Ⅲa cDNA克隆成功，基因序列也分析清楚。本文以SDS－PAGE电泳及PAS染色，RT－PCR(逆转录一多聚酶链反应)等实验，根据分子生物学的中心法则对一例GT患者的GPⅢa mRNA的蛋白质翻译表达水平进行了分析。

1 材料与方法

1.1 SDS－PAGE电泳及过碘酸Schiff试剂(PAS)染色法分析血小板膜糖蛋白 采血于3%柠檬酸钠抗凝试管中，50×g,15min离心，取上层富含血小板血浆，加入15%(v/v)酸性柠檬酸右旋糖(Acid citrate dextrose ACD)，1000×g，15min离心，弃上清液，用Tris－EDTA生理盐水悬浮血小板，再加15%(V/V)ACD离心。反复2—3次。最后在血小板沉淀中加入电泳样品缓冲液，100℃10min水浴，备用。将样品于3%浓缩胶，7.5%的分离胶，进行常规SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS－PAGE)分离GPI,GpⅡb,GPⅢa,GPIV。电泳结束后，把凝胶进行PAS染色。糖蛋白PAS染色为桃红色，在540nm下扫描[1]。

1.2 RT－PCR 采集肝素抗凝血经100×g离心15min，收集富含血小板血浆，血小板总数约5×10^8个。将提取的RNA用寡脱氧胸苷酸纤素柱(Invitrogen)分离得到多聚腺苷mRNA[2]。用cDNA合成试剂盒(Amersham)，经逆转录酶(RT)作用，将mRNA逆转录为cDNA。以此cDNA为PCR模板，设计引物1:1376－1395，引物2:1782－1799进行PCR扩增目的基因。同时用未经逆转酶作用的mRNA为PCR阴性对照[3]。

1.3 Southern blot 由肝素抗凝血分离白细胞提取DNA，分别取10μgDNA用EcoRI,TaqI,-BamHI(宝酒造，日本)等限制性内切酶切断，DNA片段经1%琼脂糖凝胶电泳分离，再经变性，转移等步骤将DNA片段移至尼龙薄膜，用GPⅢacDNA探

维普资讯 http://www.cqvip.com

针进行杂交和自显影[2]。

2 结果与讨论

2.1 一例日本人GT患者的血小板膜蛋白质经SDS－PAGE电泳及PAS染色并扫描分析，说明GPⅡb和Ⅲa蛋白质未被表达而缺失(图1)，用单克隆抗体进行Western blot得到证实。

2.2 该患者的血小板mRNA经GPⅢa的引物及RT－PCR扩增，其扩增产物GPⅢa cDNA基因片段在含溴化乙锭缓冲液中电泳后，可在紫外光下观察到扩增产物的电泳区带。该区带用GPⅢa cDNA探针进行杂交得到证实为GPⅢa的RT－PCR扩增产物。由此说明该患者虽然GPⅢa蛋白质未被翻译表达，但GPⅢamRNA是被转录表达的。即该患者的血小板中存在GpⅢa的mRNA，但未被翻译成有生理功能的GpⅢa蛋白质(图2)。

用未经逆转录的mRNA直接进行PCR，未见扩增区带。因为PCR的多聚酶链反应是以DNA为模板进行扩增的，故mRNA未经逆转录为cDNA是不能直接进行PCR扩增的。

2.3 由该患者白细胞提取的DNA，用EcoR I,Taq I,BamH I等限制性内切酶分别反应后，经电泳分离，Southern blot再进行核酸限制性片段长度多态性(RFLP)分析未见异常。提示该患者的DNA分子在GPⅢa基因及连锁范围内没有大的异常。

由上述结果可见，该患者GPⅢa基因表达的mRNA转录未见异常，而GPⅢa蛋白翻译异常。其原因可能与翻译起始调控有关。而RNA及其结构对基因表达的转录后与翻译起始调控最为关键[4]。

