

猪细胞周期蛋白 A 基因的克隆及其功能研究

范 丽, 唐青海, 张彦明*, 刘 伟, 全 刚

(西北农林科技大学动医学院, 杨凌 712100)

摘 要: 本研究旨在克隆猪细胞周期蛋白 A 基因(*Cyclin A*), 并在猪脐静脉血管内皮细胞(SUVEC)中表达, 以验证其功能。以人的 *Cyclin A* 基因为信息探针, 经电子克隆得到猪 *Cyclin A* 基因, 通过 RT-PCR 和 DNA 测序验证电子克隆结果并对其进行生物信息学分析, 用 RT-PCR、Western blot 研究它在 SUVEC 中的表达情况。应用激光共聚焦显微镜分析它在细胞中的亚细胞定位, 并通过流式细胞仪分析细胞周期以及用 MTS 法测定细胞的增殖能力。结果如下: 核酸测序证明 RT-PCR 产物同电子克隆结果相符。该 cDNA 包含 1 299 bp 的完整开放阅读框(ORF), 共编码 432 个氨基酸, 经 NCBI BLAST 分析, 该基因定位于猪的 8 号染色体上。Western blot 结果显示 *Cyclin A* 基因编码蛋白的相对分子质量大小约为 40 ku, 亚细胞定位研究表明该蛋白定位于细胞核中。经流式细胞仪分析表明稳定表达该基因的细胞, 其 G₁ 期的细胞数量比对照组细胞增加了 15%~20%, 而 S 期的细胞数量比对照组细胞减少了约 18%; MTS 法检测显示细胞株 SUVEC-CycAGFP 的增殖活性明显高于对照组细胞。作者成功克隆到新基因猪源细胞周期蛋白 A, 并验证了其生物学功能, 为今后开展病毒感染对猪细胞周期蛋白 A 影响的研究奠定了基础。

关键词: 猪细胞周期蛋白 A 基因; 克隆; 猪脐静脉血管内皮细胞; 真核表达; 细胞周期; MTS

中图分类号: S852.23; Q78

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)04-0469-09

Cloning and Functional Analysis of *Cyclin A* Gene in Pig

FAN Li, TANG Qing-hai, ZHANG Yan-ming*, LIU Wei, TONG Gang

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The study was aimed at cloning porcine *Cyclin A* gene and expressing it in swine umbilicus veins endothelial cell (SUVEC) to verify its functionality. The human *Cyclin A* gene was utilized as the informational probe to e-clone the pigs *Cyclin A* gene. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to identify the products in silico cloned, and the bioinformatics methods was used to analyze structure characteristics of the gene, RT-PCR, Western blot were employed for investigating its expression in SUVEC. Subcellular localization of Cyclin A was analyzed by confocal microscope, and the flow cytometry was used to analyze the cell cycle, and MTS was used to detect the proliferation of the cells. The results proved that the product of RT-PCR was consistent with that of silico cloning. This cDNA contains the complete open reading frame (ORF) of 1 299 bp coding 432 amino acid residues, and NCBI BLAST analysis indicated that the gene is located in swine on chromosome 8. Western blot manifested that molecular size of Cyclin A protein was about 40 kDa, and subcellular localization showed that this protein was localized in nuclear. The flow cytometry analysis showed that cell lines SUVEC-CycAGFP of G₁ phase cells increased by 15% to 20%, while those in S phase decreased about 18% compared with that of the control cells. MTS assay showed that the proliferative activity of cell lines SUVEC-CycAGFP was significantly higher than that of the control groups. Our results indicate that Cyc-

收稿日期: 2009-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972186)

作者简介: 范 丽(1984-), 女, 宁夏石嘴山市人, 硕士, 主要从事分子病原学与免疫学研究, E-mail: fanli968@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 张彦明(1956-), E-mail: ylzhangym@sohu.com

lin A gene of pig was successfully cloned and its biological function was also confirmed, which will provide a foundation for further research on the impact of virus infection on the Cyclin A.

