因子Ⅷ基因突变的研究进展

耿解萍 戚正武
（中国科学院上海生物化学研究所，上海 200031）

陈 竺
（上海第二医科大学附属瑞金医院，上海 200025）

摘要 凝血因子Ⅷ（FⅧ）是内源性凝血系统中一重要的辅助因子，由于基因缺陷而引起的A型血友病是一种常见的遗传性出血性疾病. 近几年来，由于FⅧ基因的阐明及成功的表达，从而使其基因突变的研究得以深入而广泛地展开. 文章对这方面最新的研究进展及其采用的新技术作了较全面的介绍，这是迄今遗传性疾病基因缺陷研究中最深入、最完整的一个范例.

关键词 凝血因子Ⅷ，A型血友病，基因突变

A型血友病是一种常见的X性连锁遗传性出血性疾病，它是由于患者体内凝血因子Ⅷ（简称FⅧ）的数量不足或质量异常所致，在男性中的发病率为1/5 000[1]. 血友病中85%为A型；13%为B型，该病亦为X性连锁遗传病，系凝血因子Ⅸ缺乏所致；2%为丙型，其遗传方式与前二者有所不同，为常染色体不完全隐性遗传.

FⅧ的生理功能是在内源性凝血系统中，在Ca^{2+}及磷脂的存在下，以辅酶的形式参与FIXa对FX的激活. 在血浆中，FⅧ与von Willebrand因子（vWF）形成复合物[2]. 根据患者临床表现的严重程度及血浆中FⅧ凝血活性的水平，可将A型血友病分为重型（FⅧ：$C<1\%$），中型（FⅧ：C 1—5%）及轻型（FⅧ：$C>5\%$）3种. 用抗人FⅧ抗体，采用放免分析法测定FⅧ抗原水平发现，绝大多数A型血友病中FⅧ活性与抗原水平呈平行下降，但少数患者FⅧ活性降低而抗原水平正常. 1984年，美国2个研究小组同时克隆并表达了人FⅧ[3-6]，从而极大地推动了对FⅧ结构功能关系的研究，并使重组FⅧ（rFⅧ）用于临床成为可能. 从1985年起，对FⅧ基因突变的研究广泛展开，到目前为止，研究检测的病例数数以千计. 在研究过程中发现，有近1/3患者无家族史，致病是由于其FⅧ基因自发性突变所致，故血友病已成为研究人类基因突变的一个极好的模型. 本文就这方面研究的近况作一简述.

1 FⅧ的基因、结构及功能

FⅧ基因含186kb，由26个外显子及25个内含子组成. 其mRNA为9kb，编码一条2351氨基酸的前体多肽. 在去除N端19个氨基酸的引导肽后，即成为由2332氨基酸（Ala^{1}—Tyr^{2332}）组成的成熟FⅧ. 氨基酸的顺序分析表明，FⅧ由3个A结构域（各含约330—370残基），一个B结构域（含980残基）和2个C结构域（各含约150残基）组成，排列顺序为A_1-A_2-B-A_3-C_1-C_2. FⅧ在体内是以单链的形式合成的，该多肽链的分子量约为330kD. 由血浆中及由重组细胞培养分离纯化得到的rFⅧ则由2条链构成[7]. FⅧ的重链由多肽链N末端A_1-A_2-B或A_1-A_2所组成，轻链由多肽链C末端A_3-C_1-C_2所组成，2条肽链是通过非共价键Ca^{2+}而连接. 激活后的FⅧ，由于B结构域的缺失，分子量约163kD.

凝血酶在FⅧ的激活及灭活过程中起重要作用. 激活时，凝血酶在Arg^{740}—Ser^{741}及Arg^{1689}—Ser^{1690}处裂解肽键，释放出B结构域. 在A_1与A_2结构域间Arg^{372}—Ser^{373}肽键又可

收稿日期：1992-07-10，修回日期：1992-09-15

进一步水解，而将重链裂解成分子量分别为50 000及43 000两个多肽片段. 最近研究表明，Arg^{740}—Ser^{741}位点的裂解对FVⅢ的激活作用并非必需[8]. 凝血酶及活化蛋白C灭活FⅧ的位点分别位于Arg^{226}—Ala^{227}及Arg^{335}—Met^{336}的肽键.

