

山羊 TGF β 部分 cDNA 的扩增和序列分析*

王保莉, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 在人和小鼠等的 TGF β 基因序列基础上, 选用 1 对同源性引物, 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术从山羊卵泡总 RNA 中扩增出 273 bp 的 TGF β cDNA 片段, 进行序列测定, 由此 cDNA 序列推出了相应的 TGF β 蛋白分子的氨基酸排列。比较了山羊与人、小鼠、大鼠的 TGF β 部分 cDNA 核苷酸的同源性和氨基酸的相似性, 核苷酸同源性分别为 91.9%, 87.5% 和 88.6%; 氨基酸相似性分别为 97.8%, 96.7% 和 96.7%。

[关键词] TGF β cDNA; 山羊; RT-PCR; 序列分析

[中图分类号] S827.3⁺6; S813.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)04-001-04

转化生长因子 β (transforming growth factor β) TGF β 是一组可逆的诱导非瘤细胞(如大鼠成纤维细胞等)表达转化表型, 促进或抑制细胞增殖及在创伤愈合、骨的重建和免疫调节等方面具有多功能的多肽类物质。体外试验表明, TGF β 可多方面影响哺乳动物卵巢卵泡的发育, 调节牛颗粒细胞的生长和分化^[1], 加速大鼠卵母细胞的成熟^[2]以及诱导大鼠卵泡膜间质细胞的程序化死亡等^[3]; TGF β 是 TGF β 的主要成员之一。目前, 已经对人、小鼠和大鼠等的 TGF β 基因序列和氨基酸组成进行了研究^[4-7], 但尚未见到有关山羊 TGF β 基因序列的报道。本研究对山羊的 TGF β 基因序列进行了测定和分析, 以为 TGF β 在山羊卵泡卵母细胞发育和成熟过程中的调控作用提供了分子生物学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

山羊卵巢采自西安市屠宰场, 置于 22~28℃ 生理盐水中, 4 h 内运回实验室。解剖镜下用眼科手术器械剥离直径 3~4 mm 的有腔卵泡, 保留完整的卵泡壁。将剥离的卵泡放于冷冻管中, 液氮保存备用。

1.2 方法

总 RNA 提取 采用 Trizol (Sangon 公司) 法提取山羊卵泡总 RNA。

PCR 引物合成 PCR 引物由上海 Sangon 公司合成。负链引物, 5'-TTC GAT CTT GGG CGT ATT TCC AAT-3'; 正链引物, 5'-AGA AAT GTG

CAG GAT AAT TGC TGC-3'。预期得到的 TGF β cDNA 片段为 273 bp。

RT-PCR RNA 模板(含 5 μ g 总 RNA)、DEPC 处理的水 Oligo(dT) (1 μ L) 混合液 16 μ L, 置于 70℃ 水浴中变性 10 min 后, 立即置于冰浴中冷却 5 min, 并在冰浴上加入 dNTP 混合液 2 μ L (终浓度为 1 mmol/L)、5 \times RT 缓冲液 5 μ L、RNasin 1 μ L (40 μ mol/(\mathmu L \cdot min)), M-MuLV 反转录酶 1 μ L (200 μ mol/(\mathmu L \cdot min)), 总体积 25 μ L。混匀后, 于 37℃ 反应 1 h, 立即置于 70℃ 变性 15 min, -20℃ 放置, 以备作 PCR 反应用。取 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg²⁺) 3 μ L、dNTP 1 μ L、引物各 1 μ L、反转录产物 1 μ L、DEPC 处理的水 22.5 μ L, 加 20 μ L 矿物油覆盖在液面上, 稍离心后, 置于 95℃ 温育 2 min, 85℃ 下加入 Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L。以 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min 和 72℃ 延伸 2 min 为一个循环, 循环 30 次。72℃ 再延伸 10 min。

PCR 产物的琼脂糖电泳 制备 2% 的琼脂糖凝胶, 同时加入溴化乙啶(EB) 至 1 μ g/mL; 取 PCR 扩增产物 10 μ L 与 6 \times Loading buffer 2 μ L, 混匀后点样, 电泳。在凝胶成像分析系统中分析结果, 贮存电泳图谱。

