小鼠红细胞分化去核相关因子(MEDDF) cDNA 克隆及全序列分析

章正琰 刘世广 马 静 章静波 薛社普

(中国医学科学院 中国协和医科大学 基础医学研究所细胞生物室, 北京 100005)

摘要 以小鼠脾红细胞减除杂交克隆得到的分化相关特异 cDNA 片段为探针, 用噬菌体原位杂交结合 PCR 鉴定的方法, 从小鼠中晚幼红细胞 cDNA 文库中筛选出一个阳性 cDNA 克隆. 将其亚克隆至 pBluescript-SK 载体上测序, 结果表明该 cDNA 为小鼠红细胞分化去核相关因子 (MEDDF) cDNA 全序列. 该序列全长为 505bp, 其中有一个起始于第 53 位, 终止于第 359 位的开放阅读框架, 编码区长 309bp, 共编码 102 个氨基酸和一个终止密码, 其 5' 端起始密码 ATG 附近的碱基序列符合真核生物基因的 Kozak 顺序, 第 462 位有一加尾号 AATAA, 3' 端有一个由 26 个腺苷酸组成的 PolyA 尾. 根据 GenBank 最新资料检索, 这一小鼠的红细胞分化相关基因为一未见报道的新序列 (GenBank Accession Number: BankIt 180846 AF060220). 经 Northern 印迹分析发现, 该 cDNA 仅在与造血相关的器官及中晚幼红细胞中表达, 提示它是一个与小鼠红细胞终末分化相关的新基因.

关键词 红系细胞 细胞分化去核相关基因 cDNA 文库 序列分析 组织分布

哺乳类红细胞在终末分化期表达血红蛋白, 细胞停止分裂, 出现固缩和自然去核特征, 后者是哺乳类以下低等动物界不存在的自主性活动和独特的分化模式. 其种系发生 (phylogenesis) 及分化去核机理在进化上是一个长期未解决的谜. 已有资料表明, 红细胞分化受细胞内外因素的调节, 一系列红系造血因子, 如 EPO, BSF-E, CSF-E, IL-3, IL-6 等分别作用于不同阶段的造血细胞, 介导细胞内特定基因的程序性表达^[1~3]. 但终末分化因子至今尚无确切报道. 我室多年来在红细胞分化方面开展了一系列的工作, 并证明哺乳类红细胞在终末分化期出现分化去核因子 (Erythroid differentiation denucleation factor, EDDF), 调控不同发育阶段终末分化相关基因的表达^[4] 和去核活动^[5]. 我们曾报道用减除杂交结合 PCR 的方法, 克隆到了一个与小鼠红细胞终末分化相关的 cDNA 片段^[6]. 现以该片段为探针, 对构建于 λ gt11 重组噬菌体小鼠中晚幼红细胞 cDNA 文库进行筛选, 获得了一个与探针序列基本相同的全长 cDNA 序列, 并对其结构和表达的特异性进行了分析.

1 材料与方 法

(1) 菌株、载体和病毒. pBluescript-SK 质粒载体及受体菌株 XL1-Blue 购自 Stratagene 公司, 用于重组体的转化和提取. 小鼠致贫血 Friend 病毒 (anemia inducing Friend leukemia virus, FVA) 为美国 Vanderbilt 大学医学院医学系 Koury 博士惠赠, Balb/c 小鼠购自医科院动物繁育场.

(2) 试剂. Taq DNA 酶及 PCR 试剂购自 Sangon 公司, NotI 购自 BioLabs 公司, T4 DNA 连接酶购自 Boehringer Mannheim 公司, 探针标记试剂盒购自 Promega 公司, RNA 提取试剂盒购自 Eurobio 公司, [α^{32}]P dCTP 购自北京亚辉公司, 其他化学试剂均为国产分析纯.

(3) 杂交用 cDNA 探针. 为本室从小鼠脾脏减除文库中克隆出的特异 cDNA 片段, 经 Gen-

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-6-618>

Bank 同源比较,未发现同源序列.

(4) PCR 特异引物. 以上述 cDNA 探针的部分序列为模板设计下列相应的 PCR 引物,用于鉴定所筛克隆的真伪. 1) 5' GGCTCAGCACCATTAGACTTG, 2) 5' ACAGCAACATCT-TGGGAGAAC, 其产物为 420bp.