在FⅧ多肽链中还有2个小的酸性区域，分别在A_1—A_2及B—A_3间，各由36及41个氨基酸组成. 其中第二酸性区Val^{1670}—Glu^{1684}及磺化的Tyr^{1689}是FⅧ与vWF结合的部位[9]. FⅧ激活时，Arg^{1689}—Ser^{1690}处肽键裂解，可将第二酸区释出，随之FⅧ与vWF相分离.

2 FⅧ基因突变的种类

由于FⅧ基因大，外显子多，散发病例中新突变的频率又较高，增加了基因突变研究的难度. 到目前为止，已发现80多例点突变，6例插入，7例小缺失及60例大缺失[10]. 但这还未能囊括全部突变，新的突变还在陆续发现. 目前检测到的FⅧ基因突变的类型大致有以下几种：

2.1 点突变（point mutations）

这是许多研究小组重点检测的目标. 点突变又称碱基置换，即DNA序列中，一种碱基为另一种碱基所取代.

Gitschier等1985年首次报道用限制性内切酶Taq I进行RFLP（限制性片段长度多态性）检测A型血友病FⅧ的基因突变，92例中检出4例有点突变，并认为Taq I对检测点突变特别有效[11]. 这是由于Taq I识别位点TCGA中的CpG二核苷酸是基因突变的热点. 目前已报道的点突变如表1所示，其中38%即为CpG二核苷酸的转换. 当然在FⅧ基因缺陷检测中，突变高频率集中于CpG的部分原因也可能是由于采用的方法是重点检测含CpG的DNA序列所致. 直至目前，检测到的大部分点突变位于外显子8，11，14，18，23，24和26.

在所检测到的80例点突变中，27例为重型，29例为中型，18例为轻型. 在表1中所列出的仅是不同的碱基置换，相同基因缺陷的不同病例并未一一列出. 一般而言，无义突变（即产生终止密码）多为重型，而错义突变（导致氨基酸置换）则多为中及轻型. 最近，Higuchi等人通过用变性梯度凝胶电泳（DGGE）——一种检测基因碱基置换的有效方法，检测了47例A型血友病的基因缺陷，其中30例为重型，17例为中及轻型. 其检测范围包括FⅧ基因99%编码区，94%的剪接接头部、启动子区域及3′端多聚A部位，结果在30例重型病例中仅发现16例（53%）有基因异常，17例中轻型病例中16例（94%）有基因异常. 研究者认为，重型病例检出率偏低的原因可能是由于在检测范围外的一些DNA片段如调控顺序及内含子顺序发生突变；或是对FⅧ基因表达有重要作用的一些基因外顺序异常；甚而可能是另一种基因的异常，使其对FⅧ的正常表达产生影响[12]. 至于推测是否正确，还有待进一步深入研究.

在研究中还发现，具有相同点突变的患者，其临床表型并不完全一致. 例如Pattinson等观察到一例在密码1689的C→T点突变病例是重型，另有二例相同点突变的病例则表现为中型. 该种情况较多，表1所列者并未能完全反映出这方面的情况. 造成此种差异的原因还不清楚，或许是FⅧ的表达还受上游其它一些因素的影响；或许是某些患者的FⅧ基因中还存在有第二个未检测到的碱基置换；或者有多态性变异等等. 当然也不排除不同实验室分型标准的差异.

研究中还发现约有5%患者其FⅧ抗原水平与FⅧ活性不符，即FⅧ抗原水平正常而FⅧ活力降低或缺乏，此类病例称交叉反应物阳性（CRM^+）. 这类患者的基因缺陷往往影响FⅧ的激活及与vWF的结合. 例如，在2个激活位点精氨酸残基（Arg^{372}，Arg^{1689}）中的碱基被置换，凝血酶就不能使FⅧ活化. 通过体外基因突变的研究也证实这些结果. 对1680位密码点突变的研究表明，当该位点的Tyr转变成Phe时，可影响血循环中FⅧ蛋白质的稳定性. 因该位点的Tyr是磺化的，系FⅧ与vWF相互作用

的关键残基，该残基发生异常，势必导致FⅧ从血循环中清除加快[9].

