

## 人尿激酶受体 cDNA 的克隆及序列测定

朱甫祥 贾士东 高临路 贺福初\*

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

**摘 要** 以高转移性人肺巨细胞癌细胞系 PG 的总 RNA 为模板,用 RT-PCR 方法扩增人尿激酶受体(uPAR)的 cDNA。将其亚克隆至 pGEM-T 载体后进行测序,结果表明,我们所克隆的 uPAR cDNA 片段与文献报道的人 uPAR 基因编码区 cDNA 序列高度同源(达 99%),其中第 705、746 和 755 碱基分别由 A、A 和 G 替代了文献中的 T、G 和 A,从而导致了第 249 和 252 位氨基酸由 Gly 和 Glu 变为 Asp 和 Gly,我们已将此序列申请登录 GenBank,登录号为 AF257789。

**关键词** 人尿激酶受体 cDNA RT-PCR

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0461-03

人尿激酶受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)是一种分子量为 55 kD、通过糖磷脂锚(GPI anchor)与细胞膜相连的糖蛋白,在细胞迁移和组织重塑等生理病理过程中具有重要的作用<sup>[1]</sup>。当其配体尿激酶(urokinase-type plasminogen activator, uPA)以高亲和力( $K_d = 0.1 \sim 1.0$  nM)结合后,一方面使 uPA 浓集于细胞表面从而加强细胞表面的蛋白水解酶活性,促进细胞在细胞外基质中的迁移和侵袭;另一方面这种结合对某些细胞具有丝裂原活性<sup>[2]</sup>。1990 年, uPAR cDNA 首次从 SV40 转化的人纤维母细胞中得到分离和克隆<sup>[3]</sup>。其基因定位于 19 号染色体长臂,由 7 个外显子和 6 个内含子组成。由于转录后剪接加工型式的不同, uPAR 有两种翻译型式:膜结合型(uPAR<sub>1</sub>)和可溶性非结合型(uPAR<sub>2</sub>)。前者由 313 个氨基酸残基组成,后者由 259 个氨基酸残基组成,两者间仅氨基末端 230 个氨基酸相同,而羧基末端的 29 个氨基酸残基是 uPAR<sub>2</sub> 特有的<sup>[4]</sup>。点突变结果表明, uPAR 的 GPI 锚定位点位于其分子的 Ser<sup>282</sup>和 Gly<sup>283</sup>, GPI 锚的识别信号为其分子羧基末端的 9 个氨基酸残基<sup>[5]</sup>。研究表明, uPAR 在多种肿瘤的原发病灶、转移灶和(或)周围的基质细胞中呈高水平表达,与恶性肿瘤的发展密切相关,因此近年来对 uPAR 的研究受到重视。有人用重组的可溶性 uPAR 分子进行体外研究表明,它可与膜结合的 uPAR 竞争结合 uPA 而表现出抗肿瘤细胞增殖和侵袭的作用<sup>[6]</sup>。

本文以国内建立的高转移性肺巨细胞癌细胞系 PG<sup>[7]</sup>为材料,提取其总 RNA 作为模板,用 RT-PCR 的方法合成、扩增了 uPAR 的编码区 cDNA,对其全长进行了序列测定并与国外文献报道的 uPAR cDNA 序列及其编码的氨基酸序列<sup>[3]</sup>进行了比较。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细胞株、菌株及质粒

人高转移肺巨细胞癌细胞系 PG 由北京医科大学病理学系提供。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本室保存,克隆质粒 pGEM-T 购自 Promega 公司。

#### 1.2 工具酶与试剂

所用限制酶、Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品, T4 连接酶、总 RNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒及质粒纯化试剂盒为 Promega 公司产品,逆转录试剂盒及 RPMI 1640 培养基为 GIBCO 公司产品,其它试剂均为分析纯。

所用引物根据 1990 年 Roldan 等<sup>[3]</sup>发表的人 uPAR cDNA 序列设计,上游为:5' CG GAA TTC ATG GGT CAC CCG CCG CTG C 3'(引入 EcoRI 识别位点),下游为:5' CC AAG CTT TTA GGT CCA GAG GAG AGT GCC 3'(引入 HindIII 识别位点),由 TaKaRa 公司合成。

#### 1.3 人高转移肺巨细胞癌细胞系 PG 的培养与细胞总 RNA 的提取

PG 细胞用含 10% 热灭活的新鲜小牛血清的

RPMI 1640 培养液于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。取生长状态良好的细胞按总 RNA 提取试剂盒的操作说明书提取细胞的总 RNA。

