

吉林双阳型梅花鹿 *sentrin*/*SUMO* 的发现

孙陆果, 姜颖, 于永利

(白求恩医科大学免疫学教研室, 长春 130021)

摘要: 为了确定梅花鹿未知的编码区 cDNA, 我们利用 TaKaRa 公司的 cDNA 合成试剂盒及 PCR cDNA 文库试剂盒, 构建了吉林双阳型梅花鹿子宫 PCR cDNA 文库。将文库的 PCR 产物克隆入 pGEM-Teasy 载体并进行测序后, 应用 BLAST 网络服务对测得的序列在 GenBank 数据库中进行同源性比较。结果显示构建的 PCR cDNA 文库中包含有不同长度的 cDNA 片段, 而且自该文库中我们发现了一与人 *sentrin-1*/*SUMO-1* (small ubiquitin-related modifier 1) 高度同源的全编码区 cDNA 序列。此序列已在 Genbank 登录, 登录号为 AF 242526。这说明我们自梅花鹿子宫 PCR cDNA 文库中发现了梅花鹿的 *sentrin*/*SUMO* 基因。

关键词: 梅花鹿; cDNA 文库; *sentrin*/*SUMO*

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)01-0022-05

Discovery of *Cervus nippon* Temminck-derived *sentrin*/*SUMO*

SUN Lu-guo, JIANG Ying, YU Yong-li

(Department of Immunology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China)

Abstract: In order to identify unknown encoding cDNAs of *Cervus nippon* Temminck (sika deer), we constructed a cDNA library of uterus from Jilin-Shuangyang *Cervus nippon* Temminck using PCR cDNA library kit. PCR products of the library were cloned into pGEM-Teasy vectors and the cDNAs were sequenced and analyzed by nucleotide homology comparison against GenBank Database using the BLAST network service. The results showed that the cDNA library contained cDNA fragments of different lengths and a full length encoding cDNA highly homologous to human *sentrin-1*/*SUMO-1* (small ubiquitin-related modifier 1) was identified. The cDNA was deposited in GenBank under the accession number AF 242526. These show that *Cervus nippon* Temminck-derived *sentrin*/*SUMO* gene has been discovered from PCR cDNA library of uterus from *Cervus nippon* Temminck.

Key words: *cervus nippon* temminck cDNA library; *sentrin*/*SUMO*

梅花鹿 (*Cervus nippon* Temminck) 是我国珍贵的药用动物。吉林双阳型梅花鹿是在 1985 年鉴定的我国培育的第一个梅花鹿优质品种。在人类基因组计划即将结束的时候, 以美国为代表的西方国家已开始觊觎我国珍稀动植物的基因资源, 为在全球的基因争夺战中率先占有吉林双阳型梅花鹿的基因资源, 我们建成了吉林双阳型梅花鹿子宫 cDNA 文库并对其库容 cDNA 开始了大规模的 cDNA 测序工作, 以期确定一批有意义的梅花鹿基因, 获得它

们的知识产权。在这一工作中, 我们发现, 吉林双阳梅花鹿 *sentrin*/*SUMO* 全编码区 cDNA。

1 材料与方法

1.1 材料及标本

新鲜的梅花鹿子宫采自于健康的吉林双阳梅花鹿, 并储存于液氮中。SV total RNA isolation system 及 pGEM-Teasy 质粒购自 Promaga, cDNA synthesis kit 及 PCR cDNA library kit 购于宝泰克公司。

收稿日期: 2001-01-02; 修回日期: 2001-07-17

基金项目: 本论文受国家教委跨世纪优秀人才计划基金资助(1995, 4)

作者简介: 孙陆果(1972-), 女(汉族), 吉林市人, 免疫学专业博士, 讲师, 主要从事分子免疫学研究。(E-mail: slgm@public.cc.jl.cn)

本文联系人: 于永利, 电话: (0431)5645911-6345; E-mail: ylyu@mail.jlu.edu.cn

1.2 细胞总 RNA 的提取

取新鲜冻于液氮中的梅花鹿子宫 30mg, 研磨后按 SV total RNA isolation system 的说明提取细胞总 RNA。

1.3 PCR cDNA 文库的建立

使用 PCR cDNA library kit, 以 Oligo dT-RA (5' ctgatctagacctgcaggc tcgagT_(n) 3') 为引物将上述 RNA 合成 cDNA 第一条链, 随后在 E. coli Rnase H, E. coli DNA polymerase 及 E. coli DNA ligase 的作用下合成 cDNA 第二条链; 利用 T4 DNA polymerase 将双链 cDNA 末端平滑后, 在 cDNA 两端附加上含 CA Primer 适配子 (5' agcgcgtgtaccatggtc tagagtcgataagtaggt- 3'。