综上所述，对FⅧ基因点突变研究的重要性在于不仅可从分子水平上阐明该病的分子基础并进行基因诊断，也有助于了解FⅧ结构与功能的关系.

表1 A型血友病FⅧ基因中的点突变

密码位置	内含子/外显子	碱基置换	氨基酸置换	临床表型	密码位置	内含子/外显子	碱基置换	氨基酸置换	临床表型
−5	/1	CGA→TGA	Arg→Term	重型	704	/14	GCC→ACC	Ala→Thr	轻型
11	/1	GAA→GTA	Glu→Val	轻型	795	/14	CGA→TGA	Arg→Term	重型
—	2/	CGA→TGA	—	重型	1038	/14	GAG→AAG	Glu→Lys	轻/中型
89	/3	AAG→ACG	Lys→Thr	轻型	1680	/14	TAT→TTT	Tyr→Phe	轻型
91	/3	ATG→GTG	Met→Val	轻型	1680	/14	TAT→TGT	Tyr→Cys	重型
162	/4	GTG→ATG	Val→Met	中型	1686	/14	CAG→TAG	Gln→Term	重型
166	/4	AAA→ACA	Lys→Thr	轻型	1689	/14	CGC→TGC	Arg→Cys	中型
170	/4	TCA→TTA	Ser→Leu	中型	1689	/14	CGC→CAC	Arg→His	轻型
—	4/	CGA→CAA	—	轻型	1696	/14	CGA→TGA	Arg→Term	重型
205	/5	GGG→TGG	Gly→Trp	中型	1709	/14	TAT→TGT	Tyr→Cys	中型
—	5/	ag/→gg/	—	重型	1772	/15	ATG→ACG	Met→Thr	重型
—	6/	ag/→ac/	—	重型	1781	/16	CGT→CAT	Arg→His	轻/中型
255	/7	TGG→TGA	Trp→Term	重型	1784	/16	TCC→TAC	Ser→Tyr	重型
266	/7	GTG→GGG	Val→Gly	轻型	1825	/16	CCC→TCC	Pro→Ser	中型
272	/7	GAA→GGA	Glu→Gly	中型	1826	/16	ACT→CCT	Thr→Pro	轻型
282	/7	CGC→CAC	Arg→His	重型	1843	/16	CTG→CAG	Leu→Leu	中型
293	/7	TTC→TCC	Phe→Ser	轻型	1848	/17	CAC→CGC	His→Arg	轻/中型
295	/7	ACT→GCT	Thr→Ala	中型	1922	/18	AAT→GAT	Asn→Asp	重型
326	/8	GTA→CTA	Val→Leu	重型	1922	/18	AAT→AGT	Asn→Ser	中型
329	/8	TGT→CGT	Cys→Arg	重型	1941	/18	CGA→TGA	Arg→Term	重型
336	/8	CGA→TGA	Arg→Term	重型	1941	/18	CGA→CAA	Arg→Gln	轻/中型
372	/8	CGC→TGC	Arg→Cys	中型	1941	/18	CGA→CTA	Arg→Leu	中型
372	/8	CGC→CAC	Arg→His	轻型	1966	/18	CGA→TGA	Arg→Term	重型
412	/9	TTG→TTT	Leu→Phe	轻型	1997	/19	CGG→TGG	Arg→Trp	轻/中型
425	/9	AAA→AGA	Lys→Arg	重型	2101	/22	TTT→TTG	Phe→Leu	中型
427	/9	CGA→TGA	Arg→Term	重型	2105	/22	TAT→TGT	Tyr→Cys	轻型
473	/10	TAT→CAT	Tyr→His	轻型	2116	/22	CGA→TGA	Arg→Term	重型
473	/10	TAT→TGT	Tyr→Cys	中型	2116	/22	CGA→CCA	Arg→Pro	重型
479	/10	GGA→AGA	Gly→Arg	中型	2119	/22	TCC→TAC	Ser→Tyr	轻/中型
527	/11	CGG→TGG	Arg→Trp	轻型	2147	/23	CGA→TGA	Arg→Term	重型
531	/11	CGC→TGC	Arg→Cys	中型	2150	/23	CGT→CAT	Arg→His	轻/中型
531	/11	CGC→GGC	Arg→Gly	中型	2159	/23	CGC→TGC	Arg→Cys	轻型
535	/11	AGT→GGT	Ser→Gly	?	2163	/23	CGC→CAC	Arg→His	中型
542	/11	GAT→GGT	Asp→Gly	重型	2166	/23	GTT→GCT	Leu→Ser	重型
565	/11	CAG→AAG	Gln→Lys	中型	2209	/24	CGA→CTA	Arg→Leu	中型
566	/12	ATA→ACA	Ile→Thr	重型	2209	/24	CGA→TGA	Arg→Term	重型
577	/12	TCT→CCT	Ser→Pro	?	2209	/24	CGA→CAA	Arg→Gln	中/重型
583	/12	CGA→TGA	Arg→Term	重型	2229	/25	TGG→TGT	Trp→Cys	轻/重型
584	/12	AGC→ATC	Ser→Ile	?	—	25/	CAA→CGA	—	重型
593	/12	CGC→TGC	Arg→Cys	轻型	2300	/26	CCG→CTG	Pro→Leu	轻型
612	/12	AAC→AGC	Asn→Ser	?	2304	/26	CGC→TGC	Arg→Cys	轻型
—	12/	/gtgagt→gtgaat	—	轻型	2307	/26	CGA→TGA	Arg→Term	重型
					2307	/26	CGA→CTA	Arg→Leu	轻型
644	/13	GCA→GTA	Ala→Val	轻/中	2307	/26	CGA→CAA	Arg→Gln	中型