Key words: *Cyclin A* gene of pig; cloning; swine umbilicus veins endothelial cell; eukaryotic expression; cell cycle; MTS

细胞周期蛋白家族控制着真核细胞的分裂周期,作为一种可定期活化蛋白质激酶特定子集的调整亚基,它们控制着细胞周期各个阶段的过渡时间^[1-6]。Cyclin A 作为细胞周期蛋白家族的一员,在细胞周期调控系统中发挥着重要作用,它通过和 CDK2 激酶结合来参与控制细胞周期进入 S 期,并与 CDC2 结合来促进 G₂/M 时相的转换^[7-10]。Cyclin A 的 mRNA 及蛋白质产物在 G₁ 晚期开始积累,并在 S 期达到高峰^[11]。目前,大量试验证实人 *Cyclin A* 基因的反常增殖与肿瘤的形成有关^[12-14],并且,在病毒感染的细胞中,Cyclin A 的表达也会出现异常。已有的研究证实,Cyclin A 的高表达与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染成正相关,HBV 基因整合入宿主细胞后,其序列中的增强子与启动子激活 *Cyclin A* 基因,使其高表达,从而导致细胞增殖失控,可能是诱导肝细胞癌变的一个重要因素^[15]。Yang 等证实丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)非结构蛋白 NS2 可以抑制细胞增殖,并通过下调 Cyclin A 蛋白的表达将细胞周期抑制于 S 期^[16]。这些试验结果表明,Cyclin A 不仅仅是细胞周期的重要调控蛋白,而且在肿瘤疾病和病毒感染过程中可能也扮演着重要角色。

为探讨猪 *Cyclin A* 基因的功能,本研究结合基因存在论(Gene ontology)和生物信息学方法,按照人的 *Cyclin A* 基因序列在 NCBI 数据库中电子克隆到该基因的猪体同源性基因^[17-19],并对其编码蛋白的功能进行了生物信息学分析。通过试验验证了该基因的存在,并将基因转入猪源细胞进行表达,验证了其功能,为今后对肿瘤发生以及病毒与猪细胞周期蛋白 A 相互作用的研究奠定了基础。

1 材料与方

1.1 菌株、载体、细胞来源

感受态大肠埃希氏菌 DH_{5α}、pEGFP-C1 和 pEGFP-N1 载体由作者实验室保存;pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;永生化的猪血管内皮细胞由作者实验室保存,SUVEC 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5%的

CO₂ 培养箱内培养,每隔 2 d 传代 1 次。

1.2 主要试剂及工具酶

TRIzol 试剂及细胞培养基 DMEM 购自美国 Invotrogen 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;TIAN-Script cDNA 第一链合成试剂盒、TianGen Midi Purification Kit 胶回收试剂盒、DNA Marker,均购自 TianGen 公司;质粒小提试剂盒购自杭州爱思进公司;限制性内切酶 *Bam*H I、*Sac* II 和 *Hind* III 购自 TaKaRa 公司;高效真核转染试剂购自北京威格拉斯生物技术有限公司;新霉素(G418)购自德国 Merk 公司;鼠抗 GFP 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体均购自美国 Millipore 公司。

1.3 软件及网络资源

美国国家生物技术信息中心(National center for biotechnology information, NCBI)的 EST 数据库及蛋白质序列数据库;蛋白质一级结构预测工具(www.ebi.ac.uk/InterProScan/)、二级结构预测工具(<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?page=npsa-gor4.html>)。蛋白亚细胞定位预测工具(<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/Subloc/>)。同时,利用 DNASTar、Mega (4.0) 软件对 DNA 序列进行辅助分析。

1.4 候选基因的电子克隆

以人的细胞周期蛋白 A cDNA 序列为信息探针,在 NCBI 上猪 EST 数据库中筛选与之同源的 EST 序列,取 200 bp 以上、同源性大于 80%的猪的 EST 序列进行拼接并构建 EST 连接群,得到与连接群一致的序列;用同样方法再次比对拼接,直到不再延长为止。最终校对的序列通过了猪基因组数据库的验证,获得 1 条全长 1 622 bp 的相应猪基因的序列。

