

载脂蛋白 E 多态性分析方法的研究进展

陆元善 综述 庄庆祺 审校

(上海市第一人民医院检验科, 上海 200080)

摘要 本文就载脂蛋白 E 多态性分析方法方面的有关文献进行综述。通过以等电聚焦电泳为基础的蛋白水平检测和以多聚酶链反应为工具的分子生物学水平的分型分析, 提出了多态性检测的发展趋势, 并简述了载脂蛋白 E 与动脉粥样硬化之间的关系。

关键词 载脂蛋白 E; 表型; 基因型; 等电聚焦电泳; 多聚酶链反应

载脂蛋白 E 在血液胆固醇的转运中起中介作用, 通过与肝细胞上的载脂蛋白 E 受体的相互作用, 将周围组织中的胆固醇转运到肝脏进行代谢, 从而影响血脂水平。不同表型的载脂蛋白 E 对受体亲和力有差异, 所以分析载脂蛋白 E 的多态性对研究脂质代谢及其相关的疾病有着十分重要的意义。目前已从蛋白水平和基因水平检测到载脂蛋白 E 的多态性。

1 载脂蛋白 E 多态性的分子基础及分型

载脂蛋白 E 基因位于 19 号染色体上, 由 3 597 个碱基组成, 常见的等位基因 E2、E3 和 E4 的变异发生在第 4 外显子的两个位点, 它们分别编码成熟载脂蛋白 E 的第 112 位和 158 位氨基酸。因而成熟载脂蛋白 E 的第 112 位和 158 位是常见异构体的氨基酸变异位置, E2 两位置均为半胱氨酸; E3 的 112 位为半胱氨酸, 158 位为精氨酸; E4 两位置均为精氨酸。由于半胱氨酸为中性氨基酸, 而精氨酸为碱性氨基酸, 所以三种常见异构体的等电点就有差别, 电泳时可以分成不同的等电

点区带, 经直接染色或结合免疫技术, 就可以分辨出不同的表型。基因位点的碱基突变使其构型发生变化, 也使得限制性内切酶的酶切位点数较野生型增加或减少。可用针对位点特异的引物, 扩增分析; 也可通过对目标基因片段的扩增, 经过变性或酶切处理, 电泳后与标准片段相比较, 即可分出载脂蛋白 E 的基因型。

除常见的 E2、E3 和 E4 基因型外, 目前还检测到一些稀有的异构体, 如 E1、E5、E7、E2 chrisrchurch 和 E1 Harrisburg 等。

2 检测方法

2.1 表型分析

1975 年 Utermann 等^[1]在研究 III 型高脂血症病人的血样时, 发现载脂蛋白 E 存在多态性。两年后, 在研究德国人群中 III 型高脂血症发病情况时, 他们用等电聚焦电泳分析载脂蛋白 E 表型, 并提出了载脂蛋白 E 的遗传模式。先将血样超速离心得到极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL), 脱脂, 再在脲素存在的情况下进行等电聚焦电泳, 最后用考马斯亮兰染色, 该法可将载脂蛋白 E 清晰地分成 E1、E2、E3、和 E4 等表型。此后, 有人对此作出改进, 主要集中在: ①电泳前的样本处理: 先分出 VLDL, 再分出富含精氨酸部分^[2]或经过层析柱分离出载脂蛋白 E^[3], 然后再进行等电聚焦电泳; ②电泳聚焦条件或过程的改变: 在进行等电聚焦电泳时加入十二烷基磺酸钠^[2]或二巯基苏糖醇; 或先进行预聚焦, 弃去阳极电泳液再上样^[3]; ③电泳后