2.2 缺失（deletions）

表2所列出的是已报道的FⅧ基因缺失的研究结果. 缺失范围从1bp至200kb大小不等. 一般而言，有缺失的病例都为重型，由于反复出血，而导致关节肌肉畸形. 共发现60例有大的缺失（相同的缺失表2中没有列出）、除3例为中型外，其余均为重型. 3例中型中，2例为外显子22中丢失52个氨基酸，使合成的FⅧ在C_1区短缺. 另一例则是第23及24外显子缺失. 这3例中型病例的阅读框架均未发生改变.

表2　A型血友病FⅧ基因中的缺失

A. 大的缺失

长度/kb	内含子/外显子	临床表型	长度/kb	内含子/外显子	临床表型
＞210	/1—26	重型	?	/14—22	重型
＞55	/1—6	重型	50	/14—21	重型
＞35	/1—5	重型	12—16	/14	重型
＞2	/1	重型	6	/14	重型
＞1	/1	重型	2.3—3.0	/14	重型
?	/1	重型	2.5	/14	重型
?	1/	重型	?	/15—21	重型
9—12	/2—3	重型	13	/15—18	重型
60	/3—13	重型	?	/15	重型
11.7	/3—5	重型	?	/17—19	重型
1.7—2.0	/3	重型	?	/18，19	重型
133—145	/4—25	重型	1.7	/19—21	重型
57	/5—13	重型	5.5	/22	中型
?	/5，6	重型	?	22/	中/重型
2.5—10	/5，6	重型	?	/23—26	重型
2	/5	重型	＞16	/23—25	重型
2	/5或6	重型	39	/23—25	重型
10	/6	重型	?	/23—24	中型
7	/6	重型	＞3.4	/24—25	重型
3—6	/6	重型	22	/26	重型
110	/7—22	重型	＞18	/26	重型
40—56	/7—14	重型	14	/26	重型
15—20	/7—9	重型	8.7	/26	重型
60	/11—22	重型	＞2	/26	重型
＞36	/14—22	重型			

