

# 高原鼠兔低氧诱导因子 - 1 的初步研究

赵同标<sup>1</sup> 赵新全<sup>1\*</sup> 常智杰<sup>2</sup> 朱姗姗<sup>2</sup> 赵 伟<sup>1</sup> 孙 平<sup>1</sup> 徐世晓<sup>1</sup>

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001) (2 清华大学生物科学与技术系基因组研究所, 北京, 100084)

关键词: 低氧诱导因子 - 1 ; 高原鼠兔 ; RT-PCR ; 青藏高原

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2003) 03 - 0273 - 04

## A Preliminary Study of Plateau Pika (*Ochotona curzoniae*)

### Hypoxia- Induced Factor- 1

ZHAO Tongbiao<sup>1</sup> ZHAO Xinquan<sup>1</sup> CHANG Zhijie<sup>2</sup> ZHU Shanshan<sup>2</sup> ZHAO Wei<sup>1</sup> SUN Ping<sup>1</sup> XU Shixiao<sup>1</sup>

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001)

(2 Institute of Genome Research, Department of Biological Sciences and biotechnology, Tsinghua University, Beijing, 100084)

**Abstract:** Hypoxia-induced factor-1 plays a key role during the cell hypoxia transduction. Hypoxia induced factor-1 (HIF-1) is a functional subunit of hypoxia-induced factor-1. Plateau pika (*Ochotona curzoniae*), which is a Qinghai-Tibet plateau native animal lived above 3 000 m, has high ratio of oxygen utilization to adapt to plateau hypoxia environments. One fragment of the coding region of cDNA sequence of plateau pika HIF-1 was obtained by RT-PCR technique using a degeneracy PCR primer based on previously reported cDNA sequence in human, cattle, house mouse and Norway rat HIF-1 gene. It was directly inserted into the vector pMD18-T. DNA sequencing proved that it was highly homology with human (91%), cattle (91%), house mouse (89%) and Norway rat (89%) HIF-1 gene. The study provides basic important information for the HIF-1 cDNA whole sequence cloning of plateau pika and its functional study.

**Key words:** Plateau pika (*Ochotona curzoniae*); HIF-1; RT-PCR; Qinghai-Tibet Plateau

高寒和缺氧是高原地区的两个重要的限制生态因子, 高原土著动物在长期的适应进化过程中必将形成自己独特的低温、低氧适应策略。高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 是生活在青藏高原海拔 3 000 m 以上地区的特有物种, 具有极强的低温、低氧耐受能力。它主要通过高的基础代谢率和增加非颤抖性产热以及高的氧利用率来适应高寒、缺氧环境<sup>[1-4]</sup>。低氧诱导因子-1 (Hypoxia-Induced Factor-1, HIF-1) 是 1992 年 Semanza 等在低氧的肝癌细胞株 Hep3B 中发现的一种特异性结合于红细胞生成素 (EPO) 增强子寡核苷酸序列的转录因子<sup>[5]</sup>, 它由

HIF-1 和 HIF-1/ARNT 两个亚单位组成<sup>[6]</sup>。HIF-1 受低氧诱导, 属功能性亚基, HIF-1/ARNT 在细胞中构型表达, 不受低氧诱导<sup>[7]</sup>。为进一步揭示高原鼠兔低氧适应的分子机理, 我们正在克隆高原鼠兔 HIF-1 基因的 cDNA 全长, 并试图对其在低氧适应中的作用进行研究, 本文报道了高原鼠兔低氧诱导因子-1 编码区部分片段的克隆。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

采集于中国科学院海北高寒草甸生态系统实验

基金项目: 国家基础研究规划项目 (G1998040813); 中国科学知识创新工程项目 (KZCX1-01-01); 中国科学院海北高寒草甸生态系统开放试验站基金

