

研究报告

人 MCP cDNA 的克隆、序列分析及同种型的比较*

黄 健¹⁾ 李文鑫²⁾ 苟德明 蒋达和

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 以人胚胎 mRNA 为模板, 采用 RT-PCR 法得到了人补体调节蛋白膜辅蛋白 (MCP) 的一种 cDNA 全基因, 序列分析结果表明, 所获得的 MCP cDNA 为文献报道中 10 种同种型中的一种, 属 MCP-C₂ 型, 该 cDNA 含一编码 369 个氨基酸的阅读框架, 其中的 STP 区含 14 个氨基酸, 由 STP^C 编码, 胞浆尾区含 23 个氨基酸, 为 CYT₂, 未发现东西方人种之间的核苷酸的差异。

关键词 膜辅蛋白, MCP cDNA, 序列分析, 可变剪接的 RNA, 同种型

学科分类号 Q78

当今医学已发展到通过更换病人的某个严重损伤的器官即器官移植而挽救病人的生命, 对于人类间同种器官移植也已相当普遍和成熟, 但有一个严重的问题摆在人们面前, 即可供捐献的器官严重不足^[1]。这迫使人们重视异种器官移植的研究工作。为克服跨物种间器官移植易发生的超急性排斥反应, 可在供体 (比如猪) 的器官上表达受体 (比如人) 的具有同种限制作用的补体调节蛋白, 发挥其同种限制作用, 限制补体在移植器官细胞上的激活, 抑制超急性排斥反应, 这样可使受体不再或减少排斥异种供体器官。

人的补体调节蛋白复杂多样, 至今已发现 17 种, 其中具有明显同种限制作用的有衰变加速因子 DAF (CD55), 膜辅蛋白 MCP (CD46), CR₁ (CD35), C₈bp 及 CD59^[2]。1985 年, Cole 等^[3]发现一种新的与 C₃b 结合的膜蛋白, 其相对分子质量在 SDS-PAGE 上呈异质性, 范围 45 000~70 000, 它具有细胞表面标记和辅助活性等特征, 即 MCP。MCP 的组织分布相当广泛^[4], 存在于除红细胞以外的所有外周血细胞、上皮细胞和内皮细胞表面。它的基因组构成也已确定^[5], 其基因长度至少 43 kb, 含 14 个外显子和 13 个内含子, 基因定位于人的第一号染色体 q31~41 上。

作为一种补体调控蛋白, MCP 具有非常重要的功能, 它不仅以一种内源性的方式下调 C₄b 和 C₃b, 而且还可能和 DAF 协同作用以保护宿主免受补体的攻击。另据 Seya T^[6]等报道, MCP 在人类白血病细胞株上高度表达, 这证明了高水平表达的

MCP 可使其逃脱补体的攻击, 如果使肿瘤细胞分化, MCP 表达下降, 就可使肿瘤细胞减少对补体攻击的抵抗力。由此可见 MCP 具有极其重要的功能, 本研究以来源于国内的人胚胎为材料, 获得了中国人的 MCP cDNA 全基因, 并将其基因序列与国外报道的基因进行了比较。这些前期工作为我国转 MCP 基因猪等研究的开展, 为异种器官移植的最终实现奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料, 菌株, 载体, 引物及试剂

所选用的人胚胎组织是由湖北省妇幼保健院提供。所用菌株 *E. coli* DH5α 由本实验室保存。pGEM-T 载体试剂盒和银染测序试剂盒为 Promega 公司产品, 逆转录酶是由 Gibco 公司生产的 Superscript RT。Taq 酶由加拿大 Biostar 公司生产。其余工具酶与试剂均为华美公司产品。

引物 P₁ (5'-CATATGACAGCGTCTTCCGC-3'), P₂ (5'-CAGCTGCATTCTGAGAGTG-3'), 其中含 *Pvu* II 位点, 由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 RT-PCR 法合成 MCP cDNA

用异硫氰酸胍法提取胚胎总 RNA, 并用自制的 Oligo-dT 纤维素柱分离 mRNA, 在

* 湖北省 95 重点科技攻关计划项目资助课题 (96192004)

¹⁾ 黄健, 女, 29 岁, 博士研究生。

²⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1998-03-02, 修回日期: 1998-06-22

Oligo-dT_{12~18}的引导下逆转录合成总 mRNA 的第一链 cDNA 后, 再经 PCR 扩增 MCP cDNA. 热循环条件为: 94 ℃变性 45 s, 56 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 90 s.

