

胸腺素 α 原基因的克隆与序列分析

曹俊霞 金礼吉 刘 哲 安利佳*

(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

摘 要 应用 RT-PCR 法从正常成人外周血和胎儿胸腺中分别克隆得到了四种胸腺素 α 原基因,经序列分析结果表明,克隆的四种 ProTa 基因的核苷酸序列并不一致。与已报道的胸腺素 α 原基因进行比较,胎儿胸腺中克隆的胸腺素 α 原基因几乎无变化,而从成人外周血中所克隆的则变化较大,但变化区域有一定规律,109-120 位都有 GGGAATGCTAAT 碱基的缺失,变化较多的氨基酸集中为天冬氨酸和谷氨酸,而胸腺素 α 原前 28 个氨基酸、中心酸性区和末端核定位信号区域变化较小。该结果为胸腺素 α 原的结构、功能和演化研究提供了信息。

关键词: 胸腺 胸腺素 α 原基因 DNA 序列分析

人胸腺素 α 原(ProTa)基因定位于第 2 号染色体上,编码 109 个氨基酸^[1]。在鼠和人的肾、肝、脾、T-细胞前体等中,这一蛋白的含量似乎与核的大小和细胞生长过程相关^[2]。ProTa 至少有两方面的功能:首先它可作为核蛋白参与细胞增殖,因此 ProTa 在肿瘤预测及诊断、治疗中有一定应用;其次,ProTa 具有免疫刺激活性。ProTa 基因表型复杂,虽其基因已被克隆^[3-6],但它们的核苷酸序列不尽相同,有的差异很大,比如已在 NCBI 登录的 NM-002823、BC022433、AF257099 等之间存在很大差异。为了进一步了解这种差异的分子学基础,我们从成人外周血和胎儿胸腺中通过 RT-PCR 分别钓取 ProTa 基因,进行分析和比较。

材料与方法

1. 实验取材和主要试剂及仪器

3 份正常成人外周血(22-25 岁),由大连血站提供。1 份取自胎儿胸腺,由大连医科大学附属二院提供。TaKaRa RNA LA PCR™ Kit(AMV) Ver. 2.1、DL-2000 DNA Marker、限制性内切酶、DNA 连接酶(购自 TaKaRa);TRIZOL® Reagent、焦碳酸乙二脂(DEPC)(购自 GIBCOBRL),pMD18-T 载体、JM-109 本室保存;PCR 仪(PE-9700);高速冷冻离心机-CF15R(日立公司);Pharmacia Biotch ImazgeMaster® VDS 电泳成像系统。

2. 引物的设计与合成

根据 ProTa 的基因序列^[3-5]设计引物 ProTa-F 和 ProTa-R,由宝生物有限公司合成。

ProTa-F: 5'-CCGATCCATGTCAGACGCAGCCGT AGACACCAG-3'

BamH I

ProTa-R: 5'-CCAAGCTTCTAGTCATCCTCGTCGG TCTTCTG-3'

Hind III

3. 提取 total RNA 和 RT-PCR 反应

按照 TRIZOL® Reagent 试剂盒上的说明,提取血液及胸腺组织中的总 RNA。总 RNA 经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测。以 total RNA 作模板,按反转录试剂盒上的说明进行逆转录反应。反应条件:30℃ 10min, 42℃ 45min, 99℃ 5min, 5℃ 5min, 4℃ 保存。50 μ l PCR 反应体系中,加 5 μ l 反转录产物、5 μ l 10 $\times$ PCR Buffer、4 μ l dNTP(各 2.5mmol/L)、0.5 μ l LA Taq、扩增 ProTa 基因的引物 ProTa-F(10pmol/ μ l)和 ProTa-R(10pmol/ μ l)各 1 μ l 和 33.5 μ l ddH₂O 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:预变性 94℃ 1 min, 98℃ 30 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次,后延伸 72℃ 5 min, 4℃ 保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

4. ProTa 基因的测序

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,回收并与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞 JM-109,PCR 筛选阳性菌落,提取的质粒经酶切鉴定后进行测序。

结 果

1. 分析总 RNA 的质量与目的基因

总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测,可见明显的 28S、18S 和 5S 三条带,说明提取的 RNA 较完整,没有发生降解(图 1)。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见有一条 333bp 左右的 DNA 片段,基本符合预计长度,可能是所钓取的目的基因(图 2)。

2. 序列分析

分析测序结果可见,来自四种个体的 ProTa 基因序列并不相同,个别碱基的变化可能是 PCR 扩增过程中发生的碱基错配。为了尽量避免该问题,PCR 反应中使用了具有外切酶活性的 LA Taq 酶,

