

果蝇 p53 基因的克隆及序列分析

乌慧玲, 孙莹, 王文兵* (江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江 212013)

摘要 从紫外刺激的果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 抽提总 RNA, 通过 RT-PCR 方法扩增得到有完整读码框的 p53 基因, 并且通过对 p53 基因的序列分析表明, 所得到的序列与网上已经登陆的果蝇 p53 序列有 99.4% 的相似系数, 而与其他生物的 p53 序列存在一定的分歧。系统进化树的分析表明, 7 个物种来源的 p53 基因起源于同一个祖先分子, 且同属于一个有相似功能作用的蛋白家族。但由于长久以来的进化发展, p53 基因在不同的物种内发生了一定的突变, 并延续了这种变异。

关键词 果蝇 (*Drosophila melanogaster*); p53 基因; 克隆; 同源性

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)33-10628-02

Cloning and Analysis of Sequence of *Drosophila melanogaster* p53 Gene

WU Hui-ling et al (Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013)

Abstract A pair of primers based on conservative sequences of *Drosophila melanogaster* was designed to amplify the p53 gene. The fragment with 1156 base pair was obtained and sequenced. The percent identity between others' and ours' was 99.4%, with the other biological sequence of p53 existing some differences. Phylogenetic tree analysis showed seven species sources of p53 gene originated from the same ancestor, which belong to a similar function of the protein family. However, with long evolutionary development, p53 gene in different species had took place a certain mutation, and continued this variability.

Key words *Drosophila melanogaster*; p53 gene; Cloning; Percent identity

自从 1983 年首次克隆人和小鼠 p53 cDNA 以来, 全世界科学家在 10 余年时间内对 p53 进行了广泛的研究, 发现了 p53 能影响诸多细胞过程^[1-3]: 抑制 G1 细胞周期和 G2/M 细胞周期; 抑制基因扩增; 诱导细胞凋亡; 抑制 DNA 复制; 参与 DNA 的复制, 表现在结合参与 DNA 复制蛋白、结合损伤 DNA 以及单链 DNA 或 RNA 重新缔合成为双链分子; 诱导分化(淋巴生成、精子生成和角质细胞); 刺激和抑制转录; 结合 5.8s rRNA。为了研究 p53 的有关功能, 笔者用已知的 p53 序列设计引物从果蝇的 cDNA 中调出这个基因以利于后期的研究工作, 并且对 p53 序列进行了一系列的分析讨论。

1 材料与方法

1.1 实验材料的准备

(1) 果蝇成虫的获得。直接削去苹果皮, 并将苹果切成小块放入培养瓶中, 然后盖住瓶口, 将培养瓶置于温暖处。当瓶内苹果变色发酵后, 打开瓶口, 很快发现有果蝇的成虫进入到瓶内培养基上生活, 当瓶中出现约有 10 对成虫时, 用棉球塞住瓶口, 于 15~16 培养。

(2) 供试材料的临时处理。取培养 3 日龄幼虫的果蝇置于紫外灯下照射 20 min, 然后液氮速冻待用。

1.2 总 RNA 的提取 果蝇 RNA 用 Trizol 一步法抽提, 按试剂盒说明书上的操作步骤进行。所提取的总 RNA 经 1% Agarose 胶快速电泳检测其完整性, 并用 Genespec 测定其浓度。

1.3 cDNA 第 1 链合成 cDNA 第 1 链用 SuperScript™ First-strand synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™ 公司) 合成, 按照试剂说明步骤进行。20.0 μl 体系中含有 5.0 μg 总 RNA, 0.5 μg digo(dT)₁₂₋₁₈ 引物, 1 U SuperScript™ 反转录酶, 1.0 U RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor, 1.0 μl dNTPs (各 10 mmol) 于 65 灭活 5 min, 42 50 min 合成 cDNA, 70 15

min 灭活 SuperScript™ 反转录酶, 加入 RNaseH 于 37、20 min 消化剩余的 RNA 后保存于 -20 待用。

1.4 PCR 扩增 p53 基因 根据 p53 序列的两处保守区域设计简并引物, 引物 1: atgatatcacagcca, 引物 2: tcatggcagctcgtag。

PCR 反应在 PCR 仪 (GeneAmp PCR system 9600) 上进行。反应体系为 25.0 μl, 扩增条件是: 94 4 min, 94 30 s, 40 2 min, 72 1 min, 40 个循环后再在 72 下延伸 5 min。取 PCR 产物 5.0 μl 进行电泳检测。