B. 小的缺失

长度（bp）	密码位置	临床表型	评　论
23	104—111	重型	包括IVS3供体剪接部位
4（AATG）	340—341	重型	从外显子8始框架飘移
2（GA）	341	重型	从外显子8始框架飘移
1（C）	1212	重型	从外显子14始框架飘移
1（A）	1439	重型	A8→A7，从外显子14始框架飘移
2（GA）	1535—1536	重型	从外显子14始框架飘移
2（AA）	2136	重型	A4→A2，从外显子23始框架飘移
3（CTC）	2204—2205	中型	缺失2205位脯氨酸

Miller 等用限制性内切酶检测 RFLP 方法对 1386 例 A 型血友病进行检测时发现有 34 例大缺失 (2.5%)[13]. 实际上缺失的发生率可能要高于这个数字. 目前用于研究缺失的手段主要是采用特异探针进行 DNA 印迹杂交，而小的缺失则只有通过直接 DNA 测序才能发现. 与点突变有所不同的是，迄今尚无有力证据说明缺失有热点. 但将有 FⅧ缺失病例与无缺失的重型病例相比较，前者体内产生抗体的频率是后者的 5 倍.

2.3 插入 (insertions)

表 3 所列出的是已报道的 6 例插入突变，其中有 4 例为一个碱基的插入而使阅读框架发生飘移. 较有意义的是 Kozazian 等[14]在对 240 例血友病例进行基因缺陷研究时发现有 2 例是不同长度的 L_1 顺序 (含 3′ 部分) 插入在第 14 号外显子中. L_1 顺序是人类特有的长顺序重复序列家族，长为 6.1kb，拷贝数为 10^5，散布于整个基因组中. 最新的研究表明，某些人类基因组中的 L_1 成分是反转录转座子.

Woods-Zamhels 等在对一血友病患者进行家系分析时发现，4 代人中均有 L_1 成份 (L_1 顺序的 3′ 部分) 插入至第 10 号内含子 (IVS10) 中. 由于患者的外祖父 FⅧ基因虽有该序列的插入，但并非血友病患者，提示该病例中 L_1 的插入并不是患者致病的原因[15].

表 3 A 型血友病 FⅧ基因中的插入突变

外显子	插入特征	临床表型
11	1 bp (G 在密码 513 位)	重型
14	3.8kb L_1 顺序	重型
14	2.1kb L_1 顺序	重型
14	1 bp (TCA→TCAA 在密码 1395 位)	重型
14	1 bp (A 在密码 1439 位连续 8 个 A 残基中)	重型
17	1 bp (A 在密码 1888 位连续 4 个 A 残基中))	重型

2.4 重复 (duplications)

直至目前仅发现 2 例有重复突变，1 例是 Gitschier 等人所发现. 先证者有一大的缺失 (39kb)，包括第 23—25 号外显子. 然而其母亲及姐姐有与其不同的基因缺陷，为 23kb 的一内含子重复出现于第 23 和第 24 号外显子之间. 研究者认为，内含子顺序发生重复，使基因趋于不稳定[16]. 意大利的一组研究人员在对 100 例 A 型血友病的研究时发现 1 例有外显子 13 的重复. 由于第 13 号外显子含 210bp，故其重复不会发生框架飘移. 该患者为轻型血友病，残留有 10%的 FⅧ活力. 究其致病机制，或许是由于 13 号外显子的重复，使 RNA 前体剪接不完全，导致正常转录水平降低，也可能是由于这种 mRNA 翻译的蛋白产物较大而不稳定[17].

2.5 影响 mRNA 剪接的突变 (mutations affecting mRNA splicing)

某些 FⅧ基因中碱基置换的结果可能影响到体内 mRNA 的正确剪接，可将异常剪接分 3 种情况：a. 在供体和受体剪接结合部的 GT 和 AG 二核苷酸发生突变. 如表 1 所示，在第 5 号内含子和第 6 号内含子受体位点的 AG 二核苷酸，分别发生 GG 和 AC 的碱基置换，2 例均为重型血友病；b. 供体和受体剪接结合部的延伸保守序列发生突变. 有 4 例的点突变是发生于供体剪接位点的延伸保守序列中；c. 由于突变而产生出新的供体或受体剪接位点. 此类突变仅见于 2 例，一例在内含子 4 (产生新的供体位点)，另一例在第 11 号外显子的 504 位残基 (无氨基酸置换)，二例均为轻型.