PCR 产物内切酶鉴定 取 PCR 扩增产物 10 μ L, 加 10 \times 缓冲液 2 μ L、水 6 μ L 和内切酶 Sph I 2 μ L, 混匀后, 于 37℃ 水浴反应 4 h。加 0.1 mol/L EDTA 2 μ L 终止反应。琼脂糖凝胶电泳检查酶切结果。

* [收稿日期] 2001-01-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39830280)

[作者简介] 王保莉(1960-), 女, 陕西西安人, 副教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学的教学和研究。

RNA 的甲醛琼脂糖凝胶电泳 按照文献[8]的方法,用总RNA 4.5 μ L 进行甲醛琼脂糖凝胶电泳,电泳结果经凝胶成像系统分析和图像贮存。

目的片段的转化和序列测定 将目的片段与 pMD18-T 载体 (TaRaKa 公司) 连接; 大连 TaRaKa 公司完成序列测定, 提供序列报告和原图。

2 结果与分析

2.1 山羊卵巢卵泡总 RNA 的完整性

采用甲醛琼脂糖电泳检查提取的总 RNA 的完整性。由图 1 可清晰地看出核糖体 RNA 的 28S 和

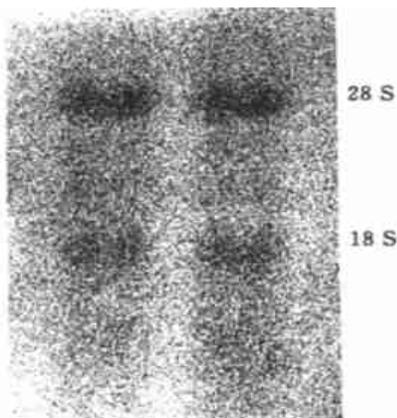


图 1 总 RNA 的甲醛变性电泳
Fig. 1 Formaldehyde denaturation electrophoresis of total RNA

18S 带, 表明所提取的山羊卵巢卵泡中的总 RNA 无明显降解, 是完整的。

2.2 山羊卵巢卵泡部分 TGF β cDNA 的扩增

从山羊卵巢卵泡扩增了部分 TGF β cDNA。从图 2 可以看出, 得到了单一的目的条带 (273 bp)。

2.3 扩增片段的酶切分析

采用限制性内切酶 *Sph* I 对目的片段进行了酶切, 经琼脂糖电泳, 明显看出两条带, 分别为 154 bp 和 119 bp (图 3), 与文献[9]的报道一致, 初步证明得到的 PCR 产物为目的片段。

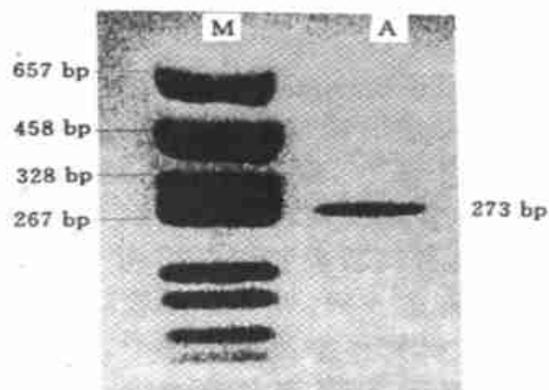


图 2 PCR 产物的电泳结果
M. DNA 标样; A. PCR 产物
Fig. 2 Electrophoresis of PCR product
M. DNA marker; A. PCR product

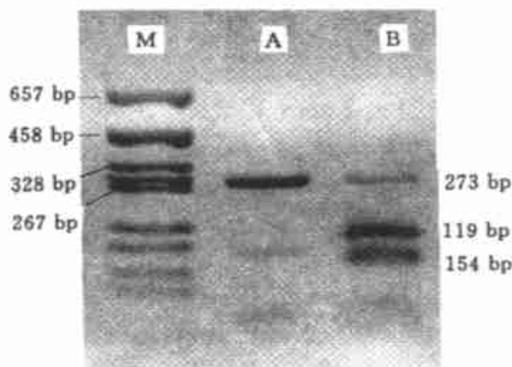


图 3 目的片段的酶切分析
M. DNA 标样; A. 目的片段; B. *Sph* I 酶切
Fig. 3 Restriction enzyme digestion of target fragment
M. DNA marker; A. Target fragment; B. *Sph* I digestion

