

# 一个新的白血病相关基因LRP16 全长 cDNA 的克隆、序列分析及表达特征

韩为东<sup>1)</sup>, 于力<sup>1)\*</sup>, 楼方定<sup>1)</sup>, 王全顺<sup>1)</sup>, 赵瑜<sup>1)</sup>, 史子江<sup>1)</sup>, 焦宏远<sup>2)</sup>, 周建军<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>中国人民解放军总医院血液科, 北京 100853; <sup>2)</sup>中国预防医学科学院病毒研究所, 北京 100052;

<sup>3)</sup>北京大学生命科学学院, 北京 100871)

**摘要** 克隆一个与白血病复发相关基因(LRP16)的全长cDNA序列, 对其进行染色体定位、组织表达谱分析, 并对该基因编码蛋白质进行原核表达。首先用获得的一段3 kb DNA片段在NCBI提供的hESTs数据库中进行电子杂交并对重叠克隆片段组装, 再设计引物进行cDNA末端快速扩增(RACE技术)。采用Northern印迹方法进行组织表达分析。以高通量基因组序列(HTGS)数据库为基础进行染色体定位。对构建的克隆菌用IPTG诱导重组蛋白表达后进行SDS-PAGE, 同时对重组体测序确证。钓取了该基因全长cDNA、推导所编码的氨基酸序列, 并将该基因定位于染色体11q12.2。原核表达筛选获得了该基因重组子的一个缺失体。对LRP16基因全长cDNA的序列分析提示, 该基因可能编码两种N端不同的蛋白质, 且该基因的转录本可能存在一种丰度较低的剪接体。

**关键词** 白血病, 相关基因, LRP16, 重组蛋白, 原核表达

**中图分类号** Q 78, R 773

## Cloning and Expression Characterization of the Full Length cDNA for a Novel Leukemia-associated Gene LRP16

HAN Weidong<sup>1)</sup>, YU Li<sup>1)\*</sup>, LOU Fang-ding<sup>1)</sup>, WANG Quan-shun<sup>1)</sup>, ZHAO Yu<sup>1)</sup>,  
SHI Zi-jiang<sup>1)</sup>, JIAO Hong-yuan<sup>2)</sup>, ZHOU Jian-jun<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Hematology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; <sup>2)</sup>Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China; <sup>3)</sup>College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract** To clone the full length cDNA of a novel leukemia relapse-associated gene (LRP16), determine its chromosome location, analyse its tissue expression pattern and characterize the prokaryotic expression of this gene. Firstly, the human ESTs (Expression Sequence Tags) fragments obtained from electronic hybridization were assembled using a 3 kb DNA fragment cloned as probe, then designed the primers for rapid amplification of cDNA end (RACE). Tissue expression pattern were analysed by Northern blotting, and bioinformatic data of High Throughout Genomic Sequences (HTGS) were used for chromosome localization. Prokaryotic recombination protein was induced by using IPTG and bacterial protein electrophoresed on SDS-PAGE. The inserted fragments of recombinant were confirmed by sequencing. The full length cDNA of the gene LRP16 was cloned and its translated amino acid sequence was deduced. This gene was localized on chromosome 11q12.2. One recombinant whose sequence had 30 bases

收稿日期: 2000-08-09, 接受日期: 2000-10-10

国家自然科学基金资助项目(No. 3997082)

\*联系人 Tel: 010-66939481, Email: liyu@plagh.com.cn

韩为东, 男, 1969年11月生, 博士, 医师

Received: August 9, 2000; Accepted: October 10, 2000

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 3997082

\* Corresponding author Tel: 010-66939481, Email: liyu@plagh.com.cn



deleted was obtained LRP16 gene might produce two types of proteins and the only difference of the two was the length of their N-terminus This gene might have two types of splicing transcripts and the shorter lower transcribing

