

羊驼 transcription elongation factor B (S III) (Tceb2)cDNA 的获取与序列分析

范瑞文,董常生,朱芷葳,赫晓燕,游蓉丽

(山西农业大学动物科技学院,太谷 030801)

摘要:【研究目的】分离和鉴定羊驼 transcription elongation factor B (S III) (Tceb2)基因,分析其序列特征,为今后研究其生物学功能奠定理论基础。【方法】用 Southern Blotting 法从羊驼皮肤 cDNA 文库中筛选 Tceb2 基因,通过 BLAST 等生物学相关软件对其进行结果分析。【结果】有 6 个阳性克隆,测序结果得知,序列片段大小大约为 472bp,具有完整的开放阅读框,可编码 119AA,分子量为 13.2KDa。序列特征、结构和同源性分析表明:该序列预测为全长 cDNA 序列,该基因序列及其编码的氨基酸序列与大鼠和小鼠的 troponin c2 同源性可达 100%。【结论】该基因是获得的羊驼全长 Tceb2(GenBank DQ646397)(命名为 AlpTceb2)。

关键词: 转录延长因子 B (S III)(Tceb2); 序列特征; 羊驼

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A

Isolation and Characterization of Transcription Elongation Factor B (S III) (Tceb2)Alpaca (Lama Pacos)

Fan Ruiwen, Dong Changsheng, Zhu Zhiwei, He Xiaoyan, You Rongli

(College of Animal Science and Veterinary Medicine of Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstract: 【OBJECTIVE】 to obtain transcription elongation factor B (S III) (Tceb2) gene of alpaca and analyze its bioinformatics. 【METHOD】 Southern Blotting and some bioinformatics tools such as BLAST were used to screen the cDNA library of alpaca skin and analyzed its characteristics, respectively. 【RESULTS】 6 positive clones of transcription elongation factor B (S III) (Tceb2) gene were screened from the cDNA library of alpaca skin with Southern Blotting. And the sizes of the inserted fragments was 472bp with the complete open reading frame. It was encoded 119AA with MW13.2KDa. Analyzing the characteristics, it was found that this sequence was the predicted full-length cDNA and it shared 100% similarity with that of mouse and rat. 【CONCLUSION】 it was named as alpaca Tceb2 (GenBank DQ646397).

Key words: transcription elongation factor B (S III) (Tceb2), characteristics of the sequence, alpaca

【本研究的重要意义】大部分真核生物在 mRNA 合成过程中,受控制 RNA 聚合酶 II 活性的转录因子的调控。至少有两类转录因子调节真核生物 mRNA 合成的延长阶段,包括 TF IIF 和 S III^[1,2],它们通过抑制聚合酶沿 DNA 模板多处的瞬时停滞,以增加 RNA 聚合酶 II,使 RNA 链延长的整体速率加快^[3]。因此,研究该

基因的分子特征具有重要的意义。【前人研究进展】延长因子 B 是正调节亚单位,通过结合延长因子 C 或与 A 相互作用,在延长因子复合体的组配中可能起伴侣蛋白样作用。此外,延长因子 B 和 C 也是一种多亚基复合体的必要组分,该复合体包含 VHL 肿瘤抑制基因^[4]。包俊英等分离到了日本血吸虫 RNA 聚合酶 II 转

基金项目: 山西省青年科技研究基金“黄色羊驼皮肤的基因表达分析”(2008021038-3); 国家自然科学基金“羊驼毛色相关基因的研究”(30571070)。

第一作者简介: 范瑞文,女,1974 年出生,山西省偏关县人,研究方向为羊驼毛特性的研究。通信地址:030801 山西省太谷县山西农业大学动物科技学院, Tel: 0354-6117478, E-mail: ruiwenfan@163.com。

通讯作者: 董常生,男,1952 年出生,教授,研究方向为羊驼生物学特性的研究,通信地址:030801 山西省太谷县山西农业大学, Tel: 0354-6288208, Fax: 0354-6222942, E-mail: cs-dong@sxau.edu.cn。

收稿日期: 2008-05-21, 修回日期: 2008-06-30。

录因子 S III-p15 亚单位^[5]。人、大鼠、小鼠和斑马鱼等的该基因序列已被测定 (GenBank)。【本研究切入点】羊驼 RNA 聚合酶 II 转录延长因子 SIII 基因的分子生物学信息未见过报道。【拟解决的关键问题】通过此项研究,了解羊驼的 Tceb2 基因的序列特征,为进一步研究该基因的生物学功能奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

白色羊驼皮肤 cDNA 文库: 由山西农业大学羊驼生物工程实验室于 2005 年构建。

试剂: Trizol Reagent 购自 Qiagen 公司、DIG DNA labeling kit 购自 Roche。二甲苯青 FF、四环素、琼脂糖、琼脂粉、氯仿、IPTG、x-Gal、二甲亚砷、甘油购自 TaKaRa 公司;胰蛋白胨、酵母提取粉、MgSO₄、麦芽糖、购自上海生物工程公司。

