

文章编号: 0529-6579 (1999) 04-0067-05

分离与克隆中国人 TPO 基因片段及序列分析^{*}

许琳¹, 徐江英¹, 戴荣¹, 唐华欣², 王章²

(1. 南京海军医学高等专科学校, 南京 210049;

2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要: 应用 RT-PCR 技术从中国人胎肝细胞中分离出 1 个 566 bp 大小的基因片段, 经过克隆、限制性内切酶鉴定和序列分析证实为 TPO 的 cDNA 片段. 与 GenBank 中发表的人 TPOmRNA 的序列比较同源性在 82%~99% 之间, 仅有 2 个碱基不相同, 在 175 位密码子(523~525 位的碱基) 分别是 CGG 和 CAA, 即精氨酸(R) 的位置上, 中国人是谷氨酰胺(G), 而与测得的韩国人序列比较, 在相应位置的氨基酸是相同的.

关键词: 中国人; 血小板生成素(TPO); RT-PCR; 序列分析

中图分类号: Q 78 **文献标识码:** A

Yamamoto (1957) 最早提出了体液调节控制血液中血小板水平的假说. 1958 年 Kel-cemen 将其命名为 TPO, 早期的工作将 TPO 描述为存在于血小板细胞生长时期的动物血浆中的一种活性物质. 近年来, 发现了 c-mpl 原癌基因编码的细胞受体的配体—血小板生成素(TPO). 通过对 TPO 基因的克隆和其特性的研究, 发现 TPO 参与产生巨核细胞和血小板的体液调节, 除对巨核细胞产生血小板具有晚期成熟因子的作用外, 还可诱导促进造血祖细胞增殖分化成巨核细胞集落^[1]. 虽然 TPO 的作用仍在研究中, 人们期望这种新的细胞因子可以作为药物, 用于治疗血小板减少导致的出血, 尤其是肿瘤进行化疗和放疗引起的出血.

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 人胎肝组织, 取自广州市产科医院.

(2) 质粒与菌株 pGEM-T 为克隆 PCR 产物专用质粒系统, 菌株 *E. coli* JM109 均购自 Promega 公司.

(3) 酶及其它试剂 *Eco*RI, *Sal*I, T4 DNA 连接酶, expandtm high fidelity PCR system kit, high pure plasmid isolation kit (Boehringer Mannheim 公司); RNase H, superscripttm prem-

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1999-04-13 作者简介: 许琳, 女, 1954 年生, 博士

plification system for first strand cDNA synthesis (Gibco BRL 公司); QIAquick PCR purification kit (Qiagen 公司); 异硫氰酸胍, N-十二烷基肌氨酸钠, β -二巯基乙醇, DEPC (Promega 公司); SDS, EDTA (Sigma 公司); 其它生化试剂均为国产 AR 试剂.

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成 根据发表的 TPO mRNA 的 cDNA 序列, 自行设计上游引物 5'-CGGAATTCATGGAGCTGACTGAATTG-3'; 下游引物 5'-ACTAGAGAGGTTCTGCTGGG-3', 中科院上海细胞研究所合成.

1.2.2 细胞总 RNA 的提取 取新鲜胎儿肝组织研磨破碎后加入强烈变性剂, 采用常规的异硫氰酸胍一步法, 提取细胞总 RNA. 取人肝细胞总 RNA 2 μ L 琼脂糖电泳观察结果.

1.2.3 RT-PCR 方法 用 superscript[™] preamplification system for first strand cDNA synthesis kit 首先合成 cDNA. 按说明书分别加入寡聚核苷酸 oligo (dT₁₅) 作为引物、总 RNA 为模板, 65 $^{\circ}$ C 5 min 置冰上 5 min 再加入 dNTP、MLV 逆转录酶等, 反应条件: 25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 99~95 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min. 再取反应产物即合成的 cDNA 为模板, 用 expand[™] high fidelity PCR system kit 作 PCR 反应. 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 35 次循环后, 72 $^{\circ}$ C 7 min.

