

# 创伤后增生性疤痕中 $\alpha 1(I)$ 及(III)型前胶原基因片段的克隆及鉴定

朱家源<sup>1</sup>, 徐兵<sup>2</sup>, 苏爱云<sup>1</sup>, 郭浩光<sup>1</sup>, 朱斌<sup>1</sup>, 唐庆<sup>1</sup>

(1. 中山医科大学附属第一医院烧伤外科, 广东广州 510080; 2. 南方医院, 广东广州 510515)

**摘要:** 【目的】胶原蛋白是构成细胞外基质的主要组分之一, 它的过量沉积是创伤后增殖性疤痕形成的原因之一, 本实验的目的就是要克隆出疤痕中  $\alpha 1(I)$  型及(III)型前胶原基因片段并进行鉴定。【方法】本研究根据  $\alpha 1(I)$  型及(III)型前胶原基因的核苷酸序列分别设计 3 条引物, 从疤痕组织中经 RT-PCR 分别扩增 I 及 III 型前胶原基因的第 2 外显子(Exon 2)区域的基因片段(I F2, III F2), 克隆到 T 载体(pGEM-T vector)。得到阳性重组质粒后经限制性内切酶酶切, PCR 及测序加以证实。【结果】分别获得长度约为 129 bp 的 DNA 片段(简称为 I F2), 与长度约为 189 bp 的 DNA 片段(简称为 III F2), 与预期片段大小一致。得到重组质粒 pT-I 及 pT-III, 并得到证实。【结论】获得的  $\alpha 1(I)$  型及(III)型前胶原基因片段是预期所要得到的正确片段。

**关键词:** 疤痕; 前胶原基因; 基因扩增

中图分类号: R644 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0417-04

## Cloning and Identification of the Gene Fragments of $\alpha 1(I)$ and(III) Procollagen Genes in the Hypertrophic Scar After Trauma

ZHU Jia-yuan<sup>1</sup>, XU Bing<sup>2</sup>, SU Ai-yun<sup>1</sup>, GUO Hao-guang<sup>1</sup>, ZHU Bin<sup>1</sup>, TANG Qing<sup>1</sup>

(1. Department of Burn, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. NanFang Hospital, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** 【Objective】Collagen protein is one of major constituents of extracellular matrices. Its overaccumulation can lead to the cicatrization. The aim of this study was to obtain the cloning and identification of the gene fragments of  $\alpha 1(I)$  and(III) procollagen genes. 【Methods】In this study, separate three primers were designed and synthesized according to the nucleotide sequence of each of  $\alpha 1(I)$  and(III) procollagen genes. By using RT-PCR, the gene fragments (I F2, III F2) within the second exons of the two procollagen genes were separately isolated and cloned into the pGEM-T vector. 【Results】The resulting two recombinant plasmids (pT-I pT-III) were verified by restriction enzymes, PCR and sequencing. 【Conclusions】The cloned sequences were the gene fragments which we just wanted to obtain them.

**Key words:** cicatrix; procollagen gene; gene amplification

胶原蛋白是细胞外基质中最主要的水不溶性纤维蛋白。构成细胞外基质的骨架结构。其类型多样, 与胞外基质中的其他组分结合形成结构与功能的复合体。过量胶原的合成易导致疤痕的形成, 尤其是在创伤延期愈合期间。前胶原是胶原蛋白

的前体和分泌形式, 前胶原基因的过表达使胶原形成异常增加, 易致疤痕的发生。目前所知的各种类型的前胶原基因均为许多外显子和内含子相间排列的断裂基因(如编码  $\alpha 1(I)$  肽链基因含 41 个外显子), 外显子编码含多个 Gly-X-Y 的重复序列(X

收稿日期: 2000-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770842)

作者简介: 朱家源(1963-), 男, 天津人, 副教授, 在职博士, 课题负责人

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

常为 Pro, Y 常为 Hypro 或 HyLys)。基因的原初转录本经拼接除去内含子而形成成熟 mRNA<sup>[1, 2]</sup>。对 mRNA 表达的抑制将有助于控制瘢痕的形成。目前, 反义 RNA (如 Ribozyme) 已被广泛用于抑制一些有害基因的表达或失控基因的过表达的研究, 并取得了较好的效果。本实验利用 RT-PCR 从人瘢痕组织中分别扩增了  $\alpha 1(I)$  及(III)型前胶原基因 Exon 2 区域片段, 并克隆至 T 载体 (pGEM-T vector) 上, 以便在体外 (*in vitro*) 研究特异性核酶对该基因片段转录物的抑制及切割效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 人瘢痕组织

人瘢痕组织来自临床标本。

### 1.2 质粒、菌种

克隆载体为 pGEM-T vector (T 载体) 购自 Promega 公司, 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  由本室保存。

