

A-S2-23

四川泸州非小红细胞低色素贫血健康个体及 G6PD 缺乏症患者 α -珠蛋白基因拷贝数缺失的检测

周 璐, 李蔓薇; 指导教师: 马明义

泸州医学院 2011 级临床医学

【目的】 获得四川泸州非小红细胞低色素贫血健康个体及 G6PD 缺乏症患者 α -珠蛋白拷贝数缺失的频率, 为该地区加强开展预防缺失型 α -地贫的分子筛查和产前基因诊断提供理论依据。

【方法】 祖籍为四川泸州的 200 例无血缘关系的非小红细胞低色素贫血健康个体及经高铁血红蛋白还原法诊断为 G6PD 缺乏症的 108 例无血缘关系患者的外周血均来自于泸州医学院附属医院检验科, 常规酚氯仿法行外周血基因组 DNA 的提取, 定制合成引物, 选取扩增效率较高的引物进行单管多重缺口 PCR 技术(gap-PCR)检测 α -珠蛋白拷贝数缺失, 调整 4 对引物的浓度及比例, 优化反应体系, 确定 PCR 扩增的最适反应条件。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴乙啶染色, Gel Doc1000 凝胶成像分析系统观察并保存电泳结果。有 1.6 kb 的扩增条带表明有 $-\alpha 3.7$ 缺失; 有 1.5 kb 的扩增条带表明有 $-\alpha 4.2$ 缺失; 有 0.8 kb 的扩增条带表明有 $-\text{SEA}$ 缺失; 有 1.9 kb 的扩增条带则表明 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 珠蛋白基因都没有缺失。

【结果】 200 例健康人群检测出 6 例有 α -珠蛋白基因拷贝数的缺失, 占 3%。其中有 4 例左侧缺失($-\alpha 4.2/\alpha\alpha$), 2 例右侧缺失($-\alpha 3.7/\alpha\alpha$)。108 例 G6PD 缺乏症患者中有 7 例有 α -珠蛋白基因拷贝数的缺失, 占 6.48%, 其中有 2 例左侧缺失($-\alpha 4.2/\alpha\alpha$), 2 例右侧缺失型($-\alpha 3.7/\alpha\alpha$), 2 例东南亚缺失($-\text{SEA}/\alpha\alpha$), 1 例右侧缺失合并东南亚缺失($-\alpha 3.7/-\text{SEA}$)。G6PD 缺乏症患者 α -珠蛋白基因拷贝数缺失的频率显著高于健康人群。

【结论】 四川泸州健康人群 α -珠蛋白基因拷贝数缺失的频率高于四川成都人群的 1.92%, 该地区育龄夫妇应加强开展 α -珠蛋白基因拷贝数缺失的检测, 尤其当夫妇一方为 G6PD 患者时尤为必要。

关键词: 缺失型 α -地中海贫血; 基因诊断; G6PD 缺乏症

A-S2-24

DNA 条形码技术用于肉制品基因鉴定

乔 娇¹, 戴振宇², 杨斯苒², 胡 申², 谢 燊²; 指导教师: 黄春洪, 朱伟锋

1. 南昌大学医学院 2012 级临床医学

2. 南昌大学医学院 2011 级临床医学

【目的】 针对当今社会越来越严重的假肉事件, 建立一种快速、特异性强的基因鉴定方法, 实现对猪、牛、羊、马、鸡、犬、鼠等常见肉类和加工熟食肉制品的鉴定。

【方法】 利用 DNA 条形码原理, 用 Genedoc 软件多序列比对猪、牛、羊、马、鸡、犬以及鼠等常见肉源动物线粒体基因, 寻找能够特异性区分各物种和亚种的基因片段。针对 DNA 序列, 利用 Primer Premier 6.0 设计特异性引物, 考虑到加工的熟肉制品 DNA 存在降解, 引物设计时 PCR 产物大小限定在 350 bp 以下。随机混合 2~3 种肉类 DNA, 采用多重 PCR 方法扩增, 检测引物的特异性。利用 PCR 方法, 稀释 DNA 模板以 10、1、0.1、0.01 ng 进行 PCR 扩增, 检测 PCR 的灵敏度。在羊肉中按 10%、5%、1% 比例混入猪肉, 取 100 mg 混合肉, 提取 DNA 并用猪肉引物进行 PCR 扩增, 评价样品检测的灵敏度。以熟肉包、泡椒凤爪、香肠、牛肉粒、鸡肉派等深加工肉为原料, 检测上述 PCR 方法的适用性。

