

兔早期胚泡特异肽的 cDNA 克隆*

杨卫民 沈孝宙 曹咏清 张致一

(中国科学院动物研究所生殖生物学开放实验室, 北京 100080)

摘 要

从家兔受精后第 6 天(着床前)的早期胚泡构建 cDNA 文库,经阶段特异分子杂交筛选,克隆了仅在此时期表达的 9 种胚泡特异肽类的 cDNA. 对其中一种丰度较高的 cDNA 克隆进行了研究,测出其编码区含有 285 碱基对,5'和 3'侧翼区各有 132 和 170 碱基对. 经 DNA 序列分析,推导出一种分泌性多肽的一级结构,由 75 个氨基酸组成. 计算机分析显示它与迄今报道的所有基因和蛋白在结构上无任何同源性.

关键词 兔胚泡特异肽, cDNA 克隆, 差异筛选

在哺乳动物胚胎发育过程中,胚泡在母体子宫的着床(implantation),是早期胚胎发育的关键步骤,因为只有着床的胚胎才能继续发育. 着床是胚胎与母体讯息交流和相互识别的过程,它们的分子机制还很不清楚,但却有十分重要的意义. 在理论上可以阐明胚泡着床的机理,在实际应用上则可以为生育控制(如免疫阻断妊娠)开辟新的途径.

80 年代初,一些学者曾注意到胚泡在着床前能分泌一些特异的多肽和蛋白. 双向电泳分析显示小鼠胚泡不同发育阶段可以出现某些不同的蛋白^[1,2],从而认为它们可能具有重要的生理功能,参与胚泡与子宫的相互作用. 近年来,Godkin 等人发现绵羊胚泡在着床关键时期(受精后第 13—21 天),可以分泌一种特异的蛋白,称为 OTP1,并证明它是一种类似干扰素的物质,同时还克隆了该蛋白的 cDNA^[3]. 进一步研究发现猪^[4]和牛^[5]的胚泡也存在这种蛋白. 我们曾从兔着床前胚泡分离出 3 种多肽^[6],证明这些多肽具有抑制淋巴细胞转化及抑制子宫内膜合成前列腺素 $F_{2\alpha}$ 的生理功能^[7].

本研究是利用基因工程技术,克隆了兔着床前胚泡一种具有发育阶段特异性的多肽的 cDNA,并测定了其序列.

本文 1990 年 8 月 9 日收到.

* 本研究部分经费由美国洛克菲勒基金会资助.

一、材 料 和 方 法

1. 材料

限制性内切酶和 T4DNA 连接酶购自中国医学科学院友谊生物工程分公司, AMV 逆转录酶、大肠杆菌 DNA 连接酶、RNA 酶 H、DNA 聚合酶 I、T4DNA 聚合酶及外切酶 III 购自德国 Boehringer Mannheim 公司, Oligo-(dT) 纤维素(7 型)购自瑞典 Pharmacia 公司。

2. 方法

(1) 家兔超数排卵 将猪垂体 FSH 溶于 1% 甲基纤维素的生理盐水, 以 1.8mg/天/只的剂量连续注射 3 天, 第 4 天交配。分别在交配后第 6 天(D-6)和第 12 天(D-12)将动物杀死, 从子宫中收集胚泡, 液氮冻存储用。

(2) mRNA 的分离 用硫氰胍-氯化铯密度梯度超离心方法^[8,9], 获得的总 RAN 通过 Oligo-(dT) 纤维素柱, 收集 poly A⁺ RNA。

(3) cDNA 的合成 按改良的 Okayama 和 Berg 的方法^[10] 进行。得到双链 cDNA 后经甲基化处理, 与 EcoRI 人工接头连接, 再用 EcoRI 酶处理, 经 Sepharose 4B 柱层析, 收集大于 300bp 的含 EcoRI 粘性末端的 cDNA 片段。

(4) 兔胚泡 cDNA 文库的构建 用噬菌体 λ gt11 作载体, 方法依照 Maniatis^[11] 和 Young^[12] 等人所述, 将体外包装的重组噬菌体感染受体菌 Y₁₀₉₀, 最后经扩增, 形成稳定的 cDNA 文库。

