

# 人地中海贫血基因 $\beta 654$ 的克隆与序列分析

方小武, 曾瑞萍, 胡 彬

(中山医科大学遗传教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:** 【目的】克隆人地中海贫血基因  $\beta 654$  并进行序列分析, 为下游转基因小鼠模型的建立奠定工作基础。【方法】以 PCR 法扩增获得人  $\beta 654$  基因, 将其克隆入卸除了人  $\beta$  基因的质粒 pBGT51 中, 酶切、反向点杂交及测序法鉴定重组质粒。【结果】所构建的重组质粒中含人  $\beta 654$  基因, 其引入方向正确, 序列分析结果正确。【结论】构建所得的重组质粒可用于下游的转基因工作。

关键词: 地中海贫血; 克隆; 分子; 序列分析; DNA

中图分类号: R459.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0174-03

## Cloning and Sequencing of the Human Thalassemic Gene $\beta 654$

FANG Xiao-wu, ZENG Rui-ping, HU Bin

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】In order to establish the foundation for transgenic mouse model, the human thalassemic gene ( $\beta 654$ ) was cloned and sequenced. 【Methods】The human  $\beta 654$  gene was amplified by PCR, and cloned into the plasmid BGT51 in which the human  $\beta$  gene was cut out beforehand. The recombinant plasmid was certified by enzyme-digestion, reverse dot hybridization and sequencing. 【Results】A recombinant plasmid was obtained, which contained the human  $\beta 654$  gene in the correct recombinant direction. Sequencing showed that the cloned insert was correct. 【Conclusions】The recombinant plasmid constructed is useful for establishing a transgenic mouse.

**Key words:** thalassemia; cloning, molecular; sequencing analysis, DNA

作为遗传性疾病的一种新型治疗模式, 人类的基因治疗目前尚处于试验研究阶段。由于社会伦理道德的限制, 在进入临床实验以前, 具体的每一个基因治疗方案都需要先在离体细胞模型或转基因动物模型上获得安全性和有效性的验证<sup>[1]</sup>。基于此, 离体细胞模型或转基因动物模型的获得就成为了实施基因治疗方案的先决条件之一。 $\beta$ 珠蛋白基因第二内含子中第 654 位核苷酸的 C→T 点突变( $\beta 654$ )是中国人最常见的  $\beta$  地中海贫血突变类型之一。针对这种剪接缺陷性的基因突变, 反义 RNA 基因治疗途径已在非细胞体系和离体细胞培养系统中显示出了它的潜在应用价值<sup>[2,3]</sup>。由于

相应的转基因小鼠在国外刚建立不久<sup>[4]</sup>, 而国内又无现成的转基因动物模型可供利用, 目前未见反义 RNA 基因治疗途径(针对剪接缺陷性基因突变)在体内应用研究的报道。为建立相应的转基因小鼠模型, 我们克隆人地中海贫血基因( $\beta 654$ ), 并进行了序列分析, 为后续的下流工作奠定物质基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Pyrobest<sup>TM</sup> DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoRI 和 NaeI 内切酶购自大连宝生物公司;

收稿日期: 2001-03-05

基金项目: 广东省卫生厅五个一重点科研基金资助项目(202009); “211 工程” 资助项目(201038)

作者简介: 方小武(1968-), 男, 广东潮州人, 博士生, 曾瑞萍, 导师。

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

*Acc* 65 I 和 *Nde* I 内切酶、UNIQ-5 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司。

## 1.2 基因组 DNA 制备

采集  $\beta$ 654 纯合子患者外周血,按常规法制备 DNA。

## 1.3 $\beta$ 654 基因的 PCR 扩增

引物设计参照 GenBank 中正常人  $\beta$  珠蛋白基因序列,上游引物:5'-GTA CGG CTG TCA TCA CTT AGA CCT CA-3',下游引物:5'-AAG GAA CAC TTC AGG GGA AAG G-3'。扩增片段长 2 127 bp,在标准序列 HUM HBB 中为从 62 007 bp 到 64 134 bp 位置。PCR 反应参数为:97 °C 变性 10 min 后,94 °C 20 s、62 °C 40s、72 °C 2 min,共 30 个循环。从电泳凝胶中回收扩增片段。

