

## 人尿激酶原cDNA片段克隆及鉴定

李秀珍 唐红娣 关雪妮

李凤知 胡宝成 方继明

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

尿激酶(UK)是一种在人肾合成并由人尿释放的一种纤溶酶原激活剂,可用于治疗血栓病。现已发现有四种不同分子形式的尿激酶<sup>[1,2]</sup>。有关尿激酶原cDNA的克隆及表达已有文献报道<sup>[3,4]</sup>。本文报道经反转录途径获得一个含人尿激酶原cDNA片段的克隆,并进行了酶切及核苷酸序列分析鉴定。

### 材料和 方法

#### (一)材料

Detroit562细胞购自ATCC(No. CCL138); pHUK-8质粒由意大利Blasi教授赠送<sup>[5,6]</sup>; AMV反转录酶、RNaseH、多聚酶I及末端转移酶为西德Boehringer Mannheim公司产品; 限制酶为华美生物工程公司及中国医科院友谊公司产品; 肉豆蔻酯(PMA)为Sigma公司产品。

#### (二)方法

1. Poly(A)<sup>+</sup>RNA的分离:将Detroit562细胞用含10%小牛血清的DMEM培养基培养成单层。换以无血清培养基37℃维持过夜,加入10μg/ml放线菌酮37℃维持30min,再加入终浓度为80n·mol/L的PMA,37℃维持3-4h。弃上清,用0.2%胰酶消化细胞壁,用10mmol/L PBS, pH7.4洗细胞两次,离心收集细胞沉淀。用酸性硫氰胍酚氯仿法(AGPC法)<sup>[7]</sup>提取细胞总RNA,再通过Oligo(dT)-纤维素柱层析分离Poly(A)<sup>+</sup>RNA。经酸性尿素琼脂糖电泳<sup>[8]</sup>、RNA·DNA点杂交、乙二醛和二甲基亚砷变性后电泳<sup>[9]</sup>,并经过Northern转移与<sup>32</sup>P标记的pHUK-8-Pst I DNA片段探针杂交鉴定RNA样品。

2. cDNA合成:参照Gubler和Hoffman的方法<sup>[10]</sup>进行。

3. cDNA克隆:将双链cDNA以多聚(dC)谱尾,将pBR322以Pst I切割,然后以多聚(dG)谱尾,将含有多聚(dC)尾序的双链cDNA与含有多聚(dG)尾序的pBR322退火,退火条件为100mmol/L NaCl,10mmol/L Tris-HCl pH7.8,0.1mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA,0.5-1μg/ml等克分子dG尾序载体和dC尾序双链cDNA,65℃ 5min,57℃ 1-2h,转化RRI受体菌。

4. 阳性重组子的筛选和鉴定:上述转化子首先经Tc抗性平板和Ap抗性平板确定为Tc<sup>r</sup> Ap<sup>r</sup>的重组子,转移到硝酸纤维素滤膜上,用<sup>32</sup>P标记的pHUK-8-Pst I DNA片段探针进行杂交,筛选含Pro-UK基因的重组子。DNA探针<sup>32</sup>P标记方法采用随机引物方法<sup>[11]</sup>。DNA Southern转移按文献<sup>[9]</sup>进行。DNA序列分析方法采用双脱氧终止法<sup>[12]</sup>。

5. 杂交方法:将点菌或点RNA或经Northern转移和Southern转移的硝酸纤维素滤膜,经处理后,在80℃烤干2h,于预杂交液中(5×SSC,50%甲酰胺,5×Denhart's溶液,50mmol/L pH6.5的磷酸钠缓冲液,变性蛙鱼精DNA约100μg/ml)42℃预杂交6-12h,然后转入杂交液(同预杂交液,只将Denhart's溶液缩小5倍、磷酸钠改为20mmol/L、并加入10<sup>6</sup>cpm/ml加热变性的DNA探针),42℃杂交过夜,用2×SSC-0.1% SDS室温漂洗3次,每