3'NH₂-ttcatcca-P5'); 以上述 cDNA 为模板, 采用 RA、CA 引物 (RA Primer: 5'-CT-GATCTAGACCTGCAGGCTC-3'; CA Primer: 5'-CGTGGTACCATGGT CTAGAGT-3'), 通过 PCR 获得梅花鹿子宫 PCR cDNA 文库 (50ul), 反应条件: 94°C 预变性 1min; 94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 3min, 35 个循环后 72°C 延伸 5min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。PCR cDNA 文库构建示意图见图 1。

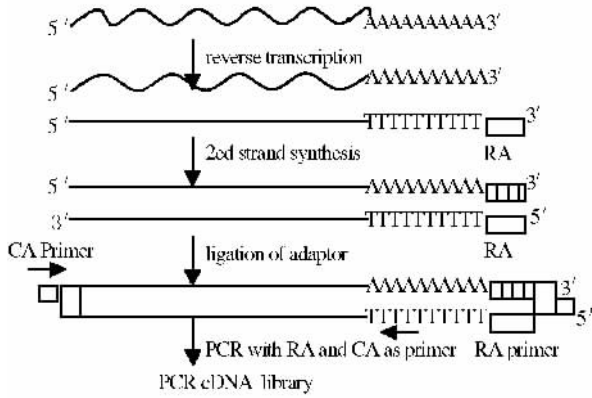


图 1 PCR cDNA 文库构建原理

Fig. 1 Diagram of PCR cDNA library construction

1.4 文库 cDNAs 的克隆及测序

将 PCR cDNA 文库中的 cDNA 克隆入 pGEM-T Easy 质粒, 以连接反应物转化大肠杆菌 JM109; 其中一阳性克隆内插入的 cDNA 片段经 PstI 酶切鉴定及 DNA 序列分析 (Shanghai Genecore Inc), 并采用 GenBank 数据库对其进行 BLASTN 分析。

2 结 果

2.1 梅花鹿子宫 cDNA PCR 文库的构建

利用含 RA 引物的 Oligo-dT 将吉林双阳型梅花鹿子宫器官 mRNA 逆转录成 cDNA, 在 cDNA 两端附加上含 CA 引物的适配子后, 通过 PCR 构建梅花鹿子宫 cDNA PCR 文库 (50ul)。取 5ul cDNA PCR 文库经琼脂糖凝胶电泳显示 (图 2); cDNA 主要弥漫分布于 500bp 与 9000bp 之间, 说明此 cDNA 文库包含了大小不同的众多的 cDNA 片段。

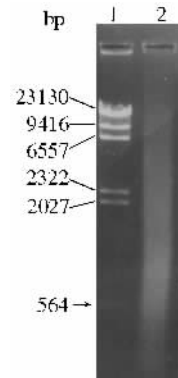


图 2 PCR cDNA 文库的构建

Fig. 2 Agarose gel analysis of PCR cDNA library. 1.

λ HindIII marker; 2. PCR products

2.2 一全编码 cDNA 片段的获得与分析

为了分离获得文库中的各 cDNA 片段, 将梅花鹿子宫 cDNA PCR 文库直接克隆入 pGEM-T Easy 质粒; 其中一阳性克隆经 PstI 酶鉴定显示含一大大小为 1000bp 的 cDNA 片段 (图 3); 测序的结果显示:

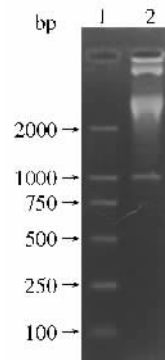


图 3 重组质粒的电泳分析

Fig. 3 Agarose gel analysis of one recombinant clone

1. DL2000 marker; 2. recombinant plasmids digested with PstI (insert indicated by an arrow)

gb|U67122|HSU67122 Human ubiquitin-related protein SUMO-1 mRNA, complete cds

Length = 816

Score = 626 bits (316), Expect = e-177 Identities = 374/392 (95%), Gaps = 1/392 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 149 gattt~~g~~taaaccccgagcgagg~~t~~tctaccaaccgaggccgctggtgtg~~c~~ggagacccc 208

|||||

Sbjct: 1 gattt~~g~~taaaccccgagcgagg~~t~~tctgcttaccgaggecgctgctgtg~~c~~ggagacccc 60

