

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00092

• 研究快报 •

人胸腺素 α 原 cDNA 序列多态性分析

弓雪莲, 郭葆玉*, 郭满盈, 吕 岩

第二军医大学药学院生化药学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**通过对人胸腺素 α 原(prothymosin- α , ProT α)cDNA 测序来分析人胸腺素 α 原的序列多态性。**方法:**应用 RT-PCR 技术从健康人外周血及健康新生儿脐带血中扩增胸腺素 α 原 cDNA, 纯化后与克隆载体 pMD18-T 连接, 进行克隆测序, 并与标准序列比对, 分析其多态性。**结果:**序列分析结果表明, 克隆的 ProT α 基因的核苷酸序列并不一致。与已报道的胸腺素 α 原基因(NM-002823)进行比较, 发现存在 2 种变异: I 类变异包括 107 位单核苷酸突变(A $\rightarrow$ G)、110~121 位和 191~205 位的核苷酸片段缺失; II 类变异为 306 位单核苷酸(G)缺失, 多见于年龄 60~80 岁者。**结论:**本研究中 ProT α cDNA 序列存在 2 种变异, 但并未影响其 N-端前 28 个氨基酸。

[关键词] 胸腺素 α 原; cDNA; 序列分析**[中图分类号]** Q 78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0092-03

Analysis of polymorphism in human cDNA sequence of prothymosin- α

GONG Xue-lian, GUO Bao-yu*, GUO Man-ying, LÜ Yan

Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To analyze the polymorphism in human cDNA sequence of prothymosin- α (ProT α) by sequencing analysis. **Methods:** The cDNA of human ProT α was amplified from cells of peripheral blood and cord blood by RT-PCR. The product of RT-PCR was purified and linked with vector pMD18-T. After cloning and sequencing, the sequence of ProT α cDNA was compared with the standard sequence to analyze the polymorphism in the ProT α cDNA sequence. **Results:** The cloned ProT α cDNA sequence was different from that of the standard. We found 2 kinds of variations; (1) The nucleotide in 107 position was varied and the nucleotides in 110-121 and 191-205 positions were deleted; (2) The nucleotide in 306 position was deleted, mainly in the 60-80 years old group. **Conclusion:** We have identified 2 kinds of variations in human ProT α cDNA, but the first 28 amino acid in the N-terminal of cDNA of human ProT α are not involved therefore the variations do not affect the function of human ProT α .

[KEY WORDS] prothymosin- α ; cDNA; sequence analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1):92-94]

人胸腺素 α 原(prothymosin- α , ProT α)是一种在体内广泛表达的强酸性蛋白质, 进化上高度保守, 分布极其广泛, 淋巴组织及非淋巴组织中均可找到, 其相对分子质量为 1.25×10^4 , 基因定位于第 2 号染色体上, 编码 109 个氨基酸^[1]。ProT α 基因家族包括 6 个成员, 其中只有 1 个功能基因, 其余均为假基因^[2]。ProT α 至少有两方面的功能: (1) 作为核蛋白调节细胞增殖, 参与细胞凋亡和癌变有关的调控; (2) 作为胸腺肽调节机体免疫功能, 具有免疫刺激活性, 能够促进 NK 细胞产生 IL-2、IFN- α 、IFN- γ 等细胞因子, 促进正常有丝分裂原刺激的 T 细胞产生,

对 IL-2 受体的表达具有上调作用。ProT α 具有广泛的生物学活性, 在细胞增殖、免疫调控和生殖活性等多方面起重要作用^[2-3]。作为一类有效的免疫增强药物, ProT α 对各种免疫缺陷病毒、病毒感染以及肿瘤都具有一定的作用^[4-6]。对细胞增殖及基因转录的调控是 ProT α 行使其多种功能的基础。也有研究^[7]报道 ProT α 在体外可以诱导细胞恶性转化, 可能有潜在的致癌作用。

ProT α 基因表型复杂, 虽其基因已被克隆, 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^[8]、BC022433、AF257099 等

[收稿日期] 2007-06-12**[接受日期]** 2007-12-17**[作者简介]** 弓雪莲, 博士。E-mail: wintous2002@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070398, E-mail: byguo1632000@yahoo.com.cn

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,本研究从外周血和脐带血细胞中通过 RT-PCR 克隆 ProTα 基因,进行分析和比较。

