

医学遗传学生化方法

吴文彦 等 编译

科学出版社

内 容 简 介

本书重点介绍了医学遗传学的生物化学方法。内容不仅包括了各种常见遗传性生化异常类型的检测方法,而且还介绍了其原理、操作步骤、所需试剂、数据计算及结果说明等。既有国际通用方法,又有国内经验。叙述简明扼要,易于阅读和实践。可供医学遗传和儿童保健工作者、遗传病检测人员、临床医生及医学院校师生参考查阅。

医学遗传学生化方法

吴文彦 等 编译

吴文彦 罗会元 审校

责任编辑 姜梦兰 彭克里

科学出版社 出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1987 年 8 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1987 年 8 月第一次印刷 印张: 10 1/2 插页 18

印数: 0001—3,700 字数: 238,000

统一书号: 14031·113

本社书号: 5210·14

定价: 2.80 元

编译者的话

医学遗传学是近年来发展较快的一门学科。随着我国优生工作的开展,许多单位都开展了遗传性代谢疾病的诊断工作,但这方面的工作者们都感到自己还缺少一本有关的实验诊断手册。为了满足广大医务工作者和科研人员的需要,上海市第六人民医院医学遗传室和中国医学科学院基础医学研究所医学遗传室以美国 Sally Kelly 编的“Biochemical Methods in Medical Genetics”为蓝本,合作编译了这本手册。

由于原书出版于 1977 年,其中关于某些遗传性疾病的概念已经过时,因此,在编译过程中对原书的章节作了些改变,并加入了一些新的概念及新的实验方法,使译本较全面地介绍了各种遗传性代谢疾病的实验诊断方法。从较简单的筛查实验到较复杂的特异实验诊断等各种方法,都有利于不同条件的实验室开展工作。

参加本书编译和审校的有王佩兰、方炳良、吴文彦、张桂香、罗会元、项坤三、施惠平、徐瑾、陆曙民、郭玉凤。由于我们水平有限,书中难免出现缺点和错误,我们热忱希望广大读者批评指正。

编译者

1985 年 8 月

目 录

编译者的话

第一章 氨基酸病	1
单向纸层析筛选试验	2
双向薄层层析法	11
其他层析方法	15
细菌抑制筛选试验	15
个别氨基酸的化学测定	19
氨基酸病的酶测定	20
苯酮尿病	20
组氨酸血症	29
酪氨酸血症	34
亚硫酸氧化酶缺乏症	36
胱氨酸尿病	40
同型胱氨酸尿病	45
精氨基琥珀酸尿病	53
槭糖尿病	54
高甘氨酸血症	58
全身性眼、皮肤白化病	70
色氨酸代谢障碍	72
尿黑酸尿病	75
第二章 有机酸尿症	81
原发性高草酸尿症	81
乳清酸尿症	89
第三章 半乳糖血症	92
半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶缺乏症	93

半乳糖激酶缺乏症.....	114
半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶缺陷的筛选试验	121
半乳糖代谢缺陷的筛选法.....	123
第四章 粘多糖贮积症.....	128
筛查试验	129
鉴别试验	138
第五章 神经鞘脂贮积症.....	160
高歇氏病	160
尼曼-皮克氏病	170
异染性脑白质营养不良症	173
Fabry 氏病	182
G _{M1} 神经节苷脂贮积症	185
泰-萨二氏病及其变异型	192
第六章 糖原贮积症.....	205
I 型 (Von Gierke 氏病)	205
II 型 (Pompe 氏病).....	210
III 型(脱枝酶缺陷)	218
IV 型	222
V 型 (McArdle).....	227
VI 型	229
第七章 其他溶酶体贮积症.....	235
筛查	236
粘脂贮积症 II 型 (I-细胞病).....	240
粘脂贮积症 III 型	242
岩藻糖苷贮积症	244
天冬氨酰葡萄糖胺尿.....	246
Wolman 氏病	248
第八章 Lesch-Nyhan 综合征	253
第九章 肌营养不良.....	260
第十章 威尔逊氏病(肝豆状核变性).....	269