本文于1989年5月31日收到。

本工作得到石成华教授的帮助特此致谢。

本文为“863”基金资助项目的一部分工作。

次 5 min, 65℃ 漂洗两次, 每次 20min, 最后以蒸馏水洗去 SDS 泡沫, 室温晾干, -20℃ 放射自显影12—36h。

### 结 果

#### (一)PMA对提高Detroit562 细胞 UKmRNA 含量的诱导作用

为了提高 Detroit562 细胞的 UKmRNA 含量, 参照文献<sup>[6]</sup>我们采用PMA和放线菌酮对 Detroit562 细胞进行诱导, 由杂交点的强弱判断诱导结果, 结果表明40—160nmol/L的PMA 诱导效果明显, 经诱导后 UKmRNA 含量至少提高 8 倍(图 1)。在PMA诱导前加入 10μg/ml 放线菌酮37℃ 处理 30min 较单用 PMA 诱导效果更佳。

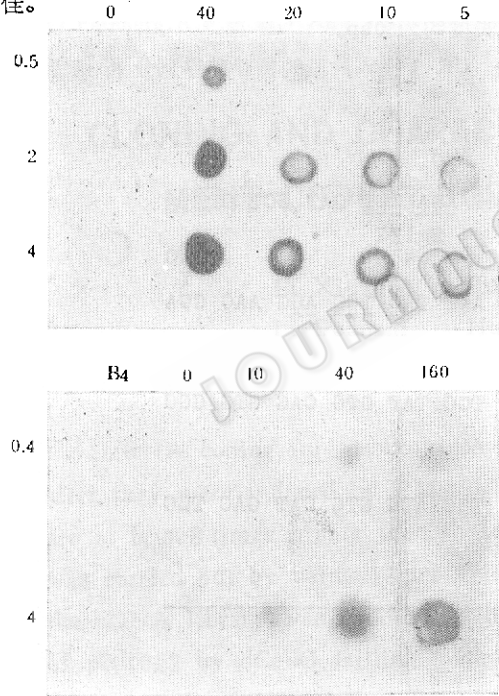


图 1 不同浓度的PMA对 Detroit562 细胞 UKmRNA 水平的点杂交分析  
每张照片上方的数字表示 PMA 浓度(n mol/L); 左边的数字表示点于硝酸纤维素滤膜上的细胞总 RNA量(μg)。B<sub>4</sub> 是Bowes 细胞(产生t-PA)的总 RNA

将大量Detroit562细胞, 按“材料和方法”中所述方法经10μg/ml放线菌酮和80nmol/L PMA 诱导后提取总 RNA, 再分离 Poly(A)<sup>+</sup>RNA, 可得200—300μg Poly(A)<sup>+</sup>RNA。取 RNA 样品

与<sup>32</sup>P标记的pHUK-8-Pst I DNA片段探针进行点杂交, 结果表明Poly(A)<sup>+</sup>RNA 样品中含较丰富的UKmRNA(图2); 将RNA 样品经乙二醛和二甲亚砜变性后电泳并进行 Northern 转移, 再与<sup>32</sup>P 标记的 pHUK-8-Pst I DNA 片段探针杂交, 表明在 18S-28S 之间有杂交区, 相当于21S 位置有一明显的UK mRNA 杂交带(图版 I-3); RNA 样品酸性尿素琼脂糖电泳表明所制备的 RNA 样品无明显降解(图版 I-2)。

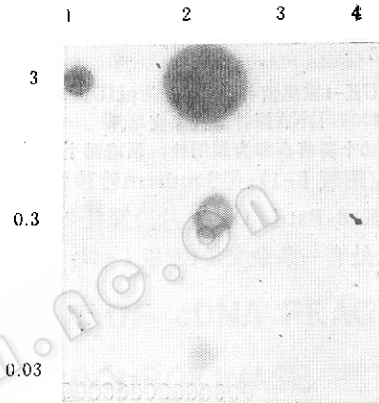


图 2 PMA诱导的Detroit562细胞Poly(A)<sup>+</sup>RNA 与<sup>32</sup>P标记pHUK-8-Pst I DNA探针点杂交结果  
1. 总RNA 2. Poly(A)<sup>+</sup>RNA 3. 总RNA过 Oligo(dT)-纤维素柱流出液 4. Bowes 细胞总 RNA。左边数字表示 RNA 点样量(μg)