1 材料和方法

1.1 样品及试剂 健康新生儿脐带血标本 11 例, 0~20 岁健康者外周血 9 例, 20~40 岁健康者外周血 10 例, 40~60 岁健康者外周血 15 例, 60~80 岁健康者外周血 8 例, 由第二军医大学长海医院提供。

大肠杆菌 DE3 由我室保存。TaKaRa RNA LA PCR™ Kit(AMV) Ver. 2. 1、DL-2000 DNA marker、pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶、rTaq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司, TRIzol Reagent、焦碳酸乙二脂(DEPC)购自 Gibco BRL 公司, 胶回收试剂盒购自上海申能博彩公司。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。

1.2 引物设计与合成 引物主要参照的序列编码区, 上游引物 P1: 5'-GGG GAA TTC ATG TCA GAT GCA GCC GTA GAC CAG-3', 引入 EcoR I 酶切位点; 下游引物 P2: 5'-GGG GTC GAC CTA GTC ATC CTC GTC GAT CTT CTG-3', 引入 Sal I 酶切位点。引物由上海基康公司合成。

1.3 ProTα 基因的 RT-PCR 扩增 常规分离外周血以及脐带血中的血细胞, 按照 TRIzol® Reagent 试剂盒上的说明提取血细胞中的总 RNA。以总 RNA 作模板, 按逆转录试剂盒上的说明进行逆转录反应。反应条件: 72℃ 10 min, 冰浴 2 min, 37℃ 90 min, 4℃ 保存。PCR 反应体系 100 μl: 10 μl 逆转录产物, 引物 P1、P2 各 50 pmol, 4 种 dNTP 各 0. 4 mmol/L、rTaq DNA 聚合酶 5 U。扩增条件: 94℃ 变性 5 min, 94℃ 45 s、60℃ 45 s、72℃ 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。扩增产物用 1. 5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 基因测序 PCR 扩增产物经 TaKaRa 公司 PCR 产物纯化试剂盒纯化, 回收产物并与克隆载体 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 DE3 感受态细胞, PCR 筛选阳性菌落, 经 TaKaRa 公司质粒抽提试剂盒提取的质粒经酶切鉴定后进行测序。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 ProTα 序列的电泳结果 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 3 条带, 说明提取的 RNA 较完整, 没有发生降解。PCR 产物经

琼脂糖凝胶电泳可见有 1 条 333 bp 左右的 DNA 片段, 基本符合预期长度, 可能是所克隆的目的基因片段(图 1)。

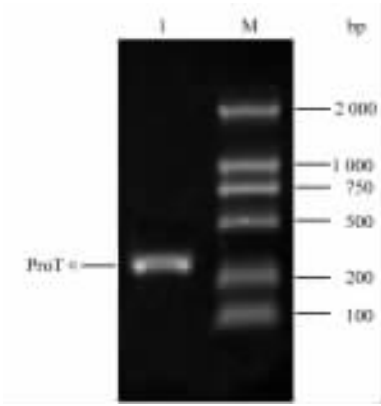


图 1 ProTα RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of ProTα RT-PCR product

1: ProTα RT-PCR product; M: DL-2000 DNA marker

2.2 序列分析 分析测序结果发现, ProTα 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。为了避免该问题, 本实验对多个样本反复检测, 并对多个菌落进行测序, 从中分析找到了一些共同的特征。与 Goodall 等^[8]发表的 ProTα 基因序列(NM-002823, 来源于人脾)相比较, 变异分 2 种。(1) I 类变异组脐带血标本 3 例, 0~20 岁健康者外周血 2 例, 20~40 岁健康者外周血 1 例, 40~60 岁健康者外周血 2 例, 60~80 岁健康者外周血 1 例。其变异为在 107 位发生变异, 即 A→G, 据此推测的氨基酸变化是 Asp³⁶→Ser; 110~121 位都有 GGA ATG CTA ATG 碱基缺失, 即为第 37~41 位氨基酸均缺失(Gly³⁷-Asn-Ala-Asn-Glu⁴¹); 191~205 位都有 AGG AGG AAG AAG AAG 碱基缺失, 即为第 64~69 位氨基酸均缺失(Glu⁶⁴-Glu-Glu-Glu-Glu-Gly⁶⁹)。(2) II 类变异组脐带血标本 2 例, 0~20 岁健康者外周血 2 例, 20~40 岁健康者外周血 2 例, 40~60 岁健康者外周血 3 例, 60~80 岁健康者外周血 5 例。其变异为在 306 位发生核苷酸(G)缺失。II 类变异多见于 60~80 年龄组, 而 I 类变异与年龄因素无特异相关。

