

P16^{ink4} cDNA 的克隆及序列分析

黄长晖 邓 炜* 傅继梁

(第二军医大学生物教研室, 医学分子遗传学开放实验室 上海 200433)

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)*

P16^{ink4} 是 CDK (Cyclin Dependent Kinase) 抑制蛋白家族中的一员, 在细胞内特异性地与 CDK4 和 CDK6 结合, 抑制 Cyclin D1/CDK4 和 Cyclin D1/CDK6 功能, 参与调控细胞 G1 期至 S 期的转换^[1,2]。1994 年, Kamb 和 Nobori 等发现在多种肿瘤细胞株中, P16^{ink4} 基因存在突变^[3,4]。进一步的研究表明多种原发性肿瘤, 比如胰腺癌、食管癌、肺癌、头颈部鳞癌、膀胱癌、前列腺癌以及白血病等都发现存在 P16^{ink4} 基因的突变^[5~7], 而且家族性黑色素瘤患者中该基因存在种系突变 (Germline mutation)^[8], 表明该基因与黑色素瘤的发病有关。体外研究表明导入 P16^{ink4} 基因表达载体可抑制肿瘤细胞的增殖^[9], 并可抑制 Ras 引起的细胞增殖和转化^[10], 而突变的 P16^{ink4} 则丧失了抑制 Cyclin D/CDK 的功能^[11,12]。这些研究结果表明 P16^{ink4} 基因可能是功能上非常重要的抑癌基因。为了研究该基因的功能, 以及该基因突变与肿瘤发生、发展间的关系, 我们克隆了 P16^{ink4} 基因的 cDNA 编码序列。

1 材料和方法

1.1 实验材料和仪器

RNA 提取试剂, X-gal 和 IPTG 为 Sigma 公司产品; Taq 酶及 PCR 扩增试剂盒为 PE 公司产品; 限制酶和 DNA 连接酶分别购自 Boehringer Mannheim 公司和 BioLabs 公司; DNA 分子量标准为华美公司产品; 同位素 α -³²P dATP 购自北京福瑞公司; 质粒 M13mp18 和 M13mp19, 宿主菌 XL1-blue 为本室储藏。PCR 上游引物 5'GGGAATTCATGGAGCCGGCGGGGGA 3' 和下游引物 5'GGGGATCCGGCCCTGTAGGACCTTCGG 3' 参照文献[1]和[9]设计。

PE2400 PCR 扩增仪, PE 公司产品; 373A 荧光自动 DNA 序列分析仪, ABI 公司产品。

1.2 方法

细胞总 RNA 提取参照异硫氰酸胍一步法^[13]。cDNA 第一链的合成采用 Gibco BRL 公司 Super-ScriptTM 试剂盒全套试剂进行。PCR 扩增、质粒重组、细菌转化及筛选均参照文献[14]进行。DNA 序列分析: 同位素标记法采用 UBI 公司 Sequenase Ver 2.0 试剂盒, 荧光测序采用 ABI 公司试剂盒, 用 PCR 方法进行。

2 结果和讨论

2.1 HeLa 细胞总 RNA 的提取

P16^{ink4} 基因在不同组织的表达是有差异的, 在肿瘤细胞中, 发现丧失 Rb 功能的细胞株 P16^{ink4} 基因的表达水平增高^[15]。考虑到 HeLa 细胞中 P16^{ink4} 基因表达水平较高, 我们以 HeLa 细胞为原材料抽提总 RNA。电泳结果可见 28S 和 18S 的清晰条带, 二者比值约为 2:1。紫外测定表明 $A_{260}/A_{280} > 1.8$, $A_{260}/A_{230} > 2.0$ 。说明抽提的总 RNA 没有降解, 而且纯度符合反转录的要求。

本文于 1996 年元月 24 日收到。

2.2 cDNA 第一链的合成及 P16^{ink4} cDNA 的扩增

以 Oligod(T)18 为引物反转录合成的 cDNA 第一链经 PCR 扩增得到 556bp 片段。该 cDNA 片段内含有两个 Sma I 位点,用 Sma I 酶切 PCR 扩增片段后得到 72、195、289bp 片段,说明扩增得到的 556bp 片段是 P16^{ink4} cDNA。

P16^{ink4} cDNA 序列 G + C 含量较高,本文扩增的 540 bp 范围内, G + C 含量为 375 碱基,占 69.4%。因此在反转录及 PCR 扩增中,应注意二级结构的影响。实验中要注意引物设计、反应体积、反应温度及 Mg²⁺ 浓度的控制,才有可能克隆成功。

2.3 P16^{ink4} cDNA 的克隆

P16^{ink4} cDNA 经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后克隆于 M13 载体,转化大肠杆菌 XL1-blue。转化的白斑先用 PCR 初筛,阳性克隆再用 BamH I 和 EcoR I 双酶切鉴定,可切出 556 bp 片段,说明 P16^{ink4} cDNA 已克隆于载体 M13。

