

大熊猫 RPS15 cDNA 的克隆及序列分析

罗晓燕¹, 胡锦矗², 侯万儒^{2*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 西华师范大学生命科学院)

摘要:本研究运用 RT-PCR 技术,首次从大熊猫 *Ailuropoda melanoleuca* 的肌肉组织总 RNA 中成功克隆了核糖体蛋白 S15 (RPS15) 基因的表达序列,并对其进行了初步分析。结果表明:大熊猫 RPS15 基因的表达序列全长为 442 bp,开放阅读框 (ORF) 为 438 bp,编码 145 个氨基酸,该蛋白的分子量为 17.0401 kDa,等电点为 10.3,含有 2 个依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点,5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,4 个 N 酰基化位点及 1 个 RPS19 蛋白 signature 位点。进一步分析发现,大熊猫 RPS15 基因的表达序列及其编码的氨基酸序列与已报道的部分哺乳动物具有很高的相似性。

关键词: 大熊猫; RT-PCR; RPS15; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q78; Q959.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2008)02-0216-04

cDNA Cloning and Sequences Analysis of RPS15 from Giant Panda

LUO Xiao-yan¹, HU Jin-chu², HOU Wan-ru^{2*}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001;

2 College of Life Sciences, China West Normal University)

Abstract: The expression sequence of ribosomal protein S15 (RPS15) gene from muscle tissue of *Ailuropoda melanoleuca* was amplified successfully through RT-PCR technique for the first time, which was sequenced and analyzed preliminarily. The result showed that the full length of the expression sequence was 442 bp containing an ORF of 438 bp. The deduced protein sequence showed that the protein was composed of 145 amino acids and its estimated molecular weight was 17.0401 kDa with a pI of 10.39. There were 4 different patterns of functional sites: two cAMP and cGMP-dependent kinase phosphorylation sites; one ribosomal protein S19 signature site; four N-myristoylation sites; five casein kinase C phosphorylation sites in the RPS15 protein. Further analysis indicated that the expression sequence of RPS15 and the protein encoded were highly homologous to some mammals reported.

Key words: *Ailuropoda melanoleuca*; RT-PCR; RPS15; cloning; sequence analysis

RPS15 是一种重要的 RNA 结合蛋白,该蛋白质在核糖体装配及翻译调节过程中具有双重作用,既能独立地与小亚基中 16S rRNA 的中心结构域直接结合,促进核糖体复合物的形成,又能与自身 mRNA 的前导序列结合调节其蛋白质的合成。故 RPS15 蛋白是整个核糖体实现装配过程及其功能作用发挥的关键成分之一。研究 RPS15 将有助于深刻理解同一蛋白在细胞活动中发挥双重作用的机制 (Golden *et al.*, 1993; Oubridge *et al.*, 1994; Ehresmann *et al.*, 1995; Liljas & Garber, 1995; Ramakrishnan & White, 1995; Avis *et al.*, 1996; Batey & Williamson, 1996)。

大熊猫 *Ailuropoda melanoleuca* 是世界上现存最古老的物种之一,被称为“活化石”,属国家一级濒危保护动物,主要分布于四川、陕西、甘肃 3 省的狭

窄地带 (仇秉兴, 1984)。大熊猫是极其宝贵的自然历史遗产,具有重要的学术研究价值,其生存和保护现状备受世人关注。多年来,国内外学者对大熊猫繁殖生物学、生理学和细胞学等方面开展了大量的研究工作 (王平等, 1980; Montali, 1990; 刘维新等, 1993; 钟顺隆等, 1993; 魏辅文, 胡锦矗, 1994; 张安居等, 1998; 冯文和, 李光汉, 2000; 侯万儒, 2000)。近年,分子生物学技术的发展使从基因水平研究大熊猫逐渐成为国内外的研究重点,目前对大熊猫基因的研究多集中于线粒体基因 (Wu *et al.*, 1990; 张亚平等, 1995) 和个别基因家族的克隆与分析 (周荣家等, 1998), 而对功能基因及其生物学功能的研究仅限于个别基因的报道 (林峰等, 1998; 汪晓晶等, 2002; Liao *et al.*, 2003a, 2003b; 郑旭等, 2004; Rao *et al.*, 2004; 廖鸣娟等, 2005; 侯万儒等, 2007), 但

收稿日期: 2007-09-18 修回日期: 2007-10-02 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30470261); 四川省应用技术项目 (2006J13-057); 四川省教育厅重点科研项目 (2004A101); 四川省重点学科建设项目 (SZD0420)

