

# 毛冠鹿 $p16^{INK4}$ 基因第二外显子序列分析

曹祥荣, 王莹, 李淑峰, 陈涛, 张锡然

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210007)

[摘要] 采用 PCR 扩增技术首次克隆毛冠鹿  $p16^{INK4}$  基因第二外显子, DNA 杂交和序列分析发现, 在 307 个碱基的第二外显子中仅有 5 个碱基的差异, 同源性达 98.4%。 $p16^{INK4}$  基因的第二外显子是高度保守的区域, 在其功能中起重要作用。

[关键词] 毛冠鹿  $p16^{INK4}$  基因, 外显子, 序列

[中图分类号] Q959.830.2; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)03-0080-03

## 0 引言

$p16^{INK4}$  基因是一种重要的多种肿瘤抑癌基因(MTS1)。1993 年以来研究者围绕该基因的基因序列、调控及在肿瘤发生中的作用与机制做了大量的研究, 人  $p16^{INK4}$  基因组由 2 个内含子和 3 个外显子组成, 外显子分别由 126 bp、307 bp 和 11 bp 构成, 编码 444 氨基酸, 第二外显子是  $p16$  蛋白的主要部分<sup>[1~3]</sup>。研究资料表明  $p16^{INK4}$  基因表达产物直接参与细胞周期的调控及凋亡<sup>[4]</sup>。1995 年, Quelle D E 等克隆了鼠的  $p16^{INK4}$  基因和  $p15^{INK4}$  基因, 并定位  $p16^{INK4}$  基因于鼠 4 号染色体<sup>[5]</sup>。在鼠肺腺癌中,  $p16^{INK4}$  基因存在着高频率的纯合缺失, 在所研究的人类和动物肿瘤中第二外显子是多种肿瘤突变的热点<sup>[6]</sup>。 $p16^{INK4}$  基因在其它物种中的情况, 还未见报道。毛冠鹿属于鹿科, 为我国特有种, 是国家二级野生保护动物。本研究分析毛冠鹿  $p16^{INK4}$  基因第二外显子基因序列, 比较不同物种的  $p16^{INK4}$  基因的同源性, 有助于了解  $p16^{INK4}$  基因及其蛋白的结构与其功能的关系, 有助于了解动物细胞周期调控、生长与发育及分子进化机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 DNA 提取

雌性毛冠鹿因外伤死亡, 发现有胎儿, 取毛冠鹿胎儿肌肉组织, 按常规方法提取基因组 DNA<sup>[7]</sup>。

### 1.2 毛冠鹿第二外显子的扩增

根据文献设计  $p16^{INK4}$  基因 exon 2 外侧引物(上海生工生物工程公司合成), 以人 DNA 为模板可扩增 427 bp DNA 片段<sup>[8]</sup>。

5'-CTCAGCTTTGGAAGCTCTCA 3' 5'-GGCTCTACACAAGCTTCCTT 3'。95℃预变性 5 min, 然后 95℃40 s, 53℃60 s, 72℃60 s, 35 个循环扩增, 然后 72℃延伸 7 min。1.2% 琼脂糖凝胶(含 0.5

收稿日期 2000-07-15

基金项目 江苏省教育厅高校科研基金(99KJB180004)

作者简介 曹祥荣, 1963—, 博士, 南京师范大学生命科学学院副教授, 从事细胞与分子生物学研究。

μg/mL EB)电泳分析扩增产物。

### 1.3 Southern Blot

pAdCMV-p16cDNA 质粒(本室保存)经酶切(HindⅢ/ClaI),分离出 p16<sup>INK4</sup> cDNA 片段,用随机引物 DIG 标记试剂盒(Boehringer Mannheim 公司)标记 p16<sup>INK4</sup> cDNA 探针,毛细管转移 DNA 至尼龙膜(Gene 公司),在分子杂交炉中(美国 Robbins Scientific 公司)进行 Southern 杂交<sup>[7]</sup>,碱性磷酸酶(NBT/BCIP)暗处显色,杂交带呈蓝色。

### 1.4 DNA 序列测定及分析

切割 427 bp 凝胶带,按试剂盒(Promega 公司)说明进行 PCR 产物的纯化,送上海生工生物工程公司进行序列测定,利用 clustawl 软件进行比较人和毛冠鹿的 p16<sup>INK4</sup>基因序列。

