

国人载脂蛋白 AⅣ多态性及其分布

郭改娥 刘德文^① 沃兴德^② 唐利华^②

(长治医学院生物化学教研室, 长治 046000)

The Polymorphism and Phenotypic Distribution of the Apolipoprotein AⅣ in Chinese

GUO Gai-E, LIU De-Wen, WO Xing-De and TANG Li-Hua

(Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

ABSTRACT

Aim To determine the genetic polymorphism and phenotypic distribution of healthy human sera apolipoprotein AⅣ in Chinese.

Methods The sera from 180 normal individuals has been detected to determine apolipoprotein AⅣ by iso-electric focusing (IEF) techniques and immunoblotting.

Results The gene frequencies of the two common alleles, apolipoprotein AⅣ * 1 and * 2, were 99.44% and 0.28%, respectively. The distribution of the two common phenotypes, apolipoprotein AⅣ-1/1 and AⅣ-2/1, were 98.89% and 0.56%, respectively.

Conclusion The statistically difference was significant in apolipoprotein AⅣ allele frequencies and phenotype distribution between normal Chinese and American and European ($P < 0.05$). There is no significant difference in apolipoprotein AⅣ allele frequencies and phenotype distribution between normal Chinese and other Asian ($P > 0.05$). These results suggest that apolipoprotein AⅣ polymorphism is different with different regions and races.

KEY WORDS Apolipoprotein AⅣ; Polymorphism; Genetic phenotype; Gene frequency

摘要 为检测我国健康汉族人群载脂蛋白 AⅣ的多态性,用等电聚焦电泳和免疫印迹技术检测了180名健康汉族人载脂蛋白 AⅣ的基因频率和表型分布。结果发现,载脂蛋白 AⅣ的等位基因 AⅣ*1 和 AⅣ*2 的出现频率分别为 99.44% 和 0.28%;两种常见表型载脂蛋白 AⅣ-1/1 和 AⅣ-2/1 的分布分别为 98.89% 和 0.56%。与欧美等西方国家人群相比有显著性差异($P < 0.05$),与日本和马来西亚人相比无显著性差异($P > 0.05$)。提示,不同种族的人群载脂蛋白 AⅣ的基因频率和表型分布不相同,推测我国汉族人群以载脂蛋白 AⅣ*1 等位基因和载脂蛋白 AⅣ-1/1 表型分布为主。

关键词 载脂蛋白 AⅣ; 多态性; 遗传表型; 基因频率

人载脂蛋白 AⅣ有遗传多态性,常见的两种异构体为载脂蛋白 AⅣ-1 和载脂蛋白 AⅣ-2,常见的两种表型为载脂蛋白 AⅣ-1/1 和载脂蛋白 AⅣ-2/1,其等位基因为常染色体共显性遗传。有研究显示,两种常见异构体的结构、功能和代谢都有差异,在多个人群中载脂蛋白 AⅣ具有多态性。国内还未见到有关这方面的报道,本文检测了我国健康人群载脂蛋白 AⅣ的基因频率和遗传表型分布,现就此作一报道。

1 材料与方法

1.1 对象与材料

正常汉族人群 180 人,均来自杭州体检合格的自愿献血者。其中男性 105 人,女性 75 人,平均年龄 36.75 岁,相互之间无血缘关系。

所用兔抗人载脂蛋白 AⅣ多克隆抗体由奥地利 Graze 大学 Kostner 教授赠送;羊抗兔免疫球蛋白 G-辣根过氧化物酶(IgG-HRP)酶标抗体由浙江中医学院分子医学研究所制备;硝酸纤维素膜购于 Amershan 公司;两性电解质(ampholine, pH4~6)为 Pharmacia LKB (Sweden)产品。其它试剂均为国产分析纯。

①山西医科大学生物化学教研室,太原 030001

②浙江中医学院分子医学研究所,杭州 310009

1.2 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳及转移电泳

用微型垂直板电泳,槽进行等电聚焦电泳和转移电泳。等电聚焦电泳所用阴极液为 0.01 mol/L NaOH,阳极液为 0.01 mol/L H_2PO_4 。将 15 μ L 稀释 7 倍的血清样品加入含有两性电解质的聚丙烯酰胺凝胶板的阴极端,在稳定电压下进行电泳,50 V 15 min,100 V 45 min,200 V 60 min,300 V 3 h。通过转移电泳将等电聚焦后的凝胶板中的血清蛋白转移至硝酸纤维素膜上。转移电泳缓冲液为 pH8.3、含 20% 甲醇的 Tris-甘氨酸溶液,在 150 mA 稳定电流下电泳 75 min。

