维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0463-03

利用 5′-RACE 技术进行人肝再生增强因子相互作用肽 cDNA5′末端快速扩增及序列分析

邓建川,刘 杞,陈 曜,孙 航,唐 琳,王 娜

(重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:利用 5′-RACE 技术进行人肝再生增强因子(hALR)相互作用肽 cDNA5′末端快速扩增并进行序列分析。方法:按照 5′-RACE 试剂盒(Takara)操作流程进行 hALR 相互作用肽 cDNA5′末端快速扩增,用 BLAST 技术对扩增序列进行生物信息学分析。结果:成功获取 487bp 的 5′-RACE 反应产物,其中 5′端延伸了 275bp,同源序列分析表明与人 Citron 激酶 mRNA 高度同源。结论:5′-RACE 技术可以用于快速有效扩增已知部分 cDNA 序列的 5′末端,Citron 激酶可能是与 hALR 具有相互作用的蛋白。

【关键词】5′-RACE;人肝再生增强因子;相互作用肽;cDNA

【中国图书分类法分类号】R730.23 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-05

Amplification of 5′ cDNA end of human augmenter of liver regeneration by 5′-RACE technique and analysis of sequence

DENG Jianchuan, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To amplify the 5′ cDNA end of human augmenter of liver regeneration (hALR) by 5′-RACE technique and to analyze the sequence. *Methods:* 5′ cDNA end of hALR was rapidly amplified by following the instructions of 5′-RACE kit (Takara). The acquired sequence was analyzed by bioinformatic tool. *Results:* 5′-RACE product with 487bp was successfully obtained, which included extending sequence with 275bp. Homology analysis by BLAST showed highly homologous with human citron kinase. *Conclusions:* 5′-RACE method can be used to amplify the 5′ end of partially known cDNA sequence. Citron kinase can interact with hALR.

【Key words】5′-RACE; hALR; Interacting peptide; cDNA

肝再生增强因子(Augmenter of liver regeneration, ALR)是近年发现并克隆的一种能促进肝脏再生的细胞因子,其在体内多种组织均有表达[1]。人的 ALR(hALR)与哺乳动物大、小鼠的 ALR 及酵母菌的 scERV1 基因高度同源[2],提示 hALR 在维系人的生命中可能起了很重要的作用。已有研究表明,hALR 的主要生物学作用[3-5]包括参与肝脏再生、抑制 NK 细胞活性,同时发现该因子能以剂量依赖方式刺激肝癌细胞增殖,但是其具体作用机制仍不明。

通过噬菌体表面展示技术可以研究具有相互作用的蛋白质,从而为一些细胞因子的作用途径提供线索。本实验室前期实验已构建出人肝癌细胞株 cDNA 噬菌体展示文库[6],我们继续利用该文库成功筛选出与 hALR 具有相互作用的特异噬菌体克隆,该噬菌体克隆衣壳蛋白展示有 hALR 相互作用多肽,其 cDNA 插入片段为 212bp。由于该片段较短,是否为一些已知或未知基因的共同读码序列,这需要进一步获取该片段的 cDNA 全长信息。RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 技术是近年发明的一种快速扩增 cDNA 末端的方法,本实验利用 5′-RACE 技术延伸该短片段 cDNA 5′末端序列,并进行同源序列分析。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人 QGY 肝癌细胞株由本研究所提供。

作者介绍:邓建川(1970-),男,主治医师,博士,主要研究方向:肝癌分子机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271178)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 酶类及主要试剂

Ex Taq 酶、T_4DNA 连接酶购自 Takara 公司，新生牛血清购自杭州四季青生物公司，总 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司，小量质粒抽提试剂盒购自上海华舜公司，5′-RACE 试剂盒、pMD18-T 载体购自 Takara 公司。引物合成由 Takara 公司完成。胶回收、PCR 纯化试剂盒购自 Omega 公司。RPMI-1640 培养液由本实验室制备。

1.3 RNA 的提取

用含 10%新生牛血清及青、链霉素双抗的 1640 培养液于 37℃、5%CO_2 条件下培养人肝癌细胞株 QGY。细胞生长达对数生长期后胰酶消化、收集细胞，按 Qiagen 公司总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。

