DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.019
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
1728 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1728-03

EOLA1基因突变体的克隆和鉴定

苏踊跃,齐 洁,罗向东,贾思远,梁光萍,陈 渝,刘月明 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 对ECV304细胞株EOLA1基因进行克隆测序以及mRNA水平检测。方法 采用RT-PCR扩增EOLA1基因片断,连接到T载体进行测序。结果 测序发现一种目的基因mRNA剪接突变体,其第3外显子起始部分比Genebank数据库相应序列多出19个碱基。RT-PCR显示剪接突变体与野生型EOLA1基因具有不同的表达水平和LPS反应性。结论 发现一个EOLA1基因剪接突变体,其生物学功能尚不清楚。

关键词:EOLA1;基因;克隆;剪接突变体
中图法分类号:Q75; R394-33 文献标识码:A

Cloning and identification of a splicing variant of EOLA1 gene

SU Yong-yue, QI Jie, LUO Xiang-dong, JIA Si-yuan, LIANG Guang-ping, CHEN Yu, LIU Yue-ming (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To clone and sequence endothelial overexpression lipopolysaccharide associated factor 1 (EOLA1) gene of ECV304 cell line and to detect its mRNA expression. **Methods** EOLA1 gene fragment amplified by RT-PCR was ligated to recombinant T vector for sequencing. **Results** A novel mRNA splicing variant of EOLA1 was identified with 19 redundant base pairs at the beginning of the 3rd exon of the target sequence published in Genebank. RT-PCR showed that the splicing variant was quite different from the wild type in expression of mRNA and reactivity to LPS. **Conclusion** A novel mRNA splicing variant of EOLA1 gene has been identified, but its biological function is unclear.

Key words: endothelial cell overexpression LPS associated factor 1; gene; cloning; splicing variant

血管内皮细胞不仅具有血管内表面的屏障作用,还能分泌多种细胞因子参与凝血、血管舒缩、炎症等多种病理生理过程,它在创(烧)伤后多器官功能不全的发生发展中具有重要的作用。内毒素(LPS)是创伤、感染后血管内皮细胞损伤的主要触发因素之一,本实验室应用LPS体外刺激人脐静脉内皮细胞株ECV-304,采用抑制性消减杂交方法筛选内皮细胞上与LPS相关的基因[1,2],其中一个基因全长序列在GeneBank登录,并命名为内皮细胞高表达脂多糖相关因子1(Endothelial cell overexpression LPS associated factor 1, EOLA1)。在阳性差异基因的克隆测序验证过程中,我们发现了该基因可能具有两种丰度不同的mRNA剪接型,目前国内外未见该基因功能的相关研究,现报告如下。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
作者简介:苏踊跃(1971—),男,辽宁省锦州市人,博士研究生,医师,主要从事创(烧)伤脏器功能不全机制方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754149-8082;E-mail:suyy511@yahoo.com
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-08-22

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞株ECV-304(ATCC)培养于含10%新生小牛血清M199培养基中。

1.2 目的基因的扩增

应用Tripue(Roche公司)提取LPS(100 ng/ml)处理6 h的ECV304细胞总RNA,应用Takara公司RNA PCR试剂盒进行反转录,设计针对新基因的引物扩增cDNA,引物为:上游5′-AGGGCCAGGTAAGAAGCTAAGTG-3′,下游5′-AGGGCCAGGTAAAGAAGCTAAGTG-3′,产物包含全部阅读框。GAPDH作为看家基因内对照。PCR参数:94 ℃ 10 min变性;94 ℃ 1 min,59 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30循环;72 ℃延伸5 min。PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳。

1.3 基因的克隆和测序

将PCR产物连接到pT-Adv载体(Clontech公司),连接体系如下:PCR产物1.5 μl,T4连接酶1.0 μl,10× Buffer 1.0 μl,pT-Adv 2.0 μl,去离子水4.5 μl,14 ℃连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌DH5α,蓝白斑筛选,挑选10个白斑进行*Eco*RI