第十一章	药物诱发的窒息(琥珀酰胆碱过敏).....	273
第十二章	儿童肝硬变及早发家族性肺气肿.....	276
第十三章	免疫缺陷性疾病.....	278
	体液免疫性缺陷	278
第十四章	家族性高脂蛋白血症.....	283
第十五章	家族性脂蛋白缺乏症.....	289
	先天性无 β 脂蛋白血症	289
	Tangier 病	289
第十六章	植烷酸贮积症 (Refsum 氏病).....	291
第十七章	酸性磷酸酶缺乏症.....	294
第十八章	由酶缺乏引起的遗传性溶血性贫血.....	297
	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症	297
	红细胞丙酮酸激酶缺乏症	313
	磷酸丙糖异构酶缺乏症	318
	谷胱甘肽还原酶缺乏症	320
索引		323

第一章 氨基酸病

原发性氨基酸病是一组各种各样的疾病，它们是由于控制酶合成或酶功能的基因突变而引起。这类酶调节着蛋白质和氨基酸代谢。临床表现与所涉及的代谢途径有关。因为它们经常与其他缺陷的临床表现重叠，所以往往要靠实验室检出某种氨基酸异常来进行诊断。

氨基酸病的基础代谢缺陷常为酶蛋白缺陷。这种缺陷引发了一系列的生化变化，导致明显的疾病。酶蛋白突变所引起的两种常见的缺陷为产量减少或分子结构异常，二者均使细胞供应的功能酶减少。蛋白质和氨基酸代谢的正常循环随之而在受影响的酶调节处中断。未利用的基质在血液内贮积(氨基酸血症)，并溢入尿液内(氨基酸尿病)；在大多数情况下，氨基酸和(或)酶缺陷本身的检出为诊断标记(表1)。

有些氨基酸病的缺陷尚未鉴定。在这种场合下，标记仅为氨基酸范型。

较常见的氨基酸病的生化缺陷将在有关的专题章节较详细地描述。

氨基酸异常一般可在实验室通过检验体液内一种或几种氨基酸来诊断。对几种可能的氨基酸异常可采用单一的试验，以初步缩小方法的选择范围，例如层析或电泳。阳性结果用确定的方法加以肯定，例如对可能涉及的氨基酸采用特异性的化学或微生物方法测定。

如果临床表现明显或已找出一种氨基酸病，例如通过新生儿筛查，则可直接用特异性的化学或微生物方法对这种氨基酸进行测定，而不须再用初步的层析或电泳去检测。

表 1 氨基酸病的血清和尿氨基酸范型

疾病	血	尿	临床体征	智能
精氨基琥 珀酸尿病	—	精氨基琥珀酸	惊厥、脆性头发,共济 失调	低下
瓜氨酸血症	低氨酸	瓜氨酸	惊厥	低下
胱硫醚尿病	—	胱硫醚	异常,精神病	低下
胱氨酸尿病	—	胱氨酸, 赖氨酸 精氨酸, 鸟氨酸	结石	正常
胱氨酸病	胱氨酸	胱氨酸, 其它氨 基酸尿, 尤其是	佝偻病, 结石 间歇性共济失调, 皮 疹, 精神病	低下 正常或低下
Hartnup 病	几种	中性氨基酸		
同型胱氨 酸尿病	甲硫氨酸	同型胱氨酸	晶状体脱位, 惊厥头 发稀而细	正常或低下
羟脯氨酸血症	羟脯氨酸	羟脯氨酸	矮小, 活动过度	正常或低下
高甘氨酸血症	甘氨酸和其它	甘氨酸	蛋白诱发性呕吐, 嗜 睡昏迷(新生儿)	低下
高赖氨酸血症	赖氨酸	赖氨酸, 鸟氨酸 γ -氨基丁酸	惊厥, 多动	低下
高脯氨酸血症	脯氨酸	脯氨酸, 羟脯氨 酸, 甘氨酸	肾脏病, 异常	正常或低下
低磷酸酶血症	—	磷酸乙醇胺	死胎, 佝偻病, 骨折	正常
枫糖尿病	缬氨酸、亮氨 酸, 异亮氨酸	酮衍生物	尿臭(焦糖臭), 惊厥,	低下
苯酮尿症	苯丙氨酸	苯酮	发育迟缓, 头发黄, 肤 白	低下
酪氨酸血症	酪氨酸	酪氨酸, 苯丙氨 酸衍生物	发育障碍, 肝肿大	低下
组氨酸血症	组氨酸	组氨酸	言语缺陷	正常或低下

