

猪肿瘤抑制基因候选 5 的克隆与序列分析

张志强, 杨国宇*, 王伟杰, 韩立强, 王静, 武宇晓, 臧猛, 台玉磊
(河南农业大学 动物生理生化实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 基于电子延伸序列, 克隆了仔猪肿瘤抑制基因候选 5 (*TUSC5*), 并初步分析其组织分布情况; 获得了 *TUSC5* 基因的全长序列 636 bp, 包括开放阅读框架 (ORF) 534 bp, 编码 177 个氨基酸。克隆的仔猪 *TUSC5* 基因与人、小鼠、大鼠的 *TUSC5* 基因序列的同源性分别为 83.5%, 82.4%, 82.6%, 推测的氨基酸序列同源性分别为 71.2%, 77.5%, 78%, 成功克隆了猪 *TUSC5* 基因。

关键词: 猪; *TUSC5*; 克隆; 序列分析

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2009)01-0112-03

cDNA Cloning and Sequence Analysis of the Gene of Porcine Tumor Suppressor Candidate 5

ZHANG Zhi-qiang, YANG Guo-yu*, WANG Wei-jie, HAN Li-qiang,
WANG Jing, WU Yu-xiao, ZANG Meng, TAI Yu-lei

(Lab of Animal Physiology & Biochemistry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002 China)

Abstract: In this study, the coding sequence of porcine tumor suppressor candidate 5 (*TUSC5*) were amplified based on the in silico sequence information. The result showed that the full length of *TUSC5* was 636 bp and the open reading frame was 534 bp long. The predicted protein-coding sequence was 177 amino acid residues. Identity analysis showed that the nucleotide sequence of porcine *TUSC5* shares 83.5%, 82.4% and 82.6% with that of human, mouse and rat, respectively. The deduced protein sequence shares 71.2%, 77.5%, and 78% homology with that of human, mouse and rat, respectively. All of these data indicates that the porcine *TUSC5* gene was successfully cloned in the present study.

Key words: Porcine; *TUSC5*; cDNA cloning; Sequence analysis

根据最新的人类基因命名数据库的更新, 人染色体 17-p-3.3 (LOST1) 被命名为肿瘤抑制基因候选 5 (tumor suppressor candidate 5, *TUSC5*), 但其生物学功能尚未被完全弄清^[1]。最近有研究提出, 在大鼠体内克隆出 1 个新的脑上皮细胞衍生因子 1 (BEC-1), 它不同于大鼠 EST 数据库的基因和已知基因, 它与小鼠 *TUSC5* 和人染色体 17-p-3.3 均有很高的同源性, 被认定为大鼠的 *TUSC5* 基因^[1,2]。它在脂肪组织中有显著表达, 涉及脂肪组织分化、脂肪组织的功能调控^[3]。本试验利用猪 ESTs 拼接

序列设计引物, 通过 RT-PCR 克隆了猪 *TUSC5* 基因, 并初步检测了该基因在猪体内的分布情况, 为进一步深入探索其在猪体内表达水平和规律奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 酶与试剂

试验所用通用引物、反转录酶、RNA 酶抑制剂、pMD19-T 载体、dNTP-mix、Takara agaose gel DNA purification kit ver. 2.0, Takara miniBEST plasmid

收稿日期: 2008-10-10

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (0523010500)

作者简介: 张志强 (1982-), 男, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物生物化学。

通讯作者: 杨国宇 (1966-), 男, 河南新野人, 教授, 博士, 主要从事动物生物化学方面的研究。

purification kit ver.2.0 均购于大连宝生物工程有限公司。动物 RNAout 购于天泽基因工程有限公司。2× Taq PCR MasterMix (含染料)购于 TIANGEN 公司。

1.2 基因克隆

1.2.1 引物设计与合成 以报道的哺乳动物 *TUSC5* 基因序列对猪 ESTs 库和 UniGene 进行搜索,利用搜索的 ESTs 拼接序列设计引物,克隆引物序列为 F1: 5'-CTGAGGAATGGTGCCTGAGCT-3' (5'-UTR), R1: 5'-TGCTAGCAGCTCCCTCTAGTTAGT-3' (3'-UTR); 鉴定引物序列为 F2: 5'-GAGGAATGGTGCCTGAGCT-3', R2: 5'-CATCGTCATGGGAATCGTCA-3'。选定 18S RNA 作为内标,长度为 195bp。上游: 5'-GCGCTTTGGTGACTCTA-3'; 下游: 5'-CTGCCTCCTGGATGTG-3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2.2 脂肪组织总 RNA 的提取 取大约 0.1g 猪脂肪组织,采用 RNAout 提取总 RNA,溶解于 15 μ L RNase-free ddH₂O 中备用。