【结果】 通过序列比对, 选择线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(COI)作为受检基因, COI 基因 1 680~1 710 bp 区域有极高的物种特异性, 例如水牛和奶牛、山羊和绵羊在该 DNA 区域的差异碱基有 5~7 个。以该区

域为 PCR 下游引物,分别针对每个物种设定上游引物,建立了七种动物源性成分的 DNA 条形码。DNA 条形码区域为 CO I 基因 1 200~1 710bp 的序列,其中猪、水牛、山羊、马、鸡、犬、鼠 7 种动物的 PCR 产物大小分别为 103、313、157、120、251、119 和 128 bp。对于大小接近的 PCR 产物,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测。结果表明利用 CO I 基因,通过混合模板、混合引物进行交叉 PCR,均能特异性检测相应肉类。DNA 模板的灵敏度可达 0.01 ng,肉制品中 1% 的假肉(猪肉,1 mg)可被检出,熟肉的基因鉴定也是阳性。

【结论】 利用 CO I 基因 1 200~1 710 bp 区域,可以较好的区分不同肉类物种。该 PCR 方法特异性强、灵敏度高,所需检材微量,方法不受添加剂和高温加工等干扰,快捷准确,可作为肉制品中动物源性成分的鉴定方法进行推广。

关键词: DNA 条形码;基因鉴定;PCR;假肉

A-S2-25

基于 MUC1 细胞内段抗炎多肽的体外构建

李红羽¹,曲 东²,任 杰³;指导教师:李煜生

1. 南方医科大学 2010 级基础医学

2. 南方医科大学 2011 级预防医学

3. 南方医科大学 2011 级中西医结合临床医学

【目的】 在前期证实粘蛋白 1(MUC1)通过封闭 TLRs 信号通路抑制呼吸道合胞病毒(RSV)诱导的呼吸道炎症的基础上,以 TLRs 细胞内段 TIR 结构域相互作用的结构特点为基础,通过生物信息学分析确定 MUC1 胞内段(MUC1 CT)抗炎多肽的候选区域,并构建各种候选区域的缺失突变体真核、原核表达载体,进而找出发挥抗炎作用的多肽片段,并在体外验证其抗炎效果。

【方法】 根据生物信息学技术预测分析 MUC1 CT 潜在的抗炎片段;构建 MUC1 CT 各种缺失突变体的真、原核表达载体,即 pEGFP-C2-MUC1 CT mutants、pcDNA3-HA-MUC1 CT mutants 以及 pET14b-MCS-SBP-EGFP-MUC1 CT mutants-TAT;转染 pEGFP-C2-MUC1 CT mutants 入 A549 细胞(来源于 II 型肺泡上皮细胞),利用荧光显微技术明确各绿色荧光蛋白标记的突变体蛋白的细胞内定位;转染 pcDNA3-HA-MUC1 CT mutants(无异常定位的突变体)入 A549 细胞,待 MUC1 CT mutants 高表达后,用 RSV 感染各组细胞一定时间后,使用 ELISA 方法测定细胞培养上清中 TNF- α 的水平,筛选发挥抗炎作用的多肽片段;在明确 MUC1 CT 的核心抗炎片段的基础上,转化 pET14b-SBP-EGFP-MUC1 CT mutant 入大肠杆菌(DE₃),体外表达并纯化含有穿透肽(TAT)的 MUC1 CT 突变多肽,预先与 A549 细胞孵育,再给予 RSV 感染,通过测定上清中的 TNF- α 的水平,进一步明确具有抗炎活性的片段。

【结果】 (1)通过生物信息学分析 MUC1 CT,确定四处具有潜在抗炎活性的候选区域,分别是氨基酸位点 7-14 位,19-26 位,36-40 位,44-53 位;(2)成功构建基于 pEGFP-C2 和 pcDNA3-HA 真核表达载体的四种缺失突变体的真核表达载体;(3)通过 pEGFP-C2-MUC1 CT mutants 明确各种突变体的细胞内定位情况;(4)利用 pcDNA3-HA-MUC1 CT mutants 明确 MUC1 CT 的抗炎片段;(5)通过带有 TAT 的 MUC1 CT 突变多肽进一步证实该段的抗炎活性。

【结论】 MUC1 CT 抗炎片段在体外实验中具有抗炎性。

关键词: MUC1;抗炎多肽;体外构建