目前血小板无力症的GPⅢa基因及不

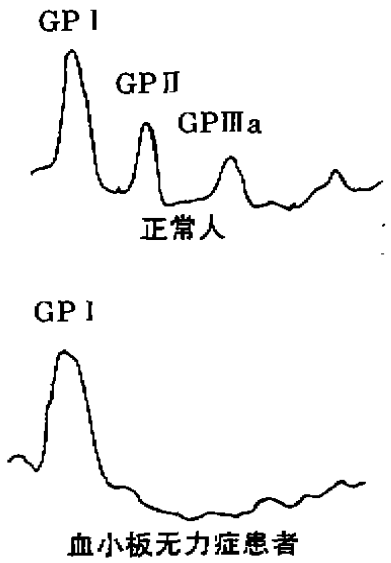


图1 血小板膜蛋白SDS PAGE电泳及PAS染色扫描图

血小板膜蛋白质经SDS－PAGE电泳及PAS染色并扫描分析，GT患者GPⅡb、Ⅲa明显缺失。

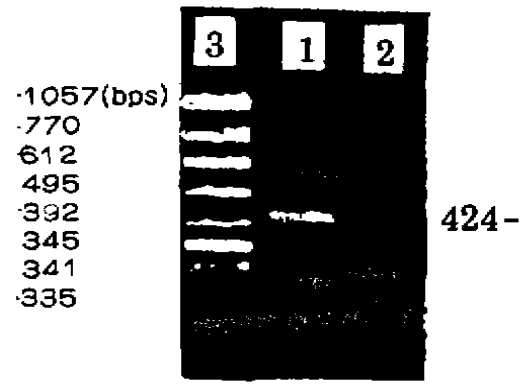


图2 GPⅢa RT－PCR及核酸电泳，紫外光下显示图

(1)经GPⅢaRT－PCR及核酸电泳后，紫外光下显示424bp核酸片段；(2)未经逆转录(RT)的GPⅢaPCR未见核酸片段；(3)Marker。

维普资讯 http://www.cqvip.com

同水平的表达异常，已有多种报道。DNA水平的基因点突变，基因插入[1,2]，mRNA水平的转录异常[6]及蛋白质水平的翻译异常[3]均有报道。由此可见，血小板无力症作为一种遗传病，发病原因是GPⅡb/Ⅲa缺失已为人们所认识，但GPⅡb/Ⅲa表达异常导致缺失的原因，其报道按照分子生物学中心法则分析可知，在DNA复制水平(遗传)，mRNA转录水平，蛋白质翻译水平及基因调控异常均可引起该病的发生。而这些异常导致GPⅡb/Ⅲa缺失的机理尚未阐明，特别是基因异常与转录，翻译调控的关系有待进一步研究。笔者认为血小板无力症不失为研究遗传性疾病的基因结构，基因调控与mRNA转录，蛋白质翻译表达等关系的理想模型。

(本文为笔者在日本留学期间所作的部分工作，在此向山口教授，寨教授，安永博士，足立博士，菅野博士，吉田博士的热心指导与帮助深表谢意。)

参 考 文 献

1. 渡边清明.临床检查 1984 28(6):634
2. J.Sambrook,et al.Molecular Cloning:A Laboratory Manual.2nd ed 1989.
3. Mutsumi Yasunaga,et al.
Jpn J.Clin.Hematol.1992 33(2):133
4. 彭晓冬，等.生命的化学 1995 15(2):13
5. Newman PJ.Thrombos Haemostas.1991 66:111
6. Bray PF.et al.Blood.1990 75:881
7. 顾建明，等.中华医学杂志 1991 71(12):680

(收稿日期 1996－01－03)

GLANZANN'S THROMBASTHENIA AND GPⅢa GENETIC EXPRESSION

Jiang Jikai, et al
Dept. of Clinical Biochemistry

Glanzann's thrombasthenia(GT) is genetic hemorrhagic disease.Unusual genes of platelet membrane glycoproteins(GP)Ⅱb/Ⅲa cause GPⅡb/Ⅲa deletion，result in platelet coagulation function deletion.Using reverse transcriptase－polymerase chain reaction(RT－PCR),analysed the genetic expression of a GT patient,showed that its translating level was unusual.It was suggested that one of the causing factors of GPⅢa deletion was GPⅢa mRNA not been translated.

KEY WORDS Glanzmann's thrombasthenia; Platelet glycoproteins Ⅲa; PCR

(上接第205页)

ANALYSIS ON EHFV COMPONENT ANTIGEN BY IMMUNOBLOT TECHNIQUE

Deng Shixiong,et al
Dept. of Forensic Medicine

Immunobloting analysis was carried out on the virion protein of strain chen and strain R22 viruses,the a etiologic agent of EHF.The viral antigen was purified and characterized roughly by protamine sulfate and polyethylene glycol precipition from brain tissue of suckling mice infected with EHFV strain chen or strain R22.Immunobloting analysis was performed with rabbit anti－EHFV sera(anti－R22 virus sera,Zhejian R3sera)and McAb A19,A20,A35,A25－1,R31.It showed four bands on NC with molecular weights of 75KD,69KD,66KD,61KD,in strain chen and three bands on NC with molecular weights of 72KD,69KD,64KD in strain R22.All antibodies reacted with the viral antigen of the two viruses.

It shows a little difference between stra in chen and R_{22} in Virral antigen.

KEY WORDS Immunoblot technique,EHFV;McAb; Component of antigen