(5) 差异筛选 取兔的 D-6 胚泡及 D-12 胚泡的 mRNA 各 0.5 μ g, 分别加入 80 μ Ci 的 ³²P-dCTP 和其他三种 dNTP, 经逆转录酶作用分别合成放射性标记的两种单链 cDNA 探针。再用这两种单链探针, 分别对 D-6 胚泡 cDNA 文库进行差异筛选, 即挑选可与 D-6 探针杂交而不与 D-12 探针杂交的克隆, 然后再进行多次复筛, 以选出 D-6 胚泡特异的克隆。

(6) DNA 序列分析 将 λ gt11 载体上的特异克隆用 EcoRI 切出插入片段, 次级克隆在单链噬菌体 M13mp18 载体 RF 型的 EcoRI 位点, 按 Sanger 的双脱氧末端终止法进行 DNA 的序列分析^[13,14]。

二、结 果

1. 兔胚泡 cDNA 文库

从大约 500 个兔 D-6 胚泡分离到 2.4 μ g polyA⁺ RNA。以 1.2 μ g poly A⁺ RNA 合成双链 cDNA 0.66 μ g, 其平均长度大致为 1 kb。将双链 cDNA 插入载体 λ gt11 两臂之间, 经体外包装后获得 7×10^4 噬菌斑, 本底 < 10%, 建成兔 D-6 胚泡的 cDNA 文库。

2. 差异筛选和重组体鉴定

从兔 D-6 胚泡 cDNA 文库取出约 4000 噬菌斑, 经差异筛选, 获得 9 个 D-6 胚泡特异的 cDNA 克隆, 分别称为 λ B2 — λ B10。将此 9 个克隆分别扩增, 提取其 DNA, 进行斑点杂交, 用 D-6 和 D-12 探针复筛, 证实这些克隆系 D-6 特异的(图 1)。当用 EcoRI 酶水解, 可将这些重组体的插入片段从载体上切出, 用琼脂糖凝胶电泳可以判断插入片段的大小。这 9 个克隆插入片段的长度从 λ B2 起依次为 0.38, 0.7, 0.53, 0.45, 0.59, 0.38, 1.40, 1.60 和 0.44 kb(图 2)。

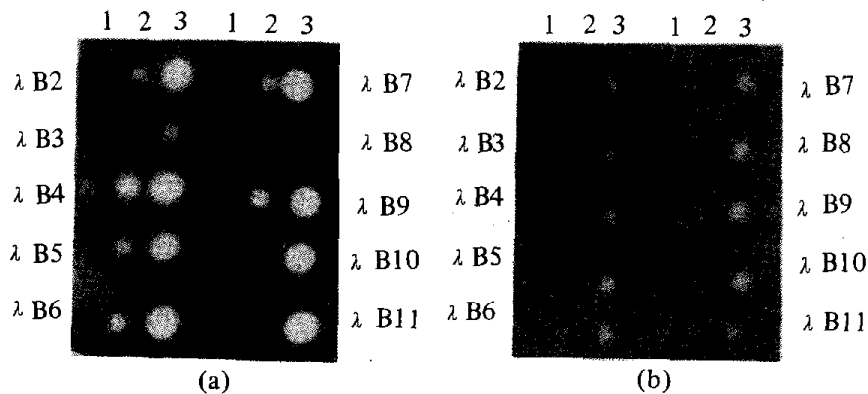


图 1 兔早期胚泡某些cDNA 克隆的阶段特异性

(将纯化的重组噬菌体 DNA(λB2—λB11)以不同量: 1——0.1 ng, 2——1 ng, 3——10ng 点于硝酸纤维素膜上,用同一份滤膜先后与 D-6(a)和 D-12(b)探针杂交)

3. 兔 D-6 胚泡一种高丰度特异肽的 cDNA 结构

对所克隆的 9 个阶段特异的胚泡 cDNA 进行部分测序,发现其中有 4 个克隆(λB2, λB4, λB6 和 λB10)的序列是相同的,其酶切图谱表示于图 3. 说明这 4 个克隆来自同一种高丰度的 mRNA,因为随机筛选出的 9 个 D-6 胚泡特异的克隆竟有 4 个是一样的. 这反映该种 mRNA 所编码的多肽在着床前胚泡所产生的蛋白中占有相当大的比例. 这 4 个克隆以 λB6 最长,对其作了全序列分析(图 4). 该 cDNA 长 587bp,正确的阅读框架为 285bp,可编码 95 氨基酸的肽链. 5' 和 3' 侧翼区各有 132 和 170bp. 根据三联体密码所推导的多肽,命名为 RBP4,其一级结构见图 4.

