

大熊猫核糖体蛋白 L34 基因 cDNA 克隆与蛋白特性*

杜玉杰¹, 侯怡铃², 侯万儒²

(1. 湛江教育学院 生化系, 广东 湛江 524000 ;2. 西华师范大学 生命科学学院, 四川 南充 637002)

摘要:为进一步研究 RPL34 的结构基因,也为更深入开展大熊猫分子生物学研究积累科学资料,本研究采用 RT-PCR 方法,首次成功克隆了大熊猫的核糖体蛋白 L34 基因的 cDNA 序列,对克隆序列进行了测序及初步分析,并利用 RPL34 蛋白构建系统树。结果表明,大熊猫 RPL34 基因的表达序列全长为 379 bp,ORF 为 354 bp,编码 117 个氨基酸的蛋白质,该蛋白分子量为 13.292 9 kD,等电点(pI)为 11.48,含有 5 种类型共 11 个功能位点。进一步分析发现,该基因与已报道的人、牛、褐家鼠、小家鼠、非洲爪蟾和斑马鱼等物种的编码序列及其编码的氨基酸序列同源性很高,蛋白质分子量、pI 非常接近,功能位点基本相同,说明核糖体蛋白 L34 基因及其编码蛋白在进化过程中非常保守,进化树分类结果与传统分类一致,表明 L34 蛋白能很好的反映物种间的进化关系。

关键词:大熊猫;RT-PCR;RPL34;克隆;分析

中图分类号:Q959.838;Q343.1⁺7

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2010)03-0019-04

核糖体作为蛋白质合成的工厂,从生物界分化出原核生物和真核生物开始,其结构和功能几乎没有发生过改变,表明了核糖体对细胞乃至生命的重大作用。因此,对其结构组成成分——核糖体蛋白(Ribosomal protein, RP)和核糖体 RNA(rRNA)的研究一直是遗传学和分子生物学研究的重要领域^[1-2]。核糖体蛋白 L34(RPL34)由核糖体蛋白 L34 基因(RPL34)编码,在细胞中与 RPS6、RPL8 协同发挥作用^[3]。目前对该蛋白的研究多见于昆虫^[4-5],而较少涉及哺乳动物^[6]。

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)素有“活化石”之称,据国家林业局野生动植物保护与自然保护管理司统计,目前世界上野生大熊猫近 1 600 只,虽然其濒危状况得到有效缓解,但对大熊猫研究和保护工作仍任重而道远。从多年来的报道成果看,其研究重心在解决大熊猫繁育技术难题方面,分子水平的研究成果相对较少,关于大熊猫重要的核糖体蛋白基因的研究报道则更少^[7-8]。本实验以大熊猫骨骼肌为材料,通过 RT-PCR 克隆出 RPL34 基因的 cDNA 序列,并对其编码蛋白的特性进行分析,为进一步研究 RPL34 的结构基因打下基础,也为更深入

开展大熊猫分子生物学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

大熊猫骨骼肌组织取自四川卧龙中国保护大熊猫中心死亡的大熊猫。总 RNA 抽提试剂盒 Total Tissue/cell RNA Extractiob Kits、逆转录试剂盒 Reverse Transcription System、胶回收试剂盒、Taq plus 聚合酶、T 载体试剂盒(PUC18 Vector Systems)、限制性内切酶 Pst I、Sca II 均购自宝生物工程(大连)有限公司;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;其它试剂均为国产,分析纯。宿主菌为本实验室保存的 *E. coli* JM109。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 取一小块肌肉组织迅速放于液氮中充分研磨,然后提取总 RNA 用于反转录实验;也可将其溶于经 DEPC 处理过的水中,置于 -70 °C 保存。

1.2.2 引物设计及一步法 RT-PCR 根据 Genbank 中已报道的人(*Homo sapiens*) (BC001773)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*) (BC167113)、小家鼠(*Mus muscu-*

* 收稿日期 2009-12-29 修回日期 2010-03-12

资助项目:国家自然科学基金项目(No. 30470261);四川省应用技术项目(No. 2006J13-057);四川省教育厅重点科研项目(No. 07ZA120)

作者简介:杜玉杰,女,助教,硕士研究生,研究方向为生物化学和分子生物学,通讯作者:侯万儒, E-mail: hwr168@yahoo.com.cn

lus)(BC028517)等 *RPL34* 的编码序列设计简并引物,前引物为 5'-TCAQ[A/G]ATGGI[T/C]CAGCGT TTG-3';后引物为 5'-TTATTI[A/T]GCTTTCTGACT CTG-3'。