作者简介: 罗晓燕 (1965~), 女, 理学学士, 副编审, 主要从事野生动物保护生物学研究, E-mail: xylo@nwipb.ac.cn

* 通讯作者: 男, 博士, 教授, 主要从事生物化学和分子生物学研究, E-mail: hwr168@yahoo.com.cn

还没有任何有关大熊猫核糖体蛋白基因的报道。

本研究从大熊猫骨骼肌组织中提取总 RNA,运用 RT-PCR 技术扩增出 RPS15 基因的表达序列 cDNA,分析了该表达序列所编码蛋白的序列特征,并与部分哺乳动物物种的序列进行了相似性比较,为开展大熊猫分子生物学研究,尤其为 RPS15 结构基因的克隆与比较研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

大熊猫骨骼肌组织取自四川卧龙中国保护大熊猫研究中心死亡的大熊猫,为防止 RNA 降解,所取组织立即冻存于液氮中。

总 RNA 抽提试剂盒 Total Tissue/cell RNA Extractiob Kits 购自 W aton 公司;逆转录试剂盒 Reverse Transcription System 购自 Promega 公司;胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;T 载体试剂盒 (PUC18 Vector Systems) 及限制性内切酶 Pst、Sca 均购自宝生物 (大连) 有限公司;Taq plus 聚合酶购自上海生物工程公司。其它试剂均为国产分析纯。宿主菌 *E. coli* JM109 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取 3 mm × 3 mm × 3 mm 左右的样品组织,液氮中充分研磨,按照 Total Tissue/cell RNA Extractiob Kits 说明书提取总 RNA。将所提总 RNA 溶于经 DEPC 处理过的水中,保存于 -70 备用。

1.2.2 引物设计及 RT-PCR 从 GenBank 数据库中检索到人 *Homo sapiens* (BC105810)、猪 *Sus scrofa* (AB005624)、褐家鼠 *Rattus norvegicus* (M19393) 及小家鼠 *Mus musculus* (M33330) 等 4 个哺乳动物物种 RPS15 的编码区全序列,根据编码序列的保守性进行引物设计,所设计的引物如下 (由北京华大生物科技发展有限公司合成):

RPLP1-F: 5'-CAAGA TGGCGGAA GTGGA GC-3';

RPLP1-R: 5'-TTACTTGA GAGGGA TGAA GC-3'。

以所提总 RNA 为模板,按逆转录试剂盒操作手册进行 cDNA 第 1 链的合成。反应总体积 20 μl 模板 1 μg, dNTPs 1 mM, MgCl₂ 5 mM, Oligo (dT)₁₅ 0.5 μg, AMV 反转录酶 15U, RNA 酶抑制剂 10U/μl; 反转录条件: 42 60 min。再适量取第 1 链产物为模板,采用 25 μl PCR 反应体系进行 PCR 扩增,各成分浓度为: MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 200 μM, 上下游引物各 0.3 μM, Taq plus 聚合酶 5U; 反应条件: 94 , 5 min; 94 , 1 min; 52 , 0.5 min; 72 , 1.5 min, 32 个循环; 72 , 10 min。然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检

测 RT-PCR 反应产物。

1.2.3 cDNA 的克隆及鉴定 对 PCR 产物进行回收纯化,用 Sma 限制性内切酶酶切并平端化质粒 pUC18 片段,将回收产物与酶切并平端化后的质粒片段连接,22 连接过夜。按常规方法转化感受态细胞,再涂于含氨苄青霉素、IPTG 及 X-gal 的 LB 培养基上过夜培养,用接种针挑取 5 个白色菌落,碱裂解法提取质粒,采用双酶切 (Pst 和 Sca) 和 PCR 两种方法对重组子进行鉴定。经鉴定的阳性重组质粒由北京华大生物科技发展有限公司测序。

1.2.4 数据处理 采用 Gnescan 软件,对所克隆的基因序列进行氨基酸序列推定;采用 ORF finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行 DNA 序列的 ORF 查找;采用 DNAMAN Version 6, 对基因序列和氨基酸序列进行同源性比较;采用 ExPASy Proteomics Server 软件 (<http://au.expasy.org/>) 进行蛋白质功能位点和生化特性预测分析。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 产物

RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示有一条 450 bp 左右的清晰明亮的区带 (图 1),重组质粒测序结果显示,该克隆片段全长为 442 bp,与预期长度一致,将该序列提交 GenBank,得到的登录号为 EF631973。