**Key words** leukemia, associated-gene, LRP16, recombinant protein, prokaryotic expression

目前的化疗方案可使 80% 以上的急性白血病初诊患者获得完全缓解(CR), 对于复发病人, 临床治疗效果较差, 再次CR 率只有 40% 所以对复发时白血病细胞进行生物学特征的研究具有重要的理论及临床意义 DNA 分子 CpG 岛的甲基化, 尤其在基因的启动子区以及近 5' 区 CpG 岛的甲基化是构成哺乳动物基因表达失活的一个重要调控因素<sup>[1]</sup>。为深入揭示 DNA 修饰水平变化与白血病复发的关系, 克隆与白血病进展密切相关的基因, 本文用既往获得的一段复发病人中 CpG 岛高度甲基化的 3kb DNA 序列出发(未公布), 在 GenBank 提供的 nr 及 dbEST 数据库中检索, 证明其代表着一个新基因, 进而利用 dbEST 数据库信息及 cDNA 末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA end, 简称 RACE 技术)成功钓取了这一新基因的 cDNA 全长, 并将其命名为白血病相关基因 LRP16。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本 来源于健康男性外周血。

1.1.2 引物及试剂 PCR 所涉及引物均由上海生物工程公司合成, 其中 RACE 所用引物有 3'-GSP1, 其序列为 5'-CCCTGCA GAGCTGTAA GACTG-3'; 3'-GSP2, 其序列为 5'-GATCA CCGGCGGCTA TCG-3'; 5'-RT-P 为 5'-GGA GCTCGCA GCCTGACT-3'; 5'-GSP1 为 5'-GGA GCTGTTGGCGGCGTTGA -3'; 5'-GSP2 为 5'-CCTCCCGCTGCTTG TCACT-3'。构建 LRP16 cDNA 全长所用外侧引物有 5'-P, 序列为 5'-CCCTGGCCA TGGCGGCGAA G-3'; 3'-P, 序列为 5'-CCGGTCA GGGTGGGCTGCG-3'; 加酶切位点的内侧引物有 5'-EP, 序列为 5'-CATATG (*Nde*I 位点) GCGGCGAA GGTGG-3'; 3'-EP 的序列为 5'-GGATCC (*Bam*H I 位点) TCA GGCCACGGG GAA -3'。RACE 试剂盒和 Trizol Reagent 购于美国 Gibco. BRL 公司; *Taq* plus I DNA 聚合酶购于上海生物工程公司。内切酶购自 TaKaRa 公司。同位素购自北京亚辉公司, 探针标记试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。质粒克隆载体 PT-A dv 和大肠杆

菌 Top-F 10 菌株购自 Clontech 公司。pRSET-C 表达载体(Invitrogen 公司产品)及 BL 21 菌株由中国预防医学科学院病毒所肝炎室焦宏远博士馈赠。Mini prep 质粒提取试剂盒及 Wizard PCR 产物纯化试剂盒购自 Promega 公司。

1.1.3 MNT 膜 人体多种组织的 Northern (MNT) 印迹膜(MNT II)购自 Clontech 公司。它们所载的 mRNA 分别来自脾、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠粘膜和外周血白细胞等 8 种组织。

1.1.4 DNA 测序 采用 ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer 进行测序, 反应试剂采用 PERKIN ELMER 公司的 ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle 测序试剂盒。

### 1.2 方法

1.2.1 电子信息杂交与序列组装 以我们获得的一段 2 948 bp 的 DNA 片段为探针, 用 NCBI 提供的 BLASTN 程序对 GenBank 的人类 EST 数据库进行电子信息杂交筛选, 以期获得与探针序列相匹配 cDNA 片段。在所获片段中选取碱基覆盖率高, 且在端侧者所为探针再次进行杂交。最终将这些片段进行综合分析, 选取相互间具有 > 50 bp 相同的一些片段, 用 Dnastar 软件包 SeqMan 程序进行序列组装。

1.2.2 总 RNA 的提取 Trizol 一步法提取外周血单个核细胞总 RNA, 1% 琼脂糖电泳证明其完整性且无 DNA 污染; 紫外分光光度计测  $A_{260}/A_{280} = 2.00$ 。

1.2.3 3'-RACE RNA 反转录及转录后的 PCR 扩增参见文献[2]。

1.2.4 5'-RACE 具体操作参见文献[2]。

1.2.5 LRP16 全长 cDNA 的构建 将 5'-及 3'-RACE 所扩增的目的片段纯化、回收, 然后将其克隆到 PT-A dv 质粒载体中, 转染感化态 Top-F 10 菌株。挑取 > 10 个菌落进行 PCR 鉴定, 随机挑取 1 个单菌落测序并选取 10 个克隆混合测序。用引物 5'-P 及 3'-P (各 10 mol/L) 对非加尾 cDNA 进行 PCR 扩增, 条件为 96 预变性 3 min 随之以 96 1 min, 64 50 s, 72 1.5 min 进行 35 个循环, 最后 72 延伸 10 min。将 PCR 产物克隆到 PT-A dv 载体中,