1.2.4 TPO cDNA 片段的克隆 从 PCR 反应产物中取样 2 μ L, 在 ρ 为 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳观察反应结果, 用 QIAquick PCR purification kit 纯化及回收扩增的 cDNA 片段. 将回收的 cDNA 片段与 pGEM-T Vector 经 T4 DNA 连接酶连接. 按分子克隆常规方法转化至大肠杆菌.

1.2.5 TPO cDNA 克隆片段的鉴定 用碱法抽提质粒, 初步筛选重组质粒阳性菌, 再加入限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 取 1/20 体积的酶切反应液进行电泳, 同时设酶切后的空质粒及 PCR 片段对照.

1.2.6 TPO cDNA 克隆片段的序列测定 重组质粒用 universal 和 reverse 通用引物进行双脱氧扩增反应后, 全自动 DNA 序列分析仪测定.

1.2.7 TPO cDNA 克隆片段的序列的比较分析方法 将所测得的 DNA 序列与 GeneBank Data base 中的 4 组人 TPO mRNA 的 cDNA 序列, 用 Alignment Program (address on line) 进行同源性分析比较.

2 结果和讨论

2.1 分离及克隆人 TPO 的 cDNA

由于肝组织中含有大量的 RNA 酶, 而 TPO mRNA 为低丰度的 mRNA, 在分离过程中极易失败, 采用异硫氰酸胍, 十二烷基肌氨酸钠等强烈变性剂提取总 RNA 的方法提取人胎肝细胞总 RNA, 提取的总 RNA 在 ρ 为 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳后可见较为清晰的 4 条带, 分别为 28S、18S、5S 的 rRNA 和更低相对分子质量的 tRNA 和 snRNA, 其背景较为模糊可能是分子大小不同的 mRNA. 结果符合总 RNA 电泳结果. 利用 RT-PCR 技术成功的从人胎肝细胞中扩增出 TPO 的 cDNA, 用 oligo (dT₁₅)、random 和 specific 引物分别作 cDNA 合成反应后再加入上、下游引物进行 PCR 反应, 将反应产物电泳并在紫外灯下观察: 加入 oligo (dT₁₅) 的反应产物中可见有一相对分子质量约为 500 bp 左右的溴化乙锭着色带, 而加入 random 引物的反应产物中无着色带, specific 引物的反应产物中有少量 DNA 片段的合成.

证明 RT-PCR 反应可否扩增出 cDNA 片断, 与 cDNA 第一链的合成密切相关 (结果未显示). 将 TPOcDNA 片段与 pGEM-T Vector 经 T₄ DNA 连接酶连接. 按分子克隆常规方法转化至大肠杆菌, 将筛选出的质粒酶切鉴定结果见图 1.

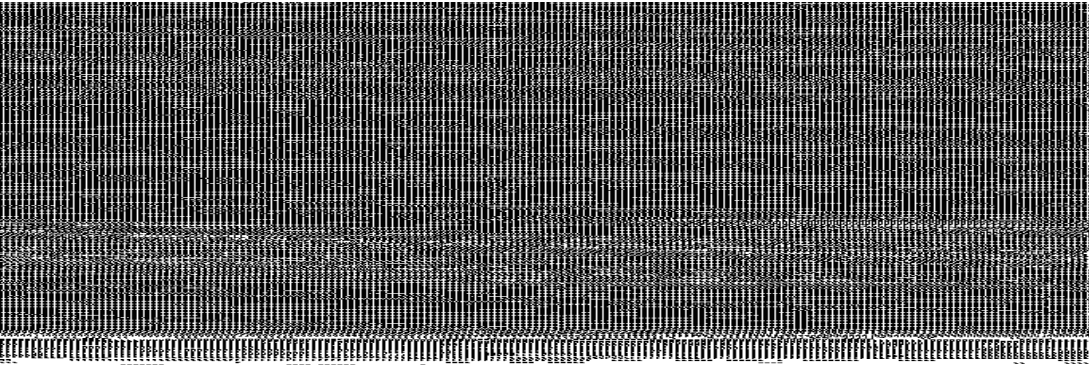


图 1 克隆载体 pGEM-TPO 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction endonucleases digestion pattern of recombinant plasmid

1 λ DNA/ *Hind*III+ *Eco*RI ; 2 pGEM-T digested with *sa*I ;