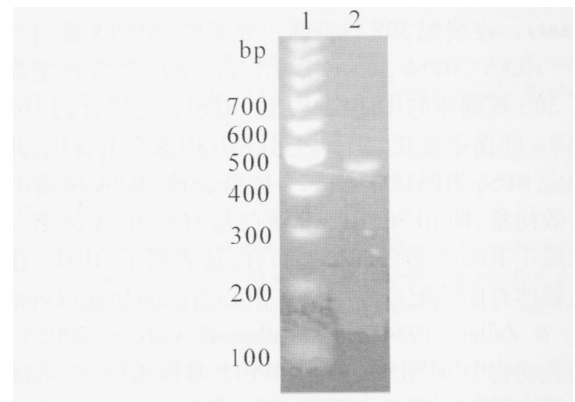


图 1 大熊猫 RPS15 基因表达序列 RT-PCR 结果

Fig 1 RT-PCR amplification result of RPS15 of *Ailuropoda melanoleuca* (1: marker, 2: RT-PCR amplification result)

2.2 序列分析

利用 Blast 检索软件,在 NCBI 数据库中进行基因同源性检索,结果发现该序列与其他动物 RPS15 的 cDNA 序列同源性很高,这证明所克隆的序列为大熊猫 RPS15 的 cDNA 序列。该序列的 ORF 为 438 bp,编码 145 个氨基酸残基,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA (图 2)。该序列碱基的平均含量分别为: A, 22.4%; C, 30.9%; G, 32.7%; T, 14.0%。利用

Proteomics Server软件对大熊猫 RPS15蛋白预测分析发现:大熊猫 RPS15蛋白的分子量为 17.0401 kDa, pI为 10.39, 含 31个带正电荷的氨基酸残基 (Arg精氨酸和 Lys赖氨酸), 14个带负电荷的氨基酸残基 (Asp天冬氨酸和 Glu谷氨酸), 其余氨基酸

均为中性;该蛋白含有 4个类型的功能位点,即:2个依赖于 cAMP和 cGMP的蛋白激酶磷酸化位点,5个蛋白激酶 C磷酸化位点,4个 N-酰基化位点及 1个 RPS19蛋白 signature位点。

1	CAAGATG GCG GAA GTG GAG CAG AAG AAG AAG CGC ACG TTC CGC AAG TTC ACC TAC CGC GGC GTG
1	M A E V E Q K K K R T F R K F T Y R G V
65	GAC CTG GAC CAG CTG CTG GAC ATG TCC TAC GAG CAG CTC ATG CAG CTG TAC AGC GCG OGG CAG
21	D L D Q L L D M S Y E Q L M Q L Y S A R Q
128	CGG CGC CGG CTG AAC CGC GGC CTG GGC AGG AAG CAG CAC TCG CTG CTC AAG CGC CTG CGC AAG
42	R R R L N R G L R R K Q H S L L K R L R K
191	GCC AAG AAG GAG GCG CCG CCG ATG GAG AAG CCC GAG GTG GTG AAG ACG CAC CTG CGG GAC ATG
63	A K K E A P P M E K P E V V K T H L R D M
254	ATC ATT CTG CCG GAG ATG GTG GGC AGC ATG GTG GGC GTC TAC AAC GGC AAG ACC TTC AAC CAG
84	I I L P E M V G S M V G V Y N G K T F N Q
317	GTG GAA ATC AAG CCC GAG ATG ATC GGC CAC TAC CTG GGC GAG TTC TCC ATC ACC TAC AAG CCC
105	V E I K F E M I G H Y L G E F S I T Y K P
380	GTG AAG CAC GGC AGG CCG GGC ATC GGG GCC ACC CAC TCG TCC CGC TTC ATC CCG CTC AAG TAA
126	V K H G R P G I G A T H S S R F I P L K *

图 2 大熊猫 RPS15基因 cDNA序列及其预测氨基酸序列

g.2 Nucleotide sequence and putative amino acid sequence of RPS15 cDNA from *Ailuropoda melanoleuca* (* 终止密码子 termination codon)

3 讨论

原核生物、真核生物细胞质及细胞器中的核糖体存在很大差异,30S核糖体亚基存在于原核生物和脊椎动物线粒体中(朱玉贤,李毅,2002),其装配是一个高度有序且连续的过程(Nikulín *et al.*, 2000)。在装配 30S核糖体小亚基时,RPS15蛋白与 16S rRNA、RPS6及 RPS18结合形成的复合物组成了 30S核糖体的中心结构域。RPS15先结合到 16S rRNA的保守核苷酸序列上引起其构象发生变化,并稳定 RPS6/RPS18异源二聚体结合该 rRNA所需的有效构象,即 RPS6、RPS18蛋白与 16S rRNA的结合依赖于 RPS15蛋白的首先结合,这表明了 RPS15在核糖体有序装配过程中具有中心角色的功能(Gregory & Zeller, 1984; Jagannathan & Culver, 2003)。哺乳动物中 RPS15蛋白由 RPS15基因编码,该基因是所有细胞增殖所必需的基因,故具有看家基因的性质(Shiga *et al.*, 1990; Ramakrishnan & Gerchman, 1991)。而在陆生植物叶绿体基因组中,RPS15基因多是假基因(Kugita *et al.*, 2003)。