我们又用 λB6 克隆的 cDNA 片段作探针,分别与 D-6 和 D-12 胚泡的 mRNA 杂交,发现在 D-6 的滤膜上有很强的杂交信号,而 D-12 的杂交信号极弱(图 5). 这就再次证实 RBP4 多肽为 D-6 胚泡所特有.

4. RBP4 信号肽区的分析

我们以 Kyte 等人所发展的疏水值计算机处理程序^[15]分析了 RBP4 多肽逐段的疏水值,结果如图 6 所示. 可以看到在 RBP4 肽链的 N 端有一段疏水性很高,约有 20 个氨基酸. 据此可以认为 RBP4 可能为一种分泌肽,含 75 个氨基酸,而 95 肽显然为其前体.

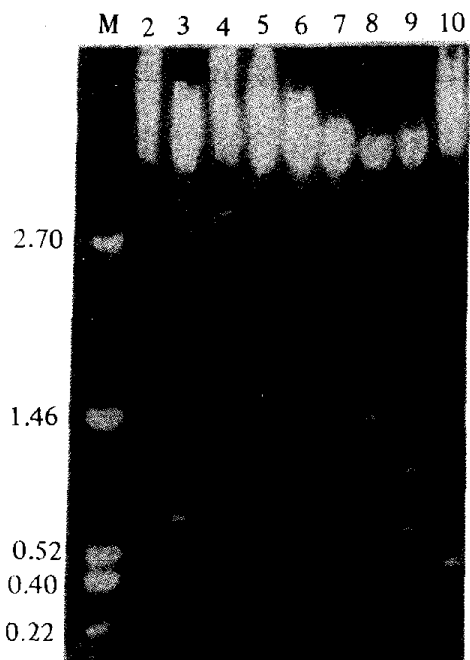


图 2 兔早期胚泡阶段特异性cDNA 克隆的长度

(取重组噬菌体 λB2—λB10 (2—10) 分别用 EcoRI 酶处理,琼脂糖凝胶电泳分离,鉴定插入片段的大小. M——分子量标准)

三、讨 论

由于哺乳动物胚泡组织量极少,取材又十分困难,多年来用传统的生化和生理学方法研究

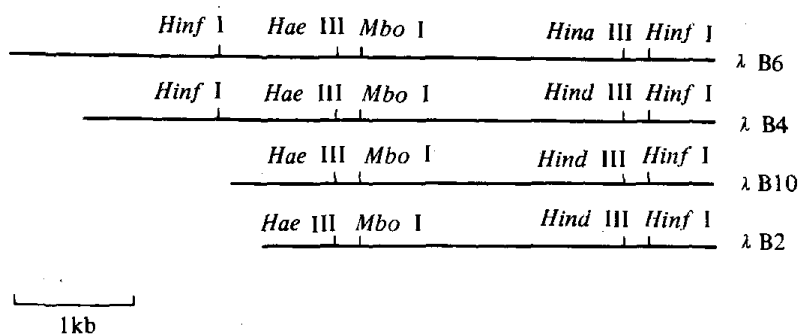


图3 根据4个重组噬菌体 λ B6, 4, 10和2, 插入片段DNA序列分析结果所建立的限制性内切酶图谱
(由图可以看到这4个克隆实际上是完全相同的)