然后选单菌落提取质粒测序同时取混合质粒测序。

**1.2.6 Northern 杂交分析** 用经同位素标记的探针针对 MNT 印迹膜进行 Northern 杂交, 操作参照产品说明书。

**1.2.7 LRP16 基因的染色体定位** 用上述钓取的 LRP16 基因的全长 cDNA 序列为探针, 应用 BLASTN 程序在 NCBI 提供的人类基因组重叠片段群数据库中进行电子杂交。

**1.2.8 全长 cDNA 编码蛋白质的计算机分析** 从 LRP16 全长 cDNA 的序列推导出它所编码的氨基酸序列, 应用 Anthonrot V 4.3c 软件预测了该蛋白质的理化特性及基序; 用 NCBI 提供的 BLASTP 程序在 SwissProt 蛋白质库中进行同源检索; 用 NCBI 提供的 COGNITOR 程序通过 COG 数据库进行直系同源比较。

**1.2.9 LRP16 编码蛋白质的原核表达** 取引物 5'-P 及 3'-P 的 PCR 扩增产物, 用引物 5'-EP 及 3'-EP (各 10 pmol/L) 进行第二次扩增, 条件为 96 预变性 3 min 随之以 96 1 min, 64 50 s, 72 1.5 min 进行 25 个循环, 72 延伸 10 min。将产物纯化, 克隆到 PT-Adv 载体中, 转染 Top-F10 菌株。提取质粒并用 *Nde*I 及 *Bam*H I 酶切。将酶切后的目的片段克隆到 pRSET-C 载体中, 转染 BL21 菌株。从加氨苄青霉素的 LB 平板上挑取单克隆菌株进行 PCR 及酶切鉴定, 确证有目的片段插入后将单克隆菌置 LB 液体培养基中于 37 摇菌。菌液  $A_{600}$  值达到 0.3 时, 加 1 mmol/L 的 IPTG 继续培养直至  $A_{600} = 1.0$ 。将菌体裂解液在含 6% SDS 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 考马斯亮蓝染色。计算重组蛋白的表达量。

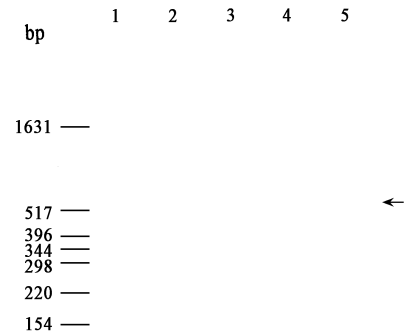
## 2 结果

### 2.1 同源 EST 的筛选及序列组装

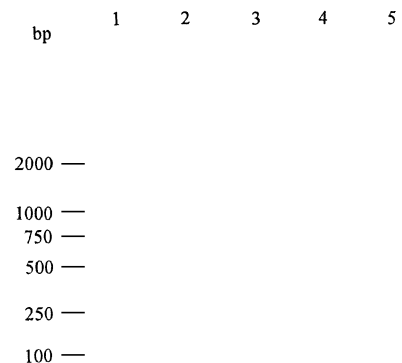
从我们克隆获得的上述 DNA 片段为探针, 在人类 EST 库中电子杂交, 选取其中的 7 条片段, 登录序号分别为 AA 284285, A 1369346, AA 236546, AA 112127, AA 975742, A 1801852, A 1469181 进行序列组装, 共长 878 bp。再以此为探针在 EST 库中步移, 未使该序列得到延长。

### 2.2 LRP16 全长 cDNA 的构建

从上述 878 bp 的片段设计了 5'-RACE 及 3'-RACE 引物。通过 5'-及 3'-RACE 扩增分别克隆到 130 bp 与 560 bp 的片段 (见 Fig. 1, 2)。通过引物 5'-EP 与 3'-EP 的扩增克隆到一条 738 bp 的片段, 将