利用 DNAMAN Version 6,将大熊猫分别与人、猪、褐家鼠和小家鼠等 4种哺乳动物物种的 RPS15基因的编码序列及其所编码的氨基酸序列进行同源性比较,结果显示具有很高的同源性:基因编码序列同源性分别为 93.38%、91.32%、90.41%和 88.81%,人与大熊猫的编码序列的同源性最高;氨基酸序列同源性均为 100.00%。进一步对其编码蛋白

的分子量及等电点进行预测分析发现:各分子量和等电点也均相同,分别为 17.0401 kDa和 10.39。

用 PredictProtein软件对这 5个哺乳动物物种的 RPS15基因所编码蛋白的功能位点进行预测,结果发现:大熊猫与人、猪、褐家鼠和小家鼠 RPS15蛋白的功能位点完全一致,均含有 2个依赖于 cAMP和 cGMP的蛋白激酶磷酸化位点,5个蛋白激酶 C磷酸化位点,4个 N酰基化位点及 1个 RPS19蛋白 signature位点。这表明大熊猫的 RPS15蛋白与所报道的哺乳动物的 RPS15蛋白在结构和功能上完全一致。

将大熊猫 RPS15基因的编码序列和人、猪、褐家鼠和小家鼠进行比较分析,发现存在不少变异位点,这些变异多系密码子的第 3位碱基发生了变异,且这些变异不引起编码氨基酸的变化,故属于同义突变,从这个意义上讲,已报道的哺乳动物的 RPS15蛋白具有高度的保守性。

目前,已报道的哺乳动物 RPS15基因的编码序列仅见于人、猪、褐家鼠和小家鼠,本实验运用分子生物学原理与相应的技术手段,首次成功地扩增出大熊猫 RPS15基因的表达序列并对其编码蛋白进行了初步分析,为进一步探讨大熊猫核糖体基因的遗传特点,合理利用基因资源、制定基因保护对策等提供基础资料。

4 参考文献

- 冯文和,李光汉. 2000. 拯救大熊猫 [M]. 成都:四川科学技术出版社:124~132
- 侯万儒,陈瑜,彭正松,等. 2007. 大熊猫辅酶 Q 细胞色素 C 氧化还