### 1.3 主要试剂

dNTP、*Taq* 酶及限制性内切酶购自德国宝灵曼公司, T4DNA 连接酶, IPTG 和 X-gal 等为 Promega 公司产品, RNA 抽提试剂盒及质粒提取试剂盒购自广州瑞康 (Recon) 生物技术研究所。凝胶纯化试剂盒 Advantage TM PCR-pure kit 购自 Clontech 公司。

### 1.4 引物

根据 D' Alessio, M. 及 M. L. Chu 等报道的序列<sup>[3, 4]</sup> 设计和合成了  $\alpha 1(I)$  型及(III)型 Exon 2 区域的引物各 3 条, 分别为 P I A、P I B、P I C 和 P III A、P III B、P III C (P I B、P I B 分别在 P I C、P III C 的下游) 序列为:

P I A: 5' CCAATCACCTGCGTACAGAACC3'

P I B: 5' AGACGGGACAGCACTCGCCC3'

P I C: 5' CTTGGTCTCGTCACAGATCACC3'

P III A: 5' CCTGAAGATGTCCTTGATGTGC3'

P III B: 5' GATCCTCCAGAACTGTGTAGG3'

P III C: 5' GAATTTGCTATTTCTTCAGCC3'

### 1.5 RNA 的抽提

取人瘢痕组织, 按 RNA 抽提试剂盒说明及参考文献[5] 进行 RNA 的抽提。

### 1.6 $\alpha 1(I)$ 及(III)型前胶原基因第 2 外显子 (Exon 2) 区的 RT-PCR 扩增

按文献[6] 进行, 以抽提的 RNA 为模板, 先用

引物对 P I A/P I B, P III A/P III B 分别进行逆转录反应 (RNA 5  $\mu$ L, 引物 1  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L, 70  $^{\circ}$ C 10 min 后, 加 5 $\times$ RT Buffer 4  $\mu$ L, 20 $\times$ dNTP 1  $\mu$ L, 逆转录酶 1  $\mu$ L, 加水至 20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 1 h), 取其产物 3  $\mu$ L, 以相应的引物对 (P I A/P I C 或 P III A/P III C) 进行 PCR 扩增 (引物各 1  $\mu$ L, *Taq* 酶 1  $\mu$ L, 反应体积 30  $\mu$ L, 92  $^{\circ}$ C 预变性 100 s, 92  $^{\circ}$ C 45 s, 53  $^{\circ}$ C 40 s, 71  $^{\circ}$ C 45 s, 33 个循环), 终产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳初鉴。

### 1.7 Exon 2 区基因片段的克隆及鉴定

参照文献[7] 与试剂盒说明, 将经 RT-PCR 扩增得到的 Exon 2 区 DNA 片段 (简称为 I F2 和 III F2) 用 Advantage TM PCR pure kit 纯化后分别与 T 载体 (pGEM-T vector) 直接进行连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 在 Apr 及 X-gal 平板上挑取白色菌落, 参照文献与试剂盒说明, 提取质粒, 琼脂糖电泳初鉴, 用 SP6 启动子区引物及 P III A 或 P I A 进行 PCR 扩增 (引物各 1  $\mu$ L, *Taq* 酶 1  $\mu$ L, 模板 3  $\mu$ L, 20 $\times$ dNTP 1.5  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 3  $\mu$ L, 灭菌双蒸水 20  $\mu$ L, 92  $^{\circ}$ C 预变性 100 s, 92  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 53  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 71  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 33 个循环), 鉴定正向插入 (以 5'  $\rightarrow$  3' 方向插入 T7 启动子下游)。用限制性内切酶图谱分析对重组质粒 (简称为 pT-I, pT-III 分别含 I F2, III F2) 进行鉴定 (对 pT-I: 用 *Sph* I / *Pst* I 双酶切, *Kpn* I 单酶切; 对 pT-III 用 *Sph* I / *Pst* I 双酶切, *Eco*RI 及 *Pvu* II 单酶切)。以 T7 引物进行测序。阳性克隆简称为 pT-I (含 I 型前胶原基因 Exon 2 片段) 和 pT-III (含 III 型前胶原基因 Exon 2 片段)。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增 $\alpha 1(I)$ 及(III)型 Exon 2 区基因片段

见图 1。以 P I A、P I B、P I C 引物扩增 (先以 P I A、P I B 进行 RT-PCR 其产物再用 P I A 及 P I C 扩增) 获得长度约为 129 bp 的 DNA 片段 (简称为 I F2), 与预期片段大小一致 (位于 I 型前胶原 Exon 2 区)。以 P III A、P III B、P III C 引物扩增得到长度约为 189 bp 的 DNA 片段 (简称为 III F2), 与预期片段大小一致 (位于 III 型 Exon 2 区)。