作者简介: 赵同标 (1977-), 男, 博士研究生, 主要从事动物生理生态学与分子生态学研究。

收稿日期: 2002-09-17; 修回日期: 2003-01-09

\*通讯作者, E-mail: xqzhao@public.xn.qh.cn

站 (37°40' N, 101°23' E, 海拔 3 200 m) 附近的高原鼠兔, 就地解剖后取所需各组织迅速投入液氮容器中, 低温保存备用。

### 1.2 菌株、载体、工具酶及主要的实验试剂

大肠杆菌菌株 TOP10 为实验室保存。载体 pMD18-T、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品。RACE 试剂盒、回收试剂盒购自 Clontech 公司, SuperScript 酶购自 Gibco BRL 公司; RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。其他试剂均为国产或进口产品。

### 1.3 引物设计

NCBI 数据库 GeneBank 里找到人、家鼠、牛及挪威鼠的 HIF-1 cDNA 序列, 输入到 Bioedit 软件上, 通过核酸序列的同源比对 (Clustalw Multiple Alignment), 找到 HIF-1 核酸序列的两个高度保守区 (对应于家鼠的 297 ~ 476 位和 1623 ~ 1691 位)。在此两个保守区域内设计如下引物: 上游引物序列为 5'-TGT TCT GAA CGT CGA AAA G-3', 对应于家鼠的 297 到 315 位; 下游兼引物序列为 5'-CAG G (A/G) T CAG CAC TAC TTC (G/T) -3' 对应于家鼠的 1641 到 1659 位。引物的设计与评价用 Primer Premier 进行。引物均由上海生工合成。使用浓度为 20 μmol/L。

### 1.4 RNA 提取

高原鼠兔脑和肾组织总 RNA 的提取采用 Trizol reagent 一步抽提法进行。用 Ultraspec 3000 分光光度计测其浓度。-20℃ 冰箱保存备用。

### 1.5 RT-PCR 扩增及序列测定

取 0.8 μg 总 RNA 为模板, 参照 Promega 公司 RT-PCR 试剂盒说明, 在 PCR 管中建立 50 μl 反应体系。反应程序为: 48℃ 逆转录 60 min, 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 50 s, 51℃ 1 min, 68℃ 2 min, 行 35 循环, 72℃ 延伸 7 min。取 20 μl 反应液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果, 按照试剂盒说明回收纯化特异性扩增片段。

回收纯化的片段连接到 pMD18-T 载体上, 连接产物转化感受态 TOP10 细胞, 用含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 培养基 37℃ 过夜培养。从转化的平板上挑白斑单克隆, 接种后 37℃ 摇床过夜。提取质粒, EcoI 和 PstI 双酶切, 随后对 4 号阳性克隆进行 XbaI、SmaI、HindIII、SalI 单酶切。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 选出含有目的片段的克

隆, 送上海联合基因科技有限公司测定 (3 700, Bigdye-Terminator)。测得的序列与家鼠、人、牛及挪威鼠 HIF-1 cDNA 序列及氨基酸序列用 Blast、Bioedit 等软件进行比较分析。

## 2 结果

### 2.1 高原鼠兔组织总 RNA 抽提

利用 Trizol reagent 一步抽提高原鼠兔肾和脑组织总 RNA, 总 RNA 经 0.8% 变性琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色, 紫外灯下显示, 28S rRNA 亮度大约是 18S rRNA 的亮度的 2 倍, 说明提取的总 RNA 完整, 没有或者很少降解 (图 1), 可以作为逆转录模板用于 RT-PCR。

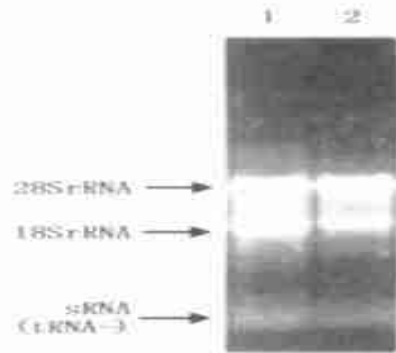


图 1 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析高原鼠兔总 RNA  
Fig. 1 Formaldehyde agarose gel electrophoresis of plateau pika total RNA  
1: 脑 Brain; 2: 肾 Kidney