#### 1.4 RT-PCR 合成 uPAR cDNA

冰上取 2μg 总 RNA 为模板,加入下游引物 (20μmol/L) 1μL, 70℃ 加热 10min, 于冰上加 dNTPs (各 2.5mmol/L) 2μL, 5×RT buffer 5μL, MMLV 逆转录酶 1.5μL (300u), RNasin 1.5μL (60u), DTT 2μL, 补水至 25μL, 37℃ 反应 2h 后 95℃ 加热 5min 以灭活 MMLV 逆转录酶。取 5μL RT 产物为模板, 加入 10×PCR buffer 5μL, 上游引物 (20μmol/L) 各 1μL, dNTPs (各 2.5mmol/L) 3μL, Taq DNA 聚合酶 1μL (5u), 补水至 50μL, 进行 PCR, 反应参数为: 95℃ 预变性 5min 后, 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 1.5min, 行 35 个循环, 72℃ 延伸 7min。取 10μL 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳以观察扩增结果, 回收、纯化特异性扩增片段。

#### 1.5 重组质粒 pGEM-uPAR 的构建和鉴定

将 PCR 产物与 pGEM-T 载体进行连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5α, 用含 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基培养过夜, 通过 α-互补作用筛选阳性重组子。经 PCR 初步鉴定后, 用酶切进一步鉴定。

#### 1.6 全自动序列测定及分析

用质粒提取试剂盒小量提取质粒, 分别以 T7 和 SP6 为测序引物, 用 PE 公司 ABI 377 Sequencer 进行全长自动测序。将测得的序列与国外文献报道的 uPAR cDNA 序列及氨基酸序列进行比较。

## 2 结果与讨论

#### 2.1 uPAR 编码区 cDNA 的 RT-PCR 合成

本研究的目的是为了获得 uPAR 编码区的 cDNA, 以便在此基础上对其缺失、重组突变体的表达和功能进行研究。我们根据文献报道的 uPAR 的全长 cDNA 序列的开放阅读框设计引物, 其上游引物含一个起始密码子 ATG 并在其前引入一个 EcoR I 识别位点, 下游引物含一个终止密码子 TAA 并在其后引入一个 Hind III 识别位点。以 PG 细胞总 RNA 为模板进行 RT-PCR 后, 取 10μL 样品进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 可见到一明显的大小约 1kb 的特异性扩增片段, 与预期产物的大小完全一致 (图 1)。用 PCR 产物回收试剂盒回收、纯化特异性扩增片段, 用于进一步克隆和鉴定。

#### 2.2 PCR 产物亚克隆、阳性重组子的筛选与鉴定

将电泳回收纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体

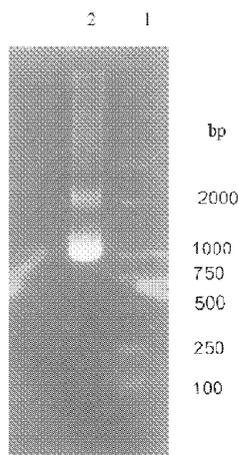


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖电泳

Fig.1 Analysis of RT-PCR products

1. DNA molecular weight marker
2. RT-PCR products

连接后转化感受态大肠杆菌 DH5α, 用含 X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂培养基培养过夜, 可观察到有若干个蓝、白色菌落生长。随机挑取 1 个蓝色菌落和 4 个白色菌落, 用含氨苄青霉素的液体 LB 培养基培养, 以菌液作模板经 PCR 初步鉴定, 可见 4 个白色菌落均有 1kb 大小的特异性扩增片段, 而蓝色菌落未见 (结果未示)。从白色菌落小量提取质粒 DNA 并用 EcoR I 和 Pst I 双酶切作进一步鉴定, 结果显示, 两个可切下大小分别为 140bp、268bp 和 673bp 的片段, 提示为正向插入, 另两个可切下大小分别为 75bp 和 268bp 的片段, 提示为反向插入 (图 2)。

