

CD147 基因在家兔肠道的克隆与结构预测

贾海丽, 韩立强, 杨国宇, 钟 凯, 郭豫杰, 台玉磊, 刘 涛, 李 平, 王艳玲

(河南农业大学 动物生理生化实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 基于电子延伸序列, 克隆并分析兔 CD147 基因。采用兔十二指肠黏膜组织提取总 RNA, 进行 RT-PCR 反应, 测序并进行结构预测。克隆的兔 CD147 基因包含一个完整的开放阅读框架, 全长为 810 bp, 编码由 270 个氨基酸残基组成的 CD147 前体蛋白, 推导的氨基酸序列信号肽为 1~16 个氨基酸。氨基酸序列与牛、人、褐鼠、野猪的同源性分别为 62.5%, 65.9%, 59.5% 和 66.3%, 三级结构预测表明 CD147 具有 2 个免疫球蛋白类似区。试验成功克隆了兔 CD147 基因, 注册到 GenBank (Accession: EU650668), 并预测其三级结构, 为进一步研究其生物学功能奠定基础。

关键词: 兔; CD147; 克隆; 序列分析; 结构预测

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)01-0093-04

Molecular Cloning and Sequence Analysis of *Oryctolagus cuniculus* CD147

JIA Hai-li, HAN Li-qiang, YANG Guo-yu, ZHONG Kai, GUO Yur-jie,

TAI Yu-lei, LIU Tao, LI Ping, WANG Yan-ling

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A pair of cloning primers were designed based on the in silico sequence information and were used to clone and analysis the *Oryctolagus cuniculus* CD147. Total RNA was extracted from the duode num mucosal tissue of *Oryctolagus cuniculus* and mRNA sequence was amplified by RT-PCR. The positive clone was identified and sequenced. The openreading frame of *Oryctolagus cuniculus* CD147 consists of 810 bp and encodes 270 amino acids. The signal peptide of deduced protein sequence includes 1-16 amino acids. The predicted peptide shared 62.5%, 65.9%, 59.5% and 66.3% homology with those of *Oryctolagus cuniculus*, *Bostaurus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* and *Sus scrofa*. The tertiary structure prediction presented that CD147 contains two extracellular Ig-like domains. The *Oryctolagus cuniculus* CD147 gene has been submitted to GenBank (Accession EU650668).

Key words: *Oryctolagus cuniculus*; CD147; Molecular cloning; Sequence analysis; Structure prediction

CD147 是一种新发现的细胞表面黏附因子, 又称为是细胞外基质金属蛋白酶诱导物 (EMMPRN), 是免疫球蛋白超家族 (IgSF) 的一个成员, Biswas 等首次发现时将其命名为肿瘤细胞介导的胶原酶激活因子 (Tumor cell collagenase stimulatoty factor, TCSF)。作为一种跨膜蛋白, CD147 广泛表达于上皮细胞、内皮细胞, 参与许多生理和病理过程, 与肿瘤细胞的表达、精子发育、神经系统功能调节等密切相关^[1], 特别是在肠道疾病中, CD147 促进上皮细胞和基质细胞产生大量的基质降解酶, 这些基质降解酶在肠道炎症和癌症中起重要作用。作为一种跨膜糖蛋白,

CD147 是通过受体/配体的结合发挥作用, 但由于 CD147 分子的 3D 结构信息还没有获得, 因此与其相互作用的分子还没有完全明确^[2]。本试验通过 RT-PCR 技术克隆了家兔肠道黏膜组织的 CD147 基因, 并对其蛋白质的结构进行预测, 以期发现其配体蛋白和为深入研究其生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集

取 60 d 家兔十二指肠黏膜组织, 入液氮速冻, 置 -80℃ 保存。

收稿日期: 2008-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671531)

作者简介: 贾海丽 (1983-), 女, 河南周口人, 在读硕士, 主要从事泌乳生物学研究工作。

通讯作者: 王艳玲 (1962-), 女, 河南内黄人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生理学研究工作。

1.2 质粒、菌株和试剂

AMV 反转录酶、RNase-Inhibitor、Oligo (dT)、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker、pMD19-T 载体、Takara Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、*E. coli* JM109 感受态细胞等(大连宝生物工程有限公司),动物组织 RNAout(天泽基因工程有限公司)。

