论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1740-04

大熊猫核糖体蛋白亚基 *RPS7* 基因的克隆及序列分析

侯怡铃,伍春莲,侯万儒,郝彦哲,张 田 (西华师范大学生命科学学院,四川 南充 637002)

摘 要:目的 了解大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)核糖体蛋白亚基 *RPS7* 基因的结构及其与已报道的人和其他哺乳动物核糖体蛋白亚基 *RPS7* 基因的同源性。**方法** 运用 RT-PCR 技术,从大熊猫的肌肉组织总 RNA 中对核糖体蛋白亚基 *RPS7* 基因的表达序列进行克隆、测序;采用 Gnescan 软件,对所克隆的基因序列进行氨基酸序列推定;采用 ORF finder 软件进行 DNA 序列的开放阅读框(ORF)查找;采用 DNAMAN Version 6,对基因序列和氨基酸序列进行同源性比较;采用 Ex2PASy Proteomics Server 软件进行蛋白质功能位点和生化特性预测分析。**结果** 大熊猫 *RPS7* 基因的表达序列全长为 589 bp, ORF 为 585 bp,编码 194 个氨基酸,该蛋白的相对分子质量为 $22.126\ 85 \times 10^3$,等电点为 10.09,含有 1 个 N-糖基化位点,2 个依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点, 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 1 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点, 2 个十四(烷)酰化位点,2 个酰胺化位点及 1 个 RPS7 蛋白 signature 位点。进一步分析结果显示,大熊猫 *RPS7* 基因的表达序列及其编码的氨基酸序列与已报道的部分哺乳动物具有很高的相似性。**结论** 运用分子生物学原理与相应的技术手段,成功地扩增出大熊猫 *RPS7* 基因的表达序列,并对其编码的蛋白进行了初步分析,丰富和完善了哺乳动物 *RPS7* 基因资料库。

关键词:大熊猫;RT-PCR;*RPS7*;克隆;序列分析
中图法分类号:Q513.1;Q754;Q785 **文献标识码**:A

cDNA cloning and sequence analysis of ribosomal protein S7 gene from giant panda

HOU Yi-ling, WU Chun-lian, HOU Wan-ru, HAO Yan-zhe, ZHANG Tian (College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, Sichuan Province, China)

Abstract: Objective To explore the structure of ribosomal protein S7 (*RPS7*) gene of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and investigate its homologies with other already reported sequences, including *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* and *Bos taurus*. **Methods** The cDNA of *RPS7* was cloned from the giant panda by RT-PCR. The sequence data were analyzed by GenScan software. Blast 2.1 was used to study the homology of the obtained *RPS7* sequence with the gene sequences of other species; Open reading frame (ORF) of the DNA sequence was searched using ORF finder software; Protein structure of the *RPS7* sequence cloned was deduced using Predict Protein software. **Results** The full length of the sequence fragment was 589 bp containing an ORF of 585 bp. The deduced protein sequence showed that the protein was composed of 194 amino acids and its estimated molecular weight was $22.126\ 85 \times 10^3$ with a pI of 10.09. There were 7 different patterns of functional sites: one N-glycosylation site; two cAMP and cGMP-dependent kinase phosphorylation sites; four casein kinase C phosphorylation sites; one casein kinase Ⅱ phosphorylation site; two N-myristoylation sites; two amidation sites and one ribosomal protein S7e signature site in the RPS7 protein. Further analysis indicated that the sequence of *RPS7* and the protein encoded were highly homologous to some mammals reported.

基金项目:国家自然科学基金(30470261);四川省应用技术项目(2006J13-057);四川省教育厅重点科研项目(07ZA120);四川省重点学科动物学建设资助项目(404001);四川省科技厅应用基础项目(2009JY0061)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470261), the Application Technology of Sichuan Province (2006J13-057), the Key Scientific Research Project of Sichuan Committee of Education (07ZA120), the Key Subject Foundation for Zoology of Sichuan Province (404001), and the Application Foundation Project in Sichuan Province (2009JY0061)

作者简介:侯怡铃,女,四川省南充市人,博士研究生,助教,主要从事药物化学、生物化学和分子生物学方面的研究。E-mail: starthlh@126.com
通信作者:侯万儒,E-mail: hwr168@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-05-22;**修回日期**:2009-06-25

Conclusion　The complete coding sequence of *RPS7* gene has been cloned through RT-PCR successfully, which is the first report on the *RPS7* gene from the giant panda.