Query: 209 gggg-gaagccaccg~~t~~caccatg~~t~~ctgaccaggaagcaaaccttcaaccgaggacttgg 267

||| |||||

Sbjct: 61 cgggtgaagccaccg~~t~~catc~~t~~g~~t~~ctgaccaggaagcaaaccttcaactgaggacttgg 120

Query: 268 gggataagaaggaaggagaa~~t~~atattaaactcaaa~~g~~t~~c~~attggacaggatagcagtgaga 327

|||||

Sbjct: 121 gggataagaaggaagg~~t~~aa~~t~~atattaaactcaaa~~g~~t~~c~~attggacaggatagcagtgaga 180

Query: 328 ttcacttcaaa~~g~~t~~g~~aaaatgacgacacatctcaaga~~a~~actcaaga~~a~~atcatactgtcaaa 387

|||||

Sbjct: 181 ttcacttcaaa~~g~~t~~g~~aaaatgacaacacatctcaaga~~a~~actcaaga~~a~~atcatactgtcaaa 240

Query: 388 gacagggagttcctatgaattcactcaggtttctctttgagggtcagagaattgctgata 447

|||||

Sbjct: 241 gacaggggtttccaatgaattcactcaggtttctctttgagggtcagagaattgctgata 300

Query: 448 atcacactcca~~a~~agaactgggaatggaggaagaagatgtgattgaagttatcatgaac 507

|||||

Sbjct: 301 atcatactcca~~a~~agaactgggaatggaggaagaagatgtgattgaagttatcaggaac 360

Query: 508 aaacagggggtcattcaacggttagatattc 539

|||||

Sbjct: 361 aaacagggggtcattcaacggttagatattc 392

Score = 73.8 bits (37), Expect = 7e-11 Identities = 45/48 (93%)

Query: 566 atccctttttatttttaaaaatagttctttt~~g~~taatggggtg~~t~~naaa 613

|||||

Sbjct: 418 atccctttttatttttaaaaatagttctttt~~g~~taatg~~t~~gggtg~~t~~tcaaa 465

gb|AF033353|AF033353 Mus musculus ubiquitin-homology domain protein (Ubl1) mRNA, complete cds Length = 1187

Score = 521 bits (263), Expect = e-145 Identities = 361/391 (92%), Gaps = 2/391 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 147 cggattt~~g~~taaaccccgagcgagg~~t~~tctaccaaccgaggccgctggtgtg~~c~~ggagacc 206

|||||

Sbjct: 38 cggattt~~g~~taaacctcagagt~~g~~agg~~t~~tctgcctg~~c~~ggaggecg~~c~~agtggtg~~c~~ggagacc 97

Query: 207 ccgggg-gaagccaccg~~t~~caccatg~~t~~ctgaccaggaagcaaaccttcaaccgaggactt 265

||| |||

Sbjct: 98 cccgggtgaatccac-g~~t~~caccatg~~t~~ctgaccaggaagcaaaccttcaactgaggactt 156

Query: 266 gggggataagaaggaaggagaa~~t~~atattaaactcaaa~~g~~t~~c~~attggacaggatagcagtgaga 325

|||

Sbjct: 157 aggcgataagaaggaaggagaa~~t~~acattaaactcaaa~~g~~t~~t~~attggacaggatagcagtgaga 216

以美国为代表的西方国家采用此方法已成功地完成了多种细胞或器官的全 cDNA 测序,在全球性的争夺基因占有权的竞争中已占有优势。为了保护 and 开发中国梅花鹿的基因资源,我们已构建了吉林双阳型梅花鹿多种器官和细胞的 cDNA 文库,并开始对库容 cDNA 进行大规模的测序。

目前构建的 cDNA 文库多为细菌质粒文库和噬菌体文库。采用 PCR 技术构建 PCR cDNA 文库是近年来出现新的构建 cDNA 文库的方法。该法有如下优点:1 相对简便易行;2 易包容低拷贝表达基因的 cDNA。这种 PCR cDNA 文库为通过 PCR 钓取某一特异 cDNA 片段提供了便利。到目前为止,从我们自己构建的吉林双阳型梅花鹿各器官 PCR cDNA 文库中,通过 PCR 方法已相继钓取到梅花鹿源的成纤维细胞生长因子和补体 C₃ 等。在本实验中,我们利用 TA 载体 (pGEM-T easy) 对库容 cDNA PCR 片段进行分离克隆及测序。从吉林双阳型梅花鹿子宫器官 PCR cDNA 文库中获得了一完整的 cDNA 序列,该序列与人 Sentrin 在核苷酸及氨基酸水平上都有 90% 以上的同源性,与家鼠及爪蟾 sentrin/SUMO cDNA 序列的同源性分别为 95% 和 92%,我们将其命名为 *Cervus sentrin*,该序列已在美国 GenBank 登录。

