

我国汉族人载脂蛋白 AI/CIII 基因的分子克隆和初步结构分析

徐洪基 周红奕 胡师学 潘孝仁

(中日友好医院内分泌科,北京)

脂蛋白代谢异常和动脉粥样硬化及冠心病的发病有密切关系,而载脂蛋白在人体脂蛋白代谢中起重要作用。近年来,国外对载脂蛋白基因的分子生物学研究取得了众多成就,已从基因文库克隆了各种载脂蛋白基因,对它们结构和功能的关系进行了深入研究;并且发现,有些载脂蛋白的基因区的限制性片段长度多态性(RFLP)可作为在 DNA 分子水平上诊断或预测高甘油三酯或高胆固醇血症风险的遗传标记,但这类遗传标记存在广泛的种族差异。为了寻找适合中国人群特点的、和脂代谢异常有关的 DNA 多态性遗传标记,亟待建立能代表我国人群的肝细胞基因文库,并对其中克隆的各种载脂蛋白的基因进行系统的分析研究。

本文利用自制的 EMBL3- λ 载体 DNA 和从 BHB2688、BHB2690 溶原菌株提取的包装混合物,建立了中国人(汉族)肝细胞基因文库。本实验制备的包装混合物用于体外包装 EMBL3 载体 DNA 时,包装效率高达 10^8 — 10^9 pfu/ μ g DNA;包装含人胚肝 DNA 插入片段的重组体 EMBL3 DNA 的包装效率,以 spi^- 重组子计算,约下降 2—3 个数量级,即为 10^5 — 10^6 pfu/ μ g DNA。EMBL3 DNA 的 BamHI/EcoRI 双酶解片段和 13—22kb 的人胚肝 DNA MboI 部分酶解片段连接反应后,大部分 DNA 的分子量在 50kb 以上。连接反应的混合物直接用于体外包装,经在 p2 溶原的 Q359 菌膜上测定滴度,证明其中含 1.05×10^6 pfu 的 spi^- 重组子,已超过建立人基因文库(对单拷贝基因的覆盖概率 > 99%)所要求的理论值 (8.1×10^5 pfu)。我们把这个基因文库定

名为 HLGL-h-1 (BamHI/MboI)。

本文还以 α - ^{32}P 标记的 apo AI cDNA 探针,利用噬斑原位杂交技术,对 4×10^5 pfu 的重组噬菌体进行了筛选,共获得三个阳性噬斑。其中两个阳性噬斑的 DNA,用限制性内切酶 SstI 完全酶解后,以 α - ^{32}P 标记的 apo AI cDNA 探针杂交,显示 (5.7kb, 4.0kb) 和 (5.7kb, 3.0kb) 两种杂交图谱,提示上述文库所代表的基因组的基因型是 4.0kb 和 3.0kb SstI 限制性片段的杂合子。这两个克隆分别定名为 λ AI-1 和 λ AI-2。对 λ AI-1 克隆的 DNA 的限制性图谱分析显示,它含有完整的 apo AI 基因以及 apo CIII 基因的大部分。

本文还对 apo AI/CIII 基因区的 SstI 限制性片段长度多态性进行了初步研究。研究对象包括本院门诊高脂蛋白血症病人 6 例,正常人 3 例,黄色瘤病人 1 例。分别从白细胞提取高分子量的细胞总 DNA,用限制性内切酶 SstI 完全酶解后,进行琼脂糖凝胶电泳;再按 Southern 方法转移至硝酸纤维素滤膜,和 (α - ^{32}p) dCTP 标记的 apo AI cDNA 探针杂交并进行放射自显影。Southern 杂交分析结果显示,在 apo AI/CIII 基因区存在 SstI 限制性片段长度的多态性。3 例正常人有 1 例为 4.0kb 和 3.0kb 片段的杂合子,2 例为 4.0kb 片段的纯合子;1 例黄色瘤病人为 4.0kb 片段纯合子;6 例高脂蛋白血症病人中上述纯合子和杂合子的基因型各占一半。从总的趋势看,3.0kb SstI 片段等位基因在中国人中较西方白种人中常见,其意义尚待进一步探讨。

[本文于 1987 年 12 月 14 日收到]