### 2.2 RT-PCR 扩增目的片段

RT-PCR 以高原鼠兔的脑总 RNA 为模板, 以寡聚核苷酸为引物, 在逆转录酶的作用下, 合成 cDNA。取 10 μl 样品进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 可见一明显的大小约 1.3 kb 左右的特异性扩增片段 (图 2), 与预期产物的大小一致。

2.3 PCR 产物的克隆与编码区部分片段的获得用 PCR 产物回收试剂盒回收该片段并克隆于 pMD18-T 载体, 转化 TOP10 菌株, 用含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 培养基 37℃ 过夜培养。从转化的平板上随机挑 10 个白色单克隆, 提取质粒, EcoI 和 PstI 双酶切鉴定, 获得含有 1.3 kb 左右片段的 4 号阳性克隆 (图 3), 随后对 4 号克隆进行 XbaI、SmaI、HindIII、SalI 单酶切进一步鉴定 (图 4)。证明所得到的 4 号克隆为真阳性克隆, 并送上海联合

基因公司测序。将测序所得片段同家鼠、人、牛、挪威鼠的 HIF-1 cDNA 执行同源比对发现，该片段与人、牛、家鼠、挪威鼠核酸序列的同源性分别为：91 %、91 %、89 %、89 %；其推测的蛋白序列同人、牛、家鼠、挪威鼠蛋白序列的同源性分别为：95 %、96 %、95 %、96 %。由此确定，该序列为高原鼠兔的 HIF-1 cDNA 部分片段。

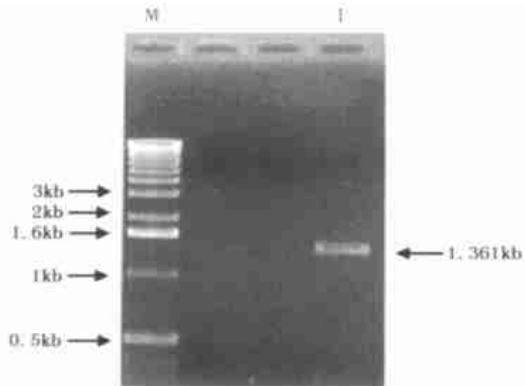


图2 RT-PCR 扩增高原鼠兔 HIF-1 cDNA 片段的 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 RT-PCR product band of the plateau pika HIF-1 cDNA in 0.8 % agarose gel  
M: DNA 标准分子量 DNA marker;  
1: HIF-1 cDNA 片段 HIF-1 cDNA fragment

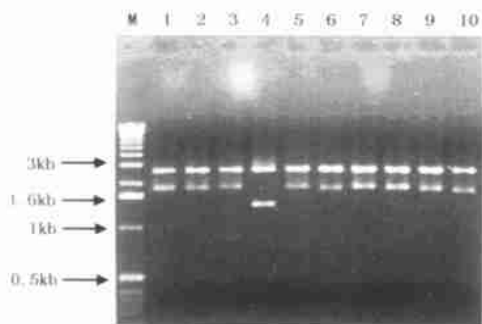


图3 EcoII 和 PstI 酶切鉴定阳性克隆

Fig.3 Identification of the clones with inserted fragments by EcoII/PstI digestion  
M: DNA 标准分子量 DNA marker;  
1 ~ 10: 挑选的克隆 Selective clones

### 3 讨论

本文首次报道了高原鼠兔 HIF-1 cDNA 部分编码序列的克隆，为快速克隆高原鼠兔 HIF-1 cDNA

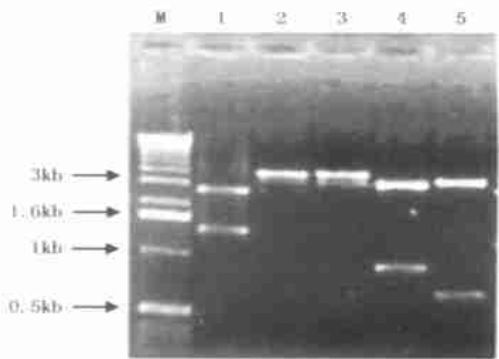


图4 4号阳性克隆的进一步酶切鉴定

Fig.4 Restriction enzymes digestion of the No. 4 positive clone for further analysis