### 2.2 I 型及 III 型 Exon 2 区基因片段的克隆

将经 PCR 扩增获得的 I F2 及 III F2 基因片段

分别与 T 载体 (pGEM-T vector) 连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 经氨苄青霉素和蓝白菌落初步筛选阳性重组质粒, 得到重组质粒 pT-I 及 pT-III。

2.3 重组质粒 pT-I 及 pT-II 的进一步鉴定

pT-I 经 *Sph* I 和 *Pst* I 双酶切, 电泳获得长度约为 178 bp 及 2 956 bp 的片段, 经 *Kpn* I 单酶切获得单一 3 134 bp 片段, 说明插入片段与预期基因片段大小一致; 用 SP6 和 P I A 引物扩增得到一 222 bp 的片段, 证实为 T7 启动子区的正向克隆 (图 2)。最后, 以 T7 启动子引物进行测序鉴定 (图 4)。pT-III 经 *Sph* I 和 *Pst* I 双酶切, 得到约 238 bp 和 2 956 bp 的片段, 经 *Eco*RI 单酶切产物约为 3 194 bp; 经 *Pvu* II 单酶切, 得到 3 个片段, 约为 185 bp, 441 bp 及 2 568 bp, 说明插入片段与预期一

致。pT-III 用 SP6 和 P IIIA 引物扩增获得一约 282 bp 的片段, 证实为载体 T7 启动子下游的正向克隆 (图 3)。最后以 T7 启动子区引物对插入片段单向测序加以证实 (图 4)。

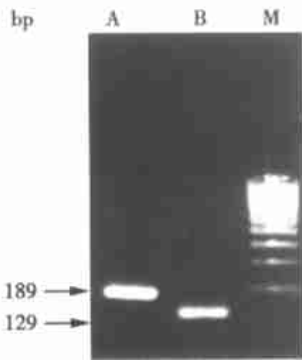


图 1 PCR 扩增的基因片段(I F2, III F2) 电泳

Fig. 1 Electrophoretic results of gene fragments I F2, III F2 by using PCR

M: 100 bp Ladder PCR marker; A: III F2 (189 bp); B: I F2 (129 bp)

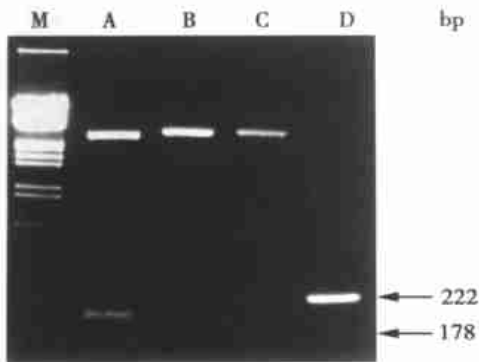


图 2 重组质粒 (pT-I) 的鉴定

Fig. 2 Verification of recombinant plasmid (pT-I)

M: / *Hind*III+ *Eco*RI marker; A: *Sph* I / *Pst* I restriction endonuclease catalysis of pT-I (178, 2 956 bp); B: *Pst* I ribozyme catalysis of pGEM-T vector (3 003 bp); C: *Kpn* I ribozyme catalysis of pT-I (3 134 bp); D: By using the primers of Sp6 and pIA to verify the clone (222 bp)

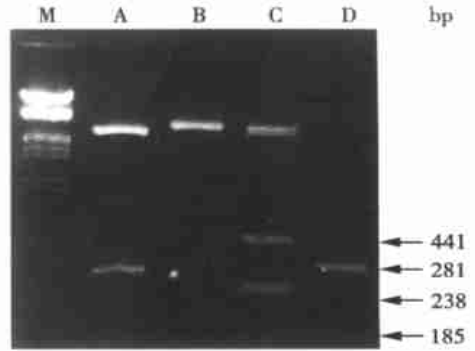


图 3 重组质粒 (pT-III) 的鉴定

Fig. 3 Verification of recombinant plasmid (pT-III)

M: / *Hind*III+ *Eco*RI marker; A: *Sph* I / *Pst* I restriction endonuclease catalysis of pT-III (238, 2 956 bp); B: *Eco*RI ribozyme catalysis of pT-gIII (3 194 bp); C: *Pvu* II ribozyme catalysis of pT-gIII (185, 441, 2 568 bp); D: By using the primers of Sp6 and pPIIA to verify the clone (282 bp)

IF 2

CCAATCACCTGCGTACAGAACGGCCTCAGGTACCATGACCGAGACGTGTGGAAACCCGA  
GCTCTGCCGGATCTGCGTCTGCGACAACGGCAAGGTGTCTGCGATGACGTGATCTGTG  
ACGAGACCAAG