用 Oligo dT 作为反转录引物,以提取的 RNA 为模板,用 20 μL 反应体积合成 cDNA 第一链,约 1 μg 总 RNA,5 mM MgCl₂,1mM dNTPs,0.5 μg Oiligo(dT)₁₅,10 U/μL RNA 酶抑制剂,15 U AMV 反转录酶;反转录条件为 42 °C,60 min;取适量 cDNA 第一链作模板,用所设计的简并引物进行 PCR 扩增:1.5mM MgCl₂,200 μM dNTP,引物各 0.3 μM,5 U Taq plus 聚合酶,总反应体积为 25 μL,94 °C,4 min,94 °C,1 min,45 °C,0.5 min,72 °C,1.5 min,35 个循环,72 °C,7 min;PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并用成像系统记录结果。

1.2.3 cDNA 克隆与鉴定 回收纯化 PCR 产物, *Sma* I 限制性内切酶酶切质粒 pUC18 并平端化,将两者 22 °C 下连接 12 h。常规方法转化 *E. coli*JM109 感受态细胞,蓝白斑筛选,煮沸法提取质粒,双酶切(*Pst* I 和 *Sca* II)和 PCR 鉴定重质粒。选取 3 个重组质粒培养,然后送北京华大生科技发展有限公司测序。
1.2.4 数据分析 利用 GENSCAN(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)查找 DNA 序列的 ORF;利用 DNA MAN Version 6 推定所克隆的基因的氨基酸序列并比较序列同源性;利用 ExPASy Proteomics Server 软件(<http://au.expasy.org/>)预测分析蛋白质功能位点和生化特性。

2 结果

2.1 RNA 提取

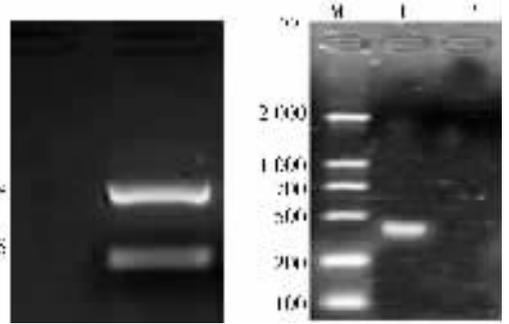
按 Total Tissue/cell RNA Extractiob Kits 说明书的推荐方法提取总 RNA,所提经琼脂糖凝胶电泳显示有 18S RNA 和 28S RNA 两条清晰明亮的条带(图 1 左),表明所提 RNA 质量良好,可用于反转录。

2.2 cDNA 克隆及测序

以所提 RNA 为模板反转录出 cDNA,再按实验方法所述,克隆 *RPL34* 基因的 cDNA 序列,电泳结果显示在大约 400 bp 处有 1 条明亮的带(图 1 右),对重组质粒的测序结果表明该克隆片段为 379 bp,符合预期长度。将测序结果用 Blast 检索发现,该序列与已报道的 *RPL34* 基因序列的最高同源性达 94%,表明克隆产物就是目的片段大熊猫 *RPL34* 的 cDNA

序列。该序列已在 GenBank 数据库登记。

对测序结果进行分析,大熊猫 *RPL34* 的 cDNA 序列 ORF 为 354 bp,编码 117 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA(图 2)。该序列包含 A、T、G 和 C 4 种碱基,其平均含量按上述顺序分别为 29.6%、25.3%、25.1% 和 20.1%,不含其他种类碱基。



M: Marker2000; 1: *RPL34* 扩增结果; 2: 空白对照

图 1 大熊猫骨骼肌总 RNA 提取及 *RPL34* 基因表达序列 RT-PCR 结果

Fig. 1 The total RNAs extracted from the skeletal muscle and RT-PCR amplification result of *RPL34* of *A. melanoleuca*



图 2 大熊猫 *RPL34* 基因 cDNA 序列及其预测氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *RPL34* cDNA from *A. melanoleuca*

2.3 RPL34 蛋白预测

利用 Proteomics Server 软件对大熊猫 *RPL34* 蛋白预测分析发现:该蛋白分子量为 13 292.9 μ pI 为 11.48,含 32 个带正电荷的氨基酸残基(精氨酸和赖氨酸),3 个带负电荷的氨基酸残基(天冬氨酸和谷氨酸),其余氨基酸均为中性;该蛋白含有 5 种类型共 11 个功能位点,即 1 个 N-糖基化位点、1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、3 个 N-酰基化位点及 1 个 *RPL34e* signature(图 3)。