(5) cDNA 文库. 为构建于 λ gt11 的小鼠脾脏中晚幼红细胞 cDNA 文库,滴度为 5.4×10^5 pfu/mL,重组百分率为 93.7%,平均插入片段长度为 2.0 kb,由中国科学院发育生物研究所构建.

(6) 杂交探针的制备. 采用 Promega 公司的 Prime-Gene labeling system 对上述 cDNA 探针进行标记.

(7) 脾脏原红细胞的分离和培养. 以 8~12 周的雌性 Balb/c 小鼠为实验动物,按 Koury 的方法^[7],采用 1%~2% BSA 连续梯度对脾脏单细胞悬液进行分离,收集原红细胞部分,将其中一部分直接提取 RNA,其余细胞悬液在 IMDM 及胎牛血清的培养液中(内含 100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 10^{-4} mol/L α -thioglycerol 和 0.2 U EPO/mL)培养 36 h (5% CO₂, 37 °C),使之分化至中晚幼红细胞阶段,收获并提取其 RNA.

(8) 特异性克隆的筛选. 参照分子克隆一书的方法^[8],以上述探针对 λ gt11 噬菌体文库进行原位杂交,筛选阳性噬菌斑,并分别用特异性 PCR 引物和 λ gt11 通用引物进行扩增,以鉴定其特异性和插入片段的大小.

(9) 阳性片段的克隆和 DNA 序列分析. 特异性克隆经琼脂糖平板扩增后,提取 λ gt11DNA 重组体^[8],后者用 *Not* I 酶切,将所得插入片段经电泳、PEG 纯化后,与预经 *Not* I 酶切线性化的 pBluescript-SK 载体重组,转化入制备好的 XL1-Blue 感受态菌中. 含插入片段的阳性克隆经电泳及酶切分析加以确认. 用质粒 DNA 小量制备法提取阳性克隆中的 DNA,经纯化后直接用作测序模板.

DNA 序列采用美国应用生物系统公司 (ABI) DNA 序列测定自动分析仪测序,分别使用 Dnasis 和 Prosis 计算机程序对其结构特征进行分析. 并通过 <http://www.EMBL-Heidelberg.de> 对其所编码的蛋白质的二级结构及亲疏水性进行预测.

(10) Northern 印迹分析. 采用分子克隆一书的方法^[8],分别提取小鼠 10 种组织中及原红细胞和中晚幼红细胞中的总 RNA,经甲醛变性凝胶电泳及转膜,用 ³²P 标记的 cDNA 探针进行杂交,并进行放射自显影观察.

2 结果

2.1 重组体的筛选和鉴定

用特异性 cDNA 标记探针对小鼠脾脏中晚幼红细胞 cDNA 文库作杂交筛选,第 1 轮得到了 22 个较强的杂交信号,将这些阳性噬菌斑取出,经特异性引物进行 PCR 鉴定,发现其中 19 个为重组噬菌斑,继之在低密度平板上作第 2 轮的杂交筛选,直至分离到清晰的单个噬菌斑. 结果证实这 19 个克隆均为阳性重组克隆. 同时对上述 19 个阳性克隆用 λ gt11 通用引物进行 PCR 扩增,发现所有克隆的产物大小均为 600 bp 左右. 将阳性克隆进行平板扩增后,提取噬菌体 DNA,经 *Not* I 酶切后发现插入片段大小约为 500 bp 左右. 这些克隆为含有小鼠红细胞分化相关因子(MEDDF)插入片段的克隆.

2.2 小鼠红细胞分化相关因子 cDNA 全长序列

将含有 MEDDF 插入片段的阳性克隆经 *Not* I 酶切后,亚克隆到 pBluescript-SK 载体的

Not iv位点上,用于核苷酸序列的测定. 经ABI DNA自动分析仪的核苷酸序列测定结果表明, MEDDF cDNA 全长序列为 505 bp, 其中编码区长 309 bp, 共编码 102 个氨基酸和一个终止密码子(图 1). 该 cDNA 的 3' 末端有一个 144bp 的非翻译区, 其中包括第 462 位的加尾信号 AATAAA 和最末端的由 26 个腺苷酸组成的多聚 A 尾端. 将该 cDNA 序列与作为探针的 472 bp cDNA 片段比较后发现, 该 cDNA 序列与 472 片段基本相同, 在 5' 端多出 2 bp, 3' 端多出 31 bp, 其中包括 26 个腺苷酸组成的多聚 A 尾.