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酶切鉴定, 阳性克隆以 M13 引物在 PE ABI PRISM 3700 测序仪上测序(上海基康生物技术有限公司、大连 Takara 公司)。

1.4　RT-PCR

针对测序得到的 EOLA1 基因 mRNA 两种剪接型进行扩增, (两种 mRNA 的差异部分以灰框显示, 相同的部分以直线表示)。

野生型 mRNA: ——CTCTGGCCGTAAAGCAGCTG——

剪接型 mRNA: ——CTCTGGCCGTAAAGCAG GTACTCTCTGC AGCACCAG CTG——

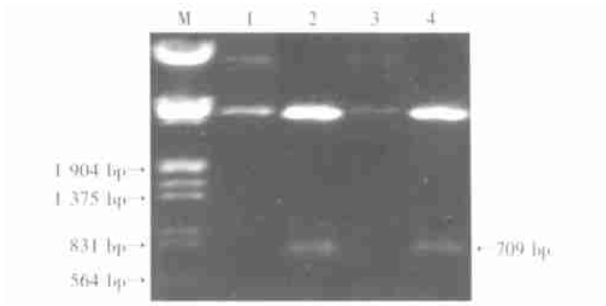
引物设计策略参考文献[3,4]: 野生型上游引物: 5′-CTCTG-GCCGTAAAGCAGCTG-3′; 剪接突变型上游引物: 5′-GTACTCTCT-GCAGCACCAG-3′; 下游通用引物为: 5′-GGAGCCCACACTT-GTCACAC-3′。

PCR 参数: 94 ℃ 45 s, 61 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 循环。PCR 产物行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳。

2　结果

2.1　EOLA1 基因的克隆及测序

应用 RT-PCR 方法, 扩增出包含全部目的基因开放读框的产物, 特异性好。PCR 产物与 pT-Adv 载体连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α, 蓝白斑筛选阳性重组质粒。阳性重组质粒 A 和 B 分别进行酶切和测序验证, *Eco*RI 酶切见图 1。两个阳性克隆测序由上海基康生物技术公司和大连 Takara 生物公司分别进行, 结果发现在阳性克隆中有两类不同目的片段序列, 其中一个与 GeneBank 数据库 No. AY074889 完全相同, 而另外一个仅在 381~399 位第 3 个外显子起始位置多出 19 bp, 其余均相同, 这种现象经两家测序代理公司独立测序证实, 两种序列以软件预测 ORF 相同(部分序列比对见图 2)。我们推测目的基因可能存在两种剪接型。



M: λ DNA /*Hind*Ⅲ marker; 1: Plasmid of clone A; 2: Plasmid of clone A digested by *Eco*RⅠ; 3: Plasmid of clone B; 4: Plasmid of clone B digested by *Eco*RⅠ

图 1　阳性重组质粒的酶切鉴定

Fig 1　Identification of the positive recombinant plasmid digested by *Eco*RⅠ

```
Consensus  CAGGACCCATGCTGCGGGAGCCTGTGTGCTCAGCCTTCTAGGGCCAGGTAAAGAAGC 342
Isoform 1  CAGGACCCATGCTGCGGGAGCCTGTGTGCTCAGCCTTCTAGGGCCAGGTAAAGAAGC 342
Isoform 2  CAGGACCCATGCTGCGGGAGCCTGTGTGCTCAGCCTTCTAGGGCCAGGTAAAGAAGC 342

Consensus  TAAGTGGAAGAGTGTTTCCTCCTCTGGCCGTAAAGCAG---------- 399
Isoform 1  TAAGTGGAAGAGTGTTTCCTCCTCTGGCCGTAAAGCAGGTACTCTCTGCAGCACCAG 399
Isoform 2  TAAGTGGAAGAGTGTTTCCTCCTCTGGCCGTAAAGCAG---------- 380

Consensus  CTGTCCCCGCCCTACTCCGGACCGCCCCAAAGACTCCATGGGATGGACCTGAGTCAG 456
Isoform 1  CTGTCCCCGCCCTACTCCGGACCGCCCCAAAGACTCCATGGGATGGACCTGAGTCAG 456
Isoform 2  CTGTCCCCGCCCTACTCCGGACCGCCCCAAAGACTCCATGGGATGGACCTGAGTCAG 437
```