1.3 MCP cDNA 的克隆与亚克隆

按图 1 的程序进行 MCP cDNA 的克隆与亚克隆, 按文献 [8] 操作筛选和鉴定阳性克隆. RT-PCR 产物与试剂盒中的 T-载体连接, 得重组克隆 pGEMMCP. 再利用 MCP 基因本身带有的二个 *Bam*H I 位点, 可得到亚克隆 pBSMCP2.

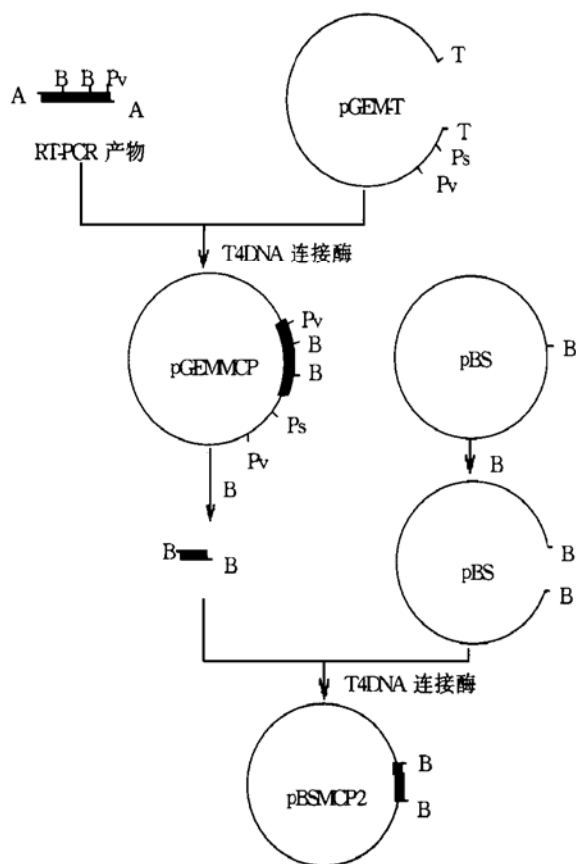


图 1 人 MCP cDNA 克隆及亚克隆示意图

Pv: *Pvu* II 酶切位点; Ps: *Pst* I 酶切位点; B: *Bam*H I 酶切位点; A, T 分别为核苷酸碱基.

1.4 MCP cDNA 的核苷酸序列测定

直接按试剂盒说明进行序列测定, 分别以 pGEM MCP 及 pBSMCP2 为模板. 其中模板经过 5 次酚-氯仿抽提后, 溶于去离子水中, 使其终浓度为 1 g/L.

2 结 果

2.1 cDNA 的合成及 MCP cDNA 的扩增

以 Oligo (dT)_{12~18} 为引物, 人胚胎总 mRNA

为模板反转录合成的 cDNA 第一链后经 PCR 扩增得到 1 233 bp 的片段, 其电泳结果见图 2.

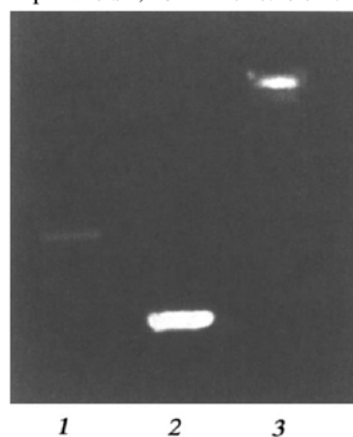


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

1: RT-PCR 产物 MCP cDNA (1 233 bp); 2: RT-PCR 产物 CD59 cDNA (420 bp); 3: λ DNA/*Hind* III 分子质量标准.