1.3 基因克隆

1.3.1 克隆引物设计 利用人 *CD147* 基因序列 (BC009040) 对兔 ESTs 库进行搜索,获得 10 个 ESTs,根据 ESTs 的拼接序列在 5'-UTR 和 3'-UTR 设计 1 对克隆引物,P1:5'-CATGCGCGCTGTGCTGTTCG-3',P2:5'-GCTCAGCTGGCGTTCCTCTGT-3',预期片段 810 bp,引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3.2 总 RNA 的提取 取 0.1 g 家兔十二指肠黏膜组织,采用家兔十二指肠组织 RNAout 提取总 RNA,溶解于 20 μ L 无 RNA 酶水中备用。

1.3.3 RT-PCR 扩增 RT 体系:无 RNA 酶水 6.5 μ L,dNTP-Mix (2.5 mmol/L) 4 μ L,5 \times AMV Buffer 4 μ L,oligo (dT) (50 pmol/L) 1 μ L,AMV (5 U/ μ L) 2 μ L,Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L,Total RNA 2 μ L。反应程序:42 60 min,72 15 min,后冰浴 2 min,得到 cDNA。PCR 扩增体系:ddH₂O (双蒸水) 15.3 μ L,10 \times Buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L,dNTP Mix (2.5 mmol/L) 3 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 1.8 μ L,P1,P2 (20 pmol/L) 各 0.5 μ L,cDNA 1 μ L,*Taq* (5 U/ μ L) 0.4 μ L,总体积 25 μ L。反应程序:95 预变性 5 min;95 变性 40 s,61 退火 40 s,72 延伸 45 s,共 35 个循环;最后 72 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,按照 Takara Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 说明进行纯化。

1.3.4 克隆与测序 按参考文献[3]的方法,将 PCR 扩增产物纯化后,与 pMD19-T 载体连接,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,进行蓝白斑筛选,进行菌落 PCR 鉴定,挑选 4 管阳性菌液送大连宝生物工程有限公司测序。

1.4 结构预测

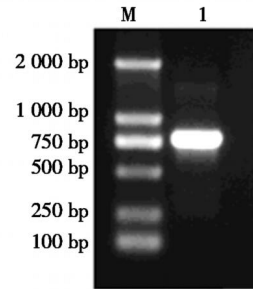
利用 DNASTar 软件进行序列分析。采用 ExPASy 网站的 ProtParam 和 SignalP 程序预测蛋白质的理化性质和信号肽,smart 预测跨膜区,motifscan 找出潜在功能区,swiss-model 进行结构预测^[4]。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增及克隆

RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,得到了长度为 810 bp 的目的片段(图 1)。阳性菌落 PCR

鉴定得到同样大小的目的片段(图 2)。

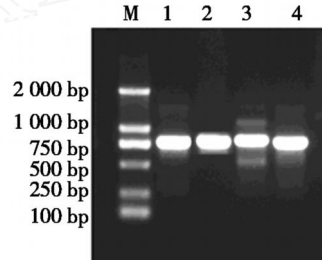


M. DL2000 DNA Marker;1. PCR 产物。

M. DL2000 DNA Marker;1. PCR products.

图 1 RT-PCR 扩增电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis analysis of RT-PCR products



M. DL2000 DNA Marker;1~4. 阳性菌落 PCR 产物。

M. DL2000 DNA Marker;1-4. PCR products of positive clone.

图 2 阳性菌落 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis analysis of PCR products of positive clone

2.2 CD147 的结构预测

对 CD147 氨基酸序列进行结构预测,结果如图 3、图 4 所示。CD147 结构上存在 IG 结构类似功能区,预测在 126 和 185 位的半胱氨酸(cys)形成二硫键,进行高级结构的同源建模后发现,其第一个 IG 区为 26~102 氨基酸,第二个 IG 区为 111~203 氨基酸,胞浆区为 141~231 和 246~270 共 40 个氨基酸,跨膜区为 207~229 共 23 个氨基酸。