## 1.4 $\beta$ 654 基因的克隆

基础质粒 pBGT51 由加拿大多伦多儿童医院的 James Ellis 博士赠送。质粒含 pUC 基本骨架,另含 3.0 kb 的人  $\beta$ LCR 及 4.2 kb 的正常人  $\beta$  珠蛋白基因( $\beta$  基因),全长约 10 kb。 $\beta$  基因两侧有单一酶切位点 *Asp* 718(*Acc* 65 I)和 *Nde* I。经 *Acc* 65 I 和 *Nde* I 双酶切后可将  $\beta$  基因卸下。以平端连接方式将 PCR 扩增所得  $\beta$ 654 基因导入卸除了  $\beta$  基因的质粒 pBGT51 中,转化感受态大肠杆菌 DH5  $\alpha$ ,经氨苄青霉素筛选后,挑取单菌落少量扩增,以碱裂解法制备质粒<sup>[5]</sup>。

## 1.5 重组质粒的鉴定

以 *Eco*RI 和 *Nae*I 次递双酶切,确认酶切片段的大小。外源插入片段经 PCR 扩增后,反向点杂交确认 C $\rightarrow$ T 点突变的存在。对  $\beta$ 654 基因以 ABI PRISM BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 自动测序。

# 2 结果

## 2.1 重组质粒的酶切

重组质粒长约 7.9 kb,经 *Eco*RI 和 *Nae*I 次递双酶切后,产生 3 种长度片段:4.5 kb、2.7 kb 和 0.7 kb(3.8 kb 产物的出现为酶切不完全的结果,表现为弱条带),说明  $\beta$ 654 基因在卸除了  $\beta$  基因的质粒 pBGT51 中的导入方向为 3' 到 5',与  $\beta$ LCR 的方向相同(图 1)。

## 2.2 重组质粒的反向点杂交

反向点杂交显示重组质粒中含有 C $\rightarrow$ T 点突

变(图 2)。

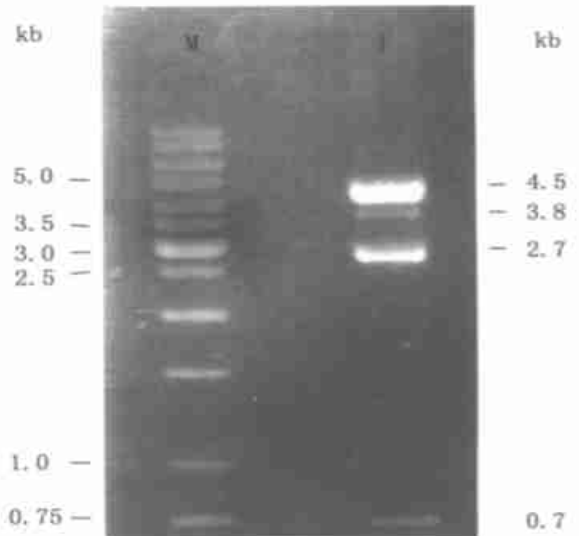


图 1 重组质粒的 *Eco*RI 和 *Nae*I 双酶切产物

Fig. 1 Products of the recombinant plasmid enzyme-digested by *Eco*RI and *Nae*I

M. DNA markers(0.5 kb, 0.75 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 8 kb, 10 kb); 1. Enzyme-digested products(0.7 kb, 2.7 kb, 3.8 kb and 4.5 kb)

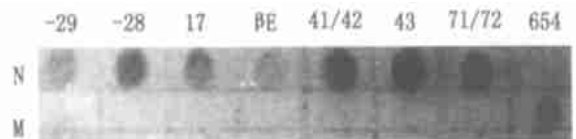


图 2 重组质粒的反向点杂交

Fig. 2 Reverse dot hybridization of the recombinant plasmid

N. normal; M. mutation; The arrow showed mutation C $\rightarrow$ T

## 2.3 人 $\beta$ 654 基因的测序

测序结果(图 3),与 GenBank 中序列对照,第二内含子中的 C $\rightarrow$ T 点突变来自患者,基因编码区 3' 端下游的 C $\rightarrow$ CC 为正常人群中的一种碱基多态性<sup>[GenBank, 9]</sup>。

# 3 讨论

针对剪接缺陷性的基因突变( $\beta$ 654),反义 RNA 基因治疗途径已在非细胞系统及离体细胞培养体系中显示出了它的潜在应用价值<sup>[1~3]</sup>,进一步的活体治疗研究需要有相应的动物模型支持。基于此,我们克隆人  $\beta$ 654 基因,为建立相应的转基因小鼠模型进行外源基因准备。