本文 2002 年 11 月 11 日收到,2003 年 3 月 9 日接受。

* 联系人:E-mail:Ljan@mail.dlptt.ln.cn

181	GAG	GAA	GAG	GAG	GAG	GAA	GAA	GAA	GGT	GAT	GGT	GAG	GAA	GAG	GAT	GGA	GAT	GAA	GAT	GAG ²⁴⁰
	E ⁶¹	E ⁶²	E ⁶³	E ⁶⁴	E ⁶⁵	E ⁶⁶	E ⁶⁷	E ⁶⁸	G ⁶⁹	D ⁷⁰	G ⁷¹	E ⁷²	E ⁷³	E ⁷⁴	D ⁷⁵	G ⁷⁶	D ⁷⁷	E ⁷⁸	D ⁷⁹	E ⁸⁰
1.	...	...	...	...	...	...	...	...T	...	...G	...	...	...	...A	... **	...	...	...	...	...
2.	...	...	...	...	...	...	...	...T	...	...G	...	...	...	...A	***	...	...	...	...	...
3.	...	...	...	...	...	...	...	...T	...	...G	...	...	...	...A	...	...	...	...	...	...
4.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...T-	...	...	...	...	...	...

241	GAA	GCT	GAG	TCA	GCT	ACG	GGC	AAG	CGG	GCA	GCT	GAA	GAT	GAT	GAG	GAT	GAC	GAT	GTC	GAT ³⁰⁰
	E ⁸¹	A ⁸²	E ⁸³	S ⁸⁴	A ⁸⁵	T ⁸⁶	G ⁸⁷	K ⁸⁸	R ⁸⁹	A ⁹⁰	A ⁹¹	E ⁹²	D ⁹³	D ⁹⁴	E ⁹⁵	D ⁹⁶	D ⁹⁷	D ⁹⁸	V ⁹⁹	D ¹⁰⁰
1.	...	...	...	...	...	...A	...	...	...	...	...	...	...	...	-C	...	...	...	...	...
2.	...	...	...	...	...	...A	...	...	...	...	...	...	...	...	-C	...	...	...	...	...
3.	...*	...	...	...	...	...A	...	...	...	...	...	...	...	...	-C	...	...	...	...	...
4.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

301	ACC	AAG	AAG	CAG	AAG	ACC	GAC	GAG	GAT	GAC	TAA ³³³
	T ¹⁰¹	K ¹⁰²	K ¹⁰³	Q ¹⁰⁴	K ¹⁰⁵	T ¹⁰⁶	D ¹⁰⁷	E ¹⁰⁸	D ¹⁰⁹	D ¹¹⁰	
1.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
2.	...	...C	...C	...	...	...	...	...	...	...	...
3.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
4.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

图 3 ProTα 的 cDNA 和氨基酸序列

短横线表示一致, * 号代表缺失, 加下横线的是多余的核苷酸; 1, 2, 3 为成人血液中克隆的 ProTα 基因; 4 为胎儿胸腺中克隆的 ProTα 基因。

讨 论

正常成人外周血和胎儿胸腺中克隆的 ProTα cDNA 序列间有很大差异, 这可能是由于 DNA 上一些位点的点突变经过连续的选择以及基因剪切的结果。虽然目前尚无定论, 但基因表达的此种多样性是存在的^[7-9]。成人血液中的 ProTα 基因序列之间的差异很小, 而且 N-端前 28 个氨基酸、中心酸性区和 C-末端的核定位序列基本未发生改变。说明虽然成人中的 ProTα 的基因序列发生了较大改变, 但其主要骨架还都具有保守性^[2]。从 109-120 位碱基的缺失, 可能是在胸腺退化性改变及衰变过程中易受到影响, 且该处结构很可能无重要生理功能因而在进化中废退^[10,11]。

个体发育是一个高度程序化的过程, 在发育的不同时空, 存在着不同组合的特定基因的表达。这种程序化的启动与关闭, 控制着特定器官的形成与个体的发育^[12]。婴儿胸腺在出生后一年左右达到最大值, 此后随年龄增长而逐渐变小^[13]。目前对胸腺的功能性退化机制还不太清楚, 不过 ProTα 基因的多样性也许是胸腺退化过程中的微观体现。

胸腺增龄性萎缩机制正成为研究的一大热点^[14,15,16], 近年来通过对模式生物酿酒酵母、秀丽线虫、果蝇等的分子生物学研究, 找到一系列与生命周期及衰老相关的基因^[17], 并提出氧化伤害假说, 基因