Key words: *Ailuropoda melanoleuca*; RT-PCR; ribosomal protein S7; cloning; sequences analysis

核糖体(ribosome)是生物细胞内的一种核糖核蛋白颗粒,其主要功能是以 mRNA 为向导将氨基酸合成蛋白质多肽链,是细胞内蛋白质合成的重要细胞器。真核生物的核糖体中约有 80 种核糖体蛋白亚基[1],其中核糖体蛋白的命名与蛋白在核糖体的大小亚基有关,小亚基核糖体蛋白命名为 S1 至 S31,大亚基核糖体蛋白命名为 L1 至 L44[2,3]。RPS7 是 40S 亚基的组成部分。

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是我国特有的珍稀大型野生动物,属国家一级濒危保护动物,主要分布于四川西部和北部、甘肃南部、西藏东部及陕西西南部,主要取食箭竹类植物,具有特殊的科学研究价值和观赏价值。目前,从分子生物学水平上对大熊猫个别基因家族进行了克隆与分析以及对少数功能基因及其生物学功能进行了研究[4-14]。

本研究从大熊猫骨骼肌组织中提取总 RNA,运用 RT-PCR 技术扩增出 *RPS7* 基因的表达序列 cDNA,分析了该表达序列所编码蛋白的序列特征,并与部分哺乳动物物种的序列进行了相似性比较,为开展大熊猫分子生物学研究,尤其为 *RPS7* 结构基因的克隆与比较研究提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　材料及试剂

大熊猫骨骼肌组织取自四川卧龙中国保护大熊猫研究中心死亡的大熊猫,为防止 RNA 降解,所取组织立即冻存于液氮中。

总 RNA 抽提试剂盒 Total Tissue/cell RNA Extractiob Kits 购自 Waton 公司,逆转录试剂盒 Reverse Transcription System 购自 Promega 公司,胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司,T 载体试剂盒(PUC18 Vector Systems)及限制性内切酶 *Pst* Ⅰ、*Sca* Ⅱ均购自宝生物(大连)有限公司,*Taq* Plus 聚合酶购自上海生物工程公司,其他试剂均为国产分析纯。宿主菌 *E. coli* JM109 由本实验室保存。

1.2　方法

1.2.1　总 RNA 的提取　　取 3 mm × 3 mm × 3 mm 左右的样品组织,液氮中充分研磨,按照 Total Tissue/cell RNA Extractiob Kits 说明书提取总 RNA。将所提总 RNA 溶于经 DEPC 处理过的水中,保存于 -70 ℃备用。

1.2.2　引物设计及 RT-PCR　　从 GenBank 数据库中检索到人(*Homo sapiens*, NM_001011)、西藏黄牛(*Bos taurus*, NM_001098874)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*, NM_031570)及小家鼠(*Mus musculus*, NM_011300)4 个哺乳动物物种 *RPS7* 的编码区全序列,根据编码序列的保守性进行引物设计,所设计的引物如下(由北京华大生物科技发展有限公司合成):*RPS7* 上游:5′-GCCATGTTCAG[C/T]TCGAGCGC-3′,下游:5′-TTTACAAC-TGAAACTC[G/T]GGG-3′。

以所提总 RNA 为模板,按逆转录试剂盒操作手册进行 cDNA 第 1 链的合成。反应总体积 20 μl:模板 1 μg, dNTPs 1 mmol/L, $MgCl_2$ 5 mmol/L, Oligo(dT)$_{15}$ 0.5 μg, AMV 反转录酶 15 U, RNA 酶抑制剂 10 U/μl; 反转录条件: 42 ℃ 60 min。再适量取第 1 链产物为模板,采用 25 μl PCR 反应体系进行 PCR 扩增,各成分浓度为:$MgCl_2$ 1.5 mmol/L, dNTP 200 μmol/L,上下游引物各 0.3 μmol/L, *Taq* Plus 聚合酶 5 U。反应条件: 94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min; 52 ℃ 0.5 min; 72 ℃ 1.5 min, 32 个循环; 72 ℃ 10 min。然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 反应产物。

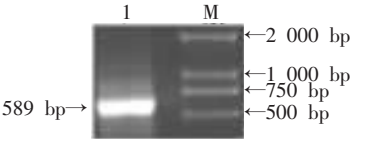
1.2.3　cDNA 的克隆及鉴定　　对 PCR 产物进行回收纯化,用 *Sma* Ⅰ限制性内切酶酶切并平端化质粒 PUC18 片段,将回收产物与酶切并平端化后的质粒片段连接, 22 ℃连接过夜。按常规方法转化感受态细胞,再涂于含氨苄青霉素、IPTG 及X-Gal 的 LB 培养基上过夜培养,用接种针挑取 5 个白色菌落,碱裂解法提取质粒,采用双酶切(*Pst* Ⅰ和 *Sca* Ⅱ)和 PCR 2 种方法对重组子进行鉴定。经鉴定的阳性重组质粒由北京华大生物科技发展有限公司测序。

