

PML 分子不同剪接体的分型及其应用

沈宇清, 夏 梅, 缪凤琴, 谢 维, 张建琼

(东南大学医学院遗传与发育生物学系, 发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 早幼粒细胞白血病 (Promyelocytic Leukemia PML) 基因位于 15 号染色体, 含有 9 个外显子, 通过对内含子不同的剪接方式产生 7 大类 20 余种不同的 PML 剪接体. 为对 PML 不同剪接体进行分型, 针对 PML 各剪接体 C 末端设计 5 对型特异性引物, 通过 PCR 扩增产物的有无及大小来判断 PML 分子的型别. 利用设计的引物, 通过对已知类型的 PML 质粒进行分型, 确定了分型引物的可行性. 对一株肝癌细胞系 QGY 7701 中表达的 PML 分子进行分型, 发现其为 PML 剪接体 IV 型与 II 型的混合型. 研究表明, 利用所设计 5 对引物的扩增, 可以判断出某种组织或细胞中表达的 PML 分子剪接体类型.

[关键词] PML 基因, 剪接体, PCR

[中图分类号] R 735.7 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)03-0088-05

Isolation Different PML Isoform by PCR Analysis

Shen Yuqing Xia Mei Miao Fengqing Xie Wei Zhang Jianqiong

(The Key Laboratory of Developmental Genes and Human Disease Ministry of Education Department of Genetics and Developmental Biology
Southeast University Medical School Nanjing 210009 China)

Abstract PML (Promyelocytic Leukemia) gene is located on chromosome 15 and composed of nine exons. More than twenty different PML isoforms have been discovered and categorized into seven groups by different splicing pattern. In order to identify different isoforms of the individual groups, five pairs of primer were designed to be used for isoform-specific PCR amplification according to the sequences at the C-terminal of PML gene. Analysis of the different isoforms was based on the presence and the size of the PCR product amplified by using all the five pairs of primers. Control experiment was done by analysis of a pcDNA3.1-GFP-PML plasmid which is known to be PMLIV. In addition, PML isoform in a liver cancer cell line QGY 7701 was determined to be a mixture of PMLII and PMLIV by the same way. In conclusion, PML isoform of the seven groups can be classified by simply PCR amplification using the designed five pairs of primers.

Key words PML gene, isoform, PCR

早幼粒细胞白血病 (Promyelocytic Leukemia PML) 基因是从具有特征性 $t(15; 17)$ 易位的急性早幼粒细胞白血病 (Acute Promyelocytic Leukemia APL) 中分离克隆并加以命名的基因. 在 70% ~ 100% APL 病例中, PML 基因与 17 号染色体上的维甲酸受体 α (Retinoid receptors alpha, RAR α) 基因发生融合, 表达 PML-RAR α 融合蛋白. PML-RAR α 融合蛋白通过失活 PML 蛋白的功能和干扰正常 RAR α 的信号转导而引起急性早幼粒白血病的发生^[1].

迄今为止, 人们已发现 PML 蛋白具有抗病毒活性, 能够抑制肿瘤的生长, 参与造血祖细胞分化, 调节基因转录, 诱导细胞凋亡等多种生物学功能^[2]. 编码 PML 蛋白的基因位于 15 号染色体上, 长约 35 kb 含有 9 个外显子^[3]. 由于对内含子的剪接方式不同, PML 基因有多种 mRNA 表达产物, 最终产生不同的 PML 蛋白分子. 至目前为止, 已有 20 余种不同的 PML 剪接体类型被报道. 剪接所产生的各种 PML 蛋白因与不同的细胞内蛋白相互作用, 具有各自独特的生物学功能. 对不同细胞及组织中的 PML 剪接体进行分型, 了

收稿日期: 2009-05-04

基金项目: 国家自然科学基金 (编号 30371311).

通讯联系人: 张建琼, 博士, 教授, 研究方向: 免疫遗传学与病原生物学. E-mail: zhjq@seu.edu.cn

解各型 PML分子的表达量,有助于了解 PML分子在该组织中发挥的特定作用. 基于此,本文针对 PML不同的剪接体设计 5对型特异性引物. 通过简单的 PCR 扩增,分析 PCR 产物的有无及大小就可以基本判断该组织或细胞中所表达的 PML分子剪接体型别.

