

三种猕猴属动物 *Fas* 基因的克隆

水波池 莉 蒋虹 张永容 何伏秋 蔡有余

(中国医学科学院中国协和医科大学实验动物研究所, 北京 100021)

摘要: 从腹股沟淋巴结或血液中提取总 RNA 根据人的 *Fas* 基因的 cDNA 序列设计上、下游引物, 通过 RT-PCR 扩增出三种猕猴属动物 *Fas* 基因的 cDNA 片段, 将片段克隆到 pGEM-T Easy 载体中, 筛选阳性克隆并进行序列测定。恒河猴 *Fas* 基因编码序列为 1005bp, GenBank 收录号为 AY007572, 熊猴的编码序列为 996bp, GenBank 收录号为 AF326208, 短尾猴的编码序列为 933bp, GenBank 收录号为 AF332357。对五种已知的灵长类动物的 *Fas* 基因进行序列比较, 结果表明 *Fas* 基因的保守区域具有高度保守性, 而处于编码序列中间的一段低复杂度序列在不同的物种间具有很高的变异性。

关键词: RT-PCR; *Fas*; 序列分析

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 0253-977X(2001)03-0223-03

Cloning of *Fas* Gene in Three *Macaca* Species

SHUI Bo, CHI Li, JIANG Hong, ZHANG Yong-rong, HE Fu-qiu, CAI You-yu

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: Total RNA were extracted from inguinal lymph nodes or blood. The *Fas* cDNA fragments of three macaca species were obtained by RT-PCR using the upper and low primers according to the *Fas* gene of human, and then cloned into pGEM-T Easy vector. The positive clones were sequenced. For the first time we cloned the *Fas* genes of *Macaca mulatta*, *Macaca assamensis* and *Macaca arctoides*, the encoding sequences are 1005bp, 996bp and 933bp, respectively. Finally we compared the sequences of *Fas* genes among five primate species that have already been submitted to GenBank. The results confirmed the conservation of regions in two ends of *Fas* genes, and the high variability of a low complexity region in middle of every *Fas* gene.

Key words: gene clone; RT-PCR; *Fas*; sequence analysis

猕猴属动物在生物医学研究领域起着重要的作用。我们在研究猴免疫缺陷综合征(simian acquired immunodeficiency syndrome, SAIDS)发病机制以及细胞凋亡的作用时,采用定量 RT-PCR 检测猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)感染恒河猴后,不同时期的淋巴结与血液中淋巴细胞 *Fas* 基因的表达状况。查询 GenBank 后,获知食蟹猴 *Fas* 基因已被克隆,而分布于中国的六种猕猴属动物:恒河猴、平顶猴、熊猴、短尾猴、藏酋猴、台湾

猴)的 *Fas* 基因还均未被克隆。本实验我们首次克隆了恒河猴、熊猴和短尾猴的 *Fas* 基因,不但通过序列比较验证了 *Fas* 基因的保守区域和可变区域,而且将会促进 *Fas*/*FasL* 多种生理功能的研究。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

恒河猴、熊猴和短尾猴由中国医学科学院实验动物研究所猴繁育场提供。TRIZOL 总 RNA 提取

试剂盒(GIBCO/BRL), SuperScripterII 逆转录酶(GIBCO/BRL), Oligo(dT)16(上海生工生物技术公司), Advantage-HF 2 PCR 试剂盒(Clontech), Wizard PCR Preps DNA 纯化系统(Promega), pGEM-T Easy 载体系统(Promega), JM109 菌株(Promega), 引物由北京奥科生物技术公司合成, 上游引物: tctttcacttcg-gaggattg, 下游引物: caagcagtatttacgccagc。

1.2 基因克隆和序列分析

1.2.1 总 RNA 的提取 取 50mg 恒河猴的腹股沟淋巴结, 按 TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒的操作说明, 匀浆后进行总 RNA 的提取。取熊猴和短尾猴的 5ml 新鲜血液, 用淋巴细胞分离液分离单核细胞^[1], 各加 1ml TRIZOL 试剂提取总 RNA。

1.2.2 逆转录及 PCR 扩增 逆转录(20 μ l 体系)及 PCR 扩增(100 μ l 体系)按 SuperScripterII 逆转录酶的操作说明进行。PCR 在 PE480 扩增仪上进行, 条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 95 $^{\circ}$ C 45s, 61 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.2.3 PCR 产物的纯化与克隆 从低熔点琼脂糖凝胶上切下 PCR 产物的目的条带, 按 Wizard PCR Preps DNA 纯化系统的操作说明进行纯化。纯化回收的片段与 pGEM-T Easy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌^[2], 37 $^{\circ}$ C 培养 16~20h。

