一个新的人类硫氧化还原蛋白基因的克隆

周彦 潘美辉 袁建刚 杜光伟 强伯勤

(中国医学科学院基础医学研究所中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要 根据不同发育阶段(13, 33周)的人胎脑组织 mRNA 差异显示分析(又称 DDRT-PCR)所得到的具有差异表达的 EST 的序列, 设计引物筛选点阵排列的人胎脑 cDNA 文库, 得到一个新的全长 cDNA 克隆. 这个克隆全长 1 208 bp, 包含一个 889 bp 的开放阅读框, 一个 132 bp 的 5' 非翻译序列和一个 209 bp 的 3' 非翻译序列以及典型的 polyA 加尾信号. 其推断的氨基酸序列与人硫氧化还原蛋白同源, 而且含有硫氧化还原蛋白的保守的活性位点序列. 将它命名为人的类硫氧化还原蛋白基因(human thioredoxin like gene, *hTRXL*).

关键词 差异显示 硫氧化还原蛋白 胎脑

从胚胎发育到个体生长、成熟、衰老的整个生命过程中, 人脑始终发挥十分重要的作用. 脑的发育与分化直接影响了人体的多种生物功能, 因此成为生物学最活跃的研究领域之一. 系统地分离、克隆与脑的发育、分化相关基因的 cDNA 可为鉴定基因功能、探索脑发育的奥秘及防治脑发育不良导致的神经疾患提供有益的信息, 具有重要的意义. 本文选择不同发育阶段(13, 33周)的人胎脑组织, 应用 mRNA 差异显示分析^[1](DDRT-PCR)等技术, 系统分离、鉴定有差异表达特征的新基因 cDNA. 根据新基因 cDNA 的序列设计引物, 通过筛选点阵排列的人胎脑 cDNA 文库^[2], 得到一个新的全长 cDNA 克隆. 序列同源性比较结果表明, 它与人的硫氧化还原蛋白(human Thioredoxin)基因同源.

1 方法

(1) 具有差异表达特征的 EST 的克隆. mRNA 差异显示实验的体系和设计参照文献[3]. 回收具有差异表达的 cDNA 条带, 经 PCR 再扩增后, 回收并克隆入 pGEM-T 载体. 将克隆的差异 cDNA 片段测序, 并利用 Blast 软件与 GenBank 数据库中的序列进行比较.

(2) 点阵排列的人胎脑 cDNA 文库的制备和筛选^[2]. 在 114 块 24 孔板中扩增 λ DR2 噬菌体 cDNA 文库, 每一孔中平均包含有 1 200 个独立克隆, 总共约 3.3×10^6 个独立克隆. 分别制备行、列、盒的混合管. 然后根据差异片段的序列设计特异的引物, 用 PCR 方法按如下步骤筛选: 1) 盒亚文库的筛选; 2) 管亚文库的筛选, PCR 筛选阳性管的每行和每列的混合亚文库, 阳性行、阳性列交叉的管为阳性管; 3) 阳性管的噬菌斑原位杂交, 挑取阳性单克隆. 在得到的阳性克隆中选择最长的克隆进行测序.

(3) 胎脑组织及成人多种组织 Northern 杂交. 取 13 周胎儿大脑和 33 周胎儿大脑总 RNA 各 30 μ g, 在含有甲醛的琼脂糖凝胶上进行 RNA 电泳, 毛细管洗脱法进行转膜, 用同位素标记的探针杂交, 洗膜后压 X 光片放射自显影. 同时, 为了鉴定这个 cDNA 的组织表达特征, 对 CLONTECH 公司的成人多组织膜(MTNTM) Blot 进行同样条件的 Northern 杂交.

(4) DNA 序列分析. 利用 Blast 软件与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比较和分析^[4].