单向纸层析筛选试验

原理

用单向纸层析对体液进行分析可以辨出几种氨基酸异

常,并可同时检测几个标本。对氨基酸正常范型容易认识,而对其异常也易于辨别(图 1)。

点在滤纸上的氨基酸用有机溶剂洗涤时,按它们在该有机溶剂系统中不同的溶解度而分离。一种可以分离十余种氨基酸的方便溶剂系统含有正丁醇、醋酸和水。茚三酮和靛红(isatin) 将氨基和亚氨基(imino) 酸染成蓝色、紫色或红色。与对照层析比较,按位置和颜色即可鉴别标本中的氨基酸。

碱性氨基酸在这个溶剂系统中的溶解度较低,层析时爬行缓慢,出现于点样处(原点);中性、酸性和芳香(环状结构)氨基酸留在溶剂中较久,出现于近纸顶边处(溶剂前沿)。浓度可与同时进行层析的标准氨基酸溶液图谱斑点的密度比较而估计。每天的排泄率和单位体积的浓度可依次从排泄体积和肌酐浓度而计算。具有特殊结构或相似溶解度的氨基酸可用特殊颜料复染已经过茚三酮染色的斑点而鉴别(表 2)。

表 2 用单向纸层析(正丁醇-醋酸-水溶剂系统,茚三酮染色)鉴别血液、血清或尿氨基酸的染色

染色的氨基酸斑点	鉴定的氨基酸	染 剂
胱氨酸-胱硫醚	胱氨酸	Pauly (阴性)
	胱氨酸	硝普盐
组氨酸-赖氨酸	组氨酸	Pauly
精氨酸	精氨酸	Sakaguchi
谷氨酰胺-同型胱氨酸	同型胱氨酸	硝普盐
瓜氨酸-丝氨酸	瓜氨酸	Ehrlich
羟脯氨酸	羟脯氨酸	Ehrlich
谷氨酸-苏氨酸-同型瓜氨酸	同型瓜氨酸	Ehrlich
色氨酸-β氨基异丁酸	色氨酸	Ehrlich