1.2.4 阳性克隆的筛选与序列测定 挑取白色单菌落于 3ml 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C, 150r/min 振荡过夜。取 10 μ l 菌液, 90 $^{\circ}$ C 10min 后用 1 μ l 菌液进行 PCR(20 μ l 常规反应体系), 快速筛选阳性克隆^[3]。将每种动物的两个阳性克隆送北京奥科生物技术公司进行测序。

1.2.5 序列分析 利用 BLAST 程序分析 GenBank 已收录的灵长类动物的 *Fas* 基因以及它们编码的蛋白, 包括人、食蟹猴、恒河猴、熊猴和短尾猴。

2 研究结果

2.1 序列测定结果

每种动物的两个阳性克隆的测序结果完全一致, 由于引物部分在扩增过程中可能有碱基的非特异性结合, 我们将去掉引物部分后的 *Fas* 基因序列提交 GenBank, 恒河猴^[4]、熊猴和短尾猴的收录号分别为 AY007572、AF326208、AF332357; 编码序列分别为 1005bp、996bp 和 933bp。已报道的人与食蟹猴的 *Fas* 基因在 GenBank 中的收录号分别为 M67454、AB031420。

2.2 序列的比较结果

对五种灵长类动物 *Fas* 基因的比较表明基因两端的序列高度保守; 基因的中部有一段具高度变异性的低复杂度序列, 猕猴属动物与人以及猕猴属动物之间在碱基的组成和数目方面均有较大的差别。蛋白序列比较更好地验证了如上所述的基因结构特征(图 1)。在保守区域, 它们之间没有出现连续两个氨基酸不同的差异, 氨基酸的数目方面, 人比猕猴属动物仅多一个氨基酸。在中间的低复杂度序列, 它们之间在氨基酸的组成上有较大差别, 几种蛋白大小的区别就决定于这一段序列的长短, 其中短尾猴比其它三种猴少二十几个氨基酸。

3 讨论

SIV 感染的恒河猴是研究 AIDS 的一种理想的动物模型^[5]。*Fas*/*FasL* 系统具有多种生理功能, 与多种免疫性疾病、血液系统疾病以及肿瘤的发生有关。*Fas* 与 *FasL* 结合可以诱导 *Fas* 阳性细胞发生凋亡。克隆恒河猴 *Fas* 基因对 *Fas* 途径诱导凋亡的机制及这条途径对 AIDS 发病机制的研究具有重要的作用。克隆其它猕猴属动物的 *Fas* 基因, 并结合 GenBank 已收录的一些同源序列, 可以分析 *Fas* 基因和蛋白的结构特征, 尤其是功能保守区域。RT-PCR 是克隆 cDNA 片段的常用方法。Advantage-HF 2 是一种高保真的 DNA 聚合酶, 比较两个以上的阳性克隆的测序结果, 能够更进一步确证序列的准确性。本研究根据人 *Fas* 基因的 cDNA 序列, 设计的上游引物从起始密码子上游 30 个碱基处开始, 下游引物从终止密码子下游 83 个碱基处开始, 扩增、克隆得到恒河猴、熊猴和短尾猴 *Fas* 基因完整的编码序列。PCR 方法具有快速、准确的优点, 我们在研究中经常首选此方法进行阳性克隆的筛选。

Fas(CD95、Apo-1) 属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 和神经生长因子受体 (NGFR) 家族, 分布于多种组织细胞的表面, 少量以可溶性形式存在于血浆中。这个家族的成员属于 I 类膜蛋白, 胞外部分具有与相应因子结合的区域, 胞内具有一段传导细胞凋亡信号所必需的“死亡区”。*Fas* 和 TNFR 在介导细胞凋亡时有相似和不同之处^[6]。我们的序列分析结果表明 *Fas* 胞外的 *FasL* 结合区域和胞内“死亡区”均具有高度的保守性, 而中间段的低复杂度序列(约在第 170~200 个氨基酸之间)在不同的物种间具有很高的变异性。

1 MLGTWTLPLVLTSSVRLSSKCVNAQVTDISSKGFELRKIVTTIETQNLEGLHHEGQFCRNPCPPGERKARDCTV
76 NEDEPDCVPCQEGKEYTDKGHFSSKRRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSAVCEHCDPCTKCK
151 HGIIIECTLTSNTKCKEE [shaded] VVIKPKCRKHRKENQGPHESTTLNPETAINLSD
202 VDLSKYITTIAGAMTSLQVKDFVRKNGVSEAKIDEIKNHNVQDTAEQKVQLLRNWWYQLHGKGDACDTLIKGLKTA
277 DLCTLAEKIHAVILKDITSDTENSNGNEIQNLV (短尾猴, *Macaca arctoids*)