2 结果

2.1 阳性 cDNA 克隆的分离和鉴定

根据差异 cDNA 片段的序列设计特异的引物,用 PCR 的方法逐级筛选点阵排列的 cDNA 文库后,得到 4 个 PCR 阳性的含外源 cDNA 片段的噬菌体管,再通过每阳性管噬菌斑原位杂交获得单一的阳性克隆,并用特异引物鉴定阳性克隆。用 PCR 的方法鉴定,插入 cDNA 的长度介于 0.8~1.2 kb。选择最长的 cDNA 克隆测序。

```
1   T CCG CCG TCG CCA CCT CTT CTG TCC AGG CCT CCG CCT TCC TGA GCA TCT CTC CTT CCT   58
                                     *
59   CTC CCA GAT CGT CTT CTC CTT CAG TTT CAA AGC CAG TGG CGT CGC GGC CAC CCT GCC GGG   118
119  CTC TCT GTG AGG ATG GTG GGG GTG AAG CCC GTC GGG AGC GAC CCG GAT TTC CAG CCA GAG   178
1   M V G V K P V G S D P D F Q P E   16
179  CTG AGC GGC GCG GGC TCC AGA CTC GCC GTG GTC AAG TTC ACC ATG AGA GGG TGT GGG CCA   238
17   L S G A G S R L A V V K F T M R G CGPC   36
239  TGT TTG AGG ATT GCC CCA GCA TTC AGT TCT ATG AGT AAT AAA TAT CCA CAG GCT GTT TTC   298
37   G L R I A P A F S S M S N K Y P Q A V F   56
299  TTG GAA GTC GAT GTA CAT CAG TGT CAG GGA ACA GCT GCC ACC AAG AAT ATA TCA GCA ACA   358
57   L E V D V H Q C Q G T A A T N N I S A T   76
359  CCT ACA TTT TTG TTT TTT CBA AAC AAA GTG AGA ATT GAT GAA TAT CAA GGA GCA GAT GCT   418
77   P T A L A A R N K V R I D Q Y Q G A D A   96
419  GTG GGA TTA GAA GAA AAA ATC AAG CAG CAC TTA GAA AAT GAC CCT GGA AGC AAT GAG GAC   478
97   V G L E E K I K Q H L E N D P G S N E D   116
479  ACA GAT ATT CCA AAA GGC TAT ATG GAT TTA ATG CCT TTT ATT AAC AAA GCT GGT TGT GAA   538
117  T D I P K G Y M D L M P A I N K A G C E   136
539  TGT CTT AAT GAA AGT GAT GAG CAT GGA TTT GAC AAC TGT TTA CGA AAA GAC ACA ACC TTC   598
137  C L N E S D E H G A D N C L R K D T T F   156
599  TTG GAA TCT GAC TGT GAT GAA CAG CTG CTT ATT ACT GTG GCA TTC AAT CAA CCT GTT AAG   658
157  L E S D C D E Q L L I T V A F W Q P V K   176
659  CTT TAT TCC ATG AAA TTT CAA GGG CCA GAT AAT GGT CAG GGC CCT AAA TAT GTA AAA ATT   718
177  L Y S M K A Q G P D N G Q G P K Y V K I   196
719  TTT ATC AAC CTA CCC CGA TCT ATG GAT TTT GAA GAG GCA GAA AGA AGT GAA CCA ACT CAA   778
197  A I N L P R S M D A E E A E R S E P+ T Q   216
779  GCT CTG GAA CTG ACA GAG GAT GAT ATT AAA GAA GAT GGC ATT GTT CCA CTT CGT TAT GTT   838
217  A L E L T E D D I K E D G I V P L R Y V   236
839  AAG TTT CAG AAT GTT AAC AGT GTA ACT ATA TTT GTT CAG TCG AAT CAA GGT GAA GAG GAA   898
237  K A Q N V N S V T I A V Q S N Q G E E E   256
899  ACA ACA AGA ATT TCA TAT TTT ACT TTT ATT GGT ACT CCA GTC CAG GCA ACA AAT ATG AAT   958
257  T T R I S Y A T A I G T P V Q A T N M N   276
959  GAC TTC AAA CGA GTA GTT GGC AAA AAA GGA GAA AGC CAC TAA GGT ACA AAA GAC ACT GGA   1018
277  D F K R V V G K K G E S H *   289
1019 CAA CCA TAT TGC AAT CAG ATC TAC AGC TCC TGG ATA ATT GCT TGA TTC TCG CCA GAG ACT   1078
1079 GTC AAT GTT TCA TTC ATT GCC ATT ACC AAT AAA TCA TTG CTT TTG TTC AGA TGG TAT CAC   1138
1139 TAG TGT TTC CAT TGT AAT CTT GAC ACA TGC AAT TGT AAA TAA AAG TCA CCA CTT TTG CCA   1198
1199 AAA AAA AAA A   1208
```