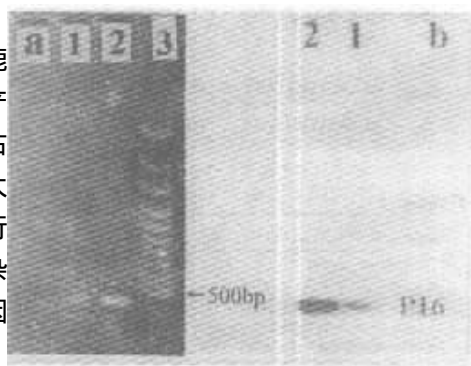
## 2 结果

### 2.1 PCR 及 Southern blot 分析

采用人 p16 基因第二外显子二侧引物对毛冠鹿基因组 DNA 进行扩增,琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,可以从毛冠鹿基因组 DNA 扩增出约 420 bp 左右的 p16<sup>INK4</sup>基因片段,与人的第二外显子扩增产物大小基本一致(图 1:a)。进一步将电泳产物进行 Southern 转移,用 DIG 标记的人 p16<sup>INK4</sup> cDNA 进行杂交,出现很强的杂交带(图 1:b),证明从毛冠鹿基因组 DNA 中扩增的片段为 p16<sup>INK4</sup>基因。

### 2.2 序列分析结果

对毛冠鹿的 p16<sup>INK4</sup>基因第二外显子扩增片段测序分析,得到 414 bp 核苷酸序列,下划线为第二外显子部分,并与人的 p16<sup>INK4</sup>基因第二外显子序列对位排列(图 2)。在人 p16<sup>INK4</sup>基因中第二外显子从编码区的第 127 bp 开始,共 307 bp(从第 43 aa 开始)。序列分析表明在人和毛冠鹿 p16<sup>INK4</sup>第二外显子中只有 5 个碱基的差异,同源率为 98.4%。



- 1 毛冠鹿基因组 DNA;
- 2 人基因组 DNA;
- 3 相对分子量标记。

图 1 人和毛冠鹿 p16<sup>INK4</sup>基因 PCR 扩增 (a)及 Southern Blot(b)

## 3 讨论

p16<sup>INK4</sup>基因是细胞周期调控中重要一员,在动物细胞生长、分化发育及遗传机制中起关键作用。本研究利用人 p16<sup>INK4</sup>基因第二外显子二侧引物能够与毛冠鹿基因组 DNA 很好地复性(53℃),进行毛冠鹿 p16<sup>INK4</sup>基因的第二外显子的扩增,但低于人 p16<sup>INK4</sup>基因扩增的复性条件(55℃),说明在毛冠鹿和人整个 p16<sup>INK4</sup>基因组间都存在较高的同源性,PCR 产物 Southern 杂交结果也证明这一点。序列分析表明,在第二外显子的 307 bp 中,只有 5 个碱基的差异,与人之间有 98.4%的碱基顺序完全相同。这比鼠与人的第二外显子的同源性还要高<sup>[9]</sup>。因此,p16 基因进化是很保守的。

人 p16<sup>INK4</sup>基因第二外显子(307 bp)是 p16<sup>INK4</sup>基因的主要组成,是编码其蛋白质的主要区段,也是多种肿瘤中变异的集中区域<sup>[2]</sup>,包含与 CDK4 结合而发挥抑制细胞周期作用的区域。这些氨基酸的位点在 p16<sup>INK4</sup>基因蛋白家族中是保守的,位于 Ankyrin repeats 区间内<sup>[9]</sup>。本研究

结果通过人与毛冠鹿p16<sup>INK4</sup>基因同源序列的比较,进一步说明第二外显子区域的保守性和重要性.Zindy 等人报道 ,p16<sup>INK4</sup>基因及其家族在鼠的发育和衰老过程中起限制点的角色<sup>[ 10 ]</sup>.因此,对毛冠鹿 p16<sup>INK4</sup>基因的研究,可以帮助人们探讨 p16<sup>INK4</sup>基因的结构与其功能的关系及鹿亚科动物细胞生长与发育的调控机制,有利于开展动物保护生物学研究.