#### (二)cDNA 库的建立和阳性克隆的筛选

将上述制备的Poly(A)<sup>+</sup>RNA 用人工合成的 18 聚寡核苷酸做引物反转录合成cDNA, 这段寡核苷酸序列与Holmes的UK cDNA的3' 端非翻译区距离终止密码 60—77 位核苷酸序列(即1431—1449 位)互补。所得的cDNA经dC 接尾与含多聚 dG 尾序的Pst I-cut pBR322 的载体退火重组, 转化RRI受体菌, 获得671个Tc<sup>r</sup>Ap<sup>s</sup> 的重组子, <sup>32</sup>P标记pHUK-8-Pst I DNA 片段探针原位杂交筛选, 得到一个阳性重组子 UK-1, 并对它进行了鉴定。

#### (三)UK-1重组子的鉴定

将初步筛选为阳性的 UK-1 重组菌, 经斜面繁殖后再点种Tc抗性平板, 再次进行原位杂交, 结果所点种的10 菌落全部为强阳性(图3)。

从UK-1阳性重组菌提取质粒, 用 Pst I 消化后, 以1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 其插入片段约

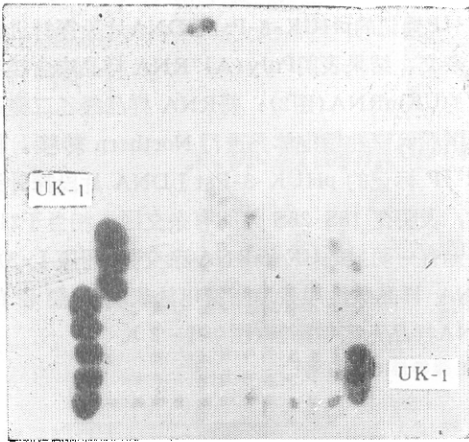


图 3 UK-1重组菌与<sup>32</sup>P标记的pHUK-8-Pst I DNA探针原位杂交结果

点种的10个菌落全部为强阳性，顶端两个为对照菌为360bp(图版 I - 1)；经Southern转移后与<sup>32</sup>P标记 pHUK-8-Pst I DNA 片段探针杂交在相当于360bp处有一条杂交带(图版 I - 4)；从琼脂糖

凝胶上回收此插入片段，取样点于硝酸纤维素滤膜上与上述<sup>32</sup>P 标记探针进行点杂交，In gDNA 样品即出现强的阳性杂交点。

将约260bp插入片段克隆到M13mp18上，进行核苷酸序列分析，首先发现3'端有 17 对多聚 dG·dC 尾序，而5'端无这种尾序，由此可见 UK-1重组质粒中的插入片段包含一个 Pst I 切点，用 Pst I 消化 UK-1 重组质粒时，将插入片段切割成两个片段，从琼脂糖凝胶上回收的 360bp 片段为较大片段，还有一个小片段在琼脂糖凝胶上看不到。将 UK-1 重组质粒经 Pst I 消化后以 8 % 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，发现除约360bp较大片段外，还有一个小的DNA片段，其迁移位置与 69bp 的标准分子量带相当(图版 I - 5)，除去17对dC-dG 尾序，小片段DNA 的长度约为50bp。