的处理:用过氯酸-考马斯亮蓝直接染色,简化操作,且染色后电泳带着色深,不易褪色^[3]。这些改进均取得了较好的电泳分离带,有助于结果的判断。

1980年,Zannis VI和Breslow JL运用双相电泳分析载脂蛋白E的多态性,第一相利用蛋白质的等电点不同将其分开,第二相根据分子量的差异将不同的异构体分开,解决了等电聚焦电泳中一些因翻译后修饰形成的异构体不能完全分开的问题。本法还可以直接从凝胶上将异构体切下,进行肽链的同源性比较,便于发现多态性蛋白的亚型。他们发现了等电聚焦电泳中所没有观察到的异构体,并发觉用神经氨酸酶处理样品并不能改变主要载脂蛋白E异构体的分子量和等电点,而对唾液酸糖基化修饰的异构体有作用。双相电泳结合家系分析,揭示了载脂蛋白E多态性产生的原因——等位基因控制及其翻译后的修饰^[4,5]。1982年,有人就等电聚焦电泳与双相电泳进行了比较,认为结合肝素-Mg²⁺沉淀技术,等电聚焦电泳较双相电泳有明显优越性,可用于大样本量的普查,而双相电泳却操作复杂、费时,对技术人员经验要求高。单相等电聚焦电泳对载脂蛋白E的表型分析是可行的,但对表型为E4的血样要得到正确的基因水平解释,双相电泳必不可少^[6]。1986年,Western blot用于载脂蛋白E的表型分析,样品先经等电聚焦电泳后,再印迹到硝酸纤维素膜上,然后用第一抗体,即抗载脂蛋白E抗体处理,分析表型^[7-9]。该法无需超速离心分离血样,可直接用血清或血浆进行分析,样本用量少,结果判断不受非载脂蛋白E蛋白的影响,适用于大样本检测。为使操作更为简便,有人用盐酸胍代替常用的脱脂来处理血清^[10];因载脂蛋白有疏水性,在含有去污剂的情况下,电泳分离出载脂蛋白E,再进行免疫印迹^[11];或对血清用pH 6.8的磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、EDTA及EDTA-Na₂缓冲液进行透析,用3 M的尿素代替常用的6~8 M的尿素进行等电聚焦电泳,分析其表型^[12]。1990年,Luley C等采用免疫固定法分析载脂蛋白E的多态性,先沉淀含有载脂蛋白E的VLDL、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL),再用去污剂处理,在琼脂糖上进行等电聚焦电泳,然后用抗体进行分析,既简化了操作,又降低了成本^[13]。

2.2 基因型分析

1986年,Funke H等^[14]用Southern blot分析载脂蛋白E基因的多态性,他们先用限制性内切酶Apa I将染色体DNA切成含有2.1 kb长度的片段后,进行电泳,再用针对158-Arg、158-Cys的寡核苷酸探针与电泳

后的DNA片段进行杂交,放射自显影,检测到载脂蛋白E2和E3。随着多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的广泛应用,使DNA的分型越来越方便,样本用量越来越少。常用者有以下三种:①PCR扩增基因组DNA后,用等位基因特异的寡核苷酸探针进行杂交分析^[15];②进行自动化碱基序列分析^[16];③用限制性内切酶酶切扩增产物,对酶切片段进行分析^[17-19]。当然,酶切片段长度多态性分析对稀有的变异可能会造成漏检,但若与表型分析结合起来,可减少漏检^[18]。由于酶切片段分析需要一定量的DNA,而被扩增模板的G+C含量较高,影响产物的生成。为了提高产物的量,有人用两套引物分两步扩增含目标片段的基因:第一步扩增较所需目的基因片段长且包含有目的基因的片段部分;第二步以第一步的产物为模板,扩增目的基因,进行分析^[17];或在设计引物时改变下游引物的5'端的核苷酸序列,改变扩增条件,提高扩增效率^[20];或在扩增反应缓冲液中加入二甲基亚砜,但加入的二甲基亚砜量对Taq DNA聚合酶活力影响较大,1%二甲基亚砜对酶无抑制作用,10%的二甲基亚砜70℃时可抑制50%的酶活性^[21-23]。除上述对PCR产物的分析方法外,也有利用Taq DNA聚合酶对引物3'端核苷酸的特异性,采用扩增惰性突变系统分析第112位和115位点突变。其原理为:如果引物的3'端核苷酸与模板不相配,扩增就不能进行。因而除共用引物外,还需合成一对针对某一位点的引物:与野生型相配的引物1和与突变型相配的引物2。若基因组DNA在该位点发生了突变,引物2被延伸,并扩增,引物1则不被延伸及扩增;反之亦然。这样就能直接检测基因中的已知位点突变^[21-23]。但该法工作量大,每份样本需做双份试验。1993年,有人用单链DNA构型多态性技术分析载脂蛋白E的基因型。由于DNA大分子在凝胶中的电泳迁移率取决于分子的大小及空间构型,在非变性条件下,单链DNA由于分子内作用形成卷曲构型。若单链DNA中有碱基发生了突变,其构型亦发生变化,电泳迁移率必受到影响,从而将之与无突变的单链DNA分开。运用银染代替单链DNA构型多态性技术中常用的放射性标记引物,使检测为方便,为研究载脂蛋白E基因型提供了可检测稀有突变的手段^[24]。