图1 人的类硫氧化还原蛋白基因的 cDNA 序列以及推测的氨基酸序列

* 为终止密码子, **CGPC** 为硫氧化还原蛋白保守的活性位点, AATAA 为加尾信号

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-12-1307>

2.2 DNA 序列分析和功能预测

利用 ABI PRISM™ Dye Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Pekin Elmer 公司) 进行测序反应. 以 ABI 377 DNA 自动分析测序仪测定 DNA 的核苷酸序列. 最长的 cDNA 克隆长度为 1 208 bp, 5' 端非编码区 132 bp, 3' 端非编码区 209 bp, 它含有一个 889 bp 完整的阅读框, 编码一个 289 个氨基酸残基的蛋白质(图 1). 这个蛋白质 N 端的 105 个氨基酸残基与人的硫氧化还原蛋白在氨基酸水平有 42% 的同源性和 55% 的相似性, 而且这个区域还包含有硫氧化还原蛋白的保守的活性位点序列 CGPC^[5] (Cys-Gly-Pro-Cys) (图 2); 其 C 端的 184 个氨基酸残基与蛋白数据库中的已知蛋白没有任何同源. 我们将这种新的人硫氧化还原蛋白的类似蛋白命名为人的类硫氧化还原蛋白基因(human thioredoxin like gene, *hTRXL*).

```

hTRXL VKPVGSDPDFQPEL SGAGSR LA VVKFTMRG CGPCLRLA PAFSSMSN KY P QAV FLEVDV HQ 63
hTRX  VKQIE SKTAA QEA L DAAGDK LV VVD F SATW CGPCKM LN FFAH SL SE KY SNVI FLEVDV DD 61

hTRXL CQGT AATNNISA TETAL AARNKVRIDQYQ GADAVGLE EK I KQHLENDPGSNEDTDIPKGYMD 125
hTRX  CQDV A SECEVKC TETFO AAKKGQKVGEAS GANKEK LEATINE _____ 103

hTRXL LMPAINKAGCECLNESDEHGADNCLRKDTTFLESDCDEQLLITVAFNQPVKLYSMKAQGPDNG 185
hTRX  _____

hTRXL QGPKYVKIAINLPRSMDAEEAERSEPTQALELTEDDIKEDGIVPLRYVKAQNVNSVTIAVQSN 251
hTRX  _____

hTRXL QGEEETTRISYATAIGTPVQATNMNDFKR VVGKKGES H 289
hTRX  _____

```

图2 人的类硫氧化还原蛋白(*hTRXL*)与人的硫氧化还原蛋白(*hTRX*)氨基酸序列的比较
□代表同源的氨基酸

2.3 表达特异性分析

以全长 cDNA 为模板, 用随机引物法标记探针, 掺入 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, 与胎脑组织总 RNA 以及成人多种组织 mRNA 进行 Northern 杂交. 胎脑组强 Northern 结果表明, 这个基因有一个长约 1.2 kb 的转录本, 而且它在不同发育阶段的胎脑组织中有表达上的差异. 由 β -actin 校正过的扫描结果可知, 它在 13 周大脑的表达量与 33 周大脑的表达量相比高出 13 倍. 这与两者的差异显示结果也完全一致. 在 8 种成人组织脑、心脏、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾和胰腺中均有不同程度表达, 其中在心脏和骨骼肌中的表达水平明显高于其他几种组织(图 3).