SEQUENCE REGION:1 - 505 TRANSLATION REGION: 53 - 359

* * * DNA TRANSLATION * * *

```
1  T CAA ACC CCG AGG ATT GTG GAT GAG GCG GGC TCA GCA 37
38 CCA TTA GAC TTG AAG ATG GCC CCT TTT CAG AGC AAT AAG 76
1      M      A      P      F      Q      S      N      K      8
77 GAT CTG ATC TCC ACA GGG ATA AAG GAG TTT AAT GTT CTG 115
9  D   L   I   S   T   G   I   K   E   F   N   V   L   21
116 CTG GAT CAG CAG GTC TTT GAT GAT CCT CTG ATC TCT GAA 154
22  L   D   Q   Q   V   F   D   D   P   L   I   S   E   34
155 GAA GAC ATG GTG ATT GTG GTT CCT GAC TGG GTG AAC TTG 193
35  E   D   M   V   I   V   V   P   D   W   V   N   L   47
194 TAC ACC AAC TAT TAC AAG AAG CTC GTG CAT GGG GAG CAG 232
48  Y   T   N   Y   Y   K   K   L   V   H   G   E   Q   60
233 GAG GAG CAA GAC AGG GCC ATG ACA GAA TTC CAG CAA GAG 271
61  E   E   Q   D   R   A   M   T   E   F   Q   Q   E   73
272 CTG AGT ACT CTG GGC AGC CAG TTT CTA GCC AAA TAC AGG 310
74  L   S   T   L   G   S   Q   F   L   A   K   Y   R   86
311 ACC TTT CTG AAG TCC AAA GAG CCC CCA AGC AAT ACA CTG 349
87  T   F   L   K   S   K   E   P   P   S   N   T   L   99
350 CCC TCC TCA TAA CTT AAA GGG TCT GGG CAT CAT GTC TTA 388
100 P   S   S   *                                     102
389 GAA CCC CAA ACA CTC GGC TCT GTG TTA TAT CTT CAG ACC 427
428 GTT CTC CCA AGA TGT TGC TGT ACT TTG ACA TGC CAA TAA 466
467 AGA CCA AAT ACT CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA 505
```

图1 MEDDF cDNA 的核苷酸序列及其编码蛋白质的氨基酸序列

2.3 编码蛋白质的二级结构预测及亲疏水性分析

该 cDNA 序列编码 102 个氨基酸, 预计其分子量为 11.8 ku, 对其蛋白质二级结构预测, 发现该蛋白结构较为松散, α -螺旋主要集中在 C-末端(图 2).

蛋白质二级结构预测

结 构	H	B	L
预测百分比	47.1	14.7	38.2

编码蛋白预测长度: 102 氨基酸

```

      .....1.....2.....3.....4.....5.....6
AA      MAPFQSNKDLISTGIKEFNVLDDQQVFDDPLISEEDMVIVVHDWVNLVTNYKKLVHGEQ
PHD sec      E      EEEE EE      HHH      EEEEEHHHHHHHHHHHHHHHH
Rel sec  99999996111236741234111133689988524016544414547999999998899

      .....7.....8.....9.....10.....11
AA      EEQDRAMTEFQQLSTLGSQFLAKYRTFLKSKEPPSNTLPSS
PHD sec  HHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHH
Rel sec  99999999999999842899999999961379878999899

```

图2 MEDDF 编码蛋白质二级结构预测及亲疏水性分析

2.4 Northern 印迹检测 MEDDF cDNA 在小鼠组织中的表达

用一步法提取小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、睾丸、骨髓组织及经 Friend 病毒诱导的小鼠脾脏原红细胞和中晚幼红细胞中的总 RNA, 用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定所提 RNA 的质量, 可见 18 和 28 S RNA 条带清晰, 将电泳后的总 RNA 转移到硝酸纤维素膜上, 与³²P 标记的 472 bp cDNA 探针进行杂交反应. 结果可见, 在分化至中晚幼阶段的红细胞, 脾脏和骨髓的 RNA 中在 500 bp 左右处出现较强的杂交条带, 原红细胞中出现较弱的杂交带, 而其他组织中未见杂交信号(图 3).