1.5 *Cyclin A* 的分子克隆

根据电子克隆得到的 *Cyclin A* 基因序列,使用 Primer Premier 5.0 及 Oligo6.0 等设计软件,设计了 1 对特异性引物,预期扩增片段为 1 622 bp,覆盖 *Cyclin A* 基因完整的编码区域。引物由北京三博远志生物有限公司合成,引物序列 P1: 5'-AG-CAGTGATGTTGGGCAGC-3'; P2: 5'-TGTA-CACCATATACTTAGAGTGATTTACATCC-3'。

采用 TRIzol 法从 SUVEC 细胞中提取总 RNA,用 cDNA 第一链合成试剂盒进行 cDNA 第一链的合成。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系: cDNA 模板 2 μL 、2 \times MasterMix 10 μL 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 1 μL 、ddH₂O 6 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,共 32 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测,并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,将回收产物与 pMD19-T 载体连接,并转化大肠杆菌 DH_{5 α} ,挑取阳性克隆、摇菌并提取质粒,经 BamHI 和 Hind III 双酶切鉴定后命名为 pMD-CycA,并进行测序分析。

1.6 猪 Cyclin A 序列的生物信息学分析

利用 DNASTar 6.0、MEGA4.0 等分析软件,将克隆到的猪 Cyclin A 基因与 GenBank 中登录的 8 个不同物种的 Cyclin A 基因在核酸水平和蛋白质水平上进行相似性比较,并进行 Cyclin A 系统发生进化关系分析。

1.7 Cyclin A 真核表达载体的构建

设计 2 对引物:上游引物 P3 (5'-GCGAAGCTTT-GATGTTGGGCAGCTCCG-3'),5'端带有 HindIII 酶切位点,下游引物 P4 (5'-GCGGGATCCAATATTTAGT-GTCTCTGGTGGGTTG-3'),5'端加上 BamHI 酶切位点;上游引物 P5 (5'-GCGAAGCTTATGTT-GGGCAGCTCCG-3'),5'端带有 HindIII 酶切位点,下游引物 P6 (5'-GCGCCGCGGAATATTTAGTGTCTCT-GGTGGGTTG-3'),5'端带有 Sac II 酶切位点。用上述 2 对引物从已构建质粒 pMD-CycA 的阳性菌液中扩增出目的片段并双酶切,然后分别同经 HindIII/BamHI 双酶切的 pEGFP-C1 和 HindIII/Sac II 双酶切的 pEGFP-N1 连接,构建真核表达质粒 pEGFP-CycA 和 pCycA-GFP。用此质粒转化大肠杆菌 DH_{5 α} ,筛选阳性克隆、扩增,用酶切法鉴定重组质粒,并送北京三博远志生物公司测序。

1.8 重组质粒的细胞转染与稳定表达细胞株的建立

将处于指数生长期的 SUVEC 细胞接种于六孔板,待细胞汇合度达到 50%~60%时,弃去细胞培养液,加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,2 h 后在单层细胞上加入高效转染试剂和质粒的混合物(2:6,质粒 DNA 的终浓度为 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 后,弃细胞上清液,加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养,48 h 后加入 G418 筛选液,连续培养。每 2

d 更换相同浓度的 G418 筛选液 1 次,并观察细胞生长及死亡情况。同时设转染载体 pEGFP-C1、pEGFP-N1 和未转染的 SUVEC 细胞的阴性对照。待对照孔的细胞全部死亡后将 G418 的浓度换为维持浓度(筛选浓度的一半)。继续培养细胞,每 2 d 换 1 次液,直到出现阳性克隆细胞。荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况,扩大培养细胞。

1.9 表达产物的 RT-PCR 和 Western blot 鉴定

将筛选的单克隆细胞、空载体转染细胞和未转染的细胞用 TRIzol 法提取 RNA,进行 RT-PCR 验证。细胞转染 60 h 后用裂解液裂解细胞收集蛋白上清,加入 2 \times 加样缓冲液,煮沸 5 min,然后进行 120 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS-PAGE 电泳,180 mA 稳压状态下转膜 3 h,室温下用 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白干粉封闭 1 h 后,用鼠抗 GFP 单克隆抗体(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。然后用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:4 000)室温作用 1 h,同上洗涤后,进行放射自显影。