M: DNA 标准分子量 DNA marker;  
1: EcoII/PstI 双酶切 Double enzyme digest by EcoII/PstI;  
2: XbaI 酶切 Enzyme digest by XbaI;  
3: SmaI 酶切 Enzyme digest by SmaI;  
4: HindIII 酶切 Enzyme digest by HindIII;  
5: SalI 酶切 Enzyme digest by SalI

全长及其表达的研究打下了基础，并为进一步研究高原鼠兔 HIF-1 在低氧适应中的作用提供了重要资料。

特有物种中克隆感兴趣基因片段，引物设计是最关键之处。同源基因不同物种中进化上的保守性以及不同物种中同源基因功能的差别是在核酸保护区设计兼并引物扩增目的片段的理论基础。

对所得阳性克隆进行初步的酶切鉴定可确定所得到的克隆为阳性克隆，但不能排除 PCR 过程中产生的假阳性片段。根据实际情况，选择合适的限制性内切酶进行详细的酶切鉴定分析可有效地排除 PCR 过程中产生的假阳性的困扰，节约测序开支。载体 pMD18-T 的单切点酶 EcoII、PstI、XbaI、SmaI、HindIII、SalI 在家鼠中的切点分别为无、无、322 和 489、128 和 216、425 和 1423 和 3575、989。其酶切图谱如图 4 所示，经分析可进一步确认该片段即为目的片段。

低氧诱导因子-1 (HIF-1) 的发现及其一系列靶基因<sup>[8-12]</sup>的研究已经成为当前细胞低氧信号转导研究的焦点。截至 2002 年 8 月 12 日，来自 GeneBank 的搜索表明，已有人、牛、家鼠、挪威鼠等 13 种动物的 HIF-1 cDNA 全序列被克隆，而出于探讨高原土著动物低氧适应机制目的的研究，国内外均未见报道。HIF-1 在高原鼠兔的低氧适应

过程中发挥着怎样的作用? 目前我们正在进行 HIF-1 cDNA 全序列的克隆和表达研究, 以期回答该问题, 并填补该项研究领域的空白。

致谢: 承蒙清华大学基因组研究所宁红秀博士、王银银及北京师范大学汪勇、李聪等同志实验过程中提供帮助, 谨此致谢。

#### 参考文献:

- [1] Li Q F, Sun Q Y, Huang C X, Wang Z K, Liu X T, Hsu J J, Liu J S, Cai L Q, Li N, Zhang S Z, Wang Y. Cold adaptive thermogenesis in small mammals from different geographical zones of China [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2001, 129: 949 - 961.
- [2] 王德华, 王祖望. 小哺乳动物在高寒环境中的生存对策: II. 高原鼠兔和根田鼠非颤抖型产热的季节性变化 [J]. *兽类学报*, 1990, 10 (1): 40 - 53.
- [3] 杜继曾, 李庆芬. 模拟高原低氧对高原鼠兔和大鼠器官与血液若干指标的影响 [J]. *兽类学报*, 1982, 2 (1): 35 - 42.
- [4] 杜继曾, 李庆芬. 高原鼠兔对环境低氧的适应 [A]. 见: 高寒草甸生态系统国际学术讨论会论文集 [C]. 北京: 科学出版社, 1986. 193 - 195.
- [5] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer [J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 5447 - 5454.
- [6] Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor - 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 21513 - 21518.
- [7] Gregg L, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 59: 47 - 53.
- [8] Hochachka P W, Lutz P L. Review mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2001, 130: 435 - 459.
- [9] Gregg L, Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13: 167 - 171.
- [10] Gregg L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis [J]. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1998, 8: 588 - 594.
- [11] Morwenna S, Peter W, Ratcliffe J. Mammalian oxygen sensing and hypoxia inducible factor-1 [J]. *J Biochem Cell Biol*, 1997, 29: 1419 - 1432.
- [12] Maria F, Czyzyk - Krzeska. Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia [J]. *Respiration Physiology*, 1997, 110: 99 - 111.