科学通报
第40卷 第8期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1995年4月

人去甲肾上腺素转运蛋白基因的研究

郭礼和 朱丽华 黄 芳 叶增产 费 俭 张孝勇
(中国科学院上海细胞生物学研究所,上海 200031)
谭炽华 林文杰
(香港生物科学技术研究院,香港新界)

关键词 人去甲肾上腺素转运蛋白基因 克隆

去甲肾上腺素(NE)是儿茶酚胺类递质的一种,存在于节后交感神经和中枢神经系统内[1]. 在去甲肾上腺素能神经元中,突触传递包括3个步骤:NE由突触前膜释放到突触间隙;间隙中的NE与突触后膜上的受体作用;接着NE被突触前神经元或胶质细胞重新吸收. NE再摄取的过程需要钠离子依赖性的去甲肾上腺素转运蛋白(NET)参与. NET是一类药物的作用位点(例如起到治疗作用的抗抑郁药及引起药物成瘾的可卡因和苯基丙胺[2]),长期以来人们在生化、药物等方面对其进行了广泛的研究,可是到1991年编码NET的cDNA才被克隆[3]. 近来通过PCR、同源筛选、表达克隆等手段,已先后克隆和表达了十多种神经递质转运蛋白的cDNA[4]. 为了了解神经系统内递质转运蛋白的结构、功能及其基因调控方式,我们首先克隆和分析了人去甲肾上腺素转运蛋白的基因,研究揭示了生物胺类递质转运蛋白家族独特的性质.

1 材料与方法

1.1 cDNA库的扩增与PCR

用常规方法扩增和抽提人脑干cDNA库DNA(克隆在Lambda ZAPII载体上,Stratagene),我们根据发表的NETcDNA序列设计了一对引物. 正链引物的序列为5′GAACACAAGGTCAACATTGAGGATGTG 3′,位于NETcDNA分子的1 111~1 137位,加线的位置是HindII识别位点. 反链引物为5′CGGAAGCTTGTGTGACCTGGACATTGGCATGG3′,位于1 911~1 892位,其中第1 907位T→A,1 904位C→A,产生1个HindIII酶切位点. PCR的过程是90℃变性1 min,55℃退火1.5 min,70℃延伸2 min,在DNA Amplifier上循环30次得到1个801 bp的片段. 该片段克隆到pTZ19u SmaI/HindIII之间,重组质粒命名为pNET1,并用GUO-WU的方法[5]测序鉴定.

1.2 克隆与染色体走步

pNET1的插入片段用同位素标记后作为探针筛选人基因组文库(克隆在Cosmid pWE15上,Stratagene),从约10^5克隆中得到一个阳性克隆,对其插入片段进行图谱分析,最5′

1994-07-12收稿,1994-11-12收修改稿

端的一段作为探针用染色体走步法筛选完整的基因.

1.3　外显子的定位与序列分析

用常规方法[6]进行限制图谱分析,Southern 杂交,亚克隆和测序,将 14 个编码外显子确定在约 59 kb 的基因组 DNA 片段上.

2　结果与讨论

我们用 PCR 的方法从人脑干 cDNA 库(NET 基因高度表达于此)中扩增了 1 111～1 911 位的一段 NETcDNA 分子,克隆,鉴定后用于从人淋巴细胞基因组文库中筛选 NET 基因,第一次筛选到 1 个插入片段长为 29.7 kb 的阳性克隆. 同 γ-P-32-dATP 标记的 5′ 端寡核苷酸杂交,阴性结果说明没有得到完整的 NET 基因,最 5′ 端的一段作为探针用染色体走步法进行筛选,3 次走步分别向 5′ 端延伸了 11,9.5 和 8.6 kb. 新的克隆命名为 phNET, 长约 59 kb, 包含了完整的 NET 开放读框(ORF). 通过图谱分析、Southern 杂交、亚克隆和序列分析,将 14 个编码外显子确定在基因组 DNA 片段上(图 1). 由基因推断的氨基酸序列同由 NETcDNA 推断的序列相一致.

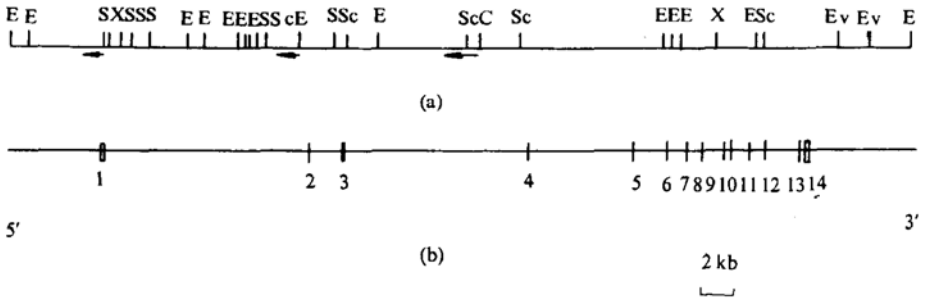

图 1

(a) 编码人去甲肾上腺素转运蛋白基因组 DNA 片段的物理图谱,长约 59 kb, 箭头表示染色体走步中探针的位子. E 为 EcoRI, Ev 为 EcoRV, Sc 为 ScaI, X 为 XhoI, C 为 ClaI, S 为 SmaI; (b)14 个外显子在去甲肾上腺素转运蛋白基因上的分布