**Fig 1** 3'-RACE electrophoresis of LRP16 gene  
1: DNA marker; 2, 3: The first and second PCR product respectively; 4, 5: Amplification control with no reverse transcriptase. A row indicates the target fragment



**Fig 2** 5'-RACE electrophoresis of LRP16 gene  
1: DNA marker; 2, 3: The first and second amplification product with the template of dC-cDNA; 4, 5: First and second amplification of cDNA with no poly(dC) tailing

它们整合获得一长度为 980 bp 的 cDNA。该序列中, 54 bp 及 188 bp 处的 ATG 及其侧翼基本符合 Kozak 序列特征, 可以认为是起始密码子。第一个开放读码框 (ORF) 从 54~785 bp 共长 732 bp。5 端非翻译区长 53 bp, 3 端非翻译区长 195 bp, 第二个 ORF 从 188~785 bp, 全长为 597 bp。925~930 bp 位置的 AA TAAA 是 polyA 加尾信号。该 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列 (如 Fig. 3 所示) 经在 GenBank 的 NR 数据库查新及同源性比较被证实为全新序列后, 于 1999 年 12 月在 GenBank 注册, 登录号为 AF202922。

### 2.3 LRP16 组织表达谱

对人体 8 种组织的 poly(A)<sup>+</sup> RNA 进行 Northern 杂交, 发现 LRP16 基因的转录本长约 1.0

```

-53 GGCCGCGCGGTGGGGCCACAGCCGGGTGCCACTGGCCCCCTGGCC -1
1 ATGCGGCGAAGGTGGACCTGAGCACCTCCACCGACTGGAAGGAGCGAAATCCTTTCTG 60
M A A K V D L S T S T D W K E A K S F L 20
AAGGGCCTGACTGACAAGCAGCGGGAGAACATTACTTCTGCAAGGACTTTGTCAGGCTG 120
K G L S D K Q R E E H Y F C K D F V R L 40
AAGAAGATCCCACATGGAAGGAGATGCGGAAAGGGGTGGCTGTGAAGGTGGAGGAGCCC 180
K K I P T W K E M A K G V A V K V E E P 60
AGGTATAAAAAGGACAAGCAGCTCAATGAGAAAATCTCCCTGCTCCCGAGCGACATCACC 240
R Y K K D K Q L N E K I S L L R S D I T 80
AAGCTGGAGGTGGACCCATCGTCAACGCCGCCAACAGCTCCCTGCTGGAGGGCGGTGC 300
K L E V D A I V N A A N S S L L G G G 100
GTGGACGGTGCATTTCATCGGGCCGCCGCCCTCTTACCGAGGACTGGGGACCCCTG 360
V D G C I H R A A G P L L T D E C R T L 120
CAGACTCTTAAGACTGGCAAGCCAAGATCACCGCGGCTATCGGCTCCCGCCAAGTAC 420
Q S C E T G K A K I T G G Y R L P A K Y 140
GTCAITCCACACAGTGGGGCCATCGCCTACGGGGAGCCCAGCCAGCCAGGCTGCCGAG 480
V I H T V G P I A Y G E P S A S Q A A E 160
CTCCGACGTCTACCTGAGCAGTCTGGACCTGCTGCTGGAGCACCGGCTCCGCTCGGTG 540
L R S C Y L S S L D L L L E H R L R S V 180
CGGTCCCTGCATCTCCACCGCGTGTGGCTACCCCTGTGAGGGCGGCCCGAGATC 600
A F P C I S T G V F G Y P C E A A A E I 200
GTGCTGCCACGCTGCGAGAGTGGCTGGAGCAGCACAAGGACAAGGTGGACCGGCTGATC 660
V L A T L R E W L E Q H K D K V D R L I 220
ATCTGCGTGTTCCTCGAGAAGGACGAGGACATCTACCGGAGCCGGTCCCCACTACTTC 720
I C V F L E K D E D I Y R S R L P H Y F 240
CCCGTGGCCTGAGGCTCCCGCAGCCCACCTGACCGGACTGACCCGCTTCGGGACCCC 780
P V A * 243aa
GCTCCAGCTCTGAGAGTCCGCAAGCCTGCAGCCTGGCCTGGCCTGCCACCCCTTC 840
TTTCCCTCCGCCCCCCCCGAGGAGCCTAATAAAGATCTCGTTGTGCAAAAAA 900
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 927

```

**Fig 3** The full length cDNA sequence of LRP16 gene and its deduced amino acid sequence. The italic GC-SP1 sequence, blackened bases are RBS site, and the underlined based is polyadenylation signal. The boxed is the N-terminus of deduced length type amino acid product. Thickened part is the deleted bases of the possible shorter transcript.