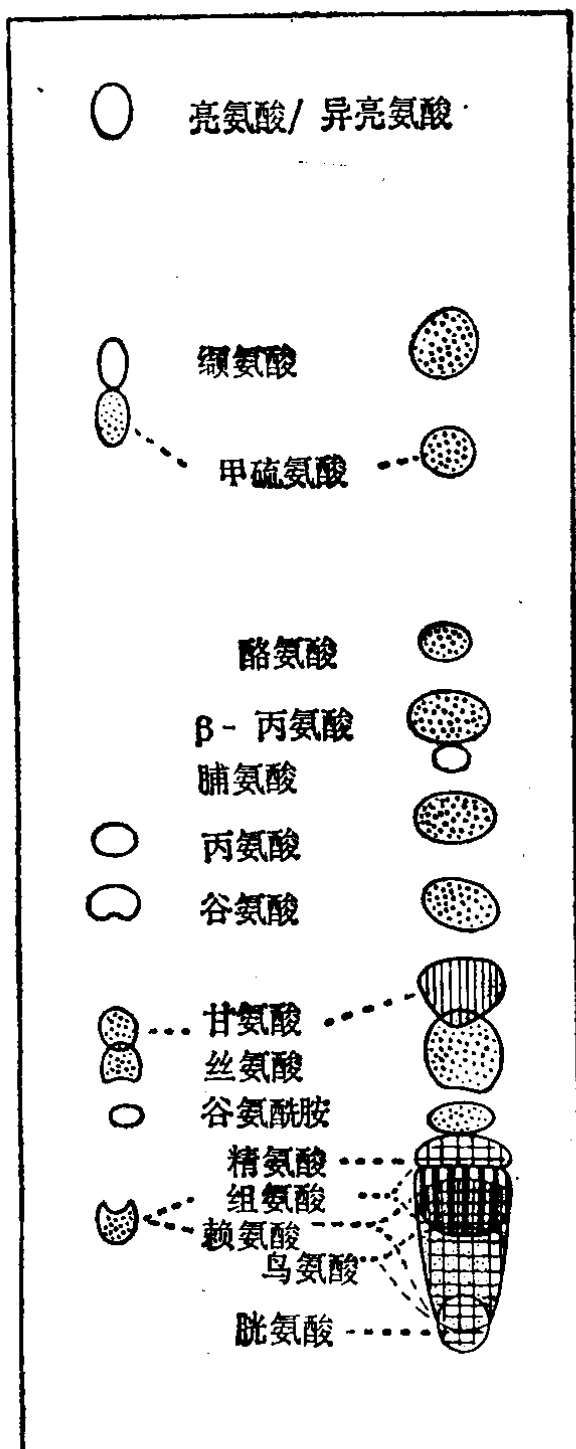


图1 单向纸层析分离的氨基酸：
血清(左)，尿(右)。氨基酸病的量增多。需要复染的氨基酸（瓜氨酸，羟脯氨酸）未显示出。滤纸在正丁醇：醋酸：水(12:3:5)溶剂系统中层析过夜，用茚三酮-靛红染色。

实验步骤

1. 将全血(静脉血或刺指尖血)使筛选苯酮尿病(PKU)的滤纸卡上的圆圈饱和(滤纸两面沾血液)。该滤纸卡用清洁、

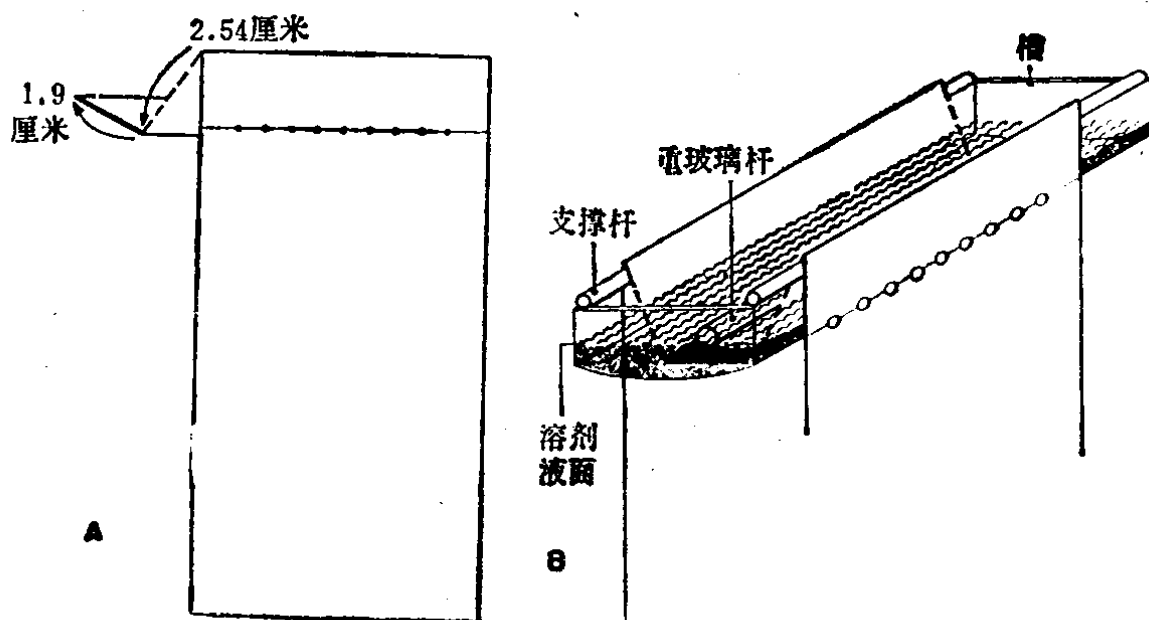


图2 单向纸层析滤纸与层析槽的制备。(A) 点样纸的折叠与标记；(B) 滤纸在槽中的位置

消毒、干燥并不受唾液和汗液污染的滤纸制成。在空气中至少干燥1小时。在110℃, 6.8kg压力下, 将血斑消毒3分钟, 沉淀血红蛋白。用血清或血浆做标本则不需消毒。