1.10 蛋白质的亚细胞定位

质粒 pEGFP-CycA 和 pCycA-GFP 转染 24 h 后用细胞核染料 Hoechst33342 进行活细胞染色,并用 Nikon 荧光倒置显微镜进行观察,同时设立空载体 pEGFP-C1、pEGFP-N1 转染和未转染细胞作为对照。

1.11 流式细胞术分析细胞周期

取 1×10^8 个对数生长期细胞,用 PBS 离心洗涤 2 次,然后加 1 mL PBS 悬浮均匀,再加入 2 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇,立即振荡混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 18 h 后用流式细胞仪分析细胞周期。

1.12 MTS 法检测细胞增殖活性

分别将 SUVEC、SUVECGFP 和 SUVEC-CycAGFP 以 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔培养板,每孔加入 20 μL MTS/PMS 混合液进行培养,分别于 24、48、72、96 h 在 490 nm 波长下测定 OD 值。试验重复 3 次,收集数据用 SPSS 11.5 软件进行方差分析,以 $P<0.05$ 为差异显著,如果差异显著,再进行 Duncan's 多重比较。

2 结果

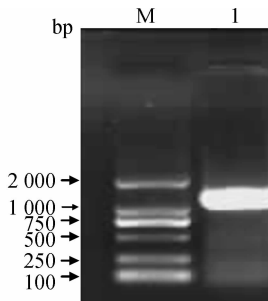
2.1 基因电子克隆结果

电子克隆获得的新基因经反复验证,获得了 1 条全长 1 622 bp 的 cDNA 序列,其最大 ORF 位于 69-1 367 bp,共 1 299 个核苷酸,编码 432 个氨基

酸;ORF 起始密码子 ATG,5'-CAGTGATG-3'序列基本符合 Kozak 规则(-3,-6,-9 位置,G 是偏好碱基),符合真核细胞 mRNA 有效转录的需要。且起始密码子上游同一相位含有终止密码子。该基因无 PolyA 加尾信号。

2.2 猪 *Cyclin A* 的 RT-PCR 扩增和重组质粒 pMD-CycA 的酶切鉴定

用所合成的特异性引物 P1 和 P2 进行扩增,结果显示,在约 1 622 bp 处有一特异性条带(图 1)和预期的目的片段一致。重组质粒 pMD-CycA 经 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切产生了约 1 622 和 2 692 bp 的条带,与预期结果一致(图 2)。



1. EC 细胞总 RNA 的 RT-PCR 产物;M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1. The RT-PCR product from the total RNA of EC cell; M. DL2000 DNA marker

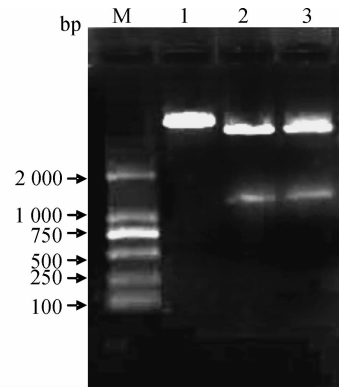
图 1 猪 *Cyclin A* 基因 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR product of pig *Cyclin A* gene

2.3 测序结果及序列分析

将重组质粒 pMD-CycA 用全自动测序仪进行

序列分析。测序结果经分析与电子克隆相符。将测序结果提交 GenBank,获得的登录号为 GQ265874。



1. *Hind* III 单酶切结果;2,3. *Bam*H I / *Hind* III 双酶切结果;M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1. The products of pMD-CycA digested by *Hind* III; 2, 3. The products of pMD-CycA digested by *Bam*H I / *Hind* III; M. DL2000 DNA marker

图 2 重组质粒 pMD-CycA 的双酶切及单酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme digestion of recombinant plasmid pMD-CycA

2.4 不同物种间 *Cyclin A* 基因的相似性分析

用 DNAMAN 软件将克隆获得的猪(*Sus scrofa*)*Cyclin A* 基因与 GenBank 中 8 个不同物种的 *Cyclin A* 基因进行相似性比较,结果如表 1 所示。核酸水平上猪 *Cyclin A* 基因与其它 8 个物种的相似性在 85.3%~94.1%,而在蛋白水平上猪 *Cyclin A* 基因与其它 8 个物种的相似性在 85.7%~95.8%,其核酸序列和蛋白序列与人 *Cyclin A* 相似性最高。