2.2 MCP cDNA 的克隆及酶切分析

挑选得到的重组克隆进行限制性酶切分析 (图 3). 分别用 *Pvu* II、*Pvu* II/*Pst* I、*Bam*H I、*Sal* I 等酶切, 结果表明除 *Sal* I 酶未能切动质粒外, 其他酶均切出与预期大小相符的条带, 初步确定所克隆的基因为人 MCP 基因, 命名该质粒为 pGEM MCP.

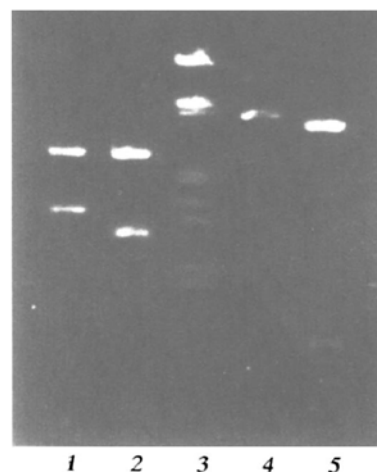


图 3 重组质粒 pGEM MCP 的酶切鉴定

1: pGEM MCP/*Pvu* II; 2: pGEM MCP/*Pvu* II 和 *Pst* I; 3: λ DNA/*Hind* III+ *Eco*R I 分子质量标准; 4: pGEM MCP/*Sal* I; 5: pGEM MCP/*Bam*H I.

2.3 pGEM MCP cDNA 的序列分析

为准确测定 pGEM MCP cDNA 的全基因序列, 对重组克隆进行了亚克隆. 序列分析结果表明, 我们所克隆的 MCP cDNA 为文献报道中 10 种同种型中的一种, 其阅读框架共编码 369 个氨基酸, 与早期报道的 MCP 序列^[7]相比, 缺失了从第 883 位到

第 927 位的共 45 个碱基, 从而导致了 15 个氨基酸的缺失, 缺失的序列即为 STP^B 区, 其中包含有一个 *Sal* I 位点. 因此它的 STP 区含 14 个氨基酸, 由 STP^C 区编码, 胞浆尾区含 23 个氨基酸, 为第 2 种胞浆尾. (详见讨论部分)

3 讨 论

在补体激活调节剂大家系中, MCP 具有极其独特的性质, 它在 SDS-PAGE 上具有较宽的带型与较大的分子质量变异, 最早曾被命名为 gp 45/70. 现已发现 MCP 蛋白质表型的多态性是由于基因的可变剪接导致 cDNA 结构的差异引起的^[9].

MCP 的分子结构目前已知有所悉 (图 4): a. 从 NH₂ 端计起除了 34 个氨基酸的信号肽 (SP) 外; b. 4 个连续的 60 个左右氨基酸的短同源重复