1.2.4　数据处理　　采用 Gnescan 软件,对所克隆的基因序列进行氨基酸序列推定;采用 ORF finder 软件(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)进行 DNA 序列的 ORF 查找;采用 DNAMAN Version 6,对基因序列和氨基酸序列进行同源性比较;采用 Ex2PASy Proteomics Server 软件(http://au.expasy.org/)进行蛋白质功能位点和生化特性预测分析。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增结果

RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示有 1 条 600 bp 左右的清晰明亮的区带(图 1),重组质粒测序结果显示,该克隆片段全长为 589 bp,与预期长度一致,将该序列提交 GenBank,得到的登录号为: FJ810496。



M: DNA 标准(DL 2000);1: *RPS7*

图 1　大熊猫 *RPS7* 基因表达序列 RT-PCR 结果

1	ATG	TTC	AGT	TCG	AGC	GCG	AAG	ATC	GTG	AAG	CCC	AAT	GGC	GAG	AAG	CCG	GAC	GAG
1	M	F	S	S	S	A	K	I	V	K	P	N	G	E	K	P	D	E
55	TTC	GAG	TCC	GGC	ATC	TCC	CAG	GCT	CTC	CTT	GAG	TTG	GAG	ATG	AAC	TCC	GAC	CTC
19	F	E	S	G	I	S	Q	A	L	L	E	L	E	M	N	S	D	L
109	AAA	GCC	CAG	TTA	AGG	GAG	CTG	AAT	ATC	ACG	GCA	GCC	AAG	GAA	ATT	GAA	GTT	GGT
37	K	A	Q	L	R	E	L	N	I	T	A	A	K	E	I	E	V	G
163	GGT	GGT	CGG	AAA	GCT	ATT	ATC	ATC	TTC	GTT	CCC	GTT	CCT	CAA	CTG	AAA	TCT	TTC
55	G	G	R	K	A	I	I	I	F	V	P	V	P	Q	L	K	S	F
217	CAG	AAA	ATC	CAA	GTC	CGG	CTA	GTC	CGT	GAA	TTG	GAG	AAA	AAG	TTC	AGT	GGG	AAG
73	Q	K	I	Q	V	R	L	V	R	E	L	E	K	K	F	S	G	K
271	CAC	GTT	GTC	TTT	ATT	GCT	CAG	AGG	AGA	ATT	CTG	CCT	AAG	CCA	ACT	CGA	AAA	AGC
91	H	V	V	F	I	A	Q	R	R	I	L	P	K	P	T	R	K	S
325	CGT	ACA	AAA	AAT	AAG	CAG	AAG	CGT	CCC	AGG	AGC	CGC	ACA	TTG	ACA	GCC	GTG	CAT
109	R	T	K	N	K	Q	K	R	P	R	S	R	T	L	T	A	V	H
379	GAC	GCG	ATC	CTG	GAG	GAC	TTG	GTT	TTC	CCA	AGT	GAA	ATT	GTG	GGC	AAG	AGA	ATC
127	D	A	I	L	E	D	L	V	F	P	S	E	I	V	G	K	R	I
433	CGT	GTG	AAA	CTG	GAT	GGC	AGC	CGG	CTC	ATA	AAG	GTT	CAT	TTG	GAT	AAA	GCA	CAG
145	R	V	K	L	D	G	S	R	L	I	K	V	H	L	D	K	A	Q
487	CAG	AAC	AAC	GTG	GAG	CAC	AAG	GTT	GAA	ACT	TTT	TCT	GGG	GTC	TAT	AAG	AAG	CTC
163	Q	N	N	V	E	H	K	V	E	T	F	S	G	V	Y	K	K	L
541	ACA	GGC	AAG	GAT	GTT	AAC	TTT	GAG	TTC	CCC	GAG	TTT	CAG	TTG	TAA			
181	T	G	K	D	V	N	F	E	F	P	E	F	Q	L	*			

图2 大熊猫 *RPS7* 基因 cDNA 序列及其预测氨基酸序列 *：终止密码子

1 MFSSSAKIVK PNGEKPDEFE SGISQALLEL EMNSDLKAQL RELNITAAKE IEVGGGRKAI

61 IIFVPVPQLK SFQKIQV*RLV* *RELE* [*KKFS*] *GK* *H*VVFIAQRRI LPKPTRKSRT KNKQKRPRSR

121 TLTAVHDAIL EDLVFPSEI**V** **GKR**IRVKLDG SRLIKVHLDK AQQNNVEHKV ETFSGVY [KKL]

181 [T] GKDVNFEFP EFQL

：N-糖基化位点；[ ]：依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点；：蛋白激酶 C 磷酸化位点；：酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点；：十四(烷)酰化位点；粗体：酰胺化位点；斜体：RPS7 蛋白 signature 位点