图3 人的类硫氧化还原蛋白基因的表达特异性分析

(a) 1 为 33 周大脑, 2 为 13 周大脑; (b) 1 为心脏, 2 为脑, 3 为胎盘, 4 为肺, 5 为肝脏, 6 为骨骼肌, 7 为肾脏, 8 为胰腺

硫氧化还原蛋白是一类具有氧化还原活性的小分子蛋白质^[6,7]。它们具有多种重要生物功能。其活性中心的二巯基可被可逆的氧化形成二硫键,并可通过这个过程来控制靶蛋白中二硫键或二巯基的形成,调控靶蛋白的活性与功能。另外,它们还具有一些不依赖氧化还原活性的功能^[8]。关于我们所分离得到的人的类硫氧化还原蛋白基因的活性和功能的研究正在进行之中。

致谢 本工作为国家“八六三”高科技(Z19-02-02-01)与国家“973”资助项目。

参 考 文 献

- 1 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic message RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257: 967~ 971
- 2 Munroe D J, Loebbert R, Bric E, et al. Systematic screening of an arrayed cDNA library by PCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2209~ 2213
- 3 Pan M H, Yuan J G, Du G W, et al. Isolation and expression pattern analysis of novel ESTs from human fetal brain. *Chinese Science Bulletin*, 1998, 43(21): 1815~ 1819
- 4 Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PST-BLAST a new generation of protein database search program. *Nucleic Acid Res*, 1997, 25: 3389~ 3402
- 5 Antonio M V, Damdimopoulos A E, Gustafsson J A, et al. Cloning, expression and characterization of a novel escherichia coli thioredoxin. *J Biol Chem*, 1997, 272: 30841~ 30847
- 6 Scharf C, Riethdorf S, Ernst H, et al. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 1869~ 1877
- 7 Muller E G. A Redox-Dependent Function of Thioredoxin is necessary to Sustain a Rapid Rate of DNA Synthesis in Yeast. *Arch of Biochem and Biophy*, 1995, 318: 356~ 361
- 8 Clarke F M, Orozco C, Pekins A V, et al. Identification of molecules involved in the 'early pregnancy factor' phenomenon. *J Reprod Fert*, 1991, 93: 525~ 539

(1998-12-09 收稿, 1999-02-26 收修改稿)

硅藻质氧化硅的稳定性及其地球化学意义

翁焕新 沈忠悦 袁明永^④ 郭德方 陈建裕

(浙江大学地球科学系, 杭州 310027; ^④浙江大学分析测试中心, 杭州 310027)

摘要 硅藻质氧化硅的稳定性实验研究表明,由于共存粘土矿物对碱性的缓冲作用,使硅藻质氧化硅开始大量溶解的 pH 值比非晶质 SiO₂ 高 2~ 3;硅藻质氧化硅在温度大于 40℃时溶解度成倍增加,它暗示着世界上大型硅藻土矿床主要分布在中、高纬度区的原因;硅藻质氧化硅的溶解度与时间无明显关系,这说明了每个硅藻土矿床中硅藻质氧化硅的含量决定于它形成以来最后一次环境介质条件,而与经历的时间无关。

关键词 硅藻质氧化硅 稳定性 硅藻土

硅藻质氧化硅(diatomaceous silica)是一种生物成因的特殊矿物,主要成分类似于非晶质蛋白石或含水氧化硅(SiO₂·nH₂O)。这种氧化硅除了含 3.5%~ 8% 的结合水外,还含有少量以固溶体形式存在的其他无机组分,如铝、铁、碱金属、碱土金属和一些微量元素。

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-12-1307>