基础质粒 pBGT51 为在质粒 Litmus 38(New England Biolabs)的 *Eco*RV 位点上导入外源转录单位构建而成。外源单位包括 3.0 kb 的  $\beta$ LCR 和

```

1      TGTGGAGCCA CACCCTAGGG TTGGCCAATC TACTCCCAGG AGCAGGGAGG GCAGGAGCCA GGGCTGGGCA TAAAAGTCAG
91     GGCAGAGCCA TCTATTGCTT ACATTGCTT CTGACACAAC TGTGTTCACT AGCAACCTCA AACAGACACC ATGGTGACC
171    TGACTCCTGA GGAGAAGTCT GCCGTTACTG CCCTGTGGGG CAAGGTGAAC GTGGATGAAG TTGGTGGTGA GGCCCTGGGC
251    AGGTTGGTAT CAAGGTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAAAAGT GGCATGTGGA GACAGAGAAG ACTCTTGGGT
331    TTCTGATAGG CACTGACTCT CTCTGCCTAT TGGTCTATTT TCCCACCCTT AGGCTGCTGG TGGTCTACCC TTGGACCAG
411    AGGTTCTTTG AGTCCTTTGG GGATCTGTCC ACTCCTGATG CTGTTATGGG CAACCCTAAG GTGAAGGCTC ATGGCAAGAA
491    AGTGCTCGGT GCCTTTAGTG ATGGCCTGGC TCACCTGGAC AACCTCAAGG GCACCTTTGC CACACTGAGT GAGCTGCACT
571    GTGACAAGCT GCACGTGGAT CCTGAGAACT TCAGGGTGG TCTATGGGAC CCTGTATGTT TTCTTTCCCC TTCTTTTCTA
651    TGGTTAAGTT CATGTCATAG GAAGGGGAGA AGTAACAGGG TACAGTTTAG AATGGGAAAC AGACGAATGA TTGCATCAGT
731    GTGGAAGTCT CAGGATCCTT TTAGTTTCTT TTATTTGCTG TTCATAACAA TTGTTTCTT TTGTTTAAAT CTTGCTTCT
811    TTTTTTTTCT TCTCCGCAAT TTTTACTATT ATACTTAATG CCTTAACATT GTGTATAACA AAAGGAAATA TCTCTGAGAT
891    ACATTAAGTA ACTTAAAAAA AAACCTTACA CAGTCTGGCT AGTACATTAC TATTTGGAAT ATATGTGTGC TTATTTGCAT
971    ATTCATAATC TCCCTACTTT ATTTTCTTTT ATTTTAAATT GATACATAAT CATTATACAT ATTTATGGGT TAAAGTGTA
1051   TGTTTTAAATA TGTGTACACA TATTGACCAA ATCAGGGTAA TTTTGCATTT GTAATTTTAA AAAATGCTTT CTCTTTTAA
1131   TATACTTTTT TGTTTATCTT ATTTCTAATA CTTTCCCTAA TCTCTTTCTT TCAGGGCAAT AATGATACAA TGTATCATGC
1211   CTCTTTGCAC CATTCTAAAG AATAACAGTG ATAATTTCTG GGTAAAGGTA ATAGCAATAT TTCTGCATAT AAATATTTCT
1291   GCATATAAAT TGTAAGTATG GTAAGAGGTT TCATATTGCT AATAGCAGCT ACAATCCAGC TACCATTCTG CTTTTATTTT
1371   ATGGTTGGGA TAAGGCTGGA TTATTCTGAG TCCAAGCTAG GCCCTTTTGC TAATCATGTT CATACCTCTT ATCTTCTCTCC
1451   CACAGCTCCT GGCACAACGT CTGGTCTGTG TGCTGGCCCA TCCCTTTGGC AAAGAATTCA CCCCACGAGT GCAGGCTGCC
1531   TATCAGAAAG TGGTGGCTGG TGTGGCTAAT GCCCTGGCCC ACAAGTATCA CTAAGCTCGC TTTCTTGCTG TCCAATTTCT
1611   ATTAAAGGTT CCTTTGTTC CTAAGTCAA CTAATAACT GGGGGATATT ATGAAGGGCC TTGAGCATCT GGATTCCTGCC
1691   TAATAAAAAA CATTATTTT CATTGCAATG ATGTATTTAA ATTATTTCTG AATATTTTAC TAAAAAGGGA ATGTGGGAGG
1771   TCAGTGCATT TAAAACATAA AAGAAATGAA AGCTAGTTCA AACCTTGGGA AAATACACTA TATCTTAAAC TCCATGAAAG
1851   AAGGTGAGGC TGCAAACAGC TAATGCACAT TGGCAACAGC CCCTGATGCC TATGCCTTAT TCATCCCTCA GAAAAGGATT
1931   CAAGTAGAGG CTTGATTGG AGGTTAAAGT TTTGCTATGC TGTATTTTAC ATTACTTATT GTTTTAGCTG TCCTCATGAA
2011   TGTCTTTTCA CTACCCATTT GCTTATCTG CATCTCTCAG CCTTGACTCC ACTCAGTTCT CTGTC