2.4 山羊 TGF β 部分 cDNA 核苷酸序列测定

将纯化后的目的片段连接到 pMD18-T 质粒载体上, 用 DNA 自动分析仪测定重组质粒, 得到了山羊部分 TGF β cDNA 核苷酸序列 (图 4)。该序列由 273 个核苷酸组成, 与预计的一致, 其中含鸟苷酸

```
AGAAATGTGCAGGATAATTGCTGCCTAC
GCCACTTTACATTGATTTCAAGAGGGA
TCTTGGGTGGAAATGGATTCATGAGCCT
AAAGGGTACAATGCCAACTTCTGTGCTG
GAGCGTGCCCGTATCTGTGGAGCGCAGA
CACTCAGCACAGTAGGGTTCTCAGCTTA
TATAATACCATAAATCCAGAAGCGTCTG
CTTCCCCTTGCTGCGTGTCCCAAGATTT
AGAGCCGCTCACCATTCTCTACTACATT
GGAAATACGCCCAAGATCGAA
```

图 4 山羊部分 TGF β cDNA 核苷酸序列
Fig. 4 Partial TGF β cDNA nucleotide acid sequence of goat

(G) 63 个, 胞苷酸 (C) 67 个, 胸苷酸 (T) 70 个, 腺苷酸 (A) 73 个。

2.5 山羊卵巢卵泡部分 TGF β 分子的氨基酸序列
由山羊部分 TGF β cDNA 的核苷酸序列, 推导出了相应的 91 个氨基酸排列 (图 5)。

Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly
 Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr
 Leu Try Ser Ala Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu
 Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile
 Gly Asn Thr Pro Lys Ile Glu

图 5 从山羊 TGFβ cDNA 核苷酸序列推导的部分氨基酸排列

Fig. 5 Partly TGFβ amino acid arrangement deduced from the sequence of goat cDNA

3 讨论

3.1 核苷酸序列与其他哺乳动物的同源性

1987 年 Martin 等首先发表了人的 TGFβ 全长 cDNA 的核苷酸序列^[4]。该全长 cDNA 由 1 695 个核苷酸组成, 包括了全部编码前体 414 个氨基酸的 TGFβ 的核苷酸, 其中编码成熟 TGFβ 多肽 (112 个氨基酸) 的核苷酸位于总 cDNA 的第 1 088~1 423 位。本试验选用引物位于该 cDNA 的第 1 112~1 135 位和第 1 360~1 384 位。将山羊部分 TGFβ cDNA 核苷酸序列与已知的人、小鼠和大鼠的基因 (mRNA 或 cDNA) 序列加以比较 (表 1)。

由表 1 可见, 山羊 TGFβ 部分 cDNA 与人相

比, 有 21 个碱基差异, 同源性为 91.9%; 与小鼠有 34 个碱基差异, 同源性为 87.5%; 与大鼠比较有 31 个核苷酸不同, 同源性为 88.6%。这些结果表明, 山羊 TGFβ 的基因序列与其他哺乳动物基因序列的同源性很高。

表 1 山羊与其他动物 TGFβ cDNA 序列比较

Table 1 The comparison of goat TGFβ cDNA sequence with some mammals

哺乳动物 Mammal	不同核苷酸数 Number of different nucleotide acid	同源性/% Homology
山羊 Goat	0	100
人 Human	21	91.9
小鼠 Mouse	34	87.5
大鼠 Rat	31	88.6

9	10	20	30	
Arg	Asn	Val	Gln	Asp
Asn	Cys	Cys	Leu	Arg
Pro	Leu	Tyr	Ile	Asp
Phe	Lys	Arg	Asp	Leu
Gly	Trp	Lys	Trp	Ile
His	Glu	Pro	Lys	Gly
Tyr	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
40	50	60	70	
Asn	Ala	Asn	Phe	Cys
Ala	Gly	Ala	Cys	Pro
Tyr	Leu	Try	Ser	Ala
Asp	Thr	Gln	His	Ser
Arg	Val	Leu	Ser	Leu
Tyr	Asn	Thr	Ile	Asn
Pro	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
80	90	99		
Glu	Ala	Ser	Ala	Ser
Pro	Cys	Cys	Val	Ser
Gln	Asp	Leu	Glu	Pro
Leu	Thr	Ile	Leu	Tyr
Tyr	Ile	Gly	Asn	Thr
Pro	Lys	Ile	Glu	(goat)
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*
*	*	*	*	*