1.3 免疫印迹实验

将经过转移电泳的硝酸纤维素膜放入缓冲液 A (pH7.4 的 Tris-NaCl 溶液)中洗涤 2 次后,加入 3% BSA 封闭液,室温摇床上封闭 2 h;再用缓冲液 A 洗涤 2 次后,加入 1% BSA 稀释的 1:500 的兔抗人载脂蛋白 AN 多克隆抗体,室温摇床孵育 2 h,再按以下顺序洗涤硝酸纤维素膜。缓冲液 A 洗涤 2 次,每次 1 min;缓冲液 B(缓冲液 A 中加入 0.5% SDS、1.25% 脱氧胆酸钠和 0.05% 的 Tween 20)洗涤 2 次,每次 10 min;再用缓冲液 A 洗涤 2 次,每次 1 min;然后加入 1:800 的羊抗兔免疫球蛋白 G-辣根过氧化物酶(IgG-HRP)酶标抗体,室温摇床上孵育 2 h,重复上述洗涤后,甩干,加入新配制的底物液(含底物 4-氯-1-奈酚和 30% H_2O_2),硝酸纤维素膜上显示出清晰的紫色条带后,用自来水冲洗,终止反应,冲洗 10 min 左右,将硝酸纤维素膜避光保存。

1.4 载脂蛋白 AN 的分型

根据 Menzel 等^[1]的分型方法将每个个体的载脂蛋白 AN 进行分型。每个个体都有 1~2 条主要蛋白带,将频率最高的主要蛋白带被命名为载脂蛋白 AN-1,等电点小于载脂蛋白 AN-1 的为载脂蛋白 AN-0,等电点大于载脂蛋白 AN-1 的依次为载脂蛋白 AN-2、AN-3 和 AN-4 等。次要的蛋白条带可能是载脂蛋白 AN 翻译后的改变^[1],不作为分型的根据。只有一条主要蛋白带者为纯合子基因,如只有载脂蛋白 AN-1 的载脂蛋白 AN 表型为载脂蛋白 AN-1/1;有两条主要蛋白带的为杂合子基因,如有载脂蛋白 AN-1 和 AN-2 两条主要蛋白带的载脂蛋白 AN 的表型为载脂蛋白 AN-2/1 型。以此类推。

2 结果

研究的 180 人中,都有 1~2 条主要蛋白带和 2~5 条次要蛋白带,其中 178 例只有一条主要蛋白带,其表型为载脂蛋白 AN-1/1,占 98.89%。其余 2 例有两条主要蛋白带,1 例是载脂蛋白 AN-1 和 AN-2(图 1, Figure 1, 第 6 列),其表型为载脂蛋白 AN-2/1;另 1 例是载脂蛋白 AN-1 和载脂蛋白 AN-0(图 1, Figure 1, 第 5 列),其表型为载脂蛋白 AN-1/0,各占 0.56%(图 2, Figure 2)。

载脂蛋白 AN 的等位基因载脂蛋白 AN^{*1}和 AN^{*2}基因频率分别为 99.44% 和 0.28%。载脂蛋白 AN^{*0} 罕见等位基因频率为 0.28%。

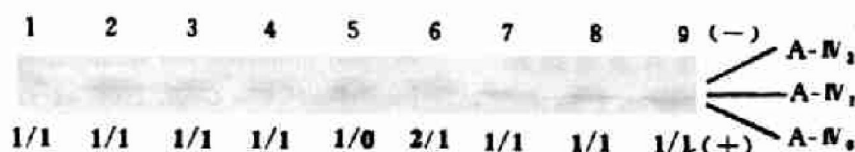


Figure 1. Apolipoprotein AN and it's phenotypes. The sera from nine unrelated subjects was separated by isoelectric focusing in a pH range of 4~6 (anode at bottom), blotted and immunostained using a polyclonal rabbit human apolipoprotein AN antibody. The three different apolipoprotein AN isoproteins are indicated on the right side. The resulting apolipoprotein AN phenotypes are given below the immunoblot.



