DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.04.013

人凝血因子VIII基因cDNA的部分分离的初步研究△

谭 骏 邱信芳* 梁 红 薛京伦** (第三军医大学训练部 医学遗传教研组) 630038

提 要 我们用血友病FⅧ基因探针p114.12从人肝细胞cDNA文库中分离到3个有杂交信号的克隆。进一步鉴定，其中1个（FⅧhc$_1$）的克隆片段比所用的探针p114.12(0.65kb) 增大0.45 kb。通过FⅧhc$_1$部分顺序分析及微机搜索，FⅧhc$_1$有210bp与FⅧcDNA (5559-5769)完全同源，提示FⅧhc$_1$从FⅧ基因cDNA17号外显子向下游延伸了800～900bp。

关键词 人凝血因子Ⅷ；DNA；克隆

甲型血友病是最为常见的遗传性凝血疾病，在男性中的发病率为万分之一[1]，是由于凝血因子Ⅷ（FⅧ）基因缺陷所致，为X染色体连锁隐性遗传。临床上主要表现为关节及软组织出血。目前唯一的治疗措施为替代疗法，尚不能根治。近年来，由于本病的分子生物学研究迅速发展，其基因治疗已成为可能。但是，进行这项工作的先决条件是获得有表达活性的FⅧ基因cDNA。本文就这方面工作的基础性研究作了初步尝试，为后续工作打下了基础。

1 材料和方法

1.1 制备探针和筛选人肝脏细胞cDNA文库

我们从ATCC(American Type Cuture Collection)公司购回Ⅷ因子基因的一个片段p114.12[2]，用限制性内切酶（New England产品）BamH I/Sac I酶切，采用从低融点琼脂糖电泳回收DNA的方法[3]，回收p114.12的0.65kb片段。该片段为单拷贝序列，可作为探针筛选人肝细胞cDNA文库。此文库由Savio L.C.Woo博士所赠送。文库以噬菌体λgt11作为载体，筛选时再用它们去转染1090γ-宿主细胞[4][5]。见图1。

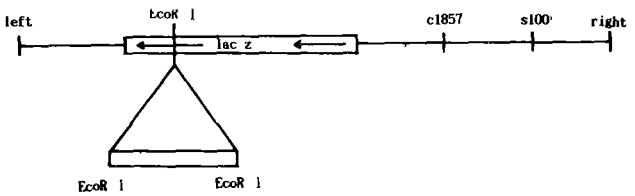


图1 λgt11物理图谱

Fig.1 Restriction Map of λgt11

筛选人肝脏细胞cDNA文库的方法基本上按照T.Maniatis的噬菌斑原位杂交法进行[6]。

1.2 噬菌体DNA的制备及Souther Blot鉴定

参照快速抽提噬菌体DNA Kowk[8]等方法。阳性重组的噬菌体DNA经EcoR I消化，琼脂糖电泳分离，Souther印迹以及用^{32}P-α-dATP标记p114.12探针（比活性1.5×10^{7}cPm/μg）进行分子杂交。

1.3 FⅧ片段的亚克隆

克隆的FⅧ片段亚克隆于质粒pUC9。经EcoR I酶切和CIP(calf intestinal alkaline phosphatas)处理pUC9后，与从低融点琼脂糖胶中回收FⅧhc1 EcoR I片段连接、转化，采用快速细胞破碎法（Creaking Gel）选择阳性克隆。

△复旦大学国家重点基因工程开放实验室资助项目。

**复旦遗传学学研究所。

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

1.4 FⅧhc$_1$克隆片段的部分顺序分析

克隆载体为M13mpl 8，受体菌为大肠杆菌JM109；顺序分析所用试剂为Pharmacia产品。

1.4.1 用M13mpl 8亚克隆FⅧhc$_1$ Hind III/EcoR I片段

用HindI/EcoRI酶将FⅧhc$_1$从pUC 9切出，克隆到Ml 3mpl 8 载体上，用X-Gal（5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside）选择。

1.4.2 单链提取及Dot Blot鉴定

将数个X-Gal选择阳性重组子分别接种于3ml含有1/100体积JM109过夜菌的ZYT培养液中，37℃培养6h，离心5 min，留上清液，以每毫升加200—250μl 20%PEG/2.5mol/L NaCl，置于冰浴中30min，15000rpm离心15min，沉淀用100μl TE溶解，常规方法提取DNA。电泳鉴定后，取0.1μg点在硝酸纤维膜上，以FⅧhc$_1$克隆片段为探针进行分子杂交。