2.4 P16^{ink4} cDNA 的核苷酸顺序测定

P16^{ink4} cDNA 克隆于 M13mp18 和 M13mp19 载体,使测序工作分别从 5' 端和 3' 端开始,并同时测定正负链以确证其碱基序列。由于 P16^{ink4} cDNA 的高 G + C 含量,在富含 G + C 区域形成二级结构影响序列测定,经用 dITP 标记以及荧光标记 PCR 测序方法,多次测序印证得到如图 1 所示的 DNA 序列。

```

ATG GAG CCG GCG GCG GGG AGC AGC ATG GAG OCT TCG GCT GAC TGG CTG GCC ACG
MET Glu Pro Ala Als Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu Ala Thr
GCC GCG GCC CGG GGT CGG GTA GAG GAG GTG CGG GCG CTG CTG GAG GCG GGG GCG
Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu Glu Ala Gly Ala
CTG CCC AAC GCA CCG AAT AGT TAC GGT CGG AGG CCG ATC CAG GTC ATG ATG ATG
Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro Ile Gln Val Met Met Met
GGC AGC GCC CGA GTG GCG GAG CTG CTG CTG CTC CAC GGC GCG GAG CCC AAC TGC
Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu His Gly Ala Glu Pro Asn Cys
GCC GAC CCC GCC ACT CTC ACC CGA CCC GTG CAC GAC GCT GCC CGG GAG GGC TTC
Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe
CTG GAC ACG CTG GTG GTG CTG CAC CGG GCC GGG GCG CGG CTG GAC GTG CGC GAT
Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp
GCC TGG GGC CGT CTG CCC GTG GAC CTG GCT GAG GAG CTG GGC CAT CGC GAT GTC
Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val
GCA CGG TAC CTG CGC GCG GCT GCG GGG GGC ACC AGA GGC AGT AAC CAT GCC CGC
Ala Arg Tyr Leu Arg Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg
ATA GAT GCC GCG GAA GGT CCC TCA GAC ATC CCC GAT TGA AAG AAC CAG AGA GGC
Ile Asp Ala Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp ---
TCT GAG AAA OCT CGG GAA ACT TAG ATC ATC AGT CAC CGA AGG TCC TAC AGG GGC

```

图 1 测定的 HeLa 细胞 P16^{ink4} cDNA 序列及推导的氨基酸顺序

该 DNA 序列包含了 P16^{ink4} cDNA 全部的 471 bp 编码序列以及 3' 端 69 bp 非编码序列。与 Serrano 等^[1]报道的序列比较,5' 端多 24 bp 编码 8 个氨基酸的片段,第 35 个密码子为 GGG 而不是 GTG,与后来的修订序列相同^[9],表明我们克隆了 P16^{ink4} cDNA 的全部编码序列,为研究其功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Serrano M, Hannon G J, Beach D. *Nature*, 1993, **366**: 704~707.
- [2] Hannon G J, Beach D. *Nature*, 1994, **371**: 357.
- [3] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J *et al.* *Science*, 1994, **264**: 436~440.
- [4] Nobori T, Miura K, Wu D J *et al.* *Nature*, 1994, **368**: 753~756.
- [5] Cairns P, Polascik T J, Eby Y *et al.* *Nature Genetics*, 1995, **11**: 210~212.
- [6] Caldas C, Hahn S A, Costa L T *et al.* *Nature Genetics*, 1994, **8**: 27~31.
- [7] Zhou X, Tarmin L, Yin J *et al.* *Oncogene*, 1994, **9**: 3737~3741.
- [8] Hussussian C J, Struwing J P, Goldstein AM *et al.* *Nature Genetics*, 1994, **8**: 15~21.
- [9] Okamoto A, Demetrick D J, Spillare EA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 11045~11049.
- [10] Serrano M, Gomez-Lahoz E, DePinho R A *et al.* *Science*, 1995, **267**: 249~252.
- [11] Yang R, Gornbart A F and Serrano M *et al.* *Cancer Res.* 1995, **55**: 2503~2506.
- [12] Ranade K, Hussussian C J, Sikorski R S *et al.* *Nature Genetics*, 1995, **10**: 114~116.
- [13] Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~159.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory, 1989.
- [15] Tam SW, Shay J W, Pagano M. *Cancer Res.* 1994, **54**: 5816~5820.

Molecular Cloning and Sequencing of P16^{ink4} cDNA from HeLa Cell

Huang Changhui Deng Wei Fu Jiliang

(Department of Biology, Second Military Medical University, Shanghai, 200433)

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)*

Abstract The P16^{ink4} gene has many features of a tumor suppressor gene. To examine its function, P16^{ink4} cDNA was amplified from the total RNA of HeLa cell by reverse transcription PCR with the use of the primers 5' GGGAAATTCATGGAGCCGCGGCGGGGA 3' and 5' GGGGATCCGGCCCTGTAGGACCTTCGG 3'. The PCR product including 471 bp open reading frame and 3' 69 bp non-coding region was cloned into M13mp18 and M13mp19 vector and verified by single-stranded DNA sequencing. The sequence is identical to the published sequence, that means P16^{ink4} cDNA had been cloned.

Key words P16^{ink4}/CDKN2/MTS1, cDNA, RT-PCR, sequence