- 原酶的辅酶 Q 连接蛋白基因 (QP-C) cDNA 的克隆及序列比较 [J]. 兽类学报, 27 (2): 190~194.
- 侯万儒. 2000. 大熊猫生命表及相关数据指标的修订 [J]. 动物学研究, 21 (5): 361~366.
- 廖鸣娟, 张志和, 张安居, 等. 2005. 大熊猫生长激素受体 (GHR) cDNA 的克隆与序列分析 [J]. 兽类学报, 25 (1): 24~31.
- 林峰, 杨玉华, 张义正, 等. 1998. 大熊猫脑源性神经营养因子基因的克隆与表达 [J]. 兽类学报, 18 (2): 95~98.
- 刘维新, 谢钟, 刘志刚, 等. 1993. 全人工哺育大熊猫初生幼兽研究 [A]. 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集 [C]. 成都: 四川科技出版社: 164~172.
- 仇秉兴. 1984. 人工哺育新生大熊猫的难关 [J]. 大自然, (4): 20~21.
- 汪晓晶, 王小行, 王亚军, 等. 2002. 大熊猫及其近种活化素基因 A 亚基成熟肽序列的克隆分析及其在分类地位上的应用 [J]. 遗传学报, 29 (9): 782~786.
- 王平, 曹焯, 刘维新, 等. 19580. 初生大熊猫的组织学观察 [J]. 科学通报, (13): 623.
- 魏辅文, 胡锦矗. 1994. 卧龙自然保护区大熊猫繁殖研究 [J]. 兽类学报, 14 (2): 243~248.
- 张安居, 李光汉, 张志和, 等. 1998. 四川省大熊猫迁地保护示范工程 [A]. 97 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集 [C]. 成都: 四川科学技术出版社.
- 张亚平, 王文, 宿兵, 等. 1995. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用 [J]. 动物学研究, 16 (4): 301~306.
- 郑旭, 张志和, 胡细连, 等. 2004. 大熊猫垂体泌乳素 (PRL) cDNA 的克隆与表达 [J]. 遗传学报, 31 (9): 963~966.
- 钟顺隆, 何光昕, 宋云芳, 等. 1993. 大熊猫人工育幼研究及一胎二仔成活 [A]. 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集 [C]. 成都: 四川科技出版社, 158~163.
- 周荣家, 程汉华, 余其兴. 1998. 大熊猫 Sox 和 Zfx 基因 [J]. 中国科学 (C 辑), 28 (6): 516~520.
- 朱玉贤, 李毅. 2002. 现代分子生物学 (第 2 版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 115~116.
- Avis JM, Allain FH, Howe FW, et al 1996. Solution structure of the N-terminal RNP domain of U1A protein: the role of C-terminal residues in structure stability and RNA binding [J]. J Mol Biol, 257: 398~411.
- Batey RT, Williamson JR. 1996. Interaction of the *Bacillus stearothermophilus* ribosomal protein S15 with 16S rRNA: II. Specificity determinants of RNA protein recognition [J]. J Mol Biol, 261: 550~567.
- Ehresmann C, Philippe C, Westhof E, et al 1995. A pseudoknot is required for efficient translational initiation and regulation of the *Escherichia coli* spO gene coding for ribosomal protein S15 [J]. Biochem Cell Biol, 73: 1131~1140.
- Golden BL, Hoffman DW, Ramakrishnan V, et al 1993. Ribosomal protein S17: characterization of the three dimensional structure by 1H- and 15N-NMR [J]. Biochemistry, 32: 12812~12820.
- Gregory RJ, Zeller ML, Thurlow DL, et al 1984. Interaction of ribosomal proteins S6, S8, S15 and S18 with the central domain of 16S ribosomal RNA from *Escherichia coli* [J]. J Mol Biol, 178 (2): 287~302.
- Jagannathan I, Culver GM. 2003. Assembly of the central domain of the 30S ribosomal subunit: roles for the primary binding ribosomal proteins S15 and S8 [J]. J Mol Biol, 330 (2): 373~383.
- Kugita M, Kaneko A, Yamamoto Y, et al 2003. The complete nucleotide sequence of the homwort (*Anthoceros formosae*) chloroplast genome: insight into the earliest land plants [J]. Nucleic Acids Res, 31 (2): 716~721.
- Liao MJ, Zhu MY, Zhang ZH, et al 2003a. cDNA cloning of growth hormone from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and its expression in *Escherichia coli* [J]. Comp Biochem Phys B, 135: 109~116.
- Liao MJ, Zhu MY, Zhang ZH, et al 2003b. Cloning and sequence analysis of FSH and LH in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) [J]. Anim Reprod Sci, 77: 107~116.
- Liljas A, Garber M. 1995. Ribosomal proteins and elongation factors [J]. Curt Opin Struct Biol, 5: 721~727.
- Montali RJ. 1990. Causes of neonatal mortality in giant panda [J]. Tokyo Zoological Park Society, 83~94.
- Nikulin A, Serganov A, Ennifar E, et al 2000. Crystal structure of the S15-rRNA complex [J]. Nat Struct Biol, 7 (4): 273~277.
- Oubridge C, Ito N, Evans PR, et al 1994. Crystal Structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin [J]. Nature, 372: 432~438.
- Ramakrishnan V, Gerchman SE. 1991. Cloning, sequencing and overexpression of genes for ribosomal proteins from *Bacillus stearothermophilus* [J]. J Biol Chem, 266: 880~885.
- Ramakrishnan V, White SW. 1995. Structures of prokaryotic ribosomal proteins: implications for RNA binding and evolution [J]. Biochem Cell Biol, 73: 979~986.
- Rao G, Fang SG, Tsutomu F, et al 2004. Expression of biologically active neurotrophin-4 of giant panda in *Escherichia coli* [J]. Acta Theriologica Sinica, 24 (1): 13~18.
- Shiga K, Yamamoto H, Okamoto H. 1990. Isolation and characterization of the human homologue of rig and its pseudogenes: the functional gene has features characteristic of housekeeping genes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 87 (9): 3594~3598.
- Wu ZA, Liu WX, Murphy C, et al 1990. Satellite 1 DNA sequence from genomic DNA of the giant panda [J]. Nucleic Acids Res, 18 (4): 1054.