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞系 QGY7701 构自中科院上海细胞所. 质粒小量制备采用 Q IAGEN 公司 Q Iaprep Spin Mini prep K it 逆转录试剂购自 promega 公司, PCR 扩增试剂购自 Invitrogen 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

肝癌细胞系 QGY7701在含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640培养液中, 37℃, 5% CO₂ 培养. 每隔 2~ 3 d 传代 1次.

1.2.2 质粒提取及鉴定

已知分型为 PML IV 型的 pDNA3. 1-GFP-PML IV 为 Silvia Bruno博士惠赠. 利用获得的质粒转化 DH 5α 大肠杆菌, 在 Amp⁺ LB培养板上挑取阳性菌落, 接种于 3 mL Amp⁺ LB 培养液中, 振荡培养过夜. 利用碱裂解法, 按照 Q Iaprep Spin Mini prep K it说明书进行质粒小量制备. 已制备纯化后的质粒用限制性内切酶 *HindIII*和 *EcoRI*酶切鉴定.

1.2.3 引物设计

PML基因含有 9 个外显子, 由于剪接方式不同产生 20 余种不同剪接体, 根据 Kirsten Jensen^[4]报道这些剪接体可归纳为 7 大型别: PML I- VII 它们 N 端结构基本相同, 差异主要存在于 C 端结构, 如图 1 所示.

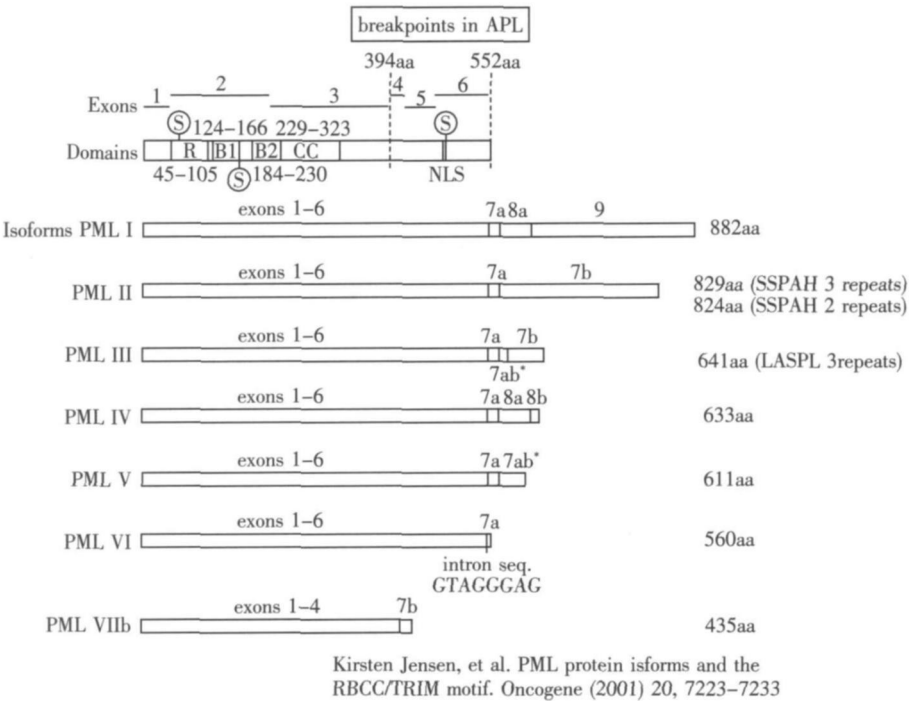


图 1 PML 分型示意图

Fig.1 PML isoforms

根据上图设计 PML分型引物,除 PML IV Ib之外,其余各型都包含外显子 1~ 6和外显子 7a 据此,将上游引物设计在共有序列部分即 7a 下游序列则分别根据不同剪接型 C 末端独特序列设计. 引物序列见结果部分.

1.2.4 细胞总 RNA 提取

细胞总 RNA 制备采用 T rizo l提取法,加入等体积异丙醇沉淀,用 75% 乙醇洗涤,晾干沉淀后加入 50

μL 左右无 RNase 水, 然后用 DU 70 紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度.