基因型分析检测载脂蛋白E多态性较蛋白水平上的分析要准确得多,因为翻译后的修饰会影响到载脂蛋白E的分子量和电荷,即使使用酶处理也不能完全消除糖基化对蛋白表型的影响^[23]。另外,E₃携带者载脂蛋白E水平较E₂/E₃者低,在进行表型分析时,可能会因一些电泳带着色较浅而被忽略,导致分型错误,且

DNA 分型可用煮沸过的片段全面进行^[25]。

3 载脂蛋白 E 与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是由于胆固醇及其它脂质在血管内膜堆积,引起细胞增殖和血管纤维化,导致管壁增厚和管腔狭窄。因此凡能增加动脉壁胆固醇内流和沉积的脂蛋白均具有致动脉粥样硬化作用,促进胆固醇外运的脂蛋白有抗动脉粥样硬化作用,前者有 LDL、 β -VLDL 及氧化型 LDL 等,后者如 HDL。不同的载脂蛋白 E 异构体对受体的亲和力存在差异,使不同的异构体携带者的血清脂质产生差别。 E_1 携带者 LDL 水平较高,与 E_2 和 E_3 携带者相比,其动脉粥样硬化发病率高,病变累及范围广且较严重^[26,27],有研究表明,在去除血脂的影响后, E_1 仍与冠心病显著相关^[28]。

总之,对载脂蛋白 E 的多态性分析正朝着快速、简便、结果易于判断且准确度高的方向发展。蛋白水平分析已经有自动化等电聚焦电泳结合免疫固定的方法^[29],基因水平分析将随着 PCR 自动化及毛细管电泳在 DNA 片段分析上的应用,也会有自动化分析方法出现。