同种型

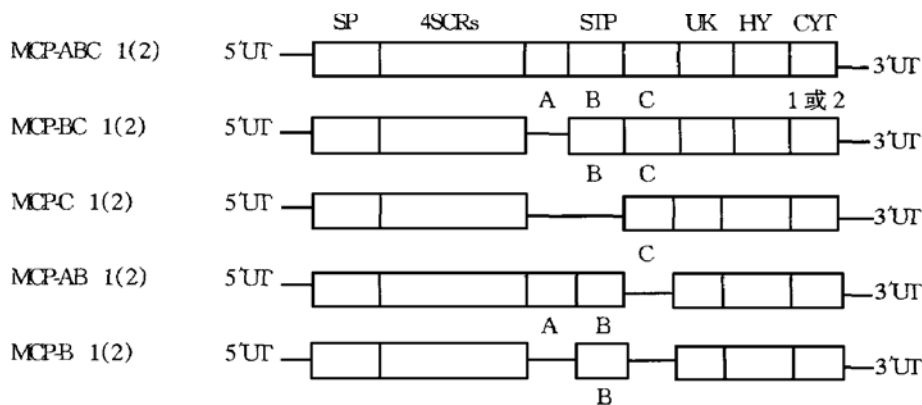


图 4 MCP 的 10 种 cDNA 同种型分析及比较

SP: 信号肽; SCR_s: 短同源重复; STP: 富含丝/苏/脯氨酸区域; UK: 意义不明区域; HY: 疏水跨膜多肽锚; CYT: 胞浆尾; A, B, C 代表 STP 各成分; 1 或 2 代表二种胞浆尾.

基因组分析证实, 如图 4 所示, 在 STP 区含有 3 个大小相似的外显子, 分别称作 STP^A、STP^B、STP^C, 分别编码 15、15、14 个氨基酸, 在研究的克隆文库中, 针对 STP 区有 5 种表型: STP^{ABC}, STP^{BC}, STP^C, STP^{AB}, STP^B, 再加上二种胞浆尾 (CYT₁ 和 CYT₂), 所以共可表达 10 种同种型. 其中 STP^{BC} 和 STP^C 这二种类型最常见, 而其他类型相对较稀少, 或者表达于其他细胞系, 或呈组织特异性表达. 高分子质量表型 (电泳中的上带) 与含 STP^{BC} 者相关, 低分子质量表型 (电泳中的下带) 则与含 STP^C 者相关. 由此看来, 不同 MCP 蛋白的异常表达是由富含 STP 区外显子的不同剪切, 造成翻译后修饰的差异而引起的. 如具有 STP^{ABC} 表型者产生相对分子质量为 65 000~75 000 的蛋白

序列 (SCR_s), 共 251 个氨基酸; c. 接着是一长度可变的丝/苏/脯富含区 (STP), 含 14~44 个氨基酸不等, 亦即含丝/苏/脯氨基酸不等. 而丝/苏氨酸的 OH 基可加上糖, 即 O—糖基化, 正是这一区域 O—糖基化的数目决定着 MCP 的分子质量, 决定着 MCP 的电泳型别, O—糖基化的数目越多, MCP 的分子质量越大; d. 以下有一由 13 个氨基酸组成的功能不明的短肽 (UK); e. 跨膜段 (HY) 是由碱性氨基酸组成的疏水多肽锚, 含 34 个氨基酸; f. 最后是胞浆尾 (CYT), MCP 的胞浆尾有二条, 一条是由 16 个氨基酸组成, 一条由 23 个氨基酸组成, 这二条胞浆尾只有一个表达使用. 正是 STP 区与胞浆尾的组成不同, 才存在着不同长度的 MCP cDNA, 才会出现蛋白质的异质性.

质, 具 STP^{BC} 者为 55 000~65 000, 具 STP^C 者为 45 000~55 000. 而 CYT₁ 或 CYT₂ 不影响成熟蛋白的相对分子质量.

STP^B 所含的 45 个碱基中包含有一个 *Sal* I 位点, 如果 STP^B 缺失, 就不能为 *Sal* I 所切割, 根据我们的酶切分析及序列分析结果, 我们所克隆的 MCP cDNA 为具有 STP^C 和 CYT₂ 的 MCP-C₂.

作为补体介导的溶细胞反应的同种限制作用调节因子, 除了 MCP 外, 还有 DAF, CD59 等, 为研究这些因子的协同作用, 我们同时也得到 CD59 的 cDNA 并进行了序列分析 (结果未显示). 无论是 MCP 或 CD59 在核苷酸序列和氨基酸序列上我们均未发现有东西方人种的差异, 这正说明这类基因非常保守, 功能非常重要.