图3 大熊猫、人、褐家鼠、小家鼠和西藏黄牛5个哺乳动物物种 RPS7 的功能位点

2.2 大熊猫 *RPS7* 的 cDNA 序列分析

在 NCBI 数据库中利用 BLAST 进行基因同源性检索，结果发现该序列与其他动物 *RPS7* 的 cDNA 序列具有很高的同源性，证明所克隆的序列为大熊猫 *RPS7* 的 cDNA 序列，ORF 为 585 bp，编码 194 个氨基酸残基，起始密码子为 ATG，终止密码子为完全终止密码子 TAA(图2)。

2.3 RPS7 蛋白的结构分析与功能位点预测

利用 Proteomics Server 软件对大熊猫 RPS7 蛋白预测分析发现：大熊猫 RPS7 蛋白的相对分子质量为 $22.126\ 85 \times 10^3$，等电点为 10.09，含 42 个碱性氨基酸残基(Arg 精氨酸，Lys 赖氨酸和组氨酸 His)，23 个酸性氨基酸残基(Asp 天冬氨酸和 Glu 谷氨酸)，其余氨基酸为非极性、疏水性氨基酸和极性、中性氨基酸。其中 Lys 赖氨酸含量最高(13.70%)，远高于其他氨基酸，Tyr 酪氨酸含量最低，仅为 0.71%，且不含 Cys 半胱氨酸和 Trp 色氨酸。

当用 PredictProtein 软件对大熊猫 *RPS7* 基因所编码蛋白的功能位点进行预测并分析时发现大熊猫的 RPS7 蛋白含有 1 个 N-糖基化位点，2 个依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点，4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点，1 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点，2 个十四(烷)酰化位点，2 个酰胺化位点及 1 个 RPS7 蛋白 signature 位点(图3)。

2.4 *RPS7* 基因和蛋白的比较分析

使用 DNAMAN Version 6，将大熊猫分别与人、褐家鼠、小家鼠和西藏黄牛 4 个哺乳动物物种的 *RPS7* 基因的编码序列及其所编码的氨基酸序列进行同源性比较。结果显示：编码序列具有较高的同源性，同源性分别为 92.80%、88.20%、89.70% 和 88.00%；氨基酸序列同源性均为 100%。在所比对的哺乳动物物种中，与大熊猫的编码序列同源性最高的哺乳动物为人(92.80%)。而所比对的哺乳动物编码蛋白 RPS7 的相对分子质量及等电点完全相同(相对分子质量：$22.126\ 85 \times 10^3$，PI：10.09)。

3 讨论

越来越多的研究表明核糖体蛋白除参与核糖体构成和蛋白质合成之外，还参与复制、转录、RNA 加工、DNA 修复等过程，并作用于细胞的增殖、凋亡、发育等

多种调控和恶性转化方面[15,16]。RPS7 是 40S 亚基的组成部分,属于核糖体蛋白 S7e 家族成员。该蛋白质位于细胞质中,作为典型的编码核糖体蛋白的基因,在核糖体基因组中有各种各样的由此基因转变的伪基因和编码不同蛋白亚型的转录变异体,黑腹果蝇中就包括至少 ABCD 4 种变异体。众所周知,鼠双微基因 2(*MDM2*)属于癌基因,是 P53 主要的负调节物,其在致癌和进行性肿瘤方面发挥重要作用。RPS7 作为 MDM2 调节蛋白与 MDM2-P53 相互作用形成三聚物,导致 MDM2 介导的 P53 在蛋白化作用失效从而稳定 P53 蛋白。并且,RPS7 的过表达可以增加 P53 的转录活性,诱发细胞程序性凋亡及抑制细胞增殖[17]。RPS7 还可以和间隙连接蛋白 43(CX43)相互作用调节发育以及细胞的新陈代谢和生长[18]。研究 RPS7 将有助于深刻理解同一蛋白在细胞活动中发挥多重作用及在肿瘤抑制和治疗方面的机制。

本研究分析结果显示,大熊猫 RPS7 蛋白的编码序列存在近 10% 的多态位点,这些多态位点大多数位于密码子的第 3 位,部分位于第 2 位,仅有个别多态位点位于密码子的第 1 位(如在 364 位上大熊猫为 T,而人、西藏黄牛、褐家鼠和小家鼠为 C),但并未引起大熊猫及所比较的 4 个哺乳动物物种 RPS7 蛋白的氨基酸序列发生变异情况(遗传密码的简并性所致),因此其所编码 RPS7 蛋白的氨基酸序列有相同位置、相同种类和相同数量的功能位点。这说明大熊猫及所比较的 4 个哺乳动物物种的 RPS7 蛋白在结构与功能上具有一致性。