1.4.3 DNA顺序分析

按Pharmacia公司T$_7$序列酶方法。取单链DNA 5 μl（约2.5μg）、4μl引物（10ng）、2 μl顺序分析缓冲液及1 μl水混匀后，置于60℃10min，室温10min，加标记混合液（Labelling Mixture）3μl、α-^{32}P-dATP 1 μl（10μCi）和稀释后的T$_7$DNA聚合酶2 μl（3 units）室温置放5 min，反应液4等分分别加到4μl预热过的A、T、C、G混合液中，37℃ 5 min。各加10μl终止液，80℃ 2 min，取2μl上样电泳。电泳胶为6%聚丙烯酰胺，内含有8.3mol/L脲素，在制胶前每100ml聚丙烯酰胺溶液中加入0.08g过硫酸铵和80μl TEMD（四甲基乙二胺）溶液。用滑动技术制成上薄下厚的梯度胶。预热至55℃，加样后，以2500V的电压电泳6h。电泳系统为LKB 2010 Maorophor system。电泳后将胶转移到普通滤纸上，真空抽干，压上X光片，室温放置48h后冲片。

2 结果和讨论

2.1 FⅧ基因cDNA的分离

2.1.1 用噬菌斑原位杂交的方法筛选人肝脏cDNA文库

（1）初筛：用20个150mm细菌培养皿，共筛选20×20000 = 4 ×10^{5}个cDNA文库重组子。见图2-1。

（2）复筛：在细菌培养皿上生长的噬斑数目与分子杂交后X光片上的黑点数相等。见图2-2。共得到3个阳性噬菌斑即3个阳性重组子定名为FⅧhc$_1$、FⅧhc和FⅧhc″。

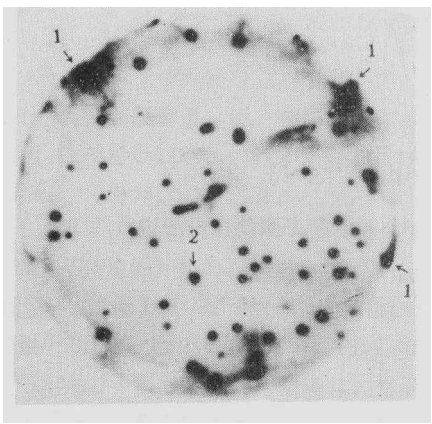


图2-1 噬菌斑原位杂交（初筛）
箭头1所指为方向标记
箭头2所指为阳性斑

Fig. 2-1 In Situ Hybridization of Plaques (First)
1 arrow shows direction mark;
2 arrow shows positive plaque.

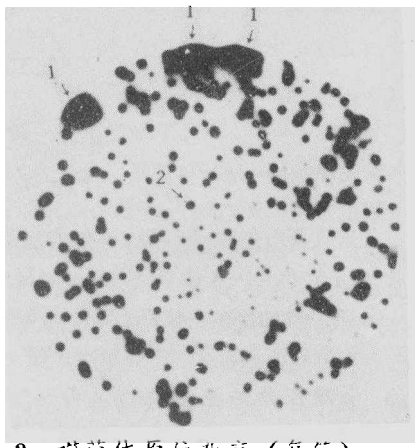


图2-2 噬菌体原位杂交（复筛）
箭头1所指为方向标记
箭头2所指为阳性斑

Fig. 2-2 In Situ Hybridization of Plaques (Second)
1 arrow shows direction mark;
2 arrow shows positive plaque.

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

2.1.2 阳性重组子DNA Souther Blot鉴定：

根据λgt11的酶切图谱，重组子FⅧhc$_1$用EcoR I酶切、电泳、拍照，并用p114.12探针进行Souther印迹分子杂交。结果见图 2 - 3 。

分离目的基因是进行基因工程，研究基因结构功能乃至基因治疗的首要环节。鉴于核酸分子杂交识别目的基因灵敏、专一性高，故已成为当今分离目的基因的主要方法。因为我们试图得到FⅧ基因完整的cDNA，所以采用了人肝脏细胞cDNA库。此文库是1983年美国斯坦福大学R.Young和R.Davis为用蛋白质抗体直接筛选基因而构建的（载体为λgt11）[4]，因此未经纯化，文库中有相当数量的野生型λgt11。假如改用核酸杂交的方法筛选此库，则必须

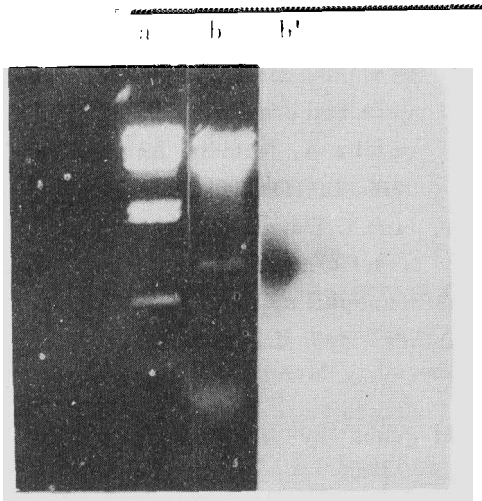


图2-3 用p114.12探针进行Southern Blot分子杂交

a：λDNA + Hind III

b：FⅧhc$_1$ + EcoR I

b'：相应b的分子杂交结果

Fig. 2-3 Analysis of Southern Blot (probe p114.12)