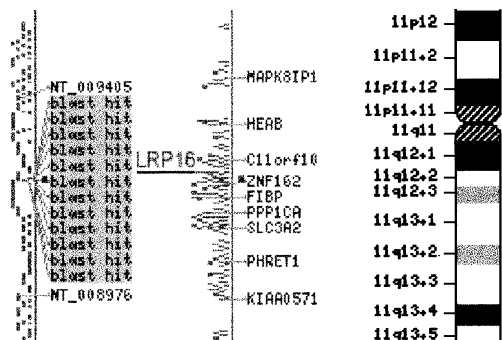
kb, 比较各组织LRP16 的表达量, 结果显示该基因在睾丸、卵巢和结肠粘膜呈高表达, 在前列腺、小脑、脾和胸腺中呈中度表达, 在外周血白细胞表达极弱。

### 2.4 LRP16 基因的染色体定位

用LRP16 基因的全长 cDNA 序列将该基因定位到染色体 11q12.23 (见 Fig 4), 与本组对 3kb DNA 序列采用辐射杂种细胞系法 (RH) 定位结果一致。

### 2.5 蛋白质的同源性分析及功能预测

在 SwissProt 数据库中进行检索, 未显示有较高同源性的蛋白质序列, 所产生的有意义排列序列多为一些与病毒复制及转录相关的非结构蛋白 (登录号: P13889, P27282, P36328, P36327, P27283),



**Fig 4** Chromosomal assignment of LRP16 gene located on chromosome 11q12.2 between gene c11orf10 and ZNF 162.

另外还有一个大鼠组蛋白家族成员 macroH2A. 1

(登录号为 Q02874), 其 Score 均 > 40 bits. 在 COG 库中进行种系发生进化保守性预测, 所产生序列均为 COG2110 类, 并预测了 LRP16 所编码蛋白是与组蛋白 macroH2A.1 具有相关基序的一种核酸结合蛋白.

## 2.6 LRP16 编码蛋白质的原核表达及重组克隆鉴定

选取 8 个 BL21 单克隆菌落, 用 IPTG 诱导 LRP16 编码蛋白质的原核表达并测定其表达量. 8 个菌株中 6 个有表达, 如 Fig 5 所示. 重组蛋白的分子量与计算机预测结果一致, 约为 27 kD. 各个菌株均获过量表达 (> 10%), 并发现 1 号菌株的表达量最大, 高达 60%, 蛋白质产物的分子量则较小, 约 26 kD. 应用 5'-EP 与 5'-RT-P 引物对重组克隆进行 PCR 扩增, 发现 1 号克隆较其它 7 个克隆的插入片段小. 进一步测序结果证明, 1 号克隆的插入片段在起始密码子后 230~259 bp 处缺失 30 个碱基.

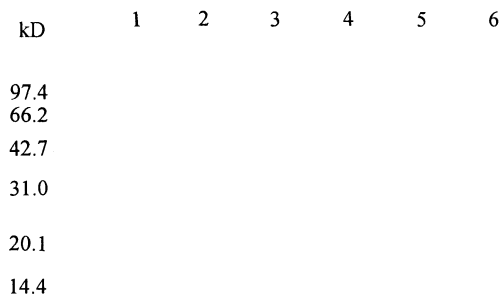


Fig 5 SDS-PAGE of LRP16 prokaryotic expression

1: Protein marker; 2: Vector control without expression of recombinant protein; 3: Recombinant product with 30 bases deleted; 4 to 6: Protein product with expression of recombinant protein