3 研究 FⅧ基因突变所用的主要方法

目前对遗传性疾病进行分子水平的检测手段有多种. FⅧ基因突变的研究始于 1985 年，最初所报道的点突变及缺失 (主要是一些大的缺失) 是用经典的 DNA 印迹杂交技术，即选择一些特殊的限制性内切酶，用 FⅧ的 cDNA 探针进行 RFLP 的检测. 由于 CpG 二核苷酸被认为是基因突变的热点，而限制性内切酶 Taq I 特异识别顺序为 TCGA. 在 FⅧ cDNA 顺序中有 7 个 Taq I 识别位点，其中 5 个若有 C→T 的置换，就成为终止密码[11]. 这就是起初多采用 Taq I 的原因. 该种方法仅可能检测出内切酶识别顺序内的碱基置换及一些大的缺失，而

对内切酶识别顺序外的点突变及小的缺失的发现则无能为力.

有许多研究采用的是用 PCR 技术将某些 DNA 区域扩增后直接测序. 除 CpG 二核苷酸为重点检测的目标外，由于考虑到凝血酶对 FⅧ活性的特殊作用，故实验者多将含 CpG 二核苷酸及含凝血酶作用位点的 DNA 片段作为测定对象. 例如 Higuchi 等人将 FⅧ基因 5′ 端区域的 DNA 顺序，含凝血酶作用位点 Arg^{372} 的第八号外显子及 Arg^{1689} 的第 14 号外显子 3′ 端的一些 DNA 片段用 PCR 方法扩增后进行直接测序，检测 127 例散发病例仅发现 4 例有点突变[18]. 鉴于该种方法检测基因突变要耗费大量的人力、财力，且检测效率并不高，故直接测序法检测基因缺陷仅适用于较小的基因. 而对于象 FⅧ这样由许多外显子组成的大基因，直接测序并不是上策.

近 2 年来，一些实验室相继采用变性梯度凝胶电泳（DGGE）法检测基因点突变，效果较好. 例如，Higuchi 等人设计 45 对引物，用 PCR 扩增 FⅧ基因片段进行 DGGE 检测，其范围包括 99%FⅧ编码区，41 个剪接结合部，在 29 例轻-中型病中就发现 25 例有点突变[19]. 通常先用 PCR 法将待测的 DNA 片段扩增，然后进行 DGGE，继而用溴乙锭染色显示条带位置，如患者的 DNA 片段条带位置与正常有所不同，则对该异常条带进行直接测序，以检出确切的碱基改变. 由于 DGGE 方法可将需作顺序分析的 DNA 片段限制到最小范围，从而节省大量人力及物力，不失为一种测定基因点突变的有效方法.

另外，也有用 RNA 酶裂解法检测点突变. 即以野生型的 cDNA 为模板合成放射性 RNA 探针，并与 PCR 扩增的 DNA 片段杂交，经 RNA 酶裂解后进行变性胶电泳和放射自显影. 如受检 DNA 片段中有碱基置换，则杂交的 RNA 不受保护，在碱基置换处被 RNA 酶裂解成大小不同的片段，从而可与正常的 DNA 片段相区分，对有碱基置换的 DNA 片段进行序列分析.

最近报道的另一种技术——单链构象多态性（SSCP）也有与 DGGE 类似的优点[20]. 该方法首先用 PCR 法扩增特异受检片段，且进行 PCR 时，应用放射标记的引物或掺入一种放射性同位素，扩增片段在变性后即进行中性聚丙烯酰胺凝胶电泳. 不同的单链 DNA 片段由于其碱基组成不同，呈不同的析叠构造. 同一序列的 DNA 片段只要有一个碱基改变，就可能对其单链构象产生影响，而使其电泳迁移率发生改变. 在放射自显影分析后，对迁移率有改变的片段即进行直接测序分析. 由于该技术方法简便，灵敏度高，已用于包括凝血因子Ⅸ在内的多种基因多态性分析及点突变检测，效果较好，值得在 FⅧ基因的研究中加以尝试.