图 6 山羊部分 TGFβ 分子的氨基酸序列与其他哺乳动物相似性的比较

(图中上面的数字表示对应于人成熟 TGFβ 多肽的氨基酸残基位置, * 表示氨基酸相同)

Fig. 6 The similarity comparison of goat TGFβ amino acid sequence with that of some mammals (The number on top of the amino acid may show the position of each amino acid in human TGFβ mature peptide)

3.2 氨基酸序列与其他哺乳动物的相似性

由山羊 TGF β cDNA 核苷酸序列推导出相应的氨基酸排列,包括 TGF β 成熟多肽中部的 91 个氨基酸,对应于人 TGF β 的第+9 位到第+99 位^[4]。将山羊 TGF β 的氨基酸序列与已知哺乳动物的进行比较,结果见图 6。由图 6 可见,山羊部分 TGF β 氨基酸,与人相比有 2 个不同,分别是 Leu/Lys89, Asn/Lys94, 相似性为 97.8%; 与小鼠和大鼠各有 3 个氨基酸不同,均为 Ala/Ser54,

Ser/Thr59, Arg/Lys60, 相似性为 96.7%。表明山羊与人、小鼠和大鼠的 TGF β 氨基酸序列的同源性很高,其中与人的同源性最好。

总之,本试验初次报道了山羊部分 TGF β cDNA 核苷酸序列,并推导了部分 TGF β 氨基酸序列;比较了山羊与其他哺乳动物间的基因序列同源性,提供了基本的分子生物学数据。同时,建立了测定 TGF β 基因表达的 RT-PCR 技术。

[参考文献]

- [1] Skinner M K, Keski-Oja J, Osteen K G, et al Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth[J]. Endocrinology, 1987, 121(2): 786- 792
- [2] Feng P, Catt K J, Knecht M. Transforming growth factor beta regulates the inhibitory actions of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation[J]. J Biol Chem, 1986, 261(30): 14167- 14170
- [3] Foghi A, Teerds K J, van der Donk H, et al Induction of apoptosis thecal/interstitial cells: transforming growth factor (TGF) alpha plus TGFbeta on bcl-2 and interleukin-1beta-converting enzyme[J]. J Endocrinol, 1998, 157: 489- 494
- [4] De Martin R. Complementary DNA for human glioblastoma-derived cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor beta gene family[J]. EMBO J, 1987, 6: 3673- 3677.
- [5] Miller D A, Lee A, Pelton R W, et al Murine transforming growth factor-beta 2 cDNA sequence and expression in adult tissues and embryos[J]. Mol Endocrinol, 1989, 3 (7): 1108- 1114
- [6] Plisov S Y, Ivanov S V, Plisova T M, et al Rat transforming growth factor-beta2, complete coding sequence[EB/OL]. <http://ncbi.nlm.nih.gov>
- [7] Rebbert M L, Bhatia Dey N, Dawid IB. The sequence of TGF-beta 2 from Xenopus laevis[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (8): 2185
- [8] 萨姆布鲁克 J, 佛里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版 金冬雁, 黎孟枫译 北京: 科学出版社, 1995 362- 367.
- [9] Watson A J, Hogan A, Hannel A, et al Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo[J]. Mol Reprod Develop, 1992, 31: 87- 95

The gene amplification and sequence analysis of partial TGF β cDNA of goat

WANG Bao-li, ZHANG Yong

(Institute of Bioengineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The partial cDNA of transforming growth factor β (TGF β) of goat was amplified by utilizing reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The isolated fragment (273 bp) was sequenced. The amino acid sequence was deduced from the cDNA, it contains 91 amino acids. The nucleotide acid and amino acid sequences of the goat TGF β were compared with those of human, mouse and rat. The results indicate that cDNA sequence homology are 91.9%, 87.5% and 88.6% respectively, and the amino acid sequence similarity are 97.8%, 96.7% and 96.7%, respectively.

Key words: TGF β ; goat; RT-PCR; sequence analysis