1. 2. 5 逆转录

取 5 μL 纯化后的细胞总 RNA (1 μg) 加入 2 μL Oligo(dT) 18 补无 RNase 水至 12. 5 μL, 70℃ 变性 10 m in, 迅速置于冰上 5 m in, 按以下次序在 Eppendorf 管内分别加入各反应成分: 5 × MMLV buffer 4. 0 μL, 10 mmol/L dNTP 2. 0 μL, RNase 抑制剂 0. 5 μL, MMLV 1 μL, 37℃ 温育 1 h, 93℃ 10 m in 以灭活 MMLV, 立即冰浴, - 20℃ 保存.

1. 2. 6 PCR 扩增

根据上述设计引物进行 PCR 扩增. PCR 反应体系为: 10 × pfu Taq buffer 2. 5 μL, 2. 5 mmol/L dNTP 2. 0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2. 0 μL, 50 pmol/μL 上下游引物各 0. 5 μL, cDNA 模板 1. 0 μL, pfu Taq 酶 0. 3 μL. PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 5 m in, 然后 94℃, 1 m in; 55~ 58℃ (不同引物退火时间各异), 30 s; 68℃, 30 s 共 35 个循环周期; 最后 68℃, 延伸 10 m in. 取 5 μL PCR 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶, 100 V 电压电泳 15 m in, 检查扩增产物, 紫外观察仪观察, 凝胶成像处理系统扫描成像.

2 结果

2. 1 引物设计

按照图 1 对 PML 剪接体的分类进行引物设计, 引物如表 1 所示, 结果判断标准如表 2 所示.

表 1 PML 剪接体分型引物表		表 2 PML 剪接体分型引物表								
Table 1 Primers designed for analysis of PML isoforms		Table 2 The absence/presence and the size of the PCR products amplified by using PML isoform specific primers								
扩增基因	引物序列	PML								
		I	II	III	IV	V	VI	VII		
7a up	5' - GGT CAT CAA GAT GGA GCT CTG - 3'	(1)	7a up	237 bp	237 bp	237 bp	237 bp	237 bp	245 bp	(-)
7a down	5' - AT CTG A GT CT TCC GAG CTG C - 3'		7a down							
7a up	5' - GGT CAT CAA GAT GGA GCT CTG - 3'	(2)	7a up	(-)	359 bp	400 bp	(-)	1 000 bp	367 bp	(-)
7b down	5' - TG TGT CT CAG CAG AGA CTG - 3'		7b down							
7a up	5' - GGT CAT CAA GAT GGA GCT CTG - 3'	(3)	7a up	279 bp	(-)	(-)	279 bp	(-)	(-)	(-)
8a down	5' - A CTG CT GCT GTC AT CCA GC - 3'		8a down							
7a up	5' - GGT CAT CAA GAT GGA GCT CTG - 3'	(4)	7a up	425 bp	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9 down	5' - GCA GCC AG CT GGT AAT C - 3'		9 down							
7a up	5' - GGT CAT CAA GAT GGA GCT CTG - 3'	(5)	7a up	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	215 bp	(-)
6 down	5' - AAC GCG TT C CT CT CCA C - 3'		6 down							

2. 2 肝癌细胞系中 PML 分型检测

制备 pDNA3. 1-GFP-PMLIV 质粒, 探索分型引物的扩增条件, 鉴定用此引物分型的可行性. 如图 2A 所示: 扩增结果为引物对 (1)、(3) 阳性. 根据表 2 判断应为 PMLIV 型, 与质粒本身型别相符. 提取肝癌细胞系 QGY-7701 细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA, 按照相同的条件扩增, 结果如图 2B 所示, QGY-7701 为引物对 (1)、(2)、(3) 扩增阳性. 并且利用引物对 (2) 进行扩增, 其产物大小为 350 bp 左右, 根据表 2 判断其为 PMLIV 型与 PMLII 型的混合型.