## 3 讨论

通过 RACE 方法, 我们克隆到了 LRP16 基因的全长 cDNA, 共 980bp. 该序列具有下列明显特征: (1) 不包括 Poly(A) 在内, GC 含量较高, 达 65%; (2) 近 5' 端区域有两个 ATG, 相距 132 bp, 其侧翼序列 [GC(A)CATGG] 的 -3 位置与 +4 位置均为嘌呤碱基, 基本符合 Kozak 序列特征<sup>[3]</sup>. 两个 ATG 与 783~785 bp 位置的 TGA 组成了同一个开放读码框 (ORF). 所以该基因的转录本在同一 ORF 中具有了两个潜在的翻译起始位点, 第一个 ORF 的起止位置为 54~785 bp; 共长 732 bp, 编码 243

个氨基酸, 5' 端非翻译区 (5'UTR) 长 53 bp, 3' 端非翻译区 (3'UTR) 长 195 bp; 第二个 ORF 从 188~785 bp, 全长 579 bp, 编码 198 个氨基酸, 5'UTR 长 187 bp, 3'UTR 同第一个 ORF. 二者唯一的不同是长型编码产物较短型在 N 末端延伸了 45 个氨基酸; (3) LRP16 5'UTR 的核酸序列 G/C 含量高 (85%). 于 -53~-48 bp 及 -38~-32 bp 的位置存在“GC 盒”重复序列 (GGGCGG), 它被认为是一种与细胞转录起始因子 Sp1 相互作用并启动基因转录的保守序列, 通常出现于看家基因的启动子区<sup>[4]</sup>. +41~+46 位置的 A GGA GG 具有核糖体结合位点 (RBS) 的特征序列.

绝大多数真核生物在翻译产生蛋白质时遵循单顺反子规则<sup>[5]</sup>, 也就是说当 40S 核糖体沿着 mRNA 滑动时, 在首先出现的 ATG 位置上停止并与 60S 的亚单位结合启动蛋白质合成过程. 除不同剪切方式外, 能编码产生 N 端长短不同两条肽链的基因在哺乳动物中较为少见. 所涉及机制目前认为有两种, 一种是当第一个 ATG 的侧翼序列对启动翻译作用较弱时, 即在其 -3 与 +4 位置不具有有利于启动翻译的保守碱基时, 40S 核糖体有可能“绕过”这一 ATG 而去扫描下一个, 通过 40S 渗漏扫描机制从第二个起始密码子启动翻译<sup>[6]</sup>, 从而产生长短两型肽链; 另一种是通过产生长短两种转录本来实现, 正如 Shaper 等所描述的那样, 长型转录本起始于两个起始密码子上游, 短型转录物起始于两个 ATG 三联密码子之间<sup>[7]</sup>. LRP16 的 mRNA 在同一 ORF 中有两个 ATG, 二者相距 132 nt, 且都符合 Kozak 序列特征, 所以通过渗漏扫描机制编码产生不同长度的两条肽链是没有可能的. 虽然我们没有采用引物延伸和 S1 核酸酶保护等实验来证实 LRP16 基因是否会有两种不同长度的转录体及其各自的丰度如何, 但 LRP16 mRNA 起始位置处的“GC — SP1”重复序列, 以及 +41~+46 位置包含的 RBS 特征使得在上述两个 ATG 之间具有了起始转录短型 mRNA 的可能.

进行 LRP16 基因原核表达时, 我们观察到一种碱基缺失现象, 出现频率为 1/8. 可能的解释是: (1) 由于重组蛋白对细菌产生的毒性压力, 从而使某些菌株对重组子进行了适应性改变. 由 Fig 4 我们不难看出, 发生碱基缺失的 1 号菌株较其它有大的表达优势, 在细菌培养过程中, 我们也观察到 1 号菌株有生长速度快的特点. 这些事实均表明该缺失体尤其适于原核表达; (2) 该碱基缺失体是 LRP16 基因

在转录后经剪接的一种存在方式, 由于它的表达丰度低而不易在克隆过程中被发现. 鉴于其翻译产物对菌体毒性小, 从而在原核表达时容易得到“捕捉”. 尽管目前还不能肯定碱基缺失就是转录后剪接的结果, 一个有趣现象还是值得我们注意的, 那就是 1 号表达质粒重组子并没有因为碱基缺失而使读码框发生移码. 另外, 虽然没有在 GenBank 的 huESTs 库中检索到相应碱基缺失体, 但我们发现一条非冗余同源达 86% 的家鼠 EST (A 1466021), 其碱基序列与上述缺失体相对合. 这一信息使我们用“剪接体”来解释碱基缺失显得更合理.