UK-1 插入片段的核苷酸序列分析结果见

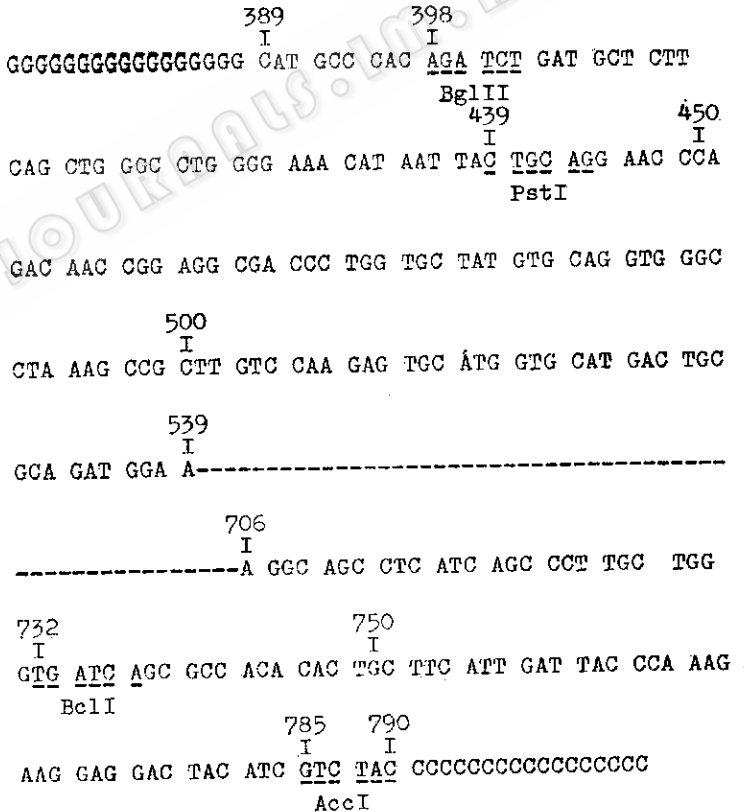


图 4 UK-1插入片段的核苷酸序列

图中数字表示相应于Holmes的UKcDNA序列的核苷酸顺序，线下示出 4 个不同酶切位点。

图4。除17对dC-dG尾序外, UK-1重组质粒中插入的 UKcDNA 编码序列为 402bp, 相应于 Holmes, W. E. [3]的UKcDNA序列的第389—

790位。在398位处有一个 Bgl I 切点,而在785处有一个 Acc I 切点,用 Bgl I 和 Acc I 可以切出392bp的Bgl I -Acc I 片段。

### 参 考 文 献

- [1] Husain, S.S. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 220: 31—38, 1983.
- [2] Stump, D.C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 261: 17120—17126, 1986.
- [3] Holmes, W.E. et al.: *Biotechnology*, 3: 923—929, 1985.
- [4] Nelles, L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 262: 5682—5689, 1987.
- [5] Verde, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 4727—4731, 1984.
- [6] Stoppelli, M.P. et al.: *The Journal of Cell Biology*, 102: 1235—1241, 1986.
- [7] Chomczynski, P. et al.: *Analytical Biochemistry*, 162: 156—159, 1987.
- [8] Shrader, W.T. et al.: in *Laboratory Methods Manual for Hormone Action and Molecular Endocrinology*, 6th ed, pp.4—18, 1982.
- [9] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.200—201, 382—386, 1982.
- [10] Gubler, U. and Hoffman, B.J.: *Gene*, 25: 263—269, 1983.
- [11] Feinberg, A.P. et al.: *Analytical Biochemistry*, 137: 266—267, 1984.
- [12] 石成华: 遗传工程理论与方法, 黄翠芬主编, 科学出版社出版, pp.211—219, 1987.