本实验运用分子生物学原理与相应的技术手段,成功地扩增出大熊猫 *RPS7* 基因的表达序列并对其编码蛋白进行了初步分析,丰富和完善了哺乳动物 *RPS7* 基因资料库,为克隆大熊猫 *RPS7* 的结构基因和进一步研究其功能以及分子多态提供了基础资料。

参考文献:

[1] Wool I G. The structure and function of eukaryotic ribosomes[J]. Annu Rev Biochem, 1979, 48: 719 – 754.

[2] 刘志华, 杨　谦. 球毛壳菌 60S 核糖体蛋白 L10a 基因克隆与特性分析[J]. 微生物学通报, 2006, 33 (1): 24 – 28.

[3] Chavez-Rios R, Arias-Romero L E, Almaraz-Barrera Mde J, *et al*. L10 ribosomal protein from Entamoeba histolytica share structural and functional homologies with QM/Jif-1: proteins with extraribosomal functions [J]. Mol Biochem Parasitol, 2003, 127(2): 151 – 160.

[4] Hou W R, Du Y J, Chen Y, *et al*. Nucleotide sequence of cDNA encoding the mitochondrial precursor protein of the ATPase inhibitor from the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) [J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(11): 799 – 802.

[5] Hou W R, Luo X Y, Du Y J, *et al*. cDNA Cloning and Sequences Analysis of RPS15 from the Giant Panda [J]. Recent Pat DNA Gene Seq, 2008, 2(1): 16 – 19.

[6] Hou Y L, Du Y J, Hou W R, *et al*. Cloning and sequence analysis of translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog (yeast) gene (TIMM10) from the giant panda [J]. J Cell Anim Biol, 2009, 3(1): 9 – 14.

[7] Hou W R, Sun G L, Chen Y, *et al*. Molecular cloning of ribosomal protein L26 (RPL26) cDNA from *Ailuropoda melanoleuca* and its potential value in phylogenetic study[J]. Biochem Syst Ecol, 2008, 36 (3): 194 – 200.

[8] Hou Y L, Hou W R, Ren Z L, *et al*. cDNA, genomic sequence and overexpression of crystallin alpha-B Gene (CRYAB) of the Giant Panda [J]. Int J Biol Sci, 2008, 4(6): 415 – 421.

[9] 侯万儒, 陈　瑜, 彭正松, 等. 大熊猫辅酶 Q-细胞色素 C 氧化还原酶的辅酶 Q 连接蛋白基因 cDNA 的克隆及序列比较[J]. 兽类学报, 2007, 27(2): 190 – 194.

[10] Du Y J, Luo X Y, Hao Y Z, *et al*. cDNA cloning and overexpression of acidic ribosomal phosphoprotein P1 gene (RPLP1) from the giant panda[J]. Int J Biol Sci, 2007, 3(7): 428 – 433.

[11] 王祖秀, 郝彦哲, 侯万儒. 大熊猫 NADH-辅酶 Q 氧化还原酶铁硫蛋白亚基 6 基因(NDUFS6)的序列分析 [J]. 兽类学报, 2008, 28(3): 321 – 324.

[12] 郝彦哲, 侯万儒, 杜玉杰, 等. 大熊猫 LSM3c DNA 序列的克隆及序列分析[J]. 四川动物, 2009, 28(2): 118 – 183.

[13] 罗晓燕, 胡锦矗, 侯万儒. 大熊猫 RPS15 cDNA 的克隆及序列分析[J].四川动物, 2008, 27(2):216 – 219.

[14] 杜玉杰, 侯万儒, 彭正松, 等. 大熊猫酸性核糖体磷酸蛋白 P1 基因 cDNA 克隆及序列分析[J].兽类学报, 2008, 28(1): 75 – 80.

[15] Wool I G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21(5): 164 – 165.

[16] Wang Q, Yang C, Zhou J, *et al*. Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer[J]. Gene, 2001, 263(1 – 2): 205 – 209.

[17] Chen D, Zhang Z, Li M, *et al*. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function[J]. Oncogene, 2007, 26 (35): 5029 – 5037.

[18] Singh D, Lampe P D. Identification of connexin-43 interacting proteins [J]. Cell Commun Adhes, 2003, 10(4 – 6): 215 – 220.

(编辑　王小寒)