参 考 文 献

1 Levinson B, Janco R, Phillips Ⅱ J *et al*. Necleic Acids Res, 1987; **15**: 9797

2 Cooper H A, Griggs T R, Wagner R H. Proc Natl Acad Sci USA, 1973; **70**: 2326

3 Gitschier J, Wood W I, Goralka T M *et al*. Nature, 1984; **312**: 326

4 Wood W I, Capon D J, Simonsen C C *et al*. Nature, 1984; **312**: 330

5 Vehar G A, Keyt B, Eaton D *et al*. Nature, 1984; **312**: 337

6 Toole J J, Knopf J L, Wozney J M *et al*. Nature, 1984; **312**: 342

7 Eaton D L, Hass P E, Riddle L *et al*. J Biol Chem, 1987; **262**: 3285

8 Pittman D D, Kaufman R J. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 2429

9 Leyte A, yan Schijndel H B, Niehrs C *et al*. J Biol Chem, 1991; **266**: 740

10 Tuddenham E G D, Cooper D N, Gitschier J *et al*. Nucleic Acids Res, 1991; **19**: 4821

11 Gitschier J, Wood W I, Tuddenham E G D *et al*. Nature, 1985; **315**: 427

12 Higuchi M, Kazazian H H, Kasch L *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 7405

13 Millar D S, Steinbrecher R A, Wieland K *et al*. Hum Genet, 1990; **86**: 219

14 Kazazian H H, Wong C, Youssoufian H *et al*. Nature, 1988; **332**: 164

15 Woods-Samuels P, Wong C, Mathias S L *et al*. Genomics, 1989; **4**: 290
16 Gitschier J. Am J Hum Genet, 1988; **43**: 274
17 Casula L, Murru S, Pecorara M *et al*. Blood, 1990; **75**: 662
18 Higuchi M, Wong C, Kochhan C *et al*. Genomics, 1990; **6**: 65
19 Higuchi M, Antonarakis S E, Kasch L *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 8307
20 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86**: 2766

转基因动物的乳腺表达

陈瑞环
（中国科学院生物物理研究所，北京 100101）

摘要 转基因动物乳腺组织特异性表达异源基因是近年来基因工程中引人注目的途径. 文章介绍了这一途径有关的乳汁蛋白基因、乳汁蛋白基因与异源基因的融合方式、重组基因的必要构成以及可能影响高效表达的因素.

关键词 转基因动物，乳汁蛋白基因，乳腺组织特异性表达

自从 Palmiter 等[1]用小鼠金属硫蛋白-I 基因融合大鼠生长激素基因显微注射入小鼠受精卵原核中，获得了“超级小鼠”，并提出可以从转基因动物中获取有价值的蛋白质以来，转基因动物的研究发展迅速. 总体来看主要有两个方面：一是试图改造动物个体的遗传性状，如生长速率，肉质构成，繁殖行为等，与传统的品种选育相比有了质的突破，可以进行物种间遗传性状基因的直接转移；另一是试图利用转基因动物生产目的蛋白，与原核表达系统相比，生产的蛋白具有充分的修饰，作为生物反应器的转基因动物具有潜在的无限增殖的能力. 由于动物在哺乳期乳腺能大量合成蛋白质，并能不进入循环系统分泌至乳汁中，因此选择乳腺作为特异性表达重组蛋白的器官，能方便地收集产品而不损害动物个体，有可能进行廉价大量生产. Gordon 等[2]首次表明哺乳期小鼠能分泌有生物活性的人组织源性纤溶酶原激活剂（tPA）进入乳汁，以后短短几年，先后有利用不同的乳汁蛋白基因启动子及其调控区指导不同的目的基因在乳腺中表达并获得分泌的报道，尤其是已有获得高效表达的转基因羊以及首例转基因牛[3-5]. 所有这些研究令人信服地表明了乳腺特异表达的转基因动物作为商用生物反应器的可行性.