-130 -120 -110 -100 -90
 GC TCTGAGCTCT AGGCTTTATT TTCCTATTTA CAGTAGGCGG TCTTACAGGA
 -80 -70 -60 -50 -40 -30
 ATTGTGCTAG CCAACTCCTC TTTAGACATC GTACTACATG ACATCTACTA TGTAGTAGCT
 -20 -10 15 30
 CACTTCCACT AGTCCTATCT ATG GGG GCT GTA TTT GCT ATT ATA GGA GGA TTT GCC
 Met Gly Ala Val Phe Ala Ile Ile Gly Gly Phe Ala
 45 60 75 90
 CTT GAT TCC CCT ATT CTC AGG CTA TAC CTT GAC CAA CTG AGC CTA AAT CAC TTC
 Leu Asp Ser Pro Ile Leu Arg Leu Tyr Leu Asp Gln Leu Ser Leu Asn His Phe
 105 120 135
 ACT GAT ATT GTA GGA GCA ACT AAG GTT TCT TCC CTC AAC ATT CCT TGG CCT CTC
 Thr Asp Ile Val Gly Ala Thr Lys Val Ser Ser Leu Asn Ile Pro Trp Pro Leu
 150 165 180 195
 AGG ATA CCC CGA CGG ATC AGA CTA CCC GGA CGC CTA TAC AAT ATG AAA TAC TGT
 Arg Ile Pro Arg Arg Ile Arg Leu Pro Gly Arg Leu Tyr Asn Met Lys Tyr Cys
 210 225 240
 TTC ATC AAT AGG CTC ATT CAT TTC CCT AAC TGC CGT AAT AGT AAT AAT TTT TAT
 Phe Ile Asn Arg Leu Ile His Phe Pro Asn Cys Arg Asn Ser Asn Asn Phe Tyr
 255 270 285 300
 AAT TCT GAG AAG CCT TCG CCT CAA AAC GAG AAG TAG A G ACTATTGAAC
 Asn Ser Glu Lys Pro Ser Pro Gln Asn Glu Lys *
 310 320 330 340 350 360
 TAACAACCAC AAACCTAGAA TGACTTCATG GATGCCCTCC CCCATACCAT ACATTGAAG
 370 380 390 400 410 420
 AACCCGCTTT CGTAAAGCT TAGTACAAGA AAGGAAGGAA TCGAACCTCC TAAAACTGGT
 430 440 450 455
 TTTTCAAGCC AGCCCCATAC CACTATNACC TTTCT

(b)

图4 RBP4的cDNA序列分析(a)及根据核苷酸序列推导的氨基酸顺序(b)
(RBP4 cDNA 含有 587bp, 其中编码区含 285bp, 可编码一条具有 95 个氨基酸的多肽。
两端非编码区各有 132bp(5')和 170bp(3'))

(a)

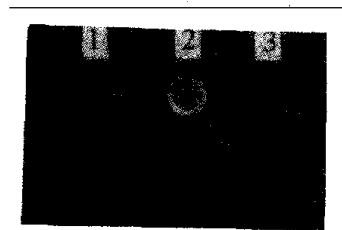


图 5 兔胚胎RBP4 cDNA 克隆的发育阶段
异性

(1 —— 1 μ g D-12 mRNA, 2 —— 0.1 μ g D-16 mRNA, 3 —— 10 μ g 酵母 tRNA 分别点在硝酸纤维素滤膜上,与放射性标记的 RBP4 cDNA 探针杂交。从放射自显影图谱上可以看到,虽然 D-12 mRNA 和酵母 tRNA 点样量分别高于 D-6 mRNA 10 倍和 100 倍,但与 RBP4 探针杂交的信号远不及 D-6 mRNA 强)