## CLONING AND CHARACTERIZATION OF cDNA FRAGMENT CODING FOR HUMAN PROUROKINASE

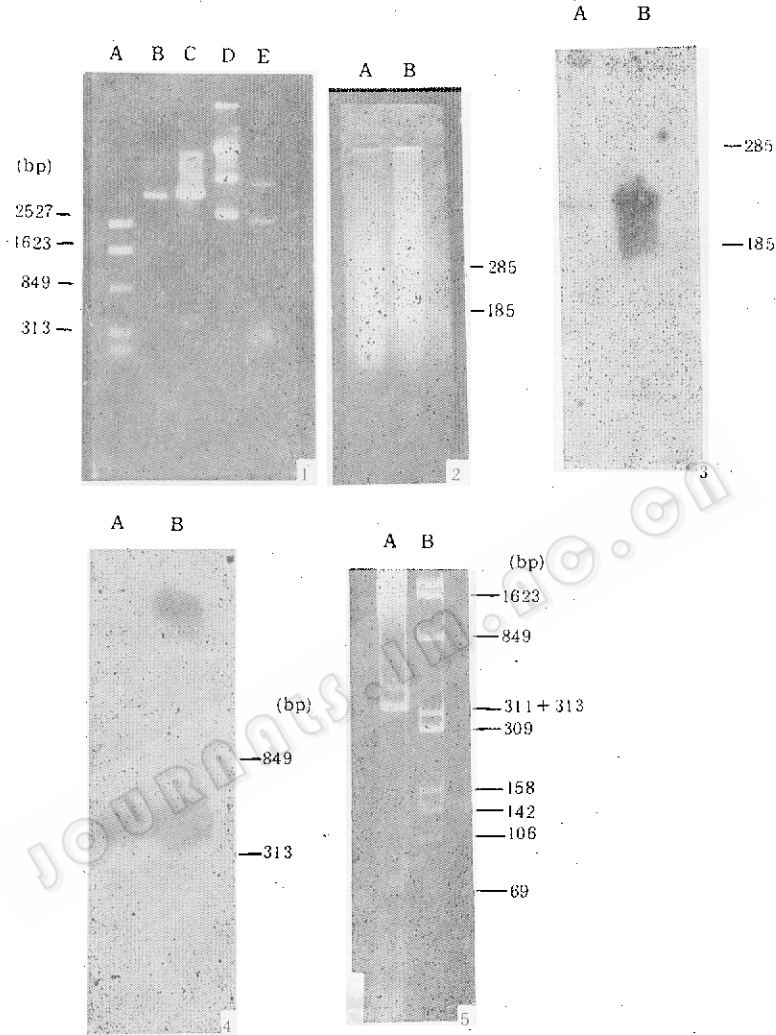
Li Xiuzhen      Tang Hongdi      Guan Xueni  
Li Fengzhi      Hu Baocheng      Fang Jiming

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

mRNA coding for prourokinase was isolated from human Detroit562 cells after they were induced by PMA. The amounts of UKmRNA from induced cells are at least 8 times higher than those of noninduced cells. Reverse transcription was carried out by using 18mer synthetic oligodeoxyribonucleotides as primer and the cDNA library was established by annealing the ds-cDNA to the Pst I site of pBR322 by dC-dG tailing method. One positive clone, UK-1, was obtained when  $^{32}\text{P}$ -labelled pHUK-8-Pst I DNA was used as a probe in screening the transformants. Restriction enzymes digestion, gel electrophoresis and nucleotide sequence analysis revealed that the inserted fragment contained 402 bp, corresponding to the 389—790 nucleotide position of UKcDNA as reported by Holmes.

### Key words

Prourokinase; UKmRNA; cDNA



1. Pst I 酶切UK-1重组质粒后1.4%琼脂糖凝胶电泳结果  
A. M<sub>13</sub>RF DNA-Hae III 标准DNA分子量 B. pBR322+Pst I C. UK-1 质粒+Pst I D. UK-1质粒 E. pBR322质粒
2. PMA诱导的Detroit562细胞RNA酸性尿素琼脂糖电泳  
A. Poly(A)+RNA B. 总RNA
3. PMA诱导的Detroit562细胞RNA Northern转移后与<sup>32</sup>P标记pHUK-8-Pst I DNA探针杂交  
A. 总RNA B. Poly(A)+RNA
4. UK-1重组质粒Pst I 酶切并Southern转移后与pHUK-8-Pst I DNA探针杂交结果  
A. 完全酶切 B. 部分酶切
5. 用Pst I 酶切UK-1重组质粒后8%聚丙烯酰胺凝胶电泳结果  
A. UK-1质粒+Pst I B. M<sub>13</sub>RF DNA-Hae III 标准分子量DNA