a：λDNA + Hind III

b：FⅧhc$_1$ + EcoR I

b'：result of Southern Blot, corresponding to b

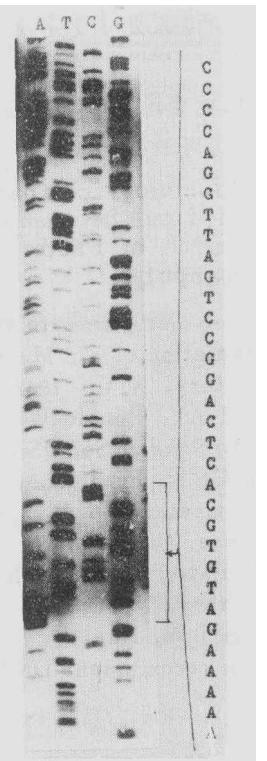


图2-4 FⅧhc$_1$克隆部分核苷酸顺序分析

箭头所指为FⅧ基因cDNA17号外显子核苷酸顺序

Fig. 2-4 Analysis of partial DNA sequence of FⅧhc$_1$ DNA sequence of 17 exon (FⅧ gene) is denoted by arrow

扩大筛选量。一般认为从哺乳类动物基因组文库中分离基因，需筛选30万个重组子[6]，若从cDNA文库中筛选，则需3万～5万个重组子[7]；而我们从未经纯化的人肝脏细胞cDNA文库中分离到FⅧhc$_1$、FⅧhc$_2$和FⅧhc$_3$三个片段，共筛了40万个重组子。

整个实验过程所用的硝酸纤维滤膜均为国产（浙江黄岩人民化工厂生产），由于采用延长重组噬菌体DNA转移时间以及三氯甲烷处理滤膜等手段，我们认为用核酸杂交的方法分离基因，选用国产硝酸纤维滤膜优于进口产品。

2.2 FⅧhc$_1$顺序分析

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

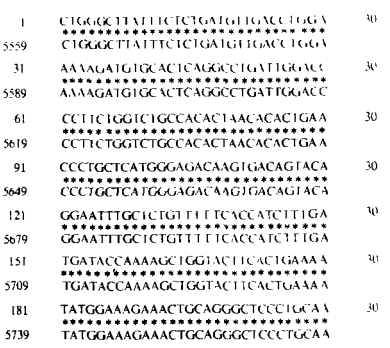


图2-5 微机搜索F Ⅷhc$_1$与F Ⅷ 基因cD-NA序列同源性比较

Fig. 2-5 Homology comparison is carried out between F Ⅷhcl and cDNA of Factor Ⅷ gene by computer.

电泳6h可以清楚读出210bp核苷酸，见图2-4。经微机搜索，与F Ⅷ基因cDNA序列进行同源性比较，F Ⅷhc$_1$有210bp与F Ⅷ基因cDNA5559-5769完全同源，见图2-5。提示F Ⅷhc$_1$从F Ⅷ基因cDNA17号外显子向前延长了800～900bp。

参考文献

1. Kare LW, Edward Richard ML. A new polymorphism in the factor Ⅷ gene for prenatal diagnosis of hemophilia A. Nucleic Acids Research 1986; 14(11):4535～4542
2. Jane G, Dennis D, Edward T, et al. Genetic mapping and diagnosis of Hemophilia. A achieved through a Bcl I polymor phism in the factor Ⅷ gene. Nature 1985; 314(25):738～740
3. T. Maniatis, et al. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1982:116
4. Richard AY, Ronald WD Efficient isolation of genes by using antibody probes Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80(March):1194～1198
5. Simon CMK, Fred DL, Anthony GD, et al. Nucleotide Sequence of a Full-Length Complementary DNA Clone and Amino Acid sequence of Human Phenylalanine Hydroxylase. Biochemistry 1985; 24(3):556～561
6. T. Maniatis, et al. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1982:202～204
7. William I W, Daniel JC, Christian CS, et al. Expression of active human factor Ⅷ from recombinant DNA clones. Nature 1984; 312(22):330～336

(收稿：1991.01.14；修回：1991.06.13)

Preliminary Study of Partial cDNA Cloning for Human Clotting Factor Ⅷ

Tan Jun, Qiu Xinfen, Liang Houg, et al (Department of Medical Genetics, Third Military College, Chongqing 630038)

Abstract A cDNA library prepared from human liver was screened for Factor Ⅷ, a clotting factor in the middle phase of blood coagulation, with p114.12 probe. 3 recombinant phages were distinguished, and one of the 3recombinants was further analyzed and extended by 450 bp as compared with the p114.12 probe. The clone 1 (F Ⅷhc$_1$) was sequenced and homology between 210 bp of F Ⅷhc$_1$ and 5559-5769 in F Ⅷ cDNA was found. It was shown that the F Ⅷhc$_1$ extended forwardly 800～900bp from 17 exon of F Ⅷ cDNA.

key words human clotting factor Ⅷ; DNA sequence; cloning

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