在 NET 基因上. 外显子与内含子拼接处的统计序列为 $\cdots\cdots g_{100}t_{100}a_{54}a_{46}g_{70}t_{61}\cdots\cdots c_{93}a_{100}g_{100}\cdots\cdots$. NET 蛋白上,除跨膜区 10,11, 跨膜区 1～9,12 分别由单个外显子编码(图 2),与我们实验室克隆的另一个氨基酸类递质转运蛋白—— γ- 氨基丁酸(GABA)转运蛋白[7]相比,两者的组织方式十分相似.

基于外显子与结构域的关系,我们可以推测 NET 基因中,14 个外显子编码 NET 蛋白的 13 个功能域(外显子 14 仅编码 C- 端的 7 个氨基酸残基,不能构成一个独立的功能域),而跨膜区 10,11 和 12 可能在功能上有着密切的联系. NET 基因是儿茶酚胺转运蛋白亚族中第一个被克隆的基因,进一步将集中研究该蛋白的分子、发育及药理机制,这将有助于理解神经性疾病、药物成瘾以及学习记忆的机理.

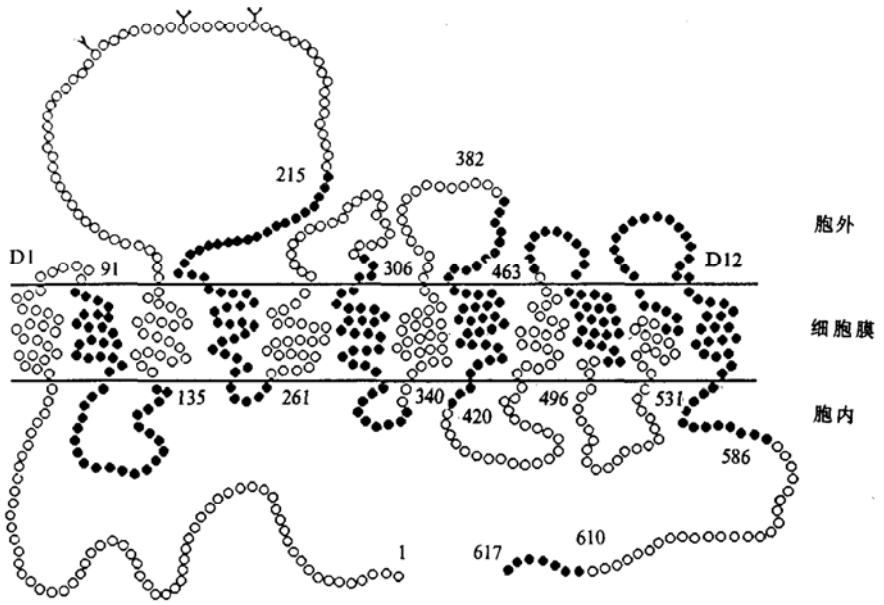

图2 人去甲肾上腺素转运蛋白的拓扑结构图

蛋白的N-和C-端位于胞内，黑白小圆表示氨基酸残基，残基的数目标在图上，一串同色的小圆代表一个外显子编码的一个结构域．Y表示蛋白位于胞外大环上的3个糖基化位点．D1,D12代表跨膜区

参 考 文 献

1 Zygmunt L K, Christopher J P. Neurotransmitters and Drugs. 3rd edition. London: Chapman & Hall Press, 1992

2 Axelrod J. Noradrenaline: fate and control of its biosynthesis. Science, 1971, 173: 598～606

3 Pacholczyk T, Blakely R D, Amara S G. Expression cloning of a cocaine- and antidepressant- sensitive human noradrenaline transporter. Nature, 1990, 350: 350～354

4 黄 芳，费 俭，郭礼和．神经递质转运蛋白．生命科学，1994, 6: 5～8

5 Guo L H, Wu R. Exonuclease III: use for DNA sequence analysis and in specific deletions of nucleotides. Methods in Enzymol, 1983, 100: 60～96

6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

7 Lam D K L, Fei J, Zhang X Y *et al*. Molecular cloning and structure of the human GABA transporter gene (GABATHG). Mol Brain Res, 1993, 19: 227～232