参考文献

- 1 Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbeta lipoproteinemia in man. *Nature*, 1997, **269**: 604~607.
- 2 Pagnan A, Havel RJ, Kane JP, et al. Characterization of human very low density lipoproteins containing two electrophoretic population: double pre-beta lipoproteinemia and primary dysbeta lipoproteinemia. *J Lipid Res*, 1977, **18**: 613~622.
- 3 Warnick GR, Mayfield C, Albers JJ, et al. Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type III. *Clin Chem*, 1979, **25**: 279~284.
- 4 Zannis VI, Breslow JL. Characterization of a unique human apolipoprotein E variant associated with type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem*, 1980, **255**: 1 759~762.
- 5 Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochem*, 1981, **1** 033~041.
- 6 Utermann G, Steinmetz A, Weber W. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism; comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet*, 1982, **60**: 344~351.
- 7 Menzel HJ, Utermann G. Apolipoprotein E phenotyping from serum by Western blotting. *Electrophoresis*, 1986, **7**: 492~495.
- 8 牛庆田, 国汉帮, 山村卓, 等. 免疫印迹法测定血清载脂蛋白 E 的表型. *中华医学检查杂志*, 1994, **17**: 16~18.
- 9 吕新跃, 陈保生, 薛红, 等. 微量血清等电聚焦电泳及免疫印迹法测定人载脂蛋白 E 表型. *中华医学检验杂志*, 1994, **17**: 26~28.
- 10 Havekes LM, Knijff PD, Beisiegel U, et al. A rapid micromethod for apolipoprotein E phenotyping directly in serum. *J Lipid Res*, 1987, **28**: 455~463.
- 11 Steinmetz A. Phenotyping of human apolipoprotein E from whole blood plasma by immunoblotting. *J Lipid Res*, 1987, **28**: 1 364~370.
- 12 Kamboh MI, Ferrell RE, Kottke H. Genetic studies of human apolipoprotein VA novel rapid procedure to screen apolipoprotein E polymorphism. *J Lipid Res*, 1988, **29**: 1 535~543.
- 13 Luley C, Baumstark MW, Wieland H. Rapid apolipoprotein E phenotyping by immunofixation in agarose. *J Lipid Res*, 1991, **32**: 880~883.
- 14 Funke H, Rust S, Assmann G. Detection of apolipoprotein E variants by an oligonucleotide "melting" procedure. *Clin Chem*, 1986, **32**: 1 285~289.
- 15 Smeets HJM, Stuyt PM, Stalenhoef AFH, et al. Identification of apolipoprotein E polymorphism by using synthetic oligonucleotides. *J Lipid Res*, 1988, **29**: 1 231~237.
- 16 Emi M, Wu LL, Robertson MA, et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics*, 1988, **3**: 373~379.
- 17 Kontula K, Aalto-Setälä K, Kuusi T, et al. Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing. *Clin Chem*, 1990, **36**: 2 087~092.
- 18 Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *Lipid Res*, 1990, **31**: 545~548.
- 19 Klasen EC, Talmud PJ, Havekes L, et al. A common restriction fragment length polymorphism of human apolipoprotein E gene and its relationship to type III hyperlipidaemia. *Hum Genet*, 1987, **75**: 244~247.
- 20 Reymer PWA, Groenemeyer BE, van de Burg R, et al. Apolipoprotein E genotyping on agarose gels. *Clin Chem*, 1995, **41**: 1 046~047.

- 21 Wenham PR, Newton CR, Price WH. Analysis of apolipoprotein E genotypes by the amplification refractory mutation system. *Clin Chem*, 1991, **37**: 241~244.
- 22 Main BF, Jones PJH, MacGillivray RTA, et al. Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide primers. *J Lipid Res*, 1991, **32**: 183~187.
- 23 Stavl Jenic-Rukavina A, Sertic J, Salzer B, et al. Apolipoprotein E phenotypes and genotypes as determined by polymerase chain reaction using allele-specific oligonucleotide probes and the amplification refractory mutation system in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *CCA*, 1993, **216**: 191~198.
- 24 Tsai MY, Suess P, Schwichtenberg K, et al. Determination of apolipoprotein E genotypes by single-strand conformational polymorphism. *Clin Chem*, 1993, **39**: 2121~2124.
- 25 Wenham PR, Price WH, Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet*, 1991, **337**: 1558~1559.
- 26 Scheer WD, Boudreau DA, Malcom GT, et al. Apolipoprotein E and atherosclerosis in Alaska Natives. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 197~202.
- 27 Lehtinen S, Lehtimäki T, Sisto T, et al. Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 83~91.
- 28 Hixson JE. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. *Arteriosclerosis Thromb*, 1991, **11**: 1237~244.
- 29 Hackler R, Schafer JR, Motzny S, et al. Rapid determination of apolipoprotein E phenotypes from whole plasma by automated isoelectric focusing using phastsystemTM and immunofixation. *J Lipid Res*, 1994, **35**: 153~158.
- (1997-02-01 收到, 1997-09-15 修回)