1.2.3 RT-PCR 扩增 反转录体系 RNase-free ddH₂O 6 μ L, dNTP Mixture (10mmol/L) 4 μ L, 5× AMV Buffer 4 μ L, oligo (dT) 18 (50pmol/ μ L) 1 μ L, AMV Reverse transcriptase (5U/ μ L) 2 μ L, Ribonuclease inhibitor (40U/ μ L) 1 μ L, Total RNA 2 μ L。RT 反应程序为: oligo (dT) 18 与 Total RNA 混合, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 立即冰浴 2min; 全体系于 30 $^{\circ}$ C 10min, 42 $^{\circ}$ C 60min, 72 $^{\circ}$ C 15min 后, 立即冰浴 2min, 得到 cDNA; 以此为模板扩增目的基因。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 Takara agaose gel DNA purification kit ver. 2.0 进行纯化。

1.2.4 DNA 序列测定 将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pMD19-T 载体上, 转化到 CaCl₂ 法制备的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。序列测定由北京三博远志生物技术有限公司测定。

1.3 序列分析

在 NCBI 上运行 BLAST, ORF Finder, SignalP 及 BioXM, DNASTar 软件分析。

1.4 猪不同组织中 *TUSC5* 的表达

提取猪心、肝、脾、肺、肾、大脑、小脑、胃、空肠、回肠、结肠、胆囊、甲状腺、肌肉、脂肪 15 个组织的 RNA, 以此反转录得到 cDNA 为模板, 分别以内标引物和鉴定序列引物为引物进行 PCR, 扩增片段用

琼脂糖电泳凝胶检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增及序列分析

猪 *TUSC5* 基因的 PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 可见约 636bp 的条带, 与预期结果相符 (图 1)。切胶回收后, 进行连接、转化、涂板、挑斑后, 进行阳性克隆筛选, 送样测序得到 *TUSC5* 基因的 cDNA 序列。经软件分析, 其开放阅读框为 531bp (79~612bp), 编码 177 个氨基酸 (图 2)。它的蛋白质分子量为 18.94kD, 等电点约为 8.895, 酸性氨基酸为 27 个, 碱性氨基酸为 20 个。

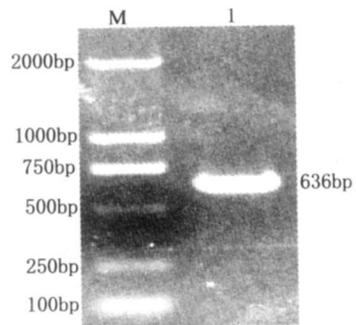


图 1 *TUSC5* 基因电泳结果

```

1  atggccaacccccgggagcagctccgctttgcccggcgaggagccaggcaccgcctctccc
   M A N P G Q P P L C P A Q E P G T A S P
61  ccagacctgccagagatgcagacgctcctcccaaggtggggaccaggatgacgtgcc
   P D L P E M Q T L L A K V G D Q D D V P
121 ctgaaggcggccaagtccctctcgggggctctggacctggagcacaacggccacggcctg
   L K A A K S L S G A L D L E H N G H G L
181 ccctcaaggtagtgccaggggccccgggagcctcggctcccgcggtgctctccgg
   P F K V M S E G P R E A S L P R S S S R
241 gccagctcaggcggcgctccctccatgccaccacctctatgccaggacagagagctc
   A S S R R A S S I A T T S Y A Q D R D V
301 cccaaagattacctgctcctgccatgccctcctgcttctgcccggctgctgacctcaac
   P K D Y L V L A I A S C F C P V W P L N
361 ctcatccccctcatcttttccatcatgtctcgaagtgcgtgcagcaggggacgtggac
   L I P L I F S I M S R S S V Q Q G D L D
421 ggggcccggaggctggcgccgctggcccggatgctcagcatcacttcatgctatggga
   G A R R L G R L A R M L S I T F I V M G
481 atcgtcattatcctggtggcgctgactgtcaacttgcagttcagaagaataa
   I V I I L V A V T V N F A V Q K K *
    
```

图 2 *TUSC5* 基因的 ORF 序列和推测的蛋白质序列

2.2 同源性比较和进化树的绘制

运用 DNASTar, 对克隆的仔猪 *TUSC5* 基因与人、小鼠、大鼠进行同源性比较, 其基因序列同源性分别为 83.5%, 82.4%, 82.6%, 推测的氨基酸序列同源性分别为 71.2%, 77.5%, 78%。根据编码区核苷酸序列绘制这几个物种的进化树 (图 3)。