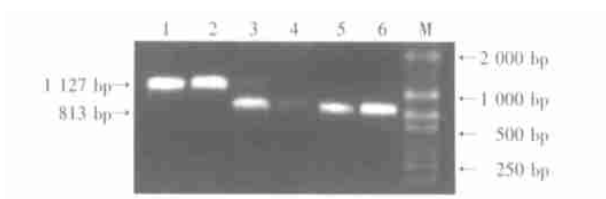
(The shadowed part shows the difference of the two splicing variants)

图 2　应用 **GeneTool** 软件对两种剪接型序列比对的一部分

Fig 2　Part of multi-align results of the two splicing variants by GeneTool software

2.3　EOLA1 基因两种 mRNA 剪接型在内皮细胞中的表达

我们应用 RT-PCR 方法, 设计分别针对每种剪接型的引物, 检测 mRNA 两种剪接型的表达量, 发现野生型 EOLA1 mRNA 的表达量与内毒素刺激无关, 呈组成性表达。而剪接突变型的表达量与 LPS 刺激呈明显的相关, LPS 刺激组剪接突变型 EOLA1 mRNA 的表达明显高于非刺激对照组, 见图 3。



M: DL2000 DNA marker; 1, 3 and 5: LPS stimulated group; 2, 4 and 6: Non-stimulated group; 1, 2: House keeping gene GAPDH; 3, 4: Splicing variant 2 of target gene; 5, 6: Splincing variant 1 of target gene

图 3　目的基因 **mRNA** 两种剪接型在 **ECV304** 细胞中的表达

Fig 3　Expressions of the two splicing variants of the target mRNA in ECV304 cell line

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

本室应用抑制性消减杂交结合 RACE(Rapid amplification of cDNA ends)方法发现了 ECV304 细胞中一个新基因,全长 cDNA 被 GeneBank 接受(登录号:AY074889),基于该基因发现的方法将其命名为内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1(EOLA1),目前该基因的功能尚不清楚,其推论蛋白质为 158 氨基酸,与 GeneBank NP-835225 理论蛋白序列 100%同源。针对该基因进行T 载体克隆测序的过程中我们意外的发现在 mRNA 水平它的表达不是 LPS 诱导性的,而是组成性的,这似乎与抑制性消减杂交得到差异片段的研究策略相悖。在后续的实验中,我们为这种现象寻求到了一定的解释。

重复实验中我们得到多个经酶切验证的阳性克隆,其中包含两种阳性克隆,一个测序结果与我们在 GeneBank 中登录的序列一致,另外一个克隆测序结果在阅读框的上游多出 19 bp(经重复实验,并经两家公司独立测序验证),提示这两个克隆可能代表了该基因 mRNA 两个不同的剪接型。对两种序列进行分析,发现增加的 10 多个碱基没有改变基因的开放阅读框,为了进一步证实这两种 mRNA 剪接型的存在以及在 ECV304 细胞中的表达情况,我们设计了两个上游引物,根据 PCR 扩增原理,引物的 5′端序列可以在一定程度上与模板不相匹配(如添加酶切位点等等),而引物 3′端必须是与模板严格匹配的,如果引物 3′末端一个或多个碱基与模板不相匹配,那么扩增效率会明显降低[3,4]。因此本实验针对目的基因两个剪接型设计的引物增出的产物应能够分别代表目的基因的两种剪接型,我们用 RT-PCR 方法证实,EOLA1 基因野生型 mRNA 的确是组成性表达的,而剪接突变型 mRNA 是 LPS 诱导性表达的,这一定程度上解释了为什么我们用 SSH 和 RACE 得到的 cDNA 全长序列是组成性表达而不是 LPS 诱导性表达的,因为以短的表达序列标签(Expression sequence tag,EST)片段为基础进行 RACE 可能扩增出两种剪接型的任何一种全长 cDNA[5,6],从表达丰度看,扩增出野生型 cDNA 全长的机会更多,本室得到的也确实是组成性表达的野生型 cDNA 全长。根据本实验的发现,EOLA1 存在不同的 mRNA 剪接型,并且表达的丰度以及对 LPS 刺激的反应性上存在明显的差异,其生物学意义目前尚不清楚,仅从 mRNA 表达水平看,剪切突变型更确切的反映了该基因的特点、更符合其命名含义。