表 1 猪 *Cyclin A* 和其它物种的 *Cyclin A* 的核酸序列与蛋白质序列的相似性比较

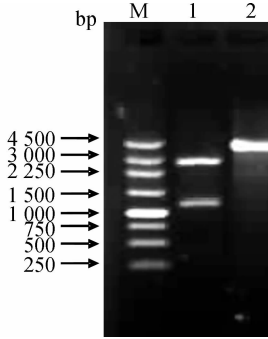
登录号 Accession Number	种 Species	相似性 Identity	
		核酸 Nucleotide	蛋白质 Protein
NM-20029951	<i>Homo sapiens</i>	94.1	95.8
XM-20011346388	<i>Pan troglodytes</i>	93	93.4
XM-5409657	<i>Canis familiaris</i>	92.9	93.1
NM-2008510	<i>Mus musculus</i>	86.8	87.1
NM-2134361	<i>Rattus norvegicus</i>	85.3	85.7
NM-2175716	<i>Bos Taurus</i>	93.5	94.4
NM-2001032947	<i>Macaca mulatta</i>	93.7	95
NM-2001009427	<i>Ovis aries</i>	93	93.6

2.5 *Cyclin A* 系统发生进化关系分析

用 DNAMAN 软件对猪(*Sus scrofa*)的 *Cyclin A* 基因与 8 个参考物种的 *Cyclin A* 基因推倒的氨基酸进行系统发生进化关系分析。从图 3 可看出构建的进化树可聚为 3 类,猪(*Sus scrofa*)与牛(*Bos*

Taurus)、人(*Homo sapiens*)以及猕猴(*Macaca mulatta*)的进化距离最近,它们可聚为一类;狗(*Canis familiaris*)、猩猩(*Pan troglodytes*)和羊(*Ovis aries*)聚为一类;小鼠(*Mus musculus*)和褐鼠(*Rattus norvegicus*)聚为一类。

生的片段大小与推测完全相符(图 6、图 7)。表明基因已成功插入 pEGFP-C1 和 pEGFP-N1 表达载体中,测序表明基因位置、大小和读码框均正确。



1. *Hind* III/*Bam* H I 双酶切结果;2. *Hind* III 单酶切结果;M. DNA 相对分子质量标准

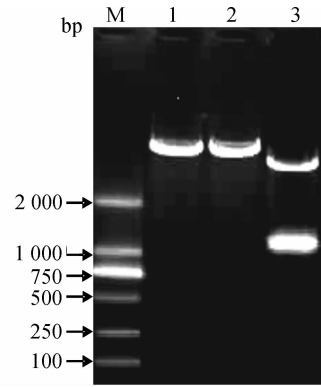
1. The products of pEGFP-CycA digested by *Hind* III/*Bam* H I ; 2. The products of pEGFP-CycA digested by *Hind* III ;M. DNA marker

图 6 重组质粒 pEGFP-CycA 的双酶切及单酶切鉴定结果
Fig. 6 Enzyme digestion of pEGFP-CycA

2.9 CyclinA 的亚细胞定位

转染细胞培养 24 h 后在激光共聚焦显微镜下

观察,对照组 EGFP 蛋白荧光信号分布在整个细胞中, pEGFP-CycA 融合蛋白分布在整个细胞中,而且大部分蛋白在核膜周围富集,融合蛋白 pCycA-GFP 仅分布在细胞核中(图 8)。



1、2. *Hind* III 单酶切结果;3. *Hind* III/*Sac* II 双酶切结果;M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1, 2. The products of pCycA-GFP digested by *Hind* III ; 2. The products of pCycA-GFP digested by *Hind* III/*Sac* II ;M. DL2000 DNA marker