2.3 组织分布

依据 *TUSC5* 基因和 18S 的 PCR 产物的电泳结果, 使用分析软件 Alpha Ease FC 对电泳结果进行分析, 可以判断出各组织中 *TUSC5* 基因的表达水平 (图 4)。

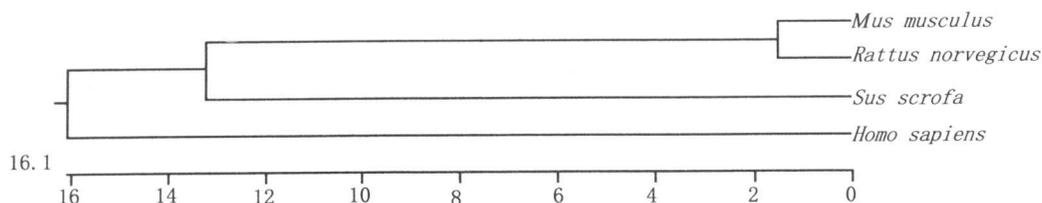


图3 猪与其他物种的 TUSC5 编码区进化树

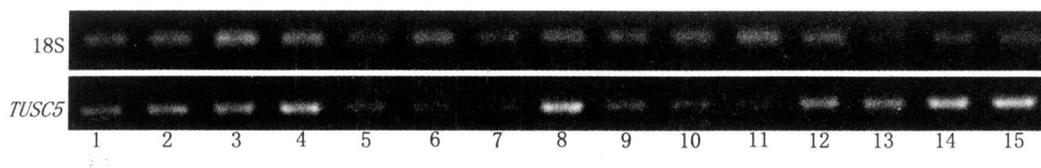


图4 TUSC5 在猪不同组织中表达电泳结果

3 讨论

对于脂肪的相关研究,一直是人们关注的热点。*TUSC5* 基因将可能成为新的着眼点。据报道,其可能与某些代谢症候有一定的联系^[3~8]。试验成功克隆出猪的 *Mighty* 的核苷酸序列(包含开放阅读框架)并进行了初步的序列分析,推测分析其氨基酸序列和特点,为该基因在其他物种中的克隆起到重要参考作用,并为后续的物种间高度保守标签序列的确定奠定了基础。

TUSC5 基因在进化中的保守性比较高,大部分氨基酸是相同的,同源性都达到了 70% 以上,预示其存在相当的进化特异性,因此,对 *TUSC5* 蛋白功能的进一步研究将有重要意义。同源性比较和进化树分析表明,小鼠和大鼠的亲缘关系最近,猪和小鼠、大鼠的亲缘关系,相对于猪和人的亲缘关系略远,这和 4 个物种间的进化关系不太一致。这种现象可能显示出 *TUSC5* 的某些特异性,有待进一步的研究。

本试验利用 RT-PCR 方法,初步探索了 *TUSC5* 基因在仔猪心、肝、脾、肺、肾、大脑、小脑、胃、空肠、回肠、结肠、胆囊、甲状腺、脂肪、肌肉 15 个组织中的分布情况,充分说明了该基因在机体内分布的广泛性。

参考文献:

[1] Konishi H, Sugiyama M, Mizuno K, *et al.* Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at dis-

tal17p13.3 in human lung cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 1892-1905.

- [2] Kawai J, Shinagawa A, Shibata K, *et al.* Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection [J]. *Nature*, 2001, 409: 685-690.
- [3] Takahisa Shibata, Hisashi Koide, Rie Hayashi, *et al.* Molecular cloning and characterization of rat brain endothelial cell derived gene-1 (tumor suppressor candidate 5) expressing abundantly in adipose tissues [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, 263: 38-45.
- [4] Isozaki O, Tsushima T, Miyakawa M, *et al.* Growth hormone directly inhibits leptin gene expression in visceral fat tissue in fatty Zucker rats [J]. *J Endocrinol*, 1999, 161: 511-516.
- [5] Berg A H, Scherer P E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2005, 96: 939-949.
- [6] Moller D E, Kaufman K D. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective [J]. *Annu Rev Med*, 2005, 56: 45-62.
- [7] Altomonte J, Harbaran S, Richter A, *et al.* Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats [J]. *Metabolism*, 2003, 52: 958-963.
- [8] Commins S P, Watson P M, Levin N, *et al.* Central leptin regulates the UCPI and ob genes in brown and white adipose tissue via different beta-adrenoceptor subtypes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 33059-33067.