人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA) mRNA 5'端非翻译区(UTR)对其表达的调控

欧阳应斌 黄培堂 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

关键词 人组织型纤溶酶原激活剂 非翻译区 表达调控

人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)在人体纤溶与凝血的平衡调控中发挥重要作用,而且在治疗心血管栓塞性疾病方面具有广阔的应用前景^[1]. t-PA在人体内的表达受严格调控,其mRNA具有较长的非翻译区序列. 我们曾报道了t-PA mRNA 3'-UTR对其表达的调控^[1],为研究长约209 nt的5'-UTR序列对t-PA表达的影响. 本文采用反转录-PCR技术从黑色素瘤细胞中克隆出t-PA cDNA 5'端序列,在体外和体内2个系统中研究了5'-UTR序列对t-PA表达的影响.

1 材料与方法

1.1 细胞株、酶及主要试剂

黑色素瘤细胞及COS-7细胞由本室保存,各种工具酶、内切酶及其它常用试剂购自华美公司、Promega公司、Biolabs公司等; [α -³²P]dATP及³⁵S-蛋氨酸分别购自福瑞公司及杜邦公司.

1.2 基因重组及序列分析

参照文献[2]进行.

1.3 体外转录、体外翻译

参照Promega公司的说明书进行,翻译产物用液闪计数法检测.

1.4 电击法转染COS-7细胞

4×10^6 对数生长期的细胞消化后与20 μ g表达质粒混匀,以电容1080 μ F、电压210 V,放电时间1000 ms电击,转染后48 h取样检测.

1.5 表达产物测定

采用ELISA双抗体夹心法.

1.6 mRNA翻译起始区(TIR)二级结构分析

采用PC Fold mRNA二级结构预测软件包,根据Turner最低自由能量模式,分析起始密码子附近mRNA的二级结构.

2 结果与讨论

2.1 含完整 5'-UTR 序列的 t-PA cDNA 的克隆

t-PA mRNA 长约 2.7 kb, 其 5'-UTR 为 209 个核苷酸. 由于分子大, 迄今报道所克隆出的 t-PA cDNA 均不含完整 5'-UTR 序列. 本实验室曾通过反转录结合化学合成获得了 t-PA cDNA 的编码序列, 但不含 5'-UTR 序列^[3]. 为研究 5'-UTR 对 t-PA 表达的影响, 我们以黑色素瘤细胞为材料, 提取 RNA, 通过反转录 PCR 扩增出 t-PA 5' 端 460 bp 的 cDNA 片段, 用 Hind III、Bgl II 酶切后与原来获得的编码序列重组, 得到含完整 5'-UTR 序列的 t-PA cDNA 克隆 pMM6015, 经序列分析证实新扩增的序列与 Degan 等报道的 t-PA 基因组中 5' 端外显子序列完全一致^[4](结果未显示), 再经进一步重组获得含完整 5'-UTR 及 3'-UTR 的全长 t-PA cDNA 克隆 pMM6011.

2.2 5'-UTR 对 t-PA 表达的影响

质粒 pMM6001, pMM6011, pMM6005 及 pMM6015 (其结构见图 1) DNA 经 BamHI 线性化, 在 $m^7G(5')ppp(5')G$ 存在的条件下用 T₇ RNA 聚合酶体外转录出 t-PA mRNA. 等摩尔数 mRNA 在兔网织红细胞裂解物中翻译, 以 ³⁵S-蛋氨酸标记, 翻译产物液闪计数显示, 含完整 5'-UTR 的 t-PA mRNA 翻译水平比不含 5'-UTR 的 mRNA 翻译水平低近一倍左右 (图 1).

图 1 5'-UTR 对 t-PA mRNA 体外翻译的影响
CPM 为 3 次试验平均值, 以 pMM6011 相对表达水平为 1

为研究异源 mRNA 5'-UTR 能否影响 t-PA mRNA 的翻译, 我们构建了杂合 t-PA 分子并研究了其在体外的表达. 苜蓿病毒 RNA 是一种翻译效率很高的 RNA, 质粒 pUAMV 含 AMV RNA 5'-UTR 序列, 用 BamHI, Sac I 双酶切质粒 pUAMV, 回收含 AMV 5'-UTR 序列的 60 bp 片段, 修饰成平端后插入 t-PA 起始密码子的上游 (t-PA 5'-UTR 序列被去除), 经序列分析筛选出 AMV 5'-UTR 正向插入的重组质粒 pMMA6005 和反向插入的重组质粒 pMMA6005R (图 2).

pMM6005, pMM6015, pMMA6005 和 pMMA6005R 质粒 DNA 经 BamHI 线性化, 体外

图2 pMMA6005和pMMA6005R的序列分析

箭头指示 t-PA 起始密码, 箭头左侧为 t-PA 编码序列, 右侧为 AMV 5'-UTR 序列

转录出的 mRNA 在兔网织红细胞裂解物中翻译后液闪计数显示, AMV 5'-UTR 能增强 t-PA mRNA 的翻译, 但其反向插入时对表达没有明显影响(图3)。