1.4 引物设计与合成

按照 5′-RACE 试剂盒要求，根据已知 cDNA 序列部分设计反转录(RT)引物及两对巢式 PCR 引物：

RT 引物：5′-(P)-AATTCAAGCGGA-3′

S1：5′-TTTTACAGCCTTCTCCAGTTTCTC-3′

S2：5′-TCGCTCCTTTGCCTGGCGGA-3′

A1：5′-AGCATTGATCTTCTCCAGTTTCGC-3′

A2：5′-TCCTTAGCCTTCAACAGTTTA-3′

所有引物均由 Takara 公司合成，其中 RT 引物 5′末端进行磷酸化标记。

1.5 5′-RACE 扩增

按照试剂盒的操作流程进行。首先进行反转录反应，以 QGY 细胞总 RNA 为模板，使用 RT 引物(200pmol/μl)进行反转录反应，合成第一链 cDNA。反应体系 15μl，反应条件：30℃ 10min、50℃ 30min、80℃ 2min。于上述反转录液加入 1μl Rase H 分解杂交 DNA-RNA 中的 RNA 链，乙醇沉淀后加入 1μl T4DNA 连接酶，16℃过夜反应，使单链 cDNA 环化或形成首尾相连物。再进行巢式 PCR 反应。第 1 次 PCR 以 S1、A1 为扩增引物，Ex Taq 酶扩增，总体系 50μl，反应条件：94℃ 3min，再 94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 30s，25 次循环。第 2 次 PCR 反应以前次 PCR 产物为模板，以 S2、A2 为扩增引物，Ex Taq 酶扩增，总体系 50μl，反应条件：94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 30s，30 次循环。用 1.0%琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物并切胶回收、纯化。

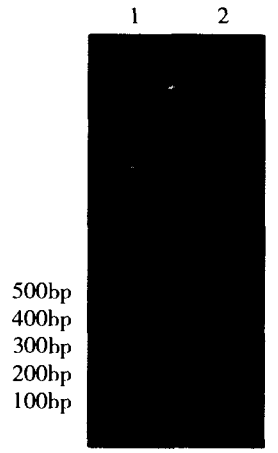
1.6 PCR 产物克隆 T 载体及序列分析

利用 T4DNA 连接酶将纯化后的 PCR 产物定向连接到 pMD18-T 载体上，转化大肠杆菌 DH5a，在含 X-gal 和氨苄青霉素的 LB 平板上筛选白色菌落，用 PCR 法鉴定重组质粒，小量提取质粒，送大连宝生物公司测序。利用 NCBI 生物信息学资源进行同源序列分析。

2 结 果

2.1 5′-RACE 扩增产物

电泳结果显示在近 500bp 处见 1 条明显的扩增条带(图 1)。



1. 100bp Marker 2. 5′-RACE 扩增产物

图 1 5′-RACE 扩增产物

2.2 测序结果及同源序列分析

该 RACE 产物测序为 487 bp(表 1)，其中包含了已知 212bp 的 hALR 相互作用肽 cDNA 序列，通过 RACE 技术钓取了 275 个核苷酸。用 BLAST 软件搜索 GenBank 中的同源序列，得到同源性达 99.79%的序列—人 Citron 激酶 mRNA，登录号为 AY257469。该激酶亦即丝/苏氨酸蛋白激酶，其 mRNA 全长为 8576bp，具有完整的开放阅读框(ORF)，5′-RACE 产物序列位于 1571~2057 位碱基之间，在 ORF 内。

5′-CCTTGCTACCTACATCACAGAATGCAGTAGCTTAAAGCGAAGTTTGGAGCAAG
CACGGATGGAGGTGTCCCAGGAGGATGACAAAGCACTGCAGCTTCTCCATGATAT
CAGAGAGCAGAGCCGGAAGCTCCAAGAAATCAAAGAGCAGGAGTACCAGGCTCA
AGTGGAAGAAATGAGGTTGATGATGAATCAGTTGGAAGAGGATCTTGTCTCAGCA
AGAAGACGGAGTGATCTCTACGAATCTGAGCTGAGAGAGTCTCGGCTTGCTGCT
GAAGAATTCAAGCGGAAAGCGACAGAATGTCAGCATAGACTGTTGAAGGCTAAGGAT
CAAGGGAAGCCTGAAGTGGGAGAATATGCGAAACTGGAGAAGATCAATGCTGAGCAG
CAGCTCAAAATTCAGGAGCTCCAAGAGAAACTGGAGAAGGCTGTAAAAGCCAGCACG
GAGGCCACCGAGCTGCTGCAGAATATCCGCCAGGCAAAGGAGCGA-3′

表 1 5′-RACE 反应产物测序结果 (黑体部分为延伸序列)