2. 制备尿标本和收集24小时尿标本如下: 测定1ml尿肌酐的浓度(见尿肌酐测定), 冷冻干燥2ml尿标本(约需1小时), 置于-20℃保存。在实验当天以去离子水(2ml左右)稀释, 使10μl标本含15μg肌酐。按下列公式计算:

$$\text{ml} = \frac{\text{肌酐浓度 (mg/100ml)} \times 2}{150}$$

3. 戴清洁塑料手套, 用铅笔在层析纸上标记相应的起点(图2)。

4. 将打洞机打下干燥血斑(直径6mm)。戴塑料手套, 将血样圆纸片用镊子放入标记的层析纸原点洞内。滤纸上的原点洞填满后, 用塑料尺衬在纸后, 用镊子柄把圆纸片按固。

5. 吸取10μl制备的尿标本点于层析纸上标记处, 吹干。

6. 吸取 $10\mu\text{l}$ 各种浓度的标准氨基酸溶液, 点于另一张纸上, 吹风干燥。

7. 将盛 50ml 溶剂的 250ml 烧杯置于层析缸底平衡至少 30 分钟。

8. 在层析过程中, 烧杯留在原处不动(下行层析)。将滤纸小心挂在层析架上并使之牢固(下行层析)。或将溶剂放入平皿内置缸底部, 将滤纸卷成筒形, 立于皿上, 平衡 30 分钟(层析缸加盖密封)。层析时, 将纸筒(垂直)放入平皿内(上行层析)。

9. 在溶剂槽内加入溶剂 90—100 ml(下行层析)。

10. 将层析缸加盖, 用油脂封口, 在室温 ($18-28^{\circ}\text{C}$) 下展开层析 15—16 小时或直至溶剂前沿接近纸端为止。

11. 取出滤纸, 置于架上, 在通风橱中干燥 1 小时, 再置于 65°C 烘箱 5 分钟。

12. 将纸以茚三酮-靛红染色(将滤纸在盛染色剂的玻璃盘中经过 2 次)。在通风橱中干燥 5 分钟, 再置于 65°C 烘箱 5 分钟。

13. 将滤纸上部剪成条状, 原点部分不动。

14. 将斑点与含标准氨基酸的纸条对照。按位置和颜色鉴定氨基酸。浓度按不同浓度的标准氨基酸斑点而估计, 标本的浓度以 $\text{mg}/100\text{ml}$ 表示。

15. 肯定组氨酸存在, 可用铅笔将斑点圈出, 并在滤纸下段喷以新鲜配制的 Pauly 试剂。如果立即出现砖红色, 即为阳性; 如果斑点的颜色不匀, 不及茚三酮的深, 则可能有其它氨基酸存在。例如赖氨酸, 鸟氨酸、胱硫醚或胱氨酸。可能的话, 应该用别的方法予以鉴别。组氨酸浓度可按 Pauly 试剂染色的斑点与同样处理的含有不同浓度的组氨酸和其它氨基酸的纸条斑点比较而得, 以 $\text{mg}/100\text{ml}$ 表示。

16. 确定瓜氨酸和羟脯氨酸存在与否,可用铅笔将斑点圈出,在滤纸中段喷以新鲜稀释的 Ehrlich 溶液。吹风干燥。羟脯氨酸在 10 分钟内出现粉红色, 而瓜氨酸在 3 小时呈粉红色, 同型瓜氨酸在 3 小时内呈橙色。将斑点颜色与同样处理的含有各种不同浓度的羟脯氨酸, 瓜氨酸和其它氨基酸的纸条上的斑点比较,即得各氨基酸的浓度,以 mg/100ml 表示。