3 pGEM-TPO digested with *Eco*RI and *Bam*HI ; 4 PCR product of the TPO cDNA

2.2 克隆片段的序列测定结果及比较分析

在筛选出重组质粒中插入的 TPO 的 cDNA 的片段, 常常发现有碱基的缺失, 其中 1 个正向插入的 TPO 的 cDNA 片段, 经测序证明中间缺失了 100 bp 碱基 (资料未显示). 将鉴定好的有外源片段插入的重组质粒纯化后, 经全自动 DNA 序列测定仪测定, 获得了 1 个为 566 bp 大小的 TPO 基因片段, 编码 188 个氨基酸与预期的结果相符. 与 GeneBank 中的发表的 4 组人 TPO mRNA 的 cDNA 序列比较结果见图 2. 与文 [2] 的 TPO mRNA 的序列比同源性为 99 %. 除了第 175 位密码子, 第 523 ~ 525 bp (CGG—CAA) 不同外, 即精氨酸 (R) 的位置上, 中国人是谷氨酰胺 (G), 其余测到的 cDNA 与文 [2] 的 TPO mRNA 的序列完全相同. 与南韩 Im^① 的序列比较, 同源性约为 82 %; 而在这个位置上南韩 Im 等的 bp 序列为 CAG, 编码的氨基酸也是谷氨酰胺 (G), 这是我们克隆的中国人 TPO mRNA 的部分 cDNA 序列中, 唯一不同于已知的 TPO mRNA 的 cDNA 序列的地方. 而该位置 (174 ~ 175) 美洲人的氨基酸序列为 2 个精氨酸被认为有可能是 N—C 端蛋白裂解酶的识别位点^[1]. 而 Im 等的序列在这个位置则为丝氨酸与谷氨酰胺, 我们测得的结果为精氨酸和谷氨酰胺, 查国内发表文章未见有同样序列分析结果报道^[3], 是否亚洲人 N—C 端蛋白裂解酶的识别位点有变异或者这里就不是蛋白裂解酶的识别位点. 有待更多的序列分析报告证实.

① GenBank 中的 U59494 和 U50494
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

参考文献:

- [1] De SAUVAGE F J, HASS P E, SPENCER S D, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the C—Mpl ligand [J]. *Nature*, 1994, 369 (16): 533~538.
- [2] FOSTER D G, SPRECHER C A, KRAMER J M, et al. Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression and chromosomal localization [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 13: 542~547.
- [3] 刘万臣, 张玉静, 李爱民, 等. 中国人血小板生成素基因的克隆 [J]. *中国生化药物杂志*, 1997, 18 (5): 232~234.

Cloning and Sequence Analysis of Chinese Thrombopoietin Gene Fragment

XU Lin^{}, XU Jiang-yin, DAI Rong, TANG Hua-xin, WANG Xun-zhang*

Abstract: Thrombopoietin (TPO) is a recently identified hematopoietic growth factor that stimulates both megakaryopoiesis and thrombopoiesis through its interaction with a specific cell surface receptor encoded by the *c-mpl* proto-oncogene. After decades of study, the regulation of this process is still not well understood, in particular those resulting from cancer chemo- or irradiation therapy. We isolated a cDNA fragment from mRNA of Chinese embryonic liver cells by means of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) then cloned and shown it to be TPO by DNA sequencing. The cDNA sequence were compared to those of human TPO cDNA in the GenBank using the multiple sequence alignment program. The results revealed that the N-terminal sequences were considered more conservative than those in C-terminal. The alignment of the Chinese and previously described human TPO cDNA indicates that the degree of homology is between 82% to 99% identical. One codon change was found at 175 (Arg-Gln) in position bp 523 to 525 (CGG—CAA) of Chinese TPO cDNA relatively to L36052 sequence. And a sequence differs from U59495 in same position (which is CAG), but it can be translate into the same amino acid with Chinese TPO.

Keywords: Chinese; thrombopoietin (TPO); RT-PCR; cDNA sequence

^{*} Centre of Gene Engineer, College of Military Medicine in Nanjing, Second Military Medical University, Nanjing 210049, China