hum	-----	-----	-----	-----	-----	CAGGTCATGA
ela	ACTTGCGGTC	TNCAAGTTGA	ANGGNGGCTA	TGAAATTCTG	TTNTCTCTGG	CANGTCATGA
hum	TGATGGGCAG	CGCCCCGAGTG	GC-GGAGCTG	CTGCTGCTCC	ACGGCGCGGA	GCCCCAACTGC
ela	TGATGGGCAG	CGGCCCGATG	GCAAGGAGCTG	CTGCTGCTCC	ACGGCGCGGA	GCCCCAACTGC
		*    ***	*			
hum	GCCGACCCCG	CCACTCTCAC	CCGACCCGTG	CACGACGCTG	CCCGGGAGGG	CTTCCTGGAC
ela	GCCGACCCCG	CCACTCTCAC	CCGACCCGTG	CACGACGCTG	CCCGGGAGGG	CTTCCTGGAC
hum	ACGCTGGTGG	TGCTGCACCG	GGCCGGGGCG	CGGCTGGACG	TGCGCGATGC	CTGGGGCCGT
ela	ACGCTGGTGG	TGCTGCACCG	GGCCGGGGCG	CGGCTGGACG	TGCGCGATGC	CTGGGGCCGT
hum	CTGCCCCGTGG	ACCTGGCTGA	GGAGCTGGGC	CATCGCGATG	TCGCACGGTA	CCTGCGCGCG
ela	CTGCCCCGTGG	ACCTGGCTGA	GGAGCTGGGC	CATCGCGATG	TCGCACGGTA	CCTGCGCGCG
hum	GCTGCGGGGG	GCACCAGAGG	CAGTAACCAT	GCCCCCATAG	ATGCCGCGGA	AGGTCCCTCA
ela	GCTGCGGGGG	GCACCAGAGG	CAGTAACCAT	GCCCCCATAG	ATGCCGCGGA	AGGTCCCTCA
hum	GA-----	-----	-----	-----	-----	---
ela	GGTGAGGACT	GATGATCTGA	GAATTTGTAC	CCTGAGAGCT	TCCAAAGCTG	AGA

ela 毛冠鹿 ; hum 人 ; 下划线表示 exon2 区域 ; \* 表示差异性  
图 2 毛冠鹿与人的 p16<sup>INK4</sup> exon 2 序列的比较分析

[ 参考文献 ]

[ 1 ] Serrano M ,Hannon G J ,Beach D ,et al . A New Regulatory Motif in Cell Cycle Control Causing Specific Inhibition of Cyclin D/CDK[ J ]. Nature ,1994 366 : 704—707 .  
[ 2 ] Kamb A ,Gruis N A ,Weaver-Feldhaus J ,et al . A Cell Cycle Potentially Involved in Genesis of Many Tumor Types [ J ]. Science ,1994 264 436—440 .  
[ 3 ] Norbori T ,miura K ,Wu D J ,et al . Deletion of Cyclin Dependent Kinase-4 Inhibitor Gene in Multiple Human Cancer [ J ]. Nature ,1994 368 : 753—756 .  
[ 4 ] Naruse I ,Heike Y ,Hama S ,et al . High Concentrations of Recombinant Adenovirus Expressing p16 Gene Induces Apoptosis in Lung Cancer Cell Line[ J ]. Anticancer Res ,1999 18( 6A ) : 4275—4282 .  
[ 5 ] Quelle D E ,Ashmun R A ,Hannon G J ,et al . Cloning and Characterization of Murine p16<sup>INK4a</sup> and p15<sup>INK4b</sup> genes[ J ]. Oncogene ,1995 11 : 635—645 .  
[ 6 ] Herzog C R ,Soloff E V ,McDoniels A L ,et al . Homozygous Codeletion and Differential Decreased Expression of p15<sup>INK4b</sup> p16<sup>INK4a-alpha</sup> and p16<sup>INK4a-beta</sup> in Mouse Lung Tumor Cell[ J ]. Oncogene ,1996 13 : 1885—1891 .

( 下转 87 页 )

(上接 82 页)

- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis. Molecular Cloning : A Laboratory Manual[ J ]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.
- [8] 金顺钱, 彭琼, 陆士新, 等. 食管癌组织中 MTS1/P16 基因的缺失[ J ]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20( 1 ) : 9—11.
- [9] Quelle D E, Zindy F, Ashmun R A, *et al.* Alternative Reading Frames of the INK4a Tumor Suppressor Genes Encode Two Unrelated Proteins Capable of Inducing Cell Cycles Arrest[ J ]. Cell, 1995, 83 : 993—1000.
- [10] Zindy F, Quelle D E, Roussel M F, *et al.* Expression of the p16<sup>INK4</sup> Tumor Suppressor Versus Other INK4 Family Members during Mouse Development and Aging[ J ]. Oncogene, 1997, 15( 2 ) : 203—211.

## Analysis of p16<sup>INK4</sup> Gene Exon 2 in *Elaphodus Cephalophus*

Cao Xiangrong, Wang Ying, Li Shufeng, Chen Tao, Zhang Xiran

( School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, PRC )

**Abstract :** The DNA fragment containing exon 2 of p16<sup>INK4</sup> gene was cloned by PCR method from *Elaphodus cephalophus* genomic DNA. Southern blotting and sequencing analysis showed there was very high homology ( 98.4% ) of p16<sup>INK4</sup> gene exon 2 between them. The exon 2 region is very conservative, it plays an important role in the function of p16<sup>INK4</sup> gene.

**Key words :** *Elaphodus cephalophus*, p16<sup>INK4</sup> gene, exon, sequence

[ 责任编辑: 孙德泉 ]