III F 2

CCTGAAGATGTCCTTGATGTGACGCTGGCATTCTTCGACTTCTCTCCAGCCGAGCTTCC  
CAGATCATCACATATCACTGCAAAATATAGCATTGCATACATGGATCAGGCCAGTGCAAAATG  
TAAAGAAGGCCCTGAAAGCTGATGGGGTCAAATGAAGGTGAATTCAAGGCTGAAGGAAA  
TAGCA AATTTC

图 4 两个基因片段(I F2, III F2) 的测序结果

Fig. 4 Sequencing results of gene fragment (I F2, III F2)

3 讨 论

前胶原蛋白是胶原蛋白的前体和胞内形式。已知胶原蛋白家族中至少有 19 种以上胶原蛋白, 由 31 种以上胶原基因所编码。它们均为由内含子和外显子构成的不连续基因。胶原蛋白含有许多重复的氨基酸序列 (Gly-X-Y, 其中 X 多为 Pro, Y 多为 Hypro 或 Hylys)。故它们的基因结构相似, 而且基因中 GC 含量很高, 为 PCR 扩增基因带来麻烦。为尽可能降低非特异性扩增, 本实验在待扩增目的基因片段的下游增加了一条引物 (引物 P I B, P IIB), 以之先行扩增 (RT-PCR), 以其产物为模板, 利用目的引物 (P I A/P I C, P IIIA/P IIIC) 进行第 2 次 PCR 扩增, 这样就大大提高了产物的特异

性和准确性。另外,由于 GC 含量很高,我们适当地提高退火温度,以减少模板与引物的非特异性结合。目前,我们正利用获得的含有 Exon 2 区基因片段的重组质粒(pT-I, pT-III)来研究反义 RNA (如 Ribozyme)对胶原蛋白基因表达的抑制作用。

#### 参考文献:

- [1] 翟中和. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 84~90.
- [2] Sato M, Ishikawa O, Miyachi Y. Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture[J]. *Br J Dermatol* 1998, 138(6): 938.
- [3] D'Alessio M, Bernard M, Pretonius P J. Complete nucleotide sequence of the region encompassing the first

twenty-five exons of the human pro alpha 1(I) collagen gene(COL1A1)[J]. *Gene* 1988, 67(1): 105.

- [4] Chu M L, Weil D, de Wet W. Isolation of cDNA and genomic clones encoding human pro-alpha 1(III) collagen. Partial characterization of the 3' end region of the gene [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(7): 4357.
- [5] Gallivan K, Alman B A, Moriarty K P. Differential collagen I gene expression in fetal fibroblasts [J]. *J Pediatr Surg*, 1997, 32(7): 1033.
- [6] Hernandez M R, Ye H, Roy S. Collagen type IV gene expression in human optic nerve heads with primary open angle glaucoma [J]. *Exp Eye Res*, 1994, 59(1): 41.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1~18.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 416 页)

和生物鉴定[J]. *解剖学报*, 1996, 27(4): 363.

- [2] Perese D A, Ulman J, Viola J, *et al.* A 6-hydroxydopamine induced selective parkinsonian rat model[J]. *Brain Res*, 1989, 494(2): 285.
- [3] 贺江海, 郭晓华. 不同剂量 6-羟基多巴胺注射大鼠单侧前脑内侧束后对中脑多巴胺能神经元损伤作用的观察[J]. *解剖科学进展*, 1998, 4(3): 229.
- [4] 桂勤, 郭晓华. 纹状体和中缝核外植块促进体外培养的中脑多巴胺神经元的发育[J]. *解剖学报*, 1994, 25(1): 59.
- [5] 佟宏霞, 张进禄, 徐群渊等. 帕金森病大鼠基因治疗后脑中多巴胺含量的变化[J]. *中华医学杂志*, 1996, 76(7): 490.
- [6] 廖瑛, 单济川, 余斌杰. HPLC-ECD 检测尿儿茶酚胺方法的优化[J]. *中山医科大学学报*, 1994, 15(3): 227.
- [7] Hudson J, Granholm A C, Gerhardt G A, *et al.* Glial cell

line-derived neurotrophic factor augments midbrain dopaminergic circuits in vivo [J]. *Brain Res Bull* 1995, 36(5): 425.

- [8] Hebert M A, Gerhardt G A. Behavioral and neurochemical effects of intranigral administration of glial cell line-derived neurotrophic factor on aged Fischer 344 rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 282(2): 760.
- [9] Shen R Y, Altar C A, Chiodo L A. Brain-derived neurotrophic factor increases the electrical activity of pars compacta dopamine neurons in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8920.
- [10] Zigmond M J, Abercrombie E D, Berger T W, *et al.* Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications [J]. *Trends Neurosci*, 1990, 13(7): 290.

(编辑 刘清海)