3 讨论

3.1 基因编码序列和氨基酸序列同源性比较

将大熊猫分别与人(*H. sapiens*)、牛(*Bos taurus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、小家鼠(*M. musculus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的 *RPL34* 基因的编码序列及其所编码的氨基酸序列进行比对可知,基因编码序列同源性分别为 95.5%、93.2%、91.0%、90.1%、82.2% 和 78.8%;氨基酸序列同源性分别为 100.0%、100.0%、100.0%、99.1%、95.7% 和 94.0%。由此可见,*RPL34* 基因的编码序列及其所编码的氨基酸序列同源性很高,在所比对的哺乳动物物种中,与大熊猫的编码序列及氨基酸序列同源性最高可达 95.5%(人)和 100%。进一步对所编码的蛋白分子量及等电点进行预测(表 1),发现各分子量和等电点的都十分接近。这些分析结果表明 *RPL34* 基因的编码序列及其所编码的氨基酸序列在哺乳动物、两栖动物及鱼类中高度保守。

3.2 *RPL34* 蛋白主要功能位点比较

用 PredictProtein 软件对 6 个物种的 *RPL34* 基因所编码蛋白的功能位点进行预测并分析(图 3),结果发现:大熊猫与所比较的 4 个哺乳动物物种(人、牛、褐家鼠、小家鼠)具有相同位置、相同种类和相同数量的功能位点,即 1 个 N-糖基化位点、1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、3 个 N-酰基化位点及 1 个 *RPL34e* signature; 而比非洲爪蟾少了一个 N-糖基化位点(14~17 位),比斑马鱼少了两个蛋白激酶 C 磷酸化功能位点(38~40 和 41~43 位)。



图 3 大熊猫与其它 6 个物种 *RPL34* 蛋白的氨基酸序列功能位点比较

Fig. 3 Comparison of the functional sites in *RPL34* amino acid sequences among the 7 species

进一步分析图 3 可知,该蛋白序列在上述物种中仅有 11 处氨基酸差异(用小写字母表示),其中第 16 位、第 38 和 41 位、第 62 和 113 位氨基酸差异分布于 *RPL34* 蛋白的功能位点内。正是第 16 位、第 38 和 41 位氨基酸差异造成了大熊猫与非洲爪蟾、斑马鱼 *RPL34* 蛋白功能位点的差异:非洲爪蟾 *RPL34* 蛋白的第 16 位氨基酸残基由丙氨酸转变为苏氨酸(A→t),导致该蛋白在 14~17 位形成一个新的 N-糖基化位点,再追踪其核苷酸序列发现,氨基酸的转变是由密码子由 GCC→ACC 所致;而斑马鱼在第 38 和 41 位氨基酸分别由缬氨酸转变为苏氨酸(V→t)、丙氨酸转变为丝氨酸(A→s),这两处差异则造成该蛋白在 38~40 和 41~43 位形成两个额外的蛋白激酶 C 磷酸化功能位点,密码子分别由 GTT→ACT、GCA→TCA;而第 62 位和第 113 位氨基酸差异并未造成该蛋白功能位点的缺失、增加或变异,其产生和存在的意义尚不清楚。此外,位于蛋白质功能位点之外的 6 处差异,不会对该蛋白的主要功能造成影响,但是否会对蛋白结构等产生影响还有待进一步研究。

3.3 同源关系

对真核生物分子进化方面的首次研究是通过小亚基 rRNA(SSU-rRNA)进行的^[9],近年核糖体蛋白也成为研究生物分子进化的候选标记。由序列比对可知,*RPL34* 蛋白序列高度保守,这表明该蛋白可用于构建分子进化树,进行分子进化方面的研究。从构建的进化树来看,分类结果与传统分类一致,表明 *RPL34* 蛋白能真实地反应物种进化的关系,并在物种进化关系的研究中具有重要的参考意义和研究价值(图 4)。