目前, 我们已将 MCP 克隆到大肠杆菌表达载体和真核表达载体上, 准备在大肠杆菌, 真核细胞及动物上分别进行表达研究。

参 考 文 献

- 1 Platt J L, Logan J S. Use of transgenic animals in xenotransplantation. *Transplantation Reviews*, 1996, **10** (2): 69~77
- 2 Christopher H H, Karen L S, Hidechika O, *et al.* Complement regulatory proteins at the feto-maternal interface during human placental development; distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *Eur J Immunol*, 1992, **22** (6): 1579~1585
- 3 Cole J L, Housley G A, Jr Dykman T R, *et al.* Identification of an additional class of C₃-binding membrane protein of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (3): 859~863
- 4 Ayako K, Kazunori I, Tsukasa S, *et al.* Membrane cofactor protein (CD46) protects cells predominantly from alternative complement pathway-mediated C₃-fragment deposition and cytolysis. *J Immunol*, 1993, **151** (3): 1519~1527
- 5 Theodore W P, Liszewski M K, Adams E M, *et al.* Membrane cofactor protein of the complement system: Alternative splicing of Serine/Threonine/Proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med*, 1991, **174** (1): 93~102
- 6 Seya T, Hara T, Matsumoto M, *et al.* Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement: High expression of MCP on human Leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation. *J Immunol*, 1990, **145** (1): 238~245
- 7 Douglas M L, Liszewski M K, Post T W, *et al.* Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP), evidence for inclusion in the multigene family of complement regulatory proteins. *J Exp Med*, 1988, **168** (1): 181~194
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~23
- 9 Russell S M, Sparrow R L, McKenzie I F C, *et al.* Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD 46 is controlled by alternative splicing. *Eur J Immunol*, 1992, **22** (6): 1513~1518

Cloning, Sequencing of Human Membrane Cofactor Protein (MCP) and Comparison with Other Isoforms. HUANG Jian, LI Wen-Xin, GOU De-Ming, JIANG Da-He (*College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract MCP is an important membrane protein for protecting host cells from damage by complement because of its wide tissue distribution and cofactor activity. A human MCP cDNA containing full encoding region was obtained by RT-PCR from Chinese human embryo. The target gene was cloned and sequenced. The data indicated that there are forty-five bases deletion compared with the counterparts previously reported, which leads to the deletion of fifteen amino acid residues. The PCR product including 369aa open reading frame was one of the ten isoforms which had been reported before and it was named MCP-C₂.

Key words MCP cDNA, RT-PCR, DNA sequencing, alternative splicing, isoforms

皮层 SI 区伤害感受神经元膜电生理特性研究*

张日辉 滕国玺

(中国医科大学脑研究所, 沈阳 110001)

摘要 用细胞内记录技术, 在 16 只成年健康猫, 研究了皮层第一躯体感觉区 (primary somatosensory cortex area, SI 区) 伤害感受神经元的电生理特性。SI 区伤害感受神经元自发电频率差异大, 放电形式多样。极化电流绝对值 ≤ 1.0 nA 时, 伤害感受神经元 $I-V$ 极相关 ($r = 0.96$), 整流作用不明显; 极化电流绝对值 > 1.0 nA 时, 在两个方向上发生整流, $I-V$ (电流-电压) 曲线表现为“S”型, 其中伤害感受神经元整流作用较非伤害感受神经元明显。伤害感受神经元 R_m 、 τ 、 C_m 明显大于非伤害感受神经元 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果提示 SI 区伤害感受神经元与非伤害感受神经元可能在细胞膜结构、细胞大小等方面存在有意义的差别, 从而反映其不同的生理功能。此电学参数特点也可作为痛觉的特异性学说提供实验资料。

关键词 皮层体感区, 伤害感受性神经元, 细胞内记录, 细胞膜参数

学科分类号 Q424

* 国家自然科学基金资助项目 (39170294)。 收稿日期: 1998-04-07, 修回日期: 1998-10-09