1 MLGTWTLPLVLTSSVRLSSKCVNAQVTDVSSKGFELRKIVTTIETQNLEGLHHEGQFCRNPCPPGERKARDCTV
76 NEDEPDCVPCQEGKEYTDKGHLSSKRRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSAVCEHCDPRIKCK
151 HGIIIECTLTSNTKCKEE [shaded] [shaded] IPPIVYVVIKKA CRKHRKENQGPHESTTLNPETAINLSD
223 VDLSKYITTIAGAMTSLQVKDFVRKNGVSEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQPLRNWWYQLHGKGDACDTLIKGLKTA
298 DLCTLAEKIHAVILKDITSDTENSNGNEVQNLV (熊猴, *Macaca assamensis*)

1 MLGIWTLPLVLTSSVRLSSKCVNAQVTDISSKGFELRKIVTTIETQNLEGLHHEGQFCRNPCPPGERKARDCTV
76 NEDEPDCVPCQEGKEYTDKGHFSSKRRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSAVCEHCDPCTKCE
151 HGIIIECTLTSNTKCKEE [shaded] [shaded] IPPIVYVVIKKA CRKHRKENQGPHESTTLNPETAINLSD
223 VDLSKYITTIAGAMTSLQVKDFVRKNGVSEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWWYQLHGKGDACDTLIKGLKTA
298 DLCTLAEKIHAVILKDITSDTENSNGNEIQSLV (食蟹猴, *Macaca fascicularis*)

1 MLGTWTLPLVLTSSVRLSSKCVIAQVTDISSKGFELRKIVTTIETQNLEGLHHEGQFCRNPCPPGERKARDCTV
76 NEDEPDCVPCQEGKEYTDKGHFSSKRRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSAVCEHCDPCTKCK
151 HGIIIECTLTSNTKCKEE [shaded] [shaded] [shaded] CRKHRKENQGPHESTTLNPETAINLSD
226 VDLSKYITTIAGAMTSLQVKDFGRKNGVSEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWWYQPHGKGDACDTLIKGLKTA
301 DLCTLAEKIHAVILKDITSDTENSNGNEIQNLV (恒河猴, *Macaca mulatta*)

1 MLGIWTLPLVLTSSVARLSSKSVNAQVTDINSKGLLELRKTVTTVETQNLEGLHHDGQFCHKPCPPGERKARDCTV
76 NGDEPDCVPCQEGKEYTDKAHFSSKRRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSAVCEHCDPCTKCE
151 HGIIKECTLTSNTKCKEE [shaded] [shaded] [shaded] CRKHRKENQGSHESTTLNPETAIVAINLSD
227 VDLSKYITTIAGVMTSLQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWWYQLHGKKEAYDTLIKDLKKA
302 NLCTLAEKIQTHLKDITSDSENSNGNEISLV (人, *Homo sapiens*)

图 1 5 种灵长类动物 Fas 蛋白的序列比较

有底纹的区域为具高度变异性的低复杂度序列 ;人比猕猴属动物在保守区域内多一个氨基酸 [V]

Fig.1 Sequences comparison of Fas proteins among five primate species

Shading regions were the low complexity sequences with high variability ; there is an excessive [V] in conservation region of human Fas compared with regions of *Macaca* species

参 考 文 献 (References) :

[1] 吴冠芸,方福德,等.基因诊断技术及应用[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1992,176.
[2] Ausual F M ,Brent R ,Kingston R E ,et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. Third Edition ,John Wiley & Sons ,Inc. 1995 ,1 ~ 22.
[3] 李永明,赵玉琪,等.实用分子生物学方法手册[M].北京:科学出版社,1998,72 ~ 73.

[4] 水波,池莉,张永容,等.恒河猴 Fas 基因的克隆[J].中国实验动物学报,2000,(8) 251 ~ 254.
[5] Esparza J. Animal models for the evaluation of drugs and vaccines for HIV infection and AIDS : report of a WHO Working Group [J]. Dev Biol Stand ,1990,72 :367 ~ 372.
[6] Clement M V ,Stamenkovic I. Fas and tumor necrosis factor receptor - mediated cell death :similarities and distinctions[J]. J Exp Med ,1994 ,180(2) 557 ~ 567.