菌株和载体: E. coli XL1-Blue; E.coli BM25.8 宿主菌; λ TripEx2 (Sfi A&B-digested arms) 载体。

该研究于 2008 年于山西农业大学羊驼生物工程实验室内进行。

1.2 方法

1.2.1 Southern Blotting cDNA 文库于 37℃ 转化入 E. coli XL1-Blue 过夜培养后,原位转移到醋酸纤维素膜。根据 GenBank 中已有的目标基因设计引物 (Left primer 5'TACAAGGACGACCAGCTCCT 3'; Right primer 5'CCAGAATCCTGTGGCTTCAT 3')。通过 RT-PCR 法获取探针,并用 DIG DNA labeling kit 标

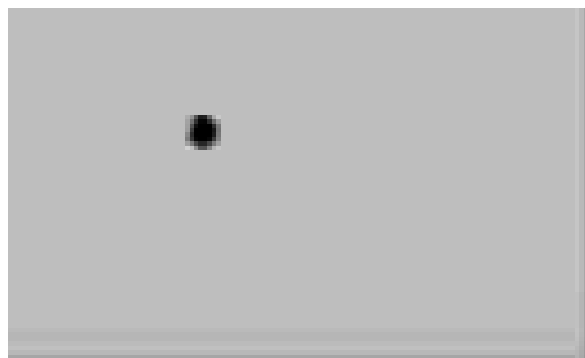


图 1 Tceb2 的阳性信号

2.2 羊驼 Tceb2 序列及其特征

测序结果和序列峰图对序列进行校正。图 3 表明羊驼的 Tceb2 cDNA 总大小为 472bp,其中含 poly(A) 尾 29bp,该 cDNA 含有一个开放阅读框 (ORF),位于

记,根据试剂盒说明书检测标记效果。膜在 0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl 溶液中变性 2 次,每次 30 min; 在 0.5mol/L Tris.Cl, 1.5mol/L NaCl 溶液中中和 2 次,每次 30 min; 在 2× SSC 液中于 80℃ 烘烤 2h。固定好的膜于预杂交液和杂交液中分别于 58℃ 反应 6h。用显色剂染色以反映阳性信号。

1.2.2 序列测定 挑取阳性噬斑,需将噬斑 λ Trip I Ex2 转化为 ρTrip I Ex2: 室温下将噬斑置于 1×λphage buffer 中 2h,取每个噬斑稀释液 150μl 与过夜 E.coli BM25.8 培养物在 31℃ 下孵育 30min,之后加入 400μl LB 液体培养基,31℃ 振荡孵育 1h (225rpm)。取 10μl 感染的细胞悬液,涂布于 LB/ 羧苄青霉素,31℃ 过夜培养。挑取单一菌落,提取 DNA 重组体,用于测序。

1.2.3 序列分析 将序列中的载体部分和构建文库时序列两端所加的引物去掉,将相同大小的序列进行 Alignment 分析,聚合为一致序列。所得的序列作为 query,用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库中进行同源性比较 (期望值均为 1e-10)。将获得的序列用 ORF 翻译为氨基酸序列,用 nn predict 预测对应蛋白质的二级结构。

2 结果

2.1 Southern Blotting 结果

Southern Blotting 结果 1 个阳性克隆 (见图 1),经 PCR 检测,其中 6 个克隆的插入片段大约为 650bp (见图 2)。

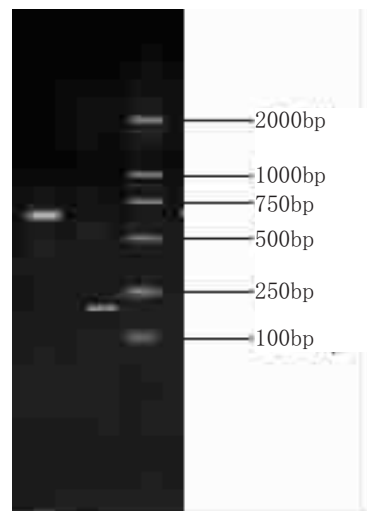


图 2 PCR 检测结果 3 条泳带分别为阳性克隆、空载体对照和 Marker

27-383bp, 编码区两侧翼分别具有 5'UTR 和 3'UTR, 在 poly(A) 尾前 18 位出现 AATAAA, 代表多聚腺苷酸合成信号。开放阅读框编码 119 个氨基酸,分子量大小约为 13.2kD。GenBankDQ646397)。