计算

1. 血、血清、血浆标本内的氨基酸可将斑点剪下直接与标准溶液纸条斑点比较而计算。以 mg/100ml 表示。

2. 计算尿标本内氨基酸浓度,以 mg/g 肌酐表示。因为冷冻干燥的尿标本按 150mg 肌酐/100ml 而制备,故

$$\text{mg 氨基酸/g肌酐} = \frac{\text{mg\% 氨基酸}}{150\text{mg\% 肌酐}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}}$$

$$\text{即 } \text{mg 氨基酸/g 肌酐} = \text{mg 氨基酸} \times 6.67$$

3. 计算氨基酸每天排出率: 因为冷冻干燥 2ml 标本重新配制成一定体积 (V_2) 含有 150mg 肌酐/100ml 标本,

$$\begin{aligned} \text{mg氨基酸/24小时} &= \text{mg\% 氨基酸} \times \frac{V_2}{2} \times \frac{24\text{小时尿量(ml)}}{100\text{ml}} \\ &= \text{mg\% 氨基酸} \times V_2 \times 0.005 \times 24\text{小时尿量(ml)} \end{aligned}$$

说明

特殊氨基酸和异常的浓度在层析纸上容易辨认。尿浓度和排出率随年龄和其它非遗传性因素而变化。因此,应将试验结果与用同样方法处理的正常值比较,最好用本实验的值。

试剂

1. 层析纸采用 Whatman 3MM 或新华滤纸。

2. 层析缸 $20 \times 30 \times 55$ cm。

3. 层析滤纸的处理：戴塑料手套操作，以防止手指氨基酸污染。将滤纸裁成 21×31 cm 大小。用铅笔在距离顶边 2 cm 处画一直线，并每隔 2 cm 画一点，作为加样原点(共 9 个)，两边各空 2.5 cm。将纸在顶边与铅笔线之间折 2 次，以便滤纸打孔，并固定于层析架上。在画点处打孔(直径 6mm)(下行层析；上行层析用同法处理滤纸)。

4. 正丁醇：冰醋酸：水溶剂(12:3:5)：随所用层析纸的多少而配制，在通风橱中操作。

5. 茚三酮-靛红染色剂：在通风橱中溶解 0.5 g 茚三酮和 20 mg 靛红于 200 ml 丙酮内。加入 2 ml 2,6-二甲基吡啶。可供 3—4 张滤纸应用。

6. 5% 亚硝酸钠溶液：溶解 5g 亚硝酸钠于 50 ml 去离子水内，并稀释至 100ml。

7. 10% 碳酸钠溶液：溶解 11.7 g 碳酸钠 ($\text{NaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 于 50ml 去离子水内，并稀释至 100 ml，用塑料瓶盛装。

8. 10% 对氨基苯磺酸：溶解 900mg 对氨基苯磺酸于 9ml 浓 HCl 和 90ml 去离子水内，微热。冷却后，用去离子水稀释至 100 ml。

9. Pauly 试剂(新配制的)：临使用时混合 4ml 10% 苯磺酸溶液和 4ml 5% 亚硝酸钠溶液，混匀后加盖，静置于 4°C 5 分钟。缓缓加入 8ml 10% 碳酸钠溶液，混匀，作喷雾染色剂。

10. Ehrlich 试剂：溶解 10g 对二甲氨基苯甲醛于 50ml 浓 HCl 内，用去离子水稀释至 100ml，置于室温保存。使用前，吸取 5ml 用 25ml 丙酮稀释，混匀，作喷雾染色剂。

11. 人工尿：溶解 3 g 尿素，2.5 g 氯化钠，0.15 g 硫酸铵，0.25 g 磷酸钾和 0.1 g 肌酐于 80 ml 去离子水内，用去离

子水再稀释至 100 ml。

12. 300 mg% 氨基酸贮存标准液: 溶解 600 mg 需要的氨基酸(或校正水合物含水量或含盐量后的重量)于150ml N^* HCl 内,加热搅拌 (50℃),如不溶解可加入 3 NHCl。用人工尿稀释至 200 ml。分装于具有螺旋塞的试管内,置于-20℃保存。