图 7 重组质粒 pCycA-GFP 的双酶切及单酶切鉴定结果
Fig. 7 Enzyme digestion of pCycA-GFP

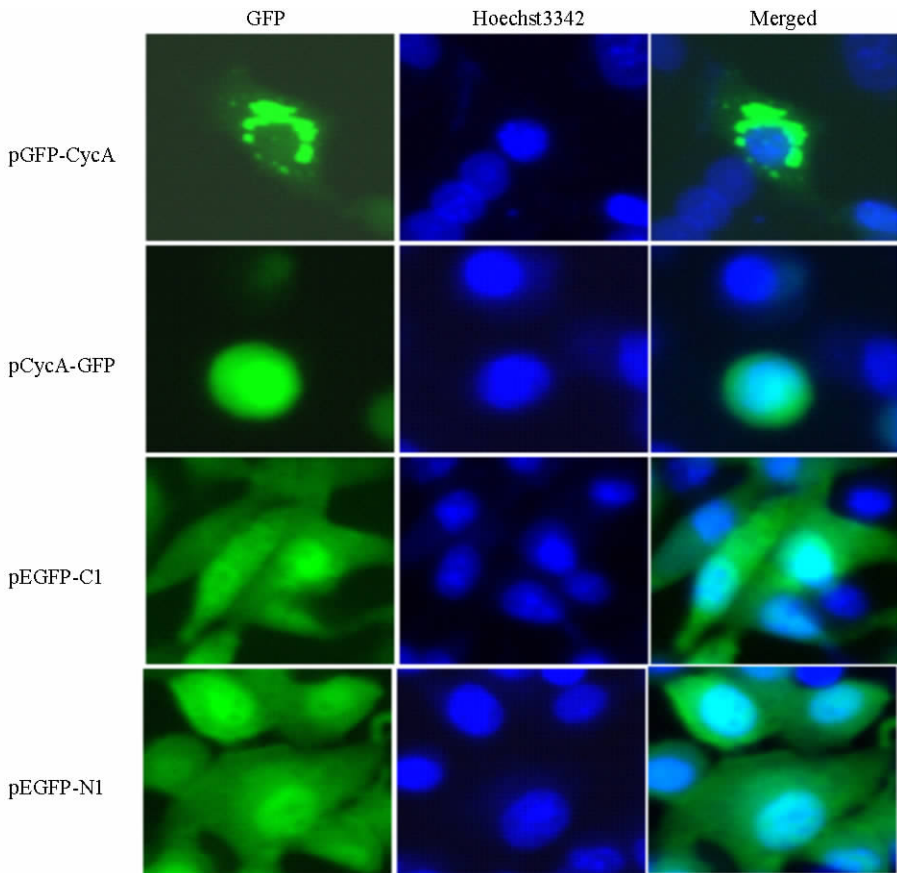
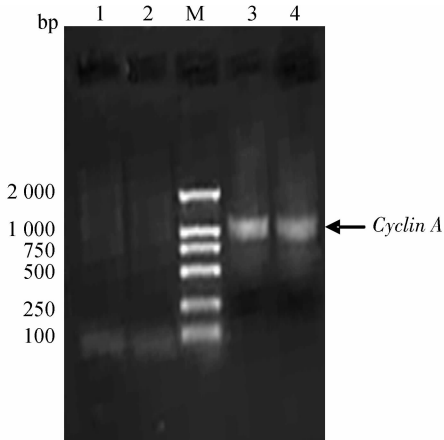


图 8 Cyclin A 的亚细胞定位 400×

Fig. 8 The subcell location of Cyclin A 400×

2.10 阳性细胞的 RT-PCR 鉴定

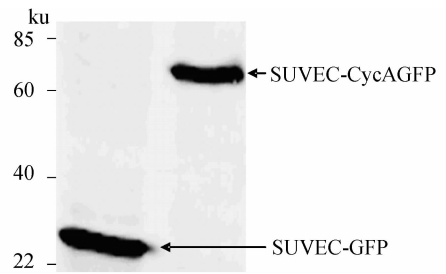
收集筛选出的阳性细胞克隆进行 RT-PCR 鉴定,发现转染重组质粒 pEGFP-CycA 和 pCycA-GFP 的细胞扩增出 1 299 bp 左右的条带,而转染空载体质粒 pEGFP-C1 和 pEGFP-N1 的细胞均未扩增出目的条带(图 9),Western blot 检测结果表明 Cyclin A 的相对分子质量约为 40 ku(图 10)。