图 3 功能区预测

Fig. 3 Domain prediction

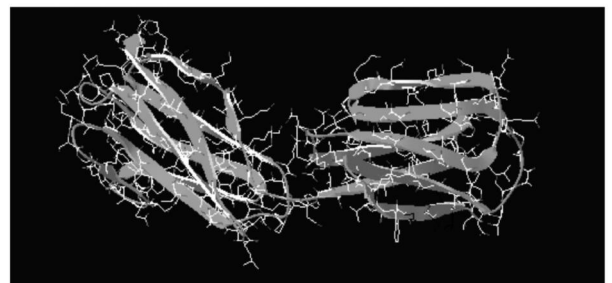


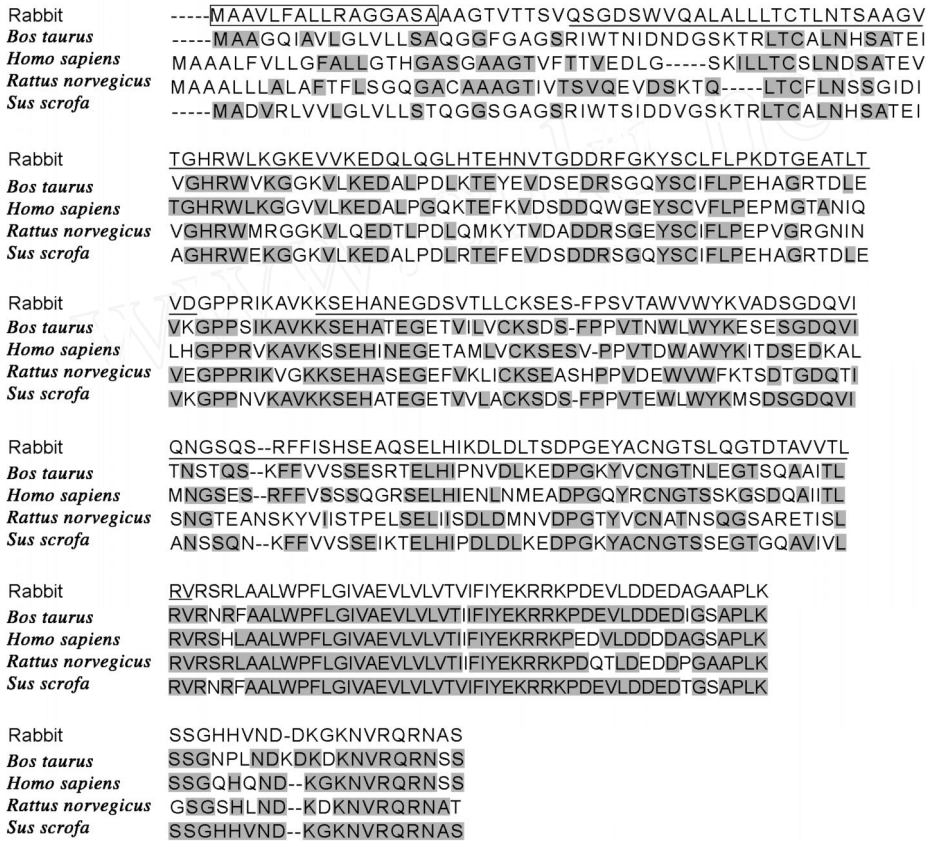
图 4 CD147 结构预测图

Fig. 4 CD147 structure prediction picture

2.3 兔 *CD147* 基因序列分析及与其他动物的比较

将测得的序列提交 GenBank 收录 (EU650668), 对序列初步分析表明兔 *CD147* 基因包含 1 个完整的开放阅读框架, 长为 810 bp, 编码 270 个氨基酸, 其中酸性氨基酸为 51 个, 碱性氨基酸为 36 个, 等电点为 6.31, 蛋白质分子量为 29.05 kDa。将兔 *CD147*

基因与牛 (*Bos taurus* NM-001075371), 人 (*Homo sapiens* BC009040), 鼠 (*Rattus norvegicus* NM-012783) 和猪 (*Sus scrofa* AK232981) 的该基因氨基酸序列进行同源性分析, 与牛、人、鼠、猪的氨基酸序列同源性分别为 62.5%, 65.9%, 59.5% 和 66.3%, 相似性 (positives) 分别为 51.6%, 45.3%, 57.7% 和 46.6% (图 5)。



信号肽序列用方框表示;IG 区序列用下划线表示。

The putative signal peptide sequence is indicated by open box;IG domain are underlined.