1.5 TA 克隆和 cDNA 测序 PUCm18-T vector 购于上海生物工程有限公司, 菌株 DH5 由实验室保存, 限制性内切酶 pst 购自 Bldabs 公司, 核苷酸同源性分析用 Blast。

2 结果与分析

2.1 p53 基因的扩增 经 PCR 扩增获得 1.2 kb 的 p53 基因 (图 1)。图 1 中 1 为重组质粒经 pst 双酶切结果, 2 为果蝇 p53 基因的 PCR 扩增产物, 电泳时取果蝇 p53 的 PCR 产物进行比较, 因为 p53 基因中 204 bp 处有一个 pst 的酶切位点, 所以双酶切可以切下 0.9 kb 的片段。

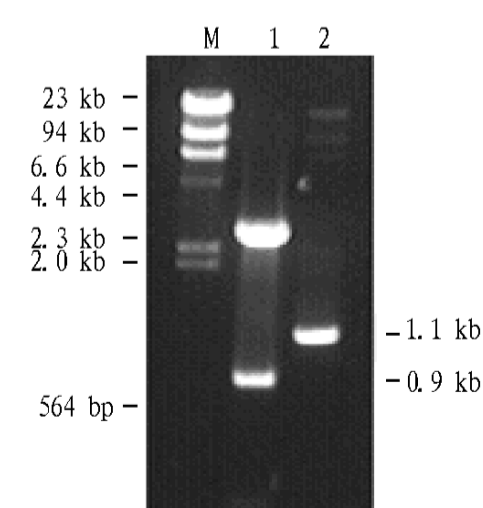


图 1 果蝇 p53 基因 PCR 产物及酶切结果

2.2 扩增片段的克隆和鉴定 p53 基因片段与 PUCm18-T 的重组质粒经转化大肠杆菌 DH5 后, 从培养板上随机挑取 5 个白色克隆, 扩增培养后, 提取质粒 DNA。质粒 DNA 经 pst 双酶切鉴定。获得有外源目的片段的阳性克隆, 酶切结果见图 1。图中可见酶切外源片段与 PCR 产物的目的片段大小位置跟理论上是一致的。

2.3 果蝇的 p53 基因的核苷酸序列分析及同源性比较 对所克隆果蝇的 p53 基因进行测序分析, 结果显示 (图 2), p53 由 1158 bp 组成, 其 5' 端、3' 端可见实验中所用的两端引物序列, 编码 385 个氨基酸。

基金项目 江苏省教育厅高校科学研究项目(02KJD18003); 江苏大学高级人才启动基金项目(1283000174)。

作者简介 乌慧玲(1978-), 女, 山东茌平人, 在读博士, 助理研究员, 从事医学分子生物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-07-19

atgtatatcacagccaatgtcgtggcacaagaagcactgattccgaggatgactcc
M Y I S Q P M S W H K E S T D S E D D S
acggaggtcgatatcaaggaggatattccgaaaacggtggaggatcgggatcggaattg
T E V D I K E D I P K T V E V S G S E L
accacggaacccatggccttcttgcaggatataactccgggaatctgatgcagttcagc
T T E P M A F L Q G L N S G N L M Q F S
cagcaatccgtgctgcgcgaaatgatgctgcaggacattcagatccaggcgaacacgctg
Q Q S V L R E M M L Q D I Q I Q A N T L
ccaagctagagaatcacaacatcggtggttattgcttcagcatggttctggatgagccg
P K L E N H N I G G Y C F S M V L D E P
ccaagtctcttggatgtactcgattccgctgaacaagctctacatccggatgaacaag
P K S L W M Y S I P L N K L Y I R M N K
gccttcaacgtggacgttcagttcaagtctaaaatgccatccaaccacttaatttgcgt
A F N V D V Q F K S K M P I Q P L N L R
gtgttcttcttccaatgatgtgagtgctcccggtggtcctgctgcaaaatcacctt
V F L C F S N D V S A P V V R C Q N H L
agcgttgagcctttgacggccaataacgcaaaaatgcgcgagagcttgctgcgcagcag
S V E P L T A N N A K M R E S L L R S E
aatcccaacagtgatattgtggaatgctcagagcaaggaatttccgagcgtcttcc
N P N S V Y C G N A Q S K G I S E R L S
gtgtgtagccccctgaacatgagccggtctgtaaccgcggtgggctcacgcgagacc
V V V P L N M S R S V T R G G L T R Q T
ctggccttcaagttctgtctgcaaaaactcgtgtatcggcgcaaaagaaacttcttagtc
L A F K F V C Q N S C I G R K E T S L V
ttctgcctggagaaagcatgcggcgatctggtggacagcatgtatacatgttaaaata
F C L E K A C G D I V G Q H V I H V K I
tgtacgtgcccccaagcgggatcgcatccaagacgaacccagctcaatagcaagaagcgc
C T C P K R D R I Q D E R Q L N S K K R
aagtcggtgccggaagccgccaagaagatgagccgtccaaggtgctgctgctgcatgct
K S V P E A A E E D E P S K V R R C I A
ataaagacggaggaacggagagcaatgatagccgagactgcgacggctccgcccagag
I K T E E T E S N D S R D C D G S A A E
tggacgtgctgcggacaccggatggcgattaccgctgcccattacgtgccccataag
W N V S R T P D G D Y R L A I T C P N K
gaatggctgctgcagagcatcgaggcatgattaaagaggcggcgctgaagtcctgcgc
E W L L Q S I E G M I K E A A A E V L R
aatcccaaccaagagaatctacgtgcccattgccaacaaattgctgagccttaagaaacgt
N P N Q E N L R R H A N K L L S L K K R
g c c t a c g a g c t g c c a t g a
A Y E L P