13. 氨基酸工作标准溶液:按下法用 1 NHCl 稀释贮备标准液。

贮存标准液		人工尿液	工作标准液	
浓度(mg%)	ml	ml	体积(ml)	浓度(mg%)
300	4	16	20	60
300	4	26	30	40
60	5	5	10	30
40	5	5	10	20
40	5	15	20	10
10	5	5	10	5
40	1	9	10	4
30	1	9	10	3
20	1	9	10	2

分装成 1ml, 置于 -20℃ 保存。

参 考 文 献

Bradley, G. and Benson, S., Examination of the urine. I. Davidsohn, I., and Henry, J. (Eds.), Todd-Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 14th ed. Philadelphia: Saunders, 1969, pp. 31—32.

Efron, M. L., Young, D., Moser, H. W., and McCready, R. A., A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of amino acid metabolism. *N. Engl. J. Med.* 1964, 270: 1378.

* N 为非法定单位,应以 $1N \triangleq (1mol/L) \times$ 离子价数加以换算,下同。
——译者注

尿肌酐测定

原理

根据肌酐与苦味酸生成的化合物的互变异构性能，尿肌酐浓度由比色法测定。在碱性溶液中主要的互变异构体为红色不稳定型（Jaffe 试验）。

先将标本内肌酸脱水变成肌酐。

实验步骤

1. 将尿标本用去离子水按 1:2, 1:10, 1:20 的比例稀释，最后体积为 10ml。

2. 吸取 1ml 稀释尿液，1ml 肌酐工作标准液和 1ml 去离子水(空白)分别放入具有螺旋塞的 150 × 20 mm 试管内(各制备两份)，再各加入 4ml 苦味酸缓冲液。加盖，在振荡器上混匀。

3. 将各试管置于 120℃ 30 分钟，使肌酸脱水成肌酐。两岁以下的婴儿尿标本因含肌酸较多，尤应如此处理。

4. 加入 0.3 ml 2.5N NaOH 溶液，静置于室温 20 分钟。加入 15 ml 去离子水，在振荡器上混匀。

5. 在波长 520 nm 处测定标准溶液，以及与标准溶液浓度范围相符的稀释尿标本(仅选一种稀释标本)的光密度。

计算

1. 绘制标准曲线，以肌酐浓度为横坐标，光密度为纵坐标。

2. 从标准曲线求出稀释尿标本内的肌酐浓度，再乘以稀释倍数即得。以 mg 肌酐/100 ml 尿表示。

说明

测定尿液内一种溶质的浓度时，肌酐浓度被作为测定溶质的单位，即尿溶质单位。

试剂

1. 1.17% 苦味酸钠缓冲液(pH2.0): 溶解 11.7 g 苦味酸于 900 ml 去离子水内。用 2.5 N NaOH 溶液调 pH 至 2.0 ± 0.05 (约需 15 ml)。用去离子水稀释至 1000 ml, 数小时后, 重调 pH。置于 4℃ 贮藏。

2. 2.5N 氢氧化钠溶液; 逐渐将 50 g 粒状 NaOH 加入 400ml 去离子水内, 搅拌直至全部溶解。用去离子水稀释至 500 ml。

3. 肌酐贮存标准液 (100mg/100ml): 溶解 100 mg 肌酐于 50 ml 去离子水内, 并稀释至 100 ml。

4. 肌酐工作标准液: 吸取 1ml 贮存标准液分别用 19.0ml 和 9.0 ml 去离子水依次稀释成 5 mg 和 10 mg/100 ml 的工作标准液。吸取 1.5 ml 贮存标准液, 用 8.5 ml 去离子水稀释成 15 mg/100ml 的工作标准液。

参 考 文 献

- Clark, I. C., Jr and Thompson, H. L., Determination of creatine and creatinine in urine. *Anal. Chem.* 1949, **21**: 1218.
Hunter, A., *Creatine and Creatinine*. New York: Longman, Green 1928, p. 26.

双向薄层层析法

氨基酸病筛选试验和氨基酸定量测定

原理

采用硅胶和微结晶纤维素制成层析板, 使氨基酸斑点分