3 讨论

已知红细胞不同发育阶段的分化, 有赖于多种因素的参与调节, 这些因素的协同作用, 决定着细胞发育分化阶段特异性基因的表达顺序. 在已知的红系造血因子中, (如 EPO, SCF, BSF-E, CSF-E, IL-3, IL-6 等) 多为作用于造血干细胞, 原红细胞和早幼红细胞等早期阶段^[1~3]. 其中依赖于 EPO 因子调节的最后阶段已知为早幼红细胞期^[3]. 自早幼期以后影响终末分化

的因子至今尚无确切的资料.

我们通过减除杂交法得到了一个与红细胞分化相关的 cDNA 片段, 并以此片段为探针, 对构建于 λ gt11 小鼠脾脏中晚幼红细胞 cDNA 表达文库中的重组噬菌体进行原位杂交筛选, 同时辅以序列特异性引物和 λ gt11 通用引物的 PCR 对阳性重组体进行鉴定, 得到了 MEDDF cDNA 全序列, 减少了繁琐费时的杂交筛选次数, 同时也减少了假阳性的出现, 实验证明第 2 轮筛选后所得到的 19 个阳性噬菌斑均为单一的目的重组体.

测序结果表明, 本实验所得到的 cDNA 为 MEDDF 的全序列, 它有一个起始于第 53 位, 终止于第 359 位的开放阅读框架, 在 5' 端起始密码 ATG 附近的 -3 位点是碱基 A, -4 位点是碱基 G, 即为 AAGATGG, 这种高度保守的特点与其他真核生物基因相一致^[9]. 3' 端还具有一个 26 个腺苷酸组成的多聚 A 尾, 其长度与 Northern 印迹分析中 MEDDF mRNA 的大小一致.

Northern 印迹实验表明, MEDDF mRNA 的表达具有组织特异性, 它仅在与造血相关的组织, 如骨髓、脾脏中表达, 而在其他被检脏器, 如心、肝、脑等组织中无表达, 同时发现, 其表达还具有发育阶段特异性, 在原红细胞中仅有微弱表达, 而在处于中晚幼阶段的红细胞中具有强表达, 提示该基因是一个与小鼠红细胞终末分化相关的新基因. 对其体外表达及功能性研究正在进行中.

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 39670364)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Dexter T M, Heyworth C M, Whetton A D. The role of haemopoietic cell growth factors (interleukin 3) in the development of haematopoietic cell. Ciba Found Symp, 1985, 116: 129~ 147
- 2 Holbrook S T, Christensen R D. Hematopoietic growth factors. Adv Pediatr, 1991, 38: 23~ 49
- 3 Koury M J, Bondurant M C. The molecular mechanism of erythropoietin action. Eur J Biochem, 1992, 210(3): 649~ 663
- 4 薛社普. 哺乳类红细胞分化调节因子对骨髓瘤细胞恶性调控的研究. 解剖学报, 1991, 22(3): 225~ 234
- 5 Xue S P, Zhang S F, Du Q, et al. The role of cytoskeletal elements in the two-phase denucleation process of mammalian erythroblasts in vitro observed by laser confocal scanning microscope. Cell and Mol Biol, 1997, 43(6): 851~ 860
- 6 刘世广, 章正琰, 马 静, 等. 小鼠红细胞分化相关因子 cDNA 片段的克隆与分析. 中国医学科学院学报, 1999, 21(2): 102~ 108
- 7 Koury M J, Sawyer S T, Bondurant M C. Splenic erythroblasts in anemia-inducing Friend disease: A source of cells for studies of erythropoietin-mediated differentiation. J Cell Physiol, 1984, 121: 526~ 532
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 154~ 166
- 9 Kozak M. Analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res, 1987, 15: 8125

(1998_06_25 收稿, 1998_10_22 收修改稿)

图3 Northern 印迹分析 MEDDF 在 Balb/c 小鼠组织中的表达

1——原红细胞, 2——中晚幼红细胞, 3——脑, 4——心脏, 5——肝脏, 6——脾脏, 7——肺脏, 8——肾脏, 9——骨髓, 10——肌肉, 11——睾丸