Sentrin 又称为 SUMO (small ubiquitin-like protein modifier) 是一种泛素 (ubiquitin) 样的在进化过程中高度保守的蛋白质,在哺乳动物的各种组织中均有不同程度的表达。它也是一种可对蛋白质进行修饰的功能蛋白,参与调节细胞凋亡^[1]、蛋白质的细胞内定位^[2]、细胞核体的形成^[3]及 P53 基因的激活^[4]等过程。最新的研究还发现^[5]: Sentrin 可加速细胞的有丝分裂,其作用位点之一可能是细胞染色体的端粒。染色体端粒是调控细胞分裂和生长重要结构,其形成受端粒酶 (telomerase) 的控制。在缺乏端粒酶作用的情况下,随着细胞的不断生长,端粒逐渐缩短,最终细胞失去分裂的能力,进入衰老的状态^[6]。所以 sentrin 在许多重要的生理病理过程中发挥着重要的调节功能。目前我们继续文库中的基因测序工作的同时,还将对梅花鹿源的 sentrin 分子的生物学活性进行深入的研究。

参 考 文 献 (References):

[1] Okura T, Gong L, Kamitani T, *et al.* Protection against Fas/APO

— 1 — and tumor necrosis factor — mediated cell death by a novel protein, sentrin[J]. *Immunol*, 1996, 157(10): 4277~81.

- [2] Kretz-Remy C, Tanguay R M. SUMO/sentrin: protein modifiers regulating important cellular functions[J]. *Biochem Cell Biol*, 1999, 77(4): 299~309.
- [3] Kamitani T, Nguyen H P, Yeh E T. Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule[J]. *Biol Chem*, 1997, 272(22): 14001~4.
- [4] Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, *et al.* Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1[J]. *EMBO J*, 1999, 18(22): 6462~71.
- [5] Tanaka K, Nishide J, Okazaki K, *et al.* Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(12): 8660~72.
- [6] Toru M, Nakamura, Julia Promisil Cooper, Thomas R. Cech. Two modes of survival of fission yeast without telomerase[J]. *Science*, 1998, 282: 493~496.

欢迎订阅《发育与生殖生物学学报》

《发育与生殖生物学学报》(Developmental and Reproductive Biology, 国际刊号 ISSN 1004-6453; 国内刊号 CN 11-3569/Q) 是中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室联合主办的, 专门报道国内外发育生物学与生殖生物学研究报告和进展的英文版学术期刊。

发育生物学与生殖生物学是两个关系非常密切的学科。前者是近几十年来由生殖生物学、胚胎学、遗传学等学科交叉产生的, 是一门以生物个体发育过程为主要研究对象的专门学科。它所研究的内容涉及遗传、分化、生长、衰老、死亡; 组织的癌变、器官的移植和再生、发育过程中的内分泌以及外界条件对个体发育的影响等基本生命过程。由于这些过程所涉及的基因表达调控的研究正是基因分子生物学研究的热点, 发育生物学已经成为当今世界上各种生命科学的带头学科, 被列为中国“九五”计划发展纲要重点发展的新学科之一。与之有着渊源关系的生殖生物学对于农业和人口控制方面所起的作用日益重要, 有关的文章大量出现在各种期刊、杂志上。

本刊以生物、农业、环保、医学和计划生育等研究领域里动植物以及人类与上述内容有关的基础研究及其相关的新技术为主要报导范围。以研究论文及简报、专题综述为主, 兼有会议、动态报道和简要书评。为方便对国内外使用中文的地区交流, 对每篇论文设有详细的中文摘要。

《发育与生殖生物学学报》热情欢迎广大科研、教育工作者踊跃投稿、可通过邮局或直接向本刊编辑部订阅, 每年定价 80 元。

投稿及订刊地址: 北京市中关村南一条 3 号 中科院遗传与发育生物学所 《发育和生殖生物学学报》编辑部收
邮编: 100080 电话/传真: 010-62545869 62551951
E-mail: wangwx@263.net