图3 AMV 5'-UTR 对 t-PA mRNA 翻译的增强作用
CPM 值为 3 次试验平均值

我们进而将 t-PA cDNA 从上述体外转录质粒中切出, 克隆入真核细胞表达载体 pLSV, 构建了一系列 t-PA 表达质粒, 用电击法转染 COS-7 细胞, 转染 48 h 后用 ELISA 法测 t-PA 的表达量, 结果表明在 COS-7 细胞中 5'-UTR 对 t-PA 表达的影响与在体外翻译系统中相似(图4)。

绝大多数真核生物 mRNA 的翻译起始都符合 Kozak 提出的扫描学说^[5], 即 eIF-4F, eIF-4A, 4B 与 mRNA 结合, 促使 40 S 小亚基(携带 eIF-2 及 Me-tRNA)

	5'-UTR	编码序列	3'-UTR	OD492	相对表达量
pMGO6005				0.81	13.5
pMGO6015	▨			0.40	6.7
pMGO6001			▨	0.09	1.5
pMGO6011	▨		▨	0.06	1.0
pMGOA6005	▨			1.56	26.0
pMGOA6005R	▨			0.65	10.8

图4 5'-UTR 对 t-PA 在 COS-7 细胞中表达的影响

OD 值为 3 次试验的平均值

▨ 示 t-PA 5'-UTR, ■ 示 t-PA 编码序列, ▨ 示 AMV 5'-UTR, ▨ 示 t-PA 3'-UTR

进入 mRNA 5'端,沿 mRNA 线性滑动,至起始密码处与 60 S 大亚基结合而起始翻译. Kozak 还对起始密码子附近的核苷酸进行了系统的突变研究,提出了著名的 Kozak 序列,即 GCCA(G)CCAUGG 为翻译起始的最佳序列,特别是-3 位的嘌呤和+4 位的 G 对翻译有最显著的促进作用. 本研究中 pMM6005, pMM6015, pMMA6005 和 pMMA6005R 转录出的 mRNA,其起始密码子的旁侧序列均符合上述 Kozak 序列,所不同的只是-4 位以前的序列. 然而其翻译水平却各不相同,这不是 Kozak 序列所能解释的.

我们对转录后 mRNA 翻译起始区附近的二级结构分析表明, pMM6015 形成茎环程度最大, pMM6005 次之,而 pMMA6005 和 pMMA6005R 形成茎环程度最小(图未给出). 在翻译起始时, eIF-4A 或 eIF-4F 与 eIF-4B 一起,具有 ATP 依赖的 RNA 解旋酶活性^[9],能解开 mRNA 的二级结构,促进 40 S 小亚基的滑动和翻译的起始. pMM6005 转录出的 mRNA,其翻译起始区能形成一定强度的二级结构. 上述因子的解旋酶活性能解开这种二级结构,故亦能被有效翻译. 但在翻译体系中,翻译起始因子的量是有限的,随着 mRNA 浓度的提高,由于上述因子均与 mRNA 结合形成起始复合物,故 mRNA 浓度再进一步提高时,因无上述因子的结合,翻译水平并不继续升高,形成“平台”现象(见图 3). pMM6015 转录的 mRNA 因二级结构较强,翻译水平较低. t-PA 5'-UTR 被 AMV 5'-UTR 置换后,由于基本上无明显二级结构,其翻译起始过程对上述解旋因子的需求较低,甚至不需要这些因子的参与,故 mRNA 浓度提高时,其翻译水平可持续上升,没有“平台”现象的出现.

然而, pMMA6005R 转录出的 mRNA 5'-UTR 中亦无明显二级结构,但其翻译水平较低. 序列分析发现,其 5'-UTR 中有一个 AUG 三联体,该三联体虽然不处于翻译起始的最佳旁侧序列中,但对翻译起始仍有一定的抑制作用.

综上所述,我们发现 t-PA mRNA 非翻译区序列对其表达起明显抑制作用,这种作用可能是造成 t-PA 在体内低水平表达. 维持凝血与纤溶平衡的一个因素. 通过调整非翻译区序列,可使 t-PA 表达水平大大提高,这对 t-PA 在哺乳动物细胞中的高效表达具有重要意义.

致谢 细胞培养得到徐秀英副教授的热情帮助,本工作得到程度胜助理研究员、王升启博士及刘士辉博士等人的帮助,在此表示衷心感谢.

参 考 文 献

- 1 欧阳应斌,黄培堂,黄翠芬. 人组织型纤溶酶原激活剂表达调控及高效表达的研究——I. t-PA mRNA 3'-UTR 对其表达的调控. 中国科学, B 辑, 1994, 24(7): 742 ~ 747
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning—A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: CSH Press, 1989
- 3 Huang P T, Xu X Y, Guo J H *et al.* Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in Chinese hamster ovary cells. Thromb Res, 1991, 63: 271
- 4 Degen, S J, Rajput B, Reich E. The human tissue plasminogen activator gene. J Biol Chem, 1986, 261: 6972 ~ 6985
- 5 Kozak M. The scanning model for translation: an update. J Cell Biol, 1989, 108: 229 ~ 241
- 6 Rozen F, Edery I, Meerovitch K *et al.* Bidirectional RNA helicase activity of eukaryotic translation initiation factors 4A and 4F. Mol Cell Biol, 1990, 10: 1134 ~ 1144