组不稳定假说解释衰老现象的机理, ProTα 基因是否也如 a poe 基因一样在各个年龄层有不均匀分布现象^[18], 是否亦是与衰老相关的基因? 上述研究中体现出的 ProTα 基因变化规律, 也将为探索胸腺衰变机理和抑制其衰变的研究提供分子生物学基础, 同时也为这一基因的家族成员及其生物学活性、免疫原性及基因工程产品开发的研究等提供分子基础。

参 考 文 献

- [1] 郑金来等, 1998, 国外医学免疫学分册[J], 21(4).
- [2] Alicia Pineiro, et al., 2000, *Peptides* [J], 21: 1433-1446.
- [3] Goodall GJ, et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [J], 83(23), 8926-8928.
- [4] Eschenfeldt WH, et al., 1986, *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [J], 83(24), 9403-9407.
- [5] Eschenfeldt WH, et al., 1989, *Biol. Chem* [J], 264(13), 7546-7555.
- [6] 郭葆玉等, 2000, 第二军医大学学报[J], Jan; 21(1).
- [7] 刘智敏等, 1999, 生物多样性[J], 1: 52-58.
- [8] 周晴等, 2002, 清华大学学报(自然科学版)[J], 1: 135-138.
- [9] Kuro O M., et al., 1997, *Nature* [J], 390(6): 45.
- [10] Elcuman E A, et al., 1998, *Vet Res Commun* [J], 22(8): 525.
- [11] Tyan M L, et al., 1997, *J Immunol* [J], 118(3): 846.
- [12] 周荣家等, 2001, 遗传[J], 23(1): 86-88.
- [13] 苏华等, 1999, 国外医学免疫学分册[J], 4: 221-224.

- [14] 杜伯雨等, 2002, 中国免疫学杂志[J], 2:143-145. (4):2180.
[15] Cavallotti D., et al., 2000, *Neurochem. int.* [J], 36 [17] Johnson F., et al., 1999, *Cell* [J], 96:291-298.
(1):75. [18] 陈华等, 2002, 复旦大学(自然科学版)[J], 1:63-66.
[16] Sempowski G D., et al., 2000, *J Immunol* [J], 164

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF PROTHYMOSIN ALPHA

CAO Jun Xia JIN Li Ji LIU Zhe AN Li Jia*

(Bioengineering Department, Dalian University of Technology, Dalian 116012 China)

ABSTRACT The proTa gene was cloned from the adult human peripheral blood and the fetus thymus. Four mutitype sequences are found. By analysing, the results show that thymus remodel age-dependently so the gene type is not only one. Notably, some of them are nearly identical and there is almost same in the characteristic structural region of the proTa and the changeable amino is focus on Asp and Glu.

Key words: Thymus Prothymosin alpha Sequence anlysis

* Corresponding author E-mail: Ljan@mail dlptt. ln. cn

独角莲对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用机理的研究

王顺启 倪虹 王娟 陈力*

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要 临床上独角莲对包括肝癌在内的多种肿瘤有一定的治疗作用。为揭示其抑癌机理, 我们用独角莲根茎水提物(the aqueous extract from dried powdered rhizomes of *Typhonium giganteum Engl.*, AEoTGE)作用肝癌细胞株 SMMC-7721, 研究独角莲对 SMMC-7721 细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响。噻唑氮蓝(MTT)比色实验和流式细胞仪(flow cytometry, FCM)测定表明: AEoTGE 能较强抑制 SMMC-7721 细胞的生长, SMMC-7721 细胞被阻滞在 S 期, 并诱导细胞凋亡。提示独角莲是一种在肝癌治疗上有前景的中草药。

关键词: 独角莲 肝癌 细胞周期

我国是肝癌高发区, 每年有 11 万人死于肝癌, 占全世界肝癌死亡人数的 45%, 对我国人民危害极大^[1]。寻找药效好, 副作用低的治疗药物, 一直是肝癌研究的一个重要方面^[2]。

独角莲在我国传统中医治疗中广泛用于治疗多种恶性肿瘤疾病, 有较好的临床疗效^[3,4], 同时动物模型实验也显示独角莲可明显抑制肿瘤生长^[11,12]。近年来虽然人们对独角莲的抑癌作用研究逐步增

多^[3-10]。但至今未能揭示其药效作用机制。

本实验采用噻唑氮蓝(MTT)比色法检测了独角莲根茎水提物(the aqueous extract from dried powdered rhizomes of *Typhonium giganteum Engl.*, AEoTGE)对肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖抑

本文 2002 年 10 月 30 日收到, 2003 年 3 月 8 日接受。

基金项目: 天津市科委重点基金(编号: 003803411)

* 通讯作者。E-mail: lichen 16@eyou.com