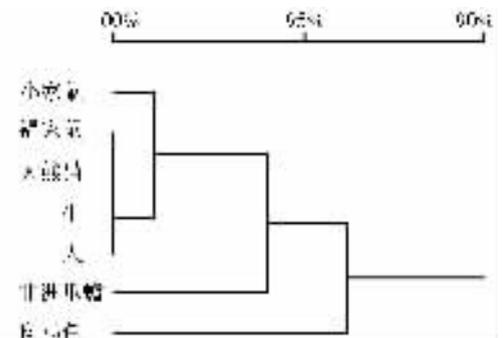


图 4 利用大熊猫 *RPL34* 蛋白序列构建进化树

Fig. 4 Constructing the homology tree using the amino acid sequence of Protein *RPL34* from *A. melanoleuca*

表 1 大熊猫与其它 6 个物种的 RPL34 蛋白分子量及等电点

Tab. 1 Molecular weight and pI of RPL34 protein of *A. melanoleuca* and other 6 species

物种	分子量/ kD	pI	物种	分子量/ kD	pI
大熊猫 <i>A. melanoleuca</i>	13.292 9	11.48	小家鼠 <i>M. musculus</i>	13.292 9	11.47
牛 <i>B. taurus</i>	13.292 9	11.48	非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	13.291 9	11.48
人 <i>H. sapiens</i>	13.292 9	11.48	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	13.368 9	11.47
褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	13.292 9	11.48			

参考文献:

- [1] Wool I G , Chan Y L , Gluck A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins[J]. *Biochem Cell Biol* ,1995 , 73 :933-947.
- [2] Draper D E , Reynaldo L P. RNA binding strategies of ribosomal proteins[J]. *Nucl Acids Res* ,1999 27 :381-388.
- [3] Niu L L , Fallon A M. Differential regulation of ribosomal protein gene expression in *aedes aegypti* mosquitoes before and after the blood meal[J]. *Insect Mol Biol* 2000 9(6) : 613-623.

- [4] Niu L L , Fallon A M. A ribosome-free extract from cultured cells improves recovery of polysomes from the mosquito fat body :analysis of vitellogenin and ribosomal protein rpl34 gene expression[J]. *J Insect Physiol* ,2002 ,48(9) :835-843.
- [5] Blitvich B J ,Rayms-keller A ,Blair C D ,et al. Molecular cloning and complete cDNA sequences of the ribosomal proteins rpl34 and rpl44 from *aedes triseriatus* mosquitoes[J]. *DNA Seq* 2000 ,11(5) :451-455.
- [6] 范瑞文 ,董常生 ,李鹏飞 ,等. 核糖体蛋白 L34(RPL34)在白色青年羊驼皮肤内表达的研究 [C]/[编者不详]中国畜牧兽医学动物解剖学及组织胚胎学分会第十五次学术研讨会论文集 [出版地不详] [出版者不详] , 2008.
- [7] 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 and Cell Biology* 2007 26 (11) :799-802.
- [8] 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(RPLP1)cDNA 克隆及序列分析 [J]. *兽类学报* 2008 28(1) :75-80.
- [9] Sogin M L. Early evolution and the origin of eukaryotes[J]. *Curr Opin Genet Dev* ,1991 (4) :457-463.

Animal Sciences

cDNA Cloning of Ribosomal Protein L34 Gene from Giant Panda and Analysis to Features of the Encoding Protein

DU Yu-jie¹ , HOU Yi-ling² , HOU Wan-ru²

(1. Biochemical Department , Zhanjiang Education College , Zhanjiang Guangdong 524000 ;

2. College of Life Science , China West Normal University , Nanchong Sichuan 637002 , China)

Abstract : In order to study the structural gene of RPL34 and accumulate a wealth of data for research on the molecular level , the cDNA of RPL34 was cloned successfully for the first time from the giant panda(*Ailuropoda melanoleuca*) using RT-PCR , which was also sequenced , analyzed preliminarily and constructed the tree using protein RPL34. The result shows that the cDNA fragment cloned is 379bp in size containing an open reading frame of 354 bp. The deduced protein sequence shows that the protein is composed of 117 amino acids and its estimated molecular weight is 13.292 9 kD with a pI of 11.48. Topology prediction shows there are eleven functional sites clarified five types. Alignment analysis indicates that the nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence share a high homology with some species studied , including *Homo sapiens* , *Bos Taurus* , *Rattus norvegicus* , *Mus musculus* , *Xenopus laevis* and *Danio rerio*. The molecular weight and pI are more closed and functional sites are roughly the same. These results display the gene and its encoding protein is highly conserved. The same category between the tree constructed by Ribosomal Protein L34 and the traditional classify indicate that the RPL34 can reflect the relationship among species very well.

Key words : giant panda ; RT-PCR ; RPL34 ; cloning ; analysis