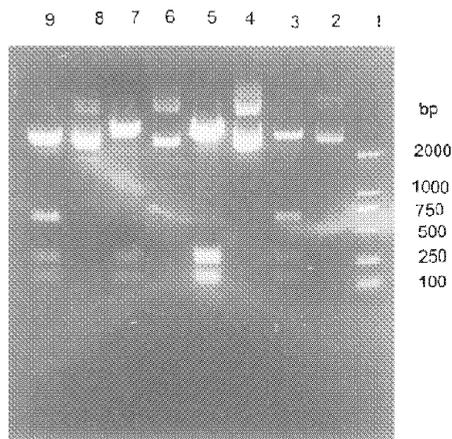


图 2 阳性克隆的酶切鉴定

Fig.2 Restriction map of recombinant plasmids

1. DNA molecular weight marker
- 2 4 6 8. Recombinant plasmid
- 3 5 7 9. Recombinant plasmid/EcoR I + Pst I

#### 2.3 uPAR cDNA 的序列测定和分析

为了证实克隆得到的片段是否确实为人 uPAR,

cDNA 以及与文献报道的序列进行比较,我们选取两个正向插入的克隆(1和4)通过自动测序得到了插入片段的序列全长(图3),两者序列完全一致。

```

ATÄ GAC TGC CGA GGC CCC ATG AAT CAA TGT
I   D   C   R   G   P   M   N   Q   C

CTG GTA GCC ACC GÄC ACT CAC GGA 703-756
L   V   A   T   D   T   H   G   235-252
  
```

图3 uPAR cDNA 部分序列及比较

Fig.3 Nucleotide sequence and alignment analysis of uPAR cDNA

将测序结果与国外已报道的 uPAR cDNA 序列<sup>[3]</sup>进行比较后发现,我们所克隆 uPAR 编码区 cDNA 与文献报道的人 uPAR 基因编码区 cDNA 序列同源性达 99%,但其中第 705、746 和 755 位碱基处有变异,分别由 A、A 和 G 替代了文献中的 T、G 和 A。氨基酸编码序列分析发现,其中第 705 位碱基变异为中性突变,另两个碱基的变异分别导致了 249 和 252 位氨基酸由 Gly 和 Glu 变为 Asp 和 Gly。结果表明我们所克隆的国人的 uPAR cDNA 与国外文献报道的序列有所差异,我们已将此序列申请登录 GenBank,登录号为 AF257789。

本实验中我们用国内建立的国人高转移性肺癌

细胞株总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增出 uPAR 的 cDNA,说明该细胞有一定水平的 uPAR 的表达。另鉴于我们用 uPA 之无酶活性而具有受体结合性的氨基末端基因转染显著抑制其体外侵袭能力和体内自发性转移的能力,提示 uPAR 在肿瘤细胞的侵袭和转移过程中具有重要的意义(待发表资料)。此外,从我们克隆的 uPAR 的 cDNA 与国外文献发表的序列比较中,发现国人的序列于靠近其羧基末端有个别的变异之处。由于两独立的克隆其序列完全一致,因而可基本排除 PCR 所致错误的可能性。此外,其三处核酸序列变异及两处氨基酸序列变异均位于 uPAR 的羧基端可变区(即 230 位以后),再次提示此变异的非偶然性。但这种变异是否具有普遍性尚有待进一步的证明。另外,研究表明 uPA 是体内的一种重要的生理性调控分子,它参与多种与蛋白溶解有关的生理过程,包括溶栓、排卵、胚胎植入、胚胎发生、细胞侵袭和脑功能等<sup>[8]</sup>,而这些功能的发挥大多有赖于其与细胞表面 uPAR 的结合,因此 uPAR cDNA 的克隆对进一步研究 uPAR 的缺失、重组变异体对这些功能的影响以及肿瘤的生物学研究均具有一定的意义。

## 参 考 文 献

- [1] Dano K, Behrendt N, Brunner N *et al.* *Fibrinolysis*. 1994, 8 (suppl. 1):189~203
- [2] Anichini E, Fibbi G, Pucci M *et al.* *Exp Cell Res*. 1994, 213:438~448
- [3] Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT *et al.* *EMBO J*. 1990, 9:467~474
- [4] Pyke C, Eriksen J, Solberg H *et al.* *FEBS Lett*, 1993, 326:69~74
- [5] Muller L B. *Eur J Biochem*, 1992, 208:493
- [6] Wilhelm O, Weidle U, Hohl S *et al.* *FEBS Lett*, 1994, 337:131~134
- [7] 吴秉铨, 孙毓恺, 郑杰, 等. 中华肿瘤学杂志, 1985, 7:324~328
- [8] Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L *et al.* *Nature*, 1994, 368:419~424

## cDNA Cloning and Sequencing of Human Urokinase Receptor

ZHU Fu-Xiang JIA Shi-Dong GAO Lin-Lu HE Fu-Chu

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

**Abstract** Human urokinase receptor (uPAR), a 55kD glycoprotein linked to the cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor plays a central role in cell migration and tissue remodeling. The human uPAR cDNA was cloned from a highly metastatic human lung giant cell line PG by RT-PCR and then subcloned into pGEM-T vector and sequenced. The data indicate that there are three bases substitution (705, 746, 755) which subsequently leads to two amino acid mutation (249, 252) compared to that of previously reported. The cDNA sequence of uPAR was registered in GenBank with accession number AF257789.

**Key words** Human uPAR cDNA, RT-PCR