1、2. 分别为转染空载体质粒 pEGFP-C1 和 pEGFP-N1 细胞的 RT-PCR 结果;3、4. 分别为转染 pEGFP-CycA 和 pCycA-GFP 细胞的 RT-PCR 结果; M. DL2000 相对分子质量标准

图 9 转染细胞的 RT-PCR 鉴定

Fig. 9 Identification of transfer cells by RT-PCR



CycA-GFP 的融合蛋白的分子质量约为 67 ku,GFP 的分子质量为 27 ku,推测 CyclinA 的分子质量约为 40 ku

The molecular weight of CycA-GFP about 67 kDa, GFP is 27 kDa, speculated that the molecular weight of Cyclin A is about 40 kDa

图 10 Cyclin A 的 Western blot 检测

Fig. 10 Identification of Cyclin A protein by Western blot

2.11 Cyclin A 功能的鉴定

经 G418 筛选后得到稳定表达 Cyclin A 的细胞株 SUVEC-CycAGFP 和 SUVEC-GFP,用流式细胞术检测细胞周期。结果显示,稳定表达 Cyclin A 的细胞株 SUVEC-CycAGFP 的 S 期细胞数量 (6.59%) 明显低于对照组细胞的 S 期细胞数量 (分别为 24.1% 和 25.5%) (图 11、12); 细胞株 SUVEC-CycAGFP 的 G₁ 期相对对照组细胞增加了 15%~20%。MTS 法检测细胞增殖活力,结果表明细胞株 SUVEC-CycAGFP 的增殖活性明显高于对照组细胞 ($P < 0.05$) (图 13)。

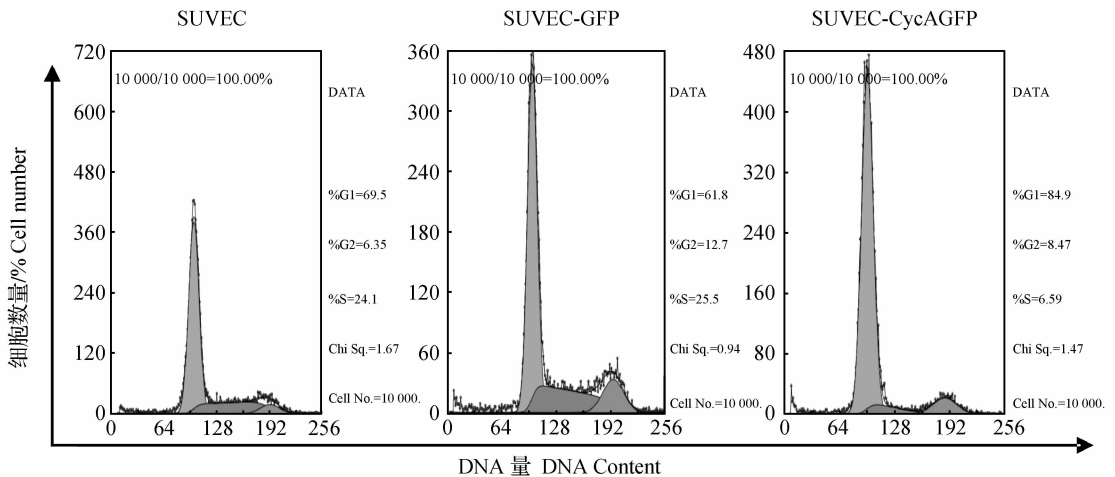


图 11 流式细胞仪分析 SUVEC、SUVEC-GFP 和 SUVEC-CycAGFP 的细胞周期分布

Fig. 11 Analyses of the cycle of SUVEC, SUVEC-GFP and SUVEC-CycAGFP by Flow Cytometry