3 讨论

基因序列出现变异是基因的遗传基本特征之一, 它是人类进化和适应环境的必然结果, 基因序列变异导致了“基因多态性”。基因序列变异可以有不同的表现形式, 如突变、插入、缺失和不同数目串联

重复等,其中以单核苷酸多态性(SNPs)的发生频率最高,平均每 1 000 个碱基就会出现 1 个 SNPs。基因组序列出现变异就有可能导致其功能上的变化,并因此而造成人类在生理特征上(身材、体形、肤色等)以及在病理条件下(对疾病的易感性、对环境、毒素、药物的耐受性和反应性等)的千差万别。

Panneerselvam 等^[9]发现胸腺素 α 原的前 28 个氨基酸(thymosin α1, T-α1)是一种免疫激素^[9],有促进淋巴细胞的成熟与分化的作用。T-α1 对促进正常有丝分裂原刺激的 T 细胞产生及 IL-2 受体的表达具有上调作用;T-α1 还具有刺激血管内皮细胞迁移,促进血管生成和伤口愈合等作用;可提高机体免疫力,抗机会感染,甚至发现它对肿瘤也有一定治疗作用。胸腺素 α 原 N 端前 28 个氨基酸、中心酸性区序列(40~82 位氨基酸)、C 末端 102~105 位核定位氨基酸序列为其主要骨架结构,具有一定的保守性^[2,10]。本研究中发现的 2 种基因变异并未涉及到 N 端前 28 个氨基酸以及 C 端的 20 个氨基酸,与国外报道的序列相比,具有相似的螺旋和转角,故我们认为基因的变异并未影响到胸腺素 α 原的功能,也就是说遗传过程中,功能序列部分是最具保守性的,因而最不易发生变异。

I 类变异中有 2 处重大的基因缺失,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;也有可能是在将目的序列转化至 DE3 菌株中时,细菌对这两段序列发生特异剪切修饰所致;还有可能是由于两端序列可发生空间构象的改变,生成二级结构的发夹状异构,而导致测序的误差所致。II 类变异为在 306 位发生单核苷酸缺失,且多见于 60~80 岁年龄组,可能是由于该碱基序列在胸腺退行性改变过程中易受到影响。

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。婴儿胸腺在出生后 1 年左右达到最大

值,此后随年龄增长而逐渐变小。目前对胸腺的功能性退化机制还不太清楚,不过 ProTα 基因的多态性也许是胸腺退化过程中的微观体现。

[参考文献]

[1] Ueda H, Fujita R, Yoshida A, Matsunaga H, Ueda M. Identification of prothymosin-α1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures[J]. J Cell Biol, 2007, 176:853-862.

[2] Eschenfeldt W H, Manrow R E, Krug M S, Krug M S, Berger S L. Isolation and partial sequencing of the human prothymosin alpha gene family[J]. J Biol Chem, 1989, 264:7546-7555.

[3] Eschenfeldt W H, Berger S L. The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:9403-9407.

[4] Naylor P H, Quadrini K, Garaci E, Rasi G, Hadden J W. Immunopharmacology of Thymosin alpha 1 and cytokine synergy[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 13:1-17.

[5] Jin Y, Cao C, Li P, Liu X, Huang W, Li C, et al. Boosting immune response to hepatitis B DNA vaccine by coadministration of prothymosin alpha-expressing plasmid[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12:1364-1369.

[6] Mosoian A, Teixeira A, High A A, Christian R E, Hunt D F, Shabanowitz J, et al. Novel function of prothymosin alpha as a potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary macrophages[J]. J Virol, 2006, 80:9200-9206.

[7] Wang M, Pan J Y. Prothymosin alpha and tumor: current status and perspective[J]. Chin J Cancer, 2006, 26:333-336.

[8] Goodall G J, Dominguez F, Horecker B L. Molecular cloning of cDNA for human prothymosin alpha[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:8926-8928.

[9] Panneerselvam C, Haritos A A, Caldarella J, Horecker B L. Prothymosin alpha in human blood[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84:4465-4469.

[10] Bustelo X R, Otero A, Gómez-Márquez J, Freire M. Expression of the rat prothymosin alpha gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration[J]. J Biol Chem, 1991, 266:1443-1447.

[本文编辑] 尹 茶

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN 31-1001/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA

ISSN 1000-1948
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725