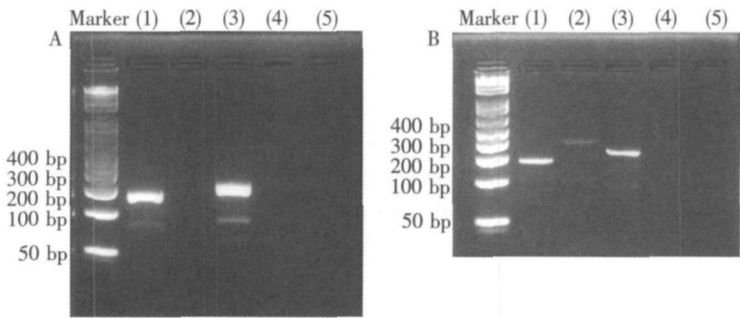


图 2 型特异性引物分析肝癌细胞 QGY-7701 中的 PML Isoform
Fig.2 Detection and analysis of PML isoforms in QGY-7701 liver cancer cells

图 A 利用 pDNA3.1-GFP-PMLIV 质粒扩增, 其结果为引物对 (1)、(3) 阳性, 根据表 2 判断应为 PMLIV 型. 图 B 利用 QGY-7701 细胞 cDNA 扩增, 其结果为引物对 (1)、(2)、(3) 阳性, 根据表 2 判断其为 PMLIV 型与 PMLII 型的混合型.

3 讨论

PML 蛋白定位于细胞内核体部分, 是一个大的多功能蛋白复合体的组成成分. 编码 PML 蛋白的基因位于 15 号染色体上, PML 基因全长约 35 kb, 含有 9 个外显子. 由于剪接方式的不同, PML 存在多种多样的转录剪接本, 因此其表达的蛋白的相对分子质量也从 48 000 至 97 000 大小不等. Kirsten Jensen 等总结了已发表的 PML 转录剪接本, 将其分为 7 种类型, 给予统一命名. 然而至今, 仍然没有比较简单的对 PML 剪接体进行分型的方法被报道.

根据 PML 分子结构进行分析, 所有 PML 转录剪接本都具有同样的 N 端结构: 即一个“环指”结构域、两个锌指样和一个卷曲螺旋结构域, 总称 RBCC 或 TRM 结构域. 对于 PML 蛋白来说, 这个结构域的存在对 PML 核体结构的形成, PML 同异二聚体结合以及 PML 蛋白发挥抑制细胞生长, 促进细胞凋亡等作用至关重要^[5]. RBCC 结构域由外显子 1 至外显子 3 编码, 外显子 4 至外显子 6 则编码 PML 的核定位信号. 由于这两个结构域对 PML 分子的功能至关重要, 因此大部分 PML 转录剪接本都含有外显子 1 到外显子 6 的序列, 而它们的差异主要表现在 C 末端序列的不同. 因此本实验的设计思路为: 将上游引物设计在共有序列部分即 7a 下游序列则分别根据不同 PML 剪接型独特序列设计, 然后根据扩增产物的有无及产物的大小即可对 PML 剪接体进行分型. PMLV III 型, 因为只有外显子 1 到外显子 4 的序列, 所以应用所有的引物都不能扩出条带. 因此根据这个设计方法, 可以基本判断出某种组织或细胞中所表达的 PML 分子的剪接体类型. 然而根据报道, 所有的 PML 转录剪接本每一型均另有 a、b、c 三个亚型, 分别代表这一型的转录剪接本缺乏外显子 5 缺乏外显子 5 和 6 以及缺乏外显子 4、5、6 的剪接变体序列^[6]. 由于 PML 的核定位信号位于外显子 4、5、6 中, 所以这些亚型的转录剪接本不同于正常的 PML 蛋白, 只能定位于细胞浆中, 且它们的功能尚未知. 但由于本文所报道的分型方法是将上游引物设计在外显子 7a, 所以这些亚型的转录剪接本均不能被扩增出来. 因此, 当所有的引物均不能扩增出相应位置的条带, 说明有可能是 PMLV III 型, 但也有可能是 PMLI-V 型的亚型, 判断这些 PML 亚型需要更进一步实验分析.