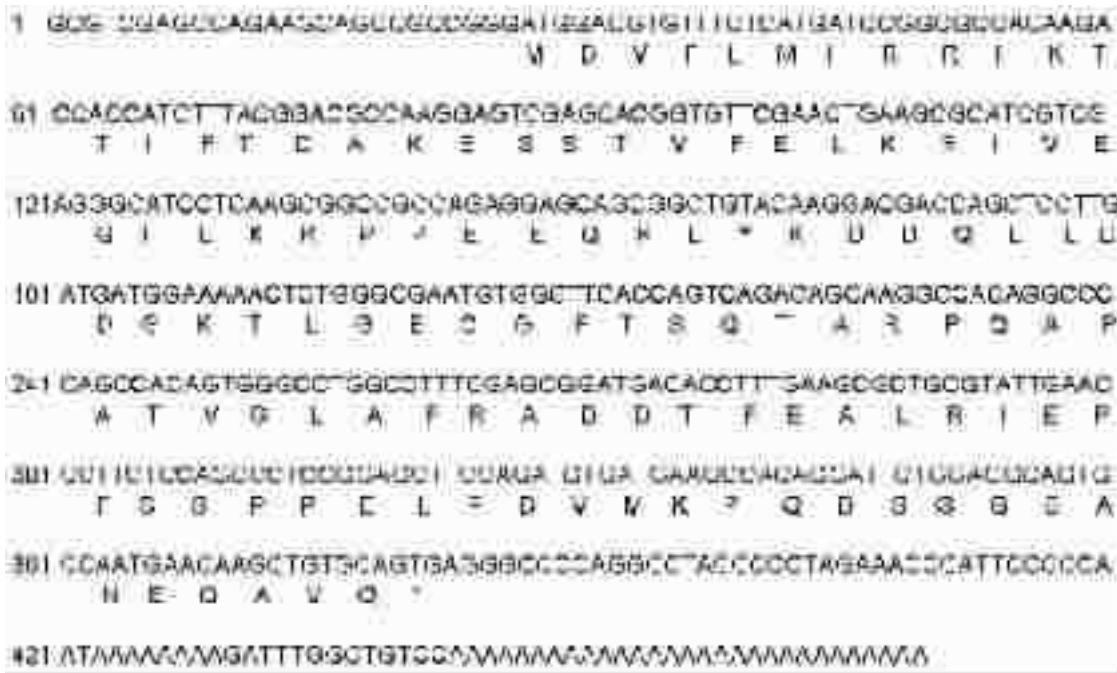


图3 羊驼 transcription elongation factor B (S III), poly peptide (Tceb2)cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

注:下划线为 ploy(A)信号,阴影为 UBQ 结构域。

Signal P-NN 结果显示:编码区含有信号肽的可能性为 0,该蛋白质没有信号肽。TMHMM 分析编码区不含跨膜区。SMART 功能位点分析显示,所编码氨基酸中含有一个 UBQ 结构域,位于 3-80 位氨基酸。

2.3 羊驼 Tceb2 氨基酸序列与其他哺乳动物氨基酸序列的多重比较

羊驼 Tceb2 与人和其它动物之间的同源性在 85%~100%左右,具有很强的保守性。序列中含有一个半胱氨酸,且位置保守。参考序列的登录号分别为 Mus musculus AAH51927, Rat norvegicus NP112391, Homo sapiens NP009039, Canis familiaris XP536998, Xenopus laevis AAH56504, Pan troglodytes XP522250, Danio rerio AAH54698 (见图 4)。

2.4 羊驼 Tceb2 氨基酸的二级结构预测

羊驼 Tceb2 氨基酸对应的蛋白质有 4 个 α -螺旋、2 个 β -折叠、1 个 α -螺旋和 β -折叠混合区,因此二级结构为 α/β 型。(H 表示 α 螺旋,E 表示 β 折叠) (见图 5)

3 讨论

分析羊驼 Tceb2 的结构,具有编码 119 个氨基酸的完整的 ORF,没有信号肽,不含跨膜区。在系统进化树上,羊驼 Tceb2 与大鼠和小鼠处于最近的位置,属于直系同源。该蛋白质具有很强的保守性,整个序列保守,与大鼠和小鼠的同源性达 100%,其局部的 α 螺旋