转基因动物中异源基因的组织特异性表达依赖于组织特异性表达基因的启动子及其上游调控区，如心肌球蛋白轻链-2（cardiac myosin light-chain-2）基因[6]、唾液分泌蛋白（partid secretory protein，PSP）基因[7]、α1（Ⅰ）胶原〔α1（Ⅰ）collagen〕基因[8]启动子分别实现了目的基因在心肌、唾液腺和产胶原组织的特异表达. 乳汁蛋白基因启动子能指导异源基因在乳腺特异表达. 表达构件由三部分组成：乳汁蛋白基因 5′ 端及上游区，目的基因，包含 PolyA 信号的基因 3′ 端及下游区. 目前使用的乳汁蛋白基因及其表达构件主要有以下几种.

1 乳清酸蛋白基因及其表达构件

乳清酸蛋白是一种富含半胱氨酸的酸性蛋白，是啮齿动物乳汁中的主要蛋白，而在其它动物如猪或反刍类动物中并未发现. 小鼠乳清酸蛋白基因（whey acidic protein gene，WAP）

收稿日期：1992-07-16，修回日期：1992-08-19

(China). 1994: **21** (1): 27

As a family of multifunctional cell-proliferation regulating factor. TGF-β has great potential in clinical application. Both naturaly secreted and recombinantly expressed TGF-β_s are existed in the inactive form of latent complex. Activation of latent TGF-β complex is an important pathway of modulating the biological function of TGF-β. This review concerns on the molecular structure of both natural and recombinant latent TGF-β complexes. and their possible activation mechanisms under physiological conditions.

Key words transforming growth factor-β. latent complex. activation mechanism

Lipid Containing Protein. Pan Huazhen. (*Institute of Basic Medical Sciences. Chinese Acadamy of Medical Sciences. Beijing* 100005). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994: **21** (1): 31

Proteins anchored in membrane by fatty acids or glycosylphosphatidylinsitol have been found in a wide variety of cells. Recent evidence shows that the function of these proteins widely related with immunology and signal transduction. This review summarizes the progress in the past few years concerning the structure. biosynthesis and functions of these proteins.

Key words lipid containing protein. palmitic acid myristic acid. glycosylphosphatidylinositol. structure. biosynthesis. function

Progress in the Studies on Gene Mutations of Factor Ⅷ. Geng Jieping. Qi Zhengwu. Chen Zhu. (*Shanghai Institute of Biochemistry. Academia Sinica. Shanghai* 200031). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994: **21** (1): 36

Human factor Ⅷ is an important cofactor in the intrinsic blood coagulation. Hemophilia A is the most common severe inherited bleeding disease due to the deficiency or abnormality of factor Ⅷ. Factor Ⅷ gene has been successfully cloned and expressed in eukaryotic cells that promotes the studies on the gene mutations of factor Ⅷ widely and thoroughly. This article introduces the recent progress about this field. and new techniques used in researches. The study on gene abnormalities of factor Ⅷ can be regarded as an excellent example both in depth and width for researches of the congenital diseases.

Key words coagulation factor Ⅷ. hemophilia A. gene mutations

Gene Expression Specifically in Mammary Glands of Transgenic Animals. Chen Ruihuan. (*Institute of Biophysics. Academia Sinica. Beijing* 100101). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994: **21** (1): 42

Heterogeneous genes express specifically in mammary glands of transgenic animals is established recently in gene engineering. The milk protein genes and their fusion fashions with heterogenous genes. the necessary elements and the possible factors which effect the expression of the recombinant genes in transgenic animals are introduced.

Key words milk protein genes. transgenic animals. mammary-gland-specific gene expression

Progression in p53 and Rb Gene Methylation. Yang Heping. Zhou Airu. Tang Jian. (*Department of Cardiopulmonary Endocrine. Beijing Medical University. Beijing* 100083). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994: **21** (1): 48

Progress in p53 and retinoblastoma (Rb) gene methylation is introduced. CpG dinucleotides are the hot spots of DNA methylation and mu-