为什么仅仅因为 10 多个碱基的差别,使得它们对 LPS 的反应性不同呢,根据以往研究,许多基因的 mRNA 非翻译区能够影响其稳定性和翻译效率,由此导致质或量上有差异的蛋白产物生成。关于 EOLA1 基因的不同剪接型可能的生物学意义,我们正在应用 RNA 干扰技术进行深入研究。

参考文献:

[1] 梁自文,罗向东,杨宗城,等. 应用抑制消减杂交克隆内皮细胞内毒素刺激后相关基因[J]. 解放军医学杂志,2002,27(4):336-338.

[2] 梁自文,杨宗城,罗向东. 人类新基因 *eola*1 全长 cDNA 序列的克隆[J]. 第三军医大学学报,2002,24(3):封2.

[3] 黄培堂,俞炜源,陈天弥 等 译. PCR 技术实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998. 23-33.

[4] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京:科学出版社,2002. 99-107.

[5] Schaefer B C. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends[J]. Anal Biochem,1995,227(2):255-273.

[6] Das M, Harvey I, Chu L L, *et al*. Full-length cDNAs: more than just reaching the ends[J]. Physiol Genomics, 2001,6(2):57-80.

(编辑 张 宁)

(上接 1727 页)

3 讨论

多年来我科室一直用硬脂酸和软蜡混合液一步法浸蜡,包埋时用硬蜡。因为透明浸蜡后没有浸硬蜡,组织中的软蜡与硬蜡的密度不同,所以造成存档后组织内陷,给再次切片造成困难。另外一些含脂肪的组织制片困难,尽管在脱水的同时已脱脂,但在浸蜡时脂肪又进入了脂肪组织,至使切片不全或切片过厚给病理诊断造成困难。而三步浸蜡法一是延长了时间,二是由于组织中的硬脂酸被置换出来了,使硬脂酸软化组织的作用明显减弱或消失,造成一些致密组织如皮肤、子宫肌瘤、肝、脾等制片困难。而二步法有效的弥补它们的不足,其中最大的优点是:浸蜡时间短;对致密的组织有软化作用;组织不内陷及保证了含有脂肪的组织切片质量。

因重庆地区夏季温度较高,为便于石蜡组织块存档,我科全年均用 60~62 ℃ 的高熔点硬蜡。浸蜡的温度宜高出石蜡熔点 2~4 ℃,而浸蜡的最高温度不宜高出 68 ℃,一般将浸蜡温度控制在 66~67 ℃。浸蜡包埋全用硬蜡,有效地避免了组织内陷。并因组织中硬脂酸大部分被置换了出来,所以脂肪组织一样可以切出 4 μm 的切片来;而子宫肌瘤等组织切起来又不涩刀。为防止第二缸中的硬脂酸逐渐增多,要每周更换一次。换下来的石蜡可以再同包埋蜡混合用于组织包埋,也可用于添补第一缸中的蜡,这样既可适当少用一些硬脂酸,也可节省石蜡的用量。经过 3 年来的临床实践证明二步法用于临床实践更具有实际意义。

关键词:石蜡切片;浸蜡法
中图法分类号:R361.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 陈恒光,吕惠荣. 应用 18 酸和软石蜡混合液改良透明浸蜡方法[J]. 诊断病理学杂志,1994,1(2):87.

[2] 王伯沂云,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000. 80-81.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net