和 β 折叠二级结构组合形成完整的 α/β 结构。

在羊驼 Tceb2 编码的氨基酸序列中,预测含有一个 UBQ (ubiquitin homologues) 结构域,Ubiquitin 是一个含有 76 个氨基酸残基的球状蛋白,C-末端的 4 个残基为 Leu-Arg-Gly-Gly,是从其紧密结构中伸出来的残基以形成一个“尾巴”,这对其功能是很重要的。Tceb2 存在于所有真核细胞核中^[9],从原核生物到脊椎动物高度保守。它的重要作用是作为一个翻译后标签,用信号通知蛋白质产生水解作用而被破坏。Ubiquitin 介导的蛋白质水解作用参与控制细胞周期所需蛋白的节制性周转;这些资料表明具有 ubiquitin domain 的蛋白质是具有适应性的转位遗传因子,这种转位因子附加到其他基因,起着各种不同的细胞功能作用。至于起何种作用有赖于蛋白质的特性,亚细胞定位以及共价结合的方式等。翻译后蛋白质连接到 ubiquitin 超家族的膜上成为决定目标蛋白命运的信号^[7]。目前,越来越多的细胞调节机制通过 ubiquitin 而与蛋白质的改变联系起来,在大多数情况下,ubiquitin 化的蛋白质会通过 26S 蛋白酶体的作用而降解^[8,9]。Tceb2 的作用之一就是延长转录,此时,ubiquitin 起着重要作用^[10]。

4 结论

认为该基因是羊驼 Tceb2,其分子结构特征为进行其生物学功能的研究奠定理论基础。

Xenopus_laevis.sMDVFLMIRH	9
alpaca.seq	-----r	9
Canis_familiaris	----r	4
Danio_rerio_(zeb	icfsfhfigensggfickfrkqrffyyllfsi-----r	40
Homo_sapiens.seq	-----r	9
Mus_musculus.seq	-----r	9
Pan_troglodytes_	-----v--r	9
Rattus_norvegicu	-----r	9
Xenopus_laevis.s	HKTTIFTDAKENTTVYELKRIVEGILKRPPEDQKLYKDDQ	49
alpaca.seq	-----ss--f-----e-r-----	49
Canis_familiaris	-----ss--f-----de-r-----	44
Danio_rerio_(zeb	-----s-----a---r---m	80
Homo_sapiens.seq	-----ss--f-----de-r-----	49
Mus_musculus.seq	-----ss--f-----e-r-----	49
Pan_troglodytes_	r-----ss--l---v-----de-r---y-	49
Rattus_norvegicu	-----ss--f-----e-r-----	49
Xenopus_laevis.s	LLDDNKTLGDCGFTSQTPQAPATVGLAFRSSGDSFEPL	89
alpaca.seq	---g---e-----ad-t--a-	88
Canis_familiaris	---g---e-----adea--a-	83
Danio_rerio_(zeb	--e-s-----n-----i-d-a---	120
Homo_sapiens.seq	---g---e-----ad-t--a-	88
Mus_musculus.seq	---g---e-----ad-t--a-	88
Pan_troglodytes_	---g---e-----ad-a--a-	88
Rattus_norvegicu	---g---e-----ad-t--a-	88
Xenopus_laevis.s	RVEPFSSPPELPDVMKPEQETSGSANEQAVQ	119
alpaca.seq	-i-----dsg-----	118
Canis_familiaris	-i-----dsgs-----	113
Danio_rerio_(zeb	-i-a-----dsgst-----	150
Homo_sapiens.seq	ci-----dsgs-----	118
Mus_musculus.seq	-i-----dsg-----	118
Pan_troglodytes_	ci-----l-----sgs--d-----	118
Rattus_norvegicu	-i-----dsg-----	118

图4 羊驼 Tceb2 的氨基酸序列与其他哺乳动物氨基酸序列的多重比较



图5 npredict 程序预测的二级结构

参考文献

- [1] Bradsher J N, Jackson K W, Conaway J W, et al. RNA polymerase II transcription factor S III. I. Identification, purification, and properties. J Biol Chem, 1993, 268:25587-25593.
- [2] Bradsher J N, Tan S, Mclaury H J, et al. RNA polymerase II transcription factor S III. II. Functional properties and role in RNA chain elongation. J Biol Chem, 1993, 268: 25594-25603.
- [3] Garrett K P, Tan S, Bradsher J N, et al. Molecular cloning of an essential subunit of DNA polymerase II elongation factor S III. Proc Nat Acad Sci USA, 1994, 91: 5237-5241.
- [4] Duan D R, Pause A, Burgess W H, et al. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. Science, 1995, 269: 1402- 1406.
- [5] 包俊英, 余新炳, 吴忠道. 日本血吸虫 RNA 聚合酶 II 转录因子 S III- p15 亚单位的分离和序列分析. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18 (4):14-16.
- [6] 张闻. 人类基因聚类[EB/OL]. <http://wzhangenster.googlepages.com> 或 <http://zwbi.zoomshare.com>. 2006.
- [7] Larsen C N, Wang H J. The ubiquitin superfamily: members, features, and phylogenies. Proteome Res, 2002, 1(5):411-419.
- [8] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. Annu Rev Genet. 1996,30:405-439.
- [9] Hershko A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. Curr Opin Cell Biol. 1997,9: 788-799.
- [10] Kurosu T, Peterlin B M. VP16 and ubiquitin; binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes. Curr Biol, 2004,14(12):1112-1116.