图 5 兔 *CD147* 氨基酸序列与牛、人、褐鼠、野猪的氨基酸序列比较

Fig. 5 The comparison of *CD147* amino acid sequences between *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* and *Sus scrofa*

3 讨论

随着近年来 ESTs 库更新速度的加快, 采用电子延伸结合 RT-PCR 技术已成为一种对不同物种新基因进行同源克隆的简便、快速方法。本试验利用与其同源性较高的人类 *CD147* 基因序列对兔 ESTs 库进行搜索, 对获得的 ESTs 进行序列拼接, 根据拼接序列, 在 5 非翻译区和 3 非翻译区设计一对克隆引物, 克隆了包含 ORF 的兔 *CD147* 基因。

CD147 是相对分子质量为 5~6 kDa 的跨膜糖蛋白, 为免疫球蛋白超家族 (IgSF) 成员, 也是一种细胞迁移、分化和炎症性过程的膜结合调节基因, 定位于上皮细胞质膜的基底外侧部, 广泛表达于多种细胞, 尤其高表达于转移肿瘤细胞^[5]。目前, 这种跨膜

蛋白已经从不同物种独立克隆出来, 根据 *CD147* 来源的不同, 对其命名也有所不同, 在人体内被称为 EMMPRIN/M6, 在小鼠中被称为 basigin 或 gp42; 在大鼠中被称为 OX47Ps; 在鸡中被称为 HT7 或 neurotherlin^[7]。

将 *CD147* 氨基酸序列与牛、人、野猪的氨基酸序列分析发现, 四者的结构特征一致, 具有相似的跨膜区和 IG 结构类似区。国外研究发现, 这种跨膜蛋白带有 2 个细胞外 IG 区、一个跨膜区和一个含有 40 个氨基酸的胞浆区^[6], 这一点与本试验结果相一致, 细胞外第一个 IG 区具有激活 MMP 的诱导作用, 可用于结构域删除和抗体阻断的研究; 第二个 IG 区具有结合小窝蛋白 I 的活性, 小窝蛋白 I 是 *CD147* 自联作用和 MMP 诱导活性的一个负调节蛋白^[7]。本

试验通过结构预测证实 CD147 存在 2 个 IG 结构类似区,这些结构域可能对 CD147 发挥功能起到关键作用。

目前,国内对 CD147 的研究尚处于起步阶段,多关注其功能。CD147 作为一种膜结合调节蛋白,必须与配体蛋白结合才能发挥其功能,因此,通过结构预测,对深入研究其与配体蛋白的相互作用机制和信号传递具有重要意义。

参考文献:

- [1] 黄灵芝,王字玲. *CD147* 的研究进展[J]. 生物技术通讯,2007,18(3):472 - 475.
- [2] 蒋建利,唐 娟. *CD147* 相互作用蛋白及其细胞生物学功能[J]. 生理学报,2007,59(4):517 - 523.
- [3] 孙建和,陆 苹,蒋 静. 鸡白介素-6(ChIL-6) 基因的克隆与序列分析[J]. 华中农业大学学报,2003,22(1):1 - 3.
- [4] Peitsch M C,Jongeneel V. A 3-dimensional model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors[J]. *Int Immunol*,1993,5:233 - 238.
- [5] Biswas C,Zhang Y,DeCastm R, *et al*. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily[J]. *Cancer Res*,1995,55:434.
- [6] Wei Tang,Martin E Hemler. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and *CD147*/EMMPRN cell surface clustering[J]. *J Biol Chem*,2004,279(12):11112 - 11118.
- [7] Alexander Schreiner,Mika Ruonala,Viktor Jakob, *et al*. Junction protein shrew-1 influences junction protein shrew-1 influences cell invasion and interacts with invasion-promoting protein *CD147* [J]. *MBC*,2007,18(4):1278 - 1281.