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

RACE是 1988 年由 Frohman 等[7]发明的一项新技术，包括 5'-RACE 和 3'-RACE，主要通过 PCR 由已知的部分 cDNA 序列来得到完整的 5' 端和 3' 端。传统的 5'-RACE 技术是用一个反向的基因特异引物（GSP）在反转录酶作用下反转录总 RNA 得到第一链 cDNA，再用末端脱氧核糖核苷酸酶（TdT）给 cDNA 的 5' 端进行同聚物加尾反应，从而在未知的 cDNA5' 端加上一个接头，再用 GSP 和接头引物经 PCR 扩增出未知 mRNA 的 5' 端。但由于这种传统方法在实际操作中仍有不少困难，我们采用的是由 Takara 公司设计的改良的 RNA 连接酶介导的 RACE 技术。其基本原理是：(1) 以目的 mRNA 为模板，用 5' 末端磷酸化标记的反转录引物进行反转录反应，合成第一链 cDNA。(2) 使用 RNA 酶分解杂交 DNA-RNA 中的 RNA 链。(3) 使用 RNA 连接酶使单链 cDNA 环化或形成首尾连接物。(4) 进行 PCR 扩增。这种基于自身连接的 RACE 法具有连接效率高，可以进行巢式 PCR 反应，扩增产物特异性高等优点。RACE 实验主要用于钓取 cDNA 全长序列，但由于 PCR 反应的复杂性，有时也仅延伸一端部分序列。如果 5'-RACE 第一次仅钓出部分序列，下一步可以根据已钓取的序列重新设计引物来再次钓取 5' 端全序列[8]。

我们前期实验从人肝癌细胞的 cDNA 噬菌体展示文库筛选出与 hALR 具有相互作用的多肽，其 cDNA 插入片段为 212bp。利用这一已知片段序列的信息设计引物，以从人肝癌细胞株 QGY 提取的总 RNA 为模板进行了 5'-RACE 实验，获得一条 487bp 的反应产物，序列分析表明已成功将 hALR 相互作用肽 cDNA5' 端延伸了 275 个核苷酸。RACE 产物 cDNA 同源序列分析证实其与人 Citron 激酶 mRNA 编码区 N 端的一段高度同源，仅有一个碱基差异，提示 Citron 激酶可能为与 hALR 具有相互作用的蛋白。

Citron 激酶 mRNA 全长 8576bp，具有完整的开放读码框，编码 1559 个氨基酸。已有作者对 Citron 激酶的特性进行研究[9]，发现该激酶主要位于细胞浆内，与细胞分裂的调控有关，可促进肝细胞由 G2 期向 M 期转变。Cunto 等[10]发现该酶 mRNA 富含于成年大鼠的脑、脾、肾、胸腺、皮肤、肺及睾丸，而静止期肝细胞、心脏及骨骼肌不能检测到，这种组织细胞分布特性与 ALR 的分布状况高度近似，提示二者具有功能相关性。尽管该激酶主要位于细胞浆内，但利用蛋白质跨膜区预测软件对该激酶氨基酸序列进行分析，表明该激酶 N 端氨基酸序列存在跨膜区，hALR 相互作用肽位于该区域内。我们拟进一步进行实验探讨该 hALR 相互作用肽的生物学特性，明确其是否为 hALR 作用的膜受体，进而揭示 hALR 促肝癌细胞增殖的机制。

参 考 文 献

[1] Hagiya MD, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: Expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad USA, 1994;91:8142 - 8146.

[2] Lisowsky T. Removal of an intron with unique 3′ branch site creates an amino-terminal protein sequence directing the scERV1 gene product to mitochondria[J]. Yeast, 1996;12:1501 - 1510.

[3] Expression of augmenter of liver regeneration (ALR) in human liver cirrhosis and carcinoma[J]. Histopathology, 2005;47:57 - 66.

[4] Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases[J]. J. Gastroenterl, 2000;35:112 - 119.

[5] 孙 航，余慧峰，吴传新，等.肝再生增强因子在肝癌细胞中的表达及意义[J].中华肝脏病杂志，2005;13:204 - 207.

[6] 张 林，刘 杞，孙 航，等.利用噬菌体表面展示技术构建人肝癌细胞的 cDNA 表达文库 [J]. 重庆医科大学学报，2005;30:329 - 332.

[7] Frohman MA, Dush MK, Martin GR, et al. Rapid productionof full-length cDNA, from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998;85:8998-9002.

[8] Liu X, Gorovsky M.A. Mapping the 5′ and 3′ ends of Tetrahymena thermophila mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE) [J]. Nucl. Acid Res, 1993;21:4954 - 4960.

[9] Liu HF, Cunto FD, Imarisio S, et al. Citron kinase is a cell cycle-dependent, nuclear protein required for G2/M transition of hepatocytes[J]. J. Biol. Chem, 2003;278:2541 - 2548.

[10] Cunto FD, Calautti E, Hsiao J, et al. Citron Rho-interacting kinase, a novel tissue-specific ser/thr kinase encompassing the rho-rac-hinding protein citron[J]. J. Biol. Chem, 1998;273:29706 - 29711.