不同 PML 蛋白剪接型功能相差很大, 这与 PML 各型的基因序列不同, 蛋白结构各异, 与之相互作用的蛋白有差别有关. 关于特异性的 PML 蛋白剪接型功能, 报道较多的是 PMLIV 型分子. 它可以通过募集 p53 分子入 PML 核体而调节 p53 分子活性, 从而影响一系列下游的信号传导通路^[7]. 也有报道发现在肿瘤组织和细胞中, PMLIV 能够上调 HLA I 类分子的重链以及加工分子的表达从而影响细胞表面 HLA I 分子复合物的表达量^[8]. 此外, PMLIV 型分子还可以结合组蛋白去乙酰化酶 (Histone Deacetylase, HDAC), 从而发挥转录抑制作用. 而 PMLV I 型或者是 PML-RAR α 融合蛋白则与 HDAC 的结合能力大大低于 PMLIV 型分子^[9]. 因此, 在 APL 病人中, 如果表达 PML-RAR α 重组蛋白, 这种转录抑制的作用被破坏, 这将导致受 HDAC 调节的一系列的基因表达改变, 最终导致白血病的发生^[10]. 因此, 对不同细胞及组织中的 PML 不同剪接体进行分型, 将有助于推测 PML 蛋白在该组织中可能发挥的作用. 此外, PML 不同剪接体在各组织细胞中的表达量也鲜有报道. 如果应用型特异性的引物进行实时荧光定量 PCR 分析, 就能检测出 PML 不同剪接体在不同组织细胞中的表达量.

总之, 本文运用相对简单的 RT-PCR 方法, 通过 5 对引物的扩增, 可以大致判断某种组织或细胞中 PML 分子表达的型别. 通过对不同组织细胞中 PML 剪接体型的质与量的分析, 有利于进一步阐明这种具有多种生物学功能的 PML 分子在某种特定组织细胞中的具体作用.

(下转第 98 页)

- protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254
- [18] Hanning G, Makrides S C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(2): 54-60
- [19] Okada H, Sekiya T, Yokoyama K, et al. Efficient secretion of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of its products[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 301-308
- [20] Takashima S, Iikura H, Nakamura A, et al. Overproduction of recombinant *Trichoderma reesei* cellulases by *Aspergillus oryzae* and their enzymatic properties[J]. J Biotechnol, 1998, 65: 163-171
- [21] Macarón R, Acebal C, Castillón M P, et al. Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*[J]. Biochem J, 1993, 289: 867-873

[责任编辑: 孙德泉]

(上接第 91 页)

[参考文献]

- [1] Grignani F, Fagioli M, Alcalá M, et al. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment[J]. Blood, 1994, 83(1): 10-25
- [2] Sakonji R, Ferguson B J, Wyllie A H, et al. New insights into the role of PML in tumour suppression[J]. Cell Res, 2008, 18(6): 622-640
- [3] Zimmer A, Nguyen Q D, Gespach C. Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease[J]. Cell Signal, 2004, 16(10): 1085-1104
- [4] Jensen K, Shields C, Freement P S, et al. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif[J]. Oncogene, 2001, 20(49): 7223-7233
- [5] Bernardi R, Papa A, Pandolfi P P. Regulation of apoptosis by PML and the PML-NB s[J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6299-6312
- [6] Fagioli M, Alcalá M, Pandolfi P P, et al. Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms[J]. Oncogene, 1992, 7(6): 1083-1091
- [7] Liu J H, Liu C C, Yen C C, et al. Pml and TAp73 interacting at nuclear body mediate inatinib-induced p53-independent apoptosis of chronic myeloid leukemia cells[J]. Int J Cancer, 2009, 125(1): 71-77
- [8] Xia M, Zhang J Q, Shen Y Q, et al. Concordant expression of proto-oncogene promyelocytic leukemia and major histocompatibility antigen HLA class I in human hepatocellular carcinoma[J]. Tissue Antigens, 2007, 70(4): 272-282
- [9] Wu W S, Vallian S, Seto E, et al. The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(7): 2259-2268
- [10] Matsushita H, Scaglioni P P, Bhaumik M, et al. In vivo analysis of the role of aberrant histone deacetylase recruitment and RAR alpha blockade in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia[J]. J Exp Med, 2006, 203(4): 821-828

[责任编辑: 孙德泉]