图2 果蝇p53 基因核苷酸和氨基酸序列

物的p53 序列进行了同源性分析,结果见图3。

同源性分析表明,所得到的序列与网上已经登陆的果蝇p53 序列有99.4%的相似系数,而与其他生物的p53 序列存在比较大的分歧。此序列有完整的读码框,笔者拟构建一个合适的表达载体对p53 基因进行表达。载体的构建还在进行之中,以利于p53 功能性的研究及其应用。

3 小结与讨论

研究结果表明,所测定的果蝇p53 的cDNA 序列及其推导的氨基酸序列与已发表的果蝇p53 的基本相同。从序列分析结果还可看出来源不同的p53 的保守性和差异,此序列与已经登陆的果蝇p53 序列有99.4%的相似系数,而其他物种p53 与该研究的p53 序列均存在一定的分歧。

与已经登陆果蝇的p53 序列之间有分歧的原因,一种可能是由于两者获得果蝇p53 基因的途径不同。该实验中,果蝇是用紫外光杀死的,而紫外光可以诱发基因突变。因此,在紫外光杀死果蝇时,可能使碱基发生突变。另一种可能性是由于密码子具有简并性,果蝇自身的p53 核苷酸序列有些碱基突变后,并不影响它的翻译与表达。就如核苷酸序列1 002、1 056 位点上的碱基突变,并没有引起氨基酸的改变。但574、595、640、915、947 位点上碱基的突变,却引起了氨基酸的改变。其中,多数氨基酸的改变为同种性质氨基酸的改变,所以它们之间的替换并不会引起蛋白质结构的改变。

p53 是与细胞凋亡相关的基因之一。国内外学者已经对果蝇p53 基因进行了一系列研究^[4],但尚未见用紫外处理来刺激与凋亡相关基因p53 的研究报道。因此,该研究不仅为p53 基因的分子生物学研究提供了新的研究数据,同时为利用基因工程技术表达p53 基因以及其在细胞信号转导中的功能研究打下了基础,还为同类基因的基础研究提供可以借鉴的经验。进一步的基因表达及生物活性研究正在进行中。

同时用DNAsar 软件对果蝇p53 序列以及其他6 种生

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8		
Divergence	1	99.4	23.7	28.3	26.4	26.5	27.1	26.7	1	drosophila melanogater1
	2	0.6	23.9	28.3	26.4	26.3	26.7	26.6	2	drosophila melanogater2
	3	350.0	350.0	26.5	33.1	34.9	35.6	27.6	3	dog
	4	246.4	246.4	350.0	27.1	29.0	24.8	27.9	4	gray short-tailed opossum
	5	297.8	298.6	167.6	268.6	34.1	33.3	26.6	5	human
	6	295.0	304.2	152.3	220.5	158.1	34.1	27.5	6	pig
	7	350.0	345.3	147.0	350.0	165.7	164.9	27.1	7	sheep
	8	282.5	290.5	251.4	248.6	294.6	254.8	272.1	8	zebrafish
	1	2	3	4	5	6	7	8		

图3 7 种生物p53 核苷酸序列同源性比较

参考文献

- [1] SIEGenga WT, VAN DER E B A J, JOCHENSEN A G, et al. How phosphorylation regulates the activity of p53[J]. *J Mol Biol*, 1996, 263: 103- 1132.
- [2] BUCKHINDER L, VALASEO MIGUEL S, CHEN Y, et al. The p53 tumor suppressor targets a novel regulator of G-protein signaling[J]. *PNAS*, 1997, 94: 7868 - 7872.
- [3] WEBSTER NJ, RESNICK J L, REICHAERT D B, et al. Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: A possible mechanism for receptor over expression in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 2781 - 2788.
- [4] 高文涛, 张泽兵, 欧阳 . 抑癌基因p53 基因克隆和表达[J]. *口腔医学纵横杂志*, 1999, 15(1): 39- 41.