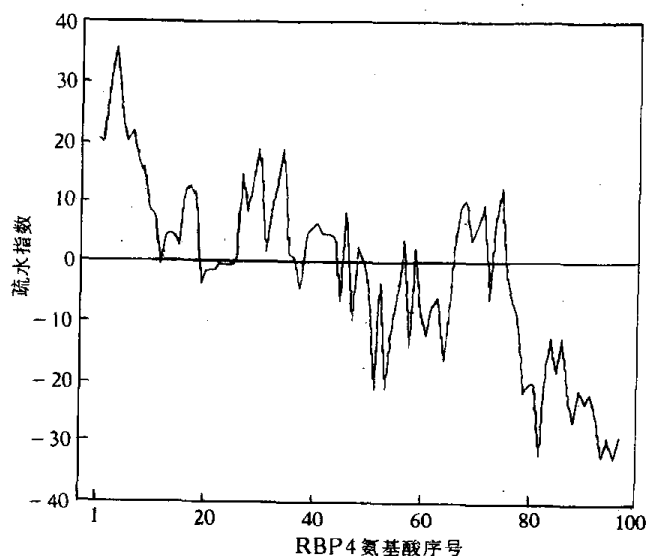


图6 RBP4 多肽的氨基酸疏水值的计算机分析

(在计算时以每 5 个氨基酸为一组,方法依 Kyte 和 Doolittle 所述^[15]。上面是根据分析结果绘制的疏水值图谱,显示 RBP4 肽链 N 端 20 个氨基酸疏水性很强,这是一般信号肽的特性,提示 RBP4 可能为一分泌性多肽。同时从该图还可看到,成熟的 RBP4 肽 N 端仍为疏水区,而分子的 C 端却呈极强的亲水性)

分泌蛋白和多肽一直受到限制。我们根据反向生物学原理^[16],希望能利用重组 DNA 技术,先从少量组织中克隆特异的基因,然后通过基因的扩增、结构分析和表达,研究这种基因所编码的特异蛋白的分子结构和生理功能。基于这样的构想,我们克隆了兔胚胎在着床前一种多肽的 cDNA,并测定了其序列,推导出这种多肽(RBP4)的一级结构。对于 RBP4,就我们目前所研究的结果,可以归纳它有如下几方面的特性:

1. 具有发育阶段特异性,即主要出现在着床前的兔胚胎,而在着床后则显著减少或消失;
2. 丰度高。在 9 个 D-6 胚胎特异的克隆中,就有 4 个是相同的,都是 RBP4 多肽的编码基因;
3. RBP4 多肽存在信号肽结构,所以可认为它是一种分泌性肽类;
4. RBP4 多肽为胚胎所特有,因将其序列与 EMBL 基因数据库所存储的数万种至今已阐明的基因序列进行比较,未发现有任何结构上的明显同源性。证明 RBP4 是一种新发现的多肽。

根据这些特性,我们有理由推测 RBP4 可能与胚胎着床有密切的关系,但其确切的生理功能还有待深入研究。

本研究有如下的意义: 首先,我们证明通过基因克隆技术中的差异筛选法,可以为研究组织量极少的胚胎所含的微量特异蛋白和多肽提供有效的途径。其次,通过胚胎特异肽的基因克隆,使胚胎特异肽类的功能研究成为可能。最后,我们认为如果本研究所发现的兔胚胎特异肽确有重要的生理功能,那么同其他重要活性物质一样,在进化上必定是保守的。这样, RBP4 的 cDNA 就可以作为一种基因探针,用来从人类的基因库中寻找同源基因,解决目前无法进

行人类胚胎特异肽研究的困难.

参 考 文 献

- [1] Magauson, J. & Epstein, C. J., *Dev. Biol.*, **81**(1981), 193.
- [2] Gary, L. N. et al., *Biol. Reprod.*, **36**(1987), 687.
- [3] Imakawa, K. et al., *Nature*, **330**(1987), 377.
- [4] Gross, J. C. & Roberts, R. M., *Biol. Reprod.*, **38**(1988), suppl. 1, abstr. 153.
- [5] Helmer, S. D. et al., *J. Reprod. Fert.*, **79**(1987), 83.
- [6] 曹咏清等, 中国科学B辑, 1987, 8 : 845.
- [7] 曹咏清等, 中国科学B辑, 1988, 9 : 928.
- [8] John, M. C., *Biochem.*, **18**(1979), 5294.
- [9] Hansen, P. J. et al., *Endocrinology*, **117**(1985), 1424.
- [10] Okayama, H. & Berg, P., *Mol. Cell. Biol.*, **2**(1982), 161.
- [11] Davis, L. G. et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, New York, Amsterdam and London 1986, p. 193.
- [12] Young, R. A. & Davis, R. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**(1983), 1194.
- [13] Sanger, F. et al., *ibid.*, **74**(1977), 5463.
- [14] Masagira, H. & Yoshiyuki, S., *Anal. Biochem.*, **152**(1986).
- [15] Kyte, J. & Doolittle, R. F., *J. Mol. Biol.*, **157**(1982), 105.
- [16] 李载平, 生物工程进展, **9**(1989), 1.