Figure 2. Apolipoprotein AN-1/1. All phenotypes of apolipoprotein AN from ten unrelated subjects are apolipoprotein AN-1/1.

3 讨论

近年来,对载脂蛋白 A IV 多态性研究倍加关注,可能与载脂蛋白 A IV 在胆固醇的逆向转运过程中起重要作用,及可能抑制动脉粥样硬化的发生发展有关。而载脂蛋白 A IV 多态性分子中的两种常见异构体载脂蛋白 A IV-1 和 A IV-2 的结构、代谢以及在胆固醇逆向转运中的功能都有差异,对脂蛋白的代谢有着不同的影响作用。国外报道在不同国家、地区和种族中,载脂蛋白 A IV 的等位基因频率和表型分布不尽相同,如两个常见等位基因载脂蛋白 A IV*1 和 A IV*2 的基因频率分别为:美国白人 0.909~0.927 及 0.067~0.088^[2,3],美国黑人 0.961 及 0.035^[2],奥地利人 0.918 及 0.077^[4],德国人 0.923 及 0.075^[1],马来西亚人 0.969 和 0.011^[5],日本人 0.9984 和 0.0016^[6]等。

本文研究表明,我国健康人群血清载脂蛋白 A IV 的两个常见等位基因载脂蛋白 A IV*1 和载脂蛋白 A IV*2 的基因频率分别是 99.44% 和 0.28%,两个常见表型载脂蛋白 A IV-1/1 和载脂蛋白 A IV-2/1 的分布分别为 98.89% 和 0.56%。分析得出,我国健康人群与欧洲五个不同地区的人群^[7]、美国白人、美国黑人、奥地利人、德国人、法国人^[8,9]和印度人^[5]等人群的载脂蛋白 A IV 的等位基因频率有显著性差异($P < 0.01$),与新加坡华人^[5]、马来西亚人和日本人载脂蛋白 A IV 等位基因频率无显著性差异($P > 0.05$),同样,我国健康人群与欧美等西方国家人群相比,载脂蛋白 A IV 的表型分布有显著差异($P < 0.05$),与日本、马来西亚和新加坡华人相比,其表型分布无显著性差异($P > 0.05$)。以上提示,人体血清载脂蛋白 A IV 的基因频率和遗传

表型分布随人群种族的不同而有所差异。

参考文献

- 1 Menzel HJ, Kovary PM, Assmann G. Apolipoprotein A-IV polymorphism in man. *Hum Genet*, 1982, **62**: 349~352.
- 2 Kamboh MI, Ferrel RE. Genetic studies of human apolipoprotein polymorphism of apolipoprotein A IV. *Am J Hum Genet*, 1987, **41**: 119~127.
- 3 Eicher JE, Kuller LH, Ferrel RE, et al. Phenotypic effects of apolipoprotein structural variation on lipid profiles/ Apolipoprotein A IV and quantitative lipid measures in the healthy women study. *Genet Epidemiol*, 1987, **6**: 493~498.
- 4 Menzel HJ, Boerwinkle E, Schrang-Will S, et al. Human apolipoprotein A IV polymorphism: Frequency and effect on lipid and lipoprotein levels. *Hum Genet*, 1988, **79**: 368~373.
- 5 Saha N. Apolipoprotein polymorphism in singapore ethnic groups. *Hum Hered*, 1991, **41**(1): 47~52.
- 6 Akiyama K. Population study of apolipoprotein A-IV polymorphism and report of a new variant in Japanese. *Hum Hered*, 1989, **39**(5): 302~303.
- 7 Ehnholm C, Tenkanen H, de Knijff P, et al. Genetic polymorphism of apolipoprotein A IV in five different regions of Europe. Relation to plasma lipoprotein and to history of myocardial infarction: The EARS Study. *Atherosclerosis*, 1994, **107**: 229~238.
- 8 Visvikis S, Steinmetz J, Boerwinkle E, et al. Frequency and effects of the apolipoprotein A IV polymorphism. *Clin Genet*, 1989, **36**: 435~441.
- 9 Zaiou M, Visvikis S, Gueguen R, et al. DNA polymorphism of human apolipoprotein A IV: Frequency and effects on lipid, lipoprotein and apolipoprotein levels in a French population. *Clin Genet*, 1994, **46**(3): 248~254.

(1997-04-20 收到,1998-04-30 修回)