肿瘤的发生、发展是一个涉及多基因改变的逐步过程, 其中包括基因的突变、缺失和扩增等<sup>[8]</sup>. 近年来的研究资料显示, 基因组 DNA CpG 岛的甲基化修饰也是多步致瘤模式中一个重要组成部分, 如抑瘤基因 P15 启动子区的 CpG 岛在 88% 成人急性髓系白血病 (AML) 中发生超甲基化<sup>[9]</sup>, CALC1、ER 等基因在不同类型的急性白血病中也有类似改变<sup>[10, 11]</sup>. 本研究以探索 AML 发生、发展过程中基因的外向型修饰变化为出发点, 从而实现发现、克隆与白血病复发相关基因的目的. 应用甲基化敏感性 (NotI)RLGS 这一发现新基因的手段<sup>[12]</sup>, 通过对 1 例经历初诊、缓解与复发三个不同阶段 AML 患者的 DNA 样品进行二维凝胶电泳分析, 发现复发的标本有 8 个点消失, 对其中一个点进行克隆, 最终获得一段长约 3kb 的 DNA 片段 (未公布), 并确认该片段代表了一个新的基因. 虽然其 mRNA 序列包含了看家基因的一些特点, 但 Northern 结果显示它在一些增殖活跃的组织中高水平表达. 近期, 于力等用甲基化敏感性 Southern 印迹法证实复发难治白血病病人 3kb DNA 序列中 CpG 岛高度甲基化 (待发表), 对白血病患者的预后评估有一定价值. 这种修饰是否会调控转录尚待进一步研究.

致谢 军事医学科学院二所分子遗传室主任王嘉玺教授在本文整理及撰写过程中给予了热情的指导和帮助, 特此表示感谢.

## 参考文献 (References)

- 1 Kundu T K, Rao M R. CpG islands in chromatin organization and gene expression. *J Biochem* (Tokyo), 1999, **125**: 217~ 222
- 2 韩为东, 于力, 楼方定, 王全顺, 赵瑜, 史子江, 靳海杰. RACE 技术在钓取白血病相关基因 LRP16 全长 cDNA 中的应用. 中国实验血液学杂志 (Han Weidong, Yu Li, Lou Fangding, Wang Quan-shun, Zhao Yu, Shi Zi-jiang, Jing Hai-je. The application of RACE technique to clone the full-length cDNA of a novel leukemia associated gene LRP16. *Chin J Exp Hematol*, 2001, **9** (1): 14~ 17
- 3 Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, 1991, **266** (30): 19867~ 19870
- 4 Kadonaga J T, Courey A J, Ladika J, Tjian R. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 1988, **242**: 1566~ 1570
- 5 Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 1999, **234**: 187~ 208
- 6 Kozak M. Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell*, 1986, **47**: 481~ 483
- 7 Shaper N S, Hollis G F, Douglas J G, Kirsch I R, Shaper J H. Characterization of the full length cDNA for murine  $\beta$ 1, 4-galactosyltransferase. *J Biol Chem*, 1988, **263** (21): 10420~ 10428
- 8 Lee T C, Mukai S. Molecular events in tumor formation. *Int Ophthalmol Clin*. 1997, **37**(4): 215~ 232
- 9 Issa J P, Baylin S B, Heman J G. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia*, 1997, **11** (suppl 1): s7~ s11
- 10 Ritter M, de K E, Huhn D, Neubauer A. Detection of DNA methylation in the calcitonin gene in human leukemias using differential polymerase chain reaction. *Leukemia*, 1995, **9**: 915~ 921
- 11 Issa J P, Zehnauer B A, Civin C I, Collector M I, Sharkis S J, Davidson N E, Kaufmann S H, Baylin S B. The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res*, 1996, **56**: 973~ 977
- 12 Kawai J, Hirose K, Fushiki S, Hirotsune S, Ozawa N, Hara A, Hayasgizaki Y, Watanabe S. Comparison of DNA methylation patterns among mouse cell lines by restriction landmark genomic scanning. *Mol Cell Biol*, 1994, **14**(11): 7421~ 7427