```

图3 重组质粒中人 $\beta 654$ 基因的测序结果

Fig. 3 Result of sequencing of the human  $\beta 654$  gene in the recombinant plasmid

Compared with GenBank, there were two point mutations in the  $\beta 654$  gene. 1: Mutation C $\rightarrow$ T; 2: Mutation C $\rightarrow$ CC

4.2 kb 的  $\beta$  基因。其中的  $\beta$ LCR 区段由 HS4 (*Std* 560-*SpeI* 1 709)、HS3 (*Sad* 4 280-*PvuII* 5 130) 和 HS2 (*SmaI* 8 225-*StuI* 9 180) 3 个核心元件所构成, 与 4.2 kb 的  $\beta$  基因一起, 共 7.2 kb 的外源片段导入转基因小鼠体内后, 结构基因的表达水平可达 45% (个人通讯, James Ellis, 1999 年 10 月)。我们以 PCR 法扩增获得人  $\beta 654$  基因, 在长约 2 127 bp 的片段中包含了基因的启动子、所有内含子及外显子, 导入切除了  $\beta$  基因的质粒 pBGT51 中, 取代  $\beta$  基因在质粒中的原有位置, 其目的是借助质粒 pBGT51 中的  $\beta$ LCR 区段 (为增强子), 以使  $\beta 654$  基因在转入小鼠体内后尽可能获得较高水平的表达。 $\beta 654$  基因内含有 *EcoRI* 切点 1 个, 正向连接 (与  $\beta$ LCR 同向, 且位于其下游) 后, 重组质粒经 *EcoRI* 和 *NaeI* 双酶切, 产物将产生 4.5 kb、2.7 kb 和 0.7 kb 3 种片段。结果图 1 显示, 重组质粒酶切产物的片段大小与预期值相符 (3.8 kb 片段的出现为酶切不完全的结果, 表现为弱条带)。由于  $\beta 654$  基因是以 PCR 法扩增所得, 为排除碱基错误掺入所造成的突变, 我们对重组质粒中的  $\beta 654$  基因进行了序列分析, 结果显示, 除第二内含子中的 C $\rightarrow$ T 点突变来自患者以外, 基因编码区 3' 端下游的 C $\rightarrow$ CC 为正常人群中的一种碱基多态

性<sup>GenBank, 9</sup>。鉴定结果说明, 我们所构建的重组质粒正确, 可用于下游的转基因工作。

(加拿大多伦多儿童医院的 James Ellis 博士惠赠质粒 BGT51, 特此致谢)

#### 参考文献:

- [1] 顾小锋, 曾溢滔. 人类疾病转基因小鼠模型在基因治疗研究中的作用[J]. 生物工程进展, 1998, 18(1): 27.
- [2] Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 8673.
- [3] Sierakowska H, Sambade M L, Agrawal S, et al. Repair of thalassemic human  $\beta$ -globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 12840.
- [4] Lewis J, Yang B L, Lim R, et al. A common human  $\beta$ -globin splicing mutation modeled in mice[J]. Blood, 1998, 91(6): 2152.
- [5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 107~110, 264~292.
- [6] Law N R M, Efstratiadis A, O'Connell C, et al. The nucleotide sequence of the  $\beta$ -globin gene[J]. Cell, 1980, 21: 647.

(编辑 张敏瑞)