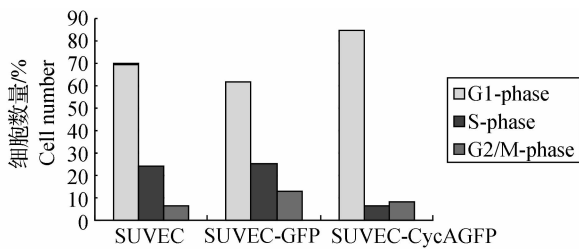
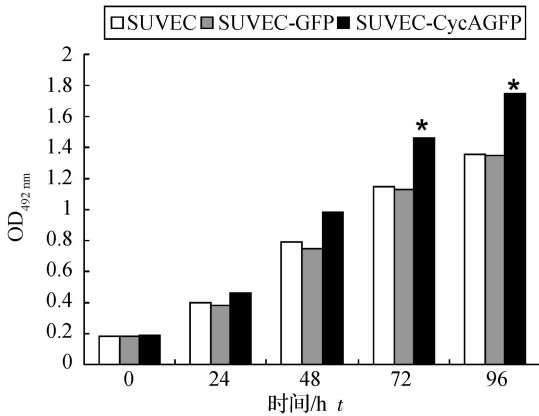


图 12 各细胞株细胞周期分布的数据统计

Fig. 12 The data of SUVEC, SUVEC-GFP and SUVEC-CycAGFP cell lines in cell cycle distribution



*. $P < 0.05$

图 13 各细胞株的细胞增殖活性检测

Fig. 13 Identification of cell proliferation of SUVEC, SUVEC-GFP and SUVEC-CycAGFP by MTS

3 讨论

在哺乳动物中,细胞周期蛋白 A 家族主要由 2 个成员组成: Cyclin A1 和 Cyclin A2, Cyclin A1 在小鼠中只在精子细胞中表达,但是在人的睾丸和特定的骨髓白血病中,其表达量可达到很高水平,定向缺失该基因后,由于产生了对精子发生的早期抑制,从而引起雄性不育,但是雌性个体显示正常^[20]。在体细胞中, Cyclin A2 在细胞 DNA 合成起始时以及 G2/M 过渡时期开始合成,在小鼠中定向缺失该基因会导致小鼠的胚胎死亡^[21]。在许多组织中, Cyclin A1 和 Cyclin A2 基因表达并不同步,说明两者的功能不能相互替代。

Cyclin A2 基因又称 Cyclin A, 首先由 Wang 等^[22]在原发性肝癌细胞中与 HBV DNA 整合的部位检测到,基因定位于 4q252q31, cDNA 为 1 649 bp,无 polyA 尾,由 432 个氨基酸组成,存在于 DNA 开始合成之前的细胞核中。作者以人 Cyclin

A 的 cDNA 序列为信息探针,通过电子克隆方法获得猪的 Cyclin A 的编码序列,并通过分子生物学试验验证了其正确性,证实猪 Cyclin A 基因的最大 ORF 由 1 299 个核苷酸组成,共编码 432 个氨基酸,无 polyA 尾,其编码蛋白相对分子质量约为 40 ku。将该基因在猪血管内皮细胞中进行融合表达,结果表明,猪的 Cyclin A 也定位于细胞核中,并且 GFP 蛋白在 Cyclin A 的 N 端能够阻碍 Cyclin A 在细胞中正确定位,说明 Cyclin A 的核定位信号肽序列很可能分布在该蛋白的 N 端。

Cyclin A 属于 S 期和 M 期周期蛋白,它的过表达和细胞增殖失控以及肿瘤的发生有关,目前还未能将 Cyclin A 确定为原癌基因,但许多研究表明,肿瘤组织中 Cyclin A 表达显著高于非肿瘤组织。Cyclin A 过表达与白血病的发生密切相关; Cyclin A 在非小细胞肺癌、原发性肝癌中的表达水平显著高于正常组织^[23-24]。本试验中作者将猪 Cyclin A 在猪的脐静脉血管内皮细胞中进行过表达,通过流式细胞术对转染细胞的细胞周期进行分析,表明转染了 Cyclin A 基因的细胞其生物代谢增强。MTS 法检测细胞增殖活力,结果表明细胞株 SUVEC-CycAGFP 的增殖活性明显高于对照组细胞。以上结果都说明猪 Cyclin A 具有能够促进细胞度过 S 期,增强细胞活力,促进细胞增殖的功能,为 Cyclin A 与肿瘤发生关系的研究提供了重要依据。

目前已有许多研究集中在病毒与细胞周期蛋白的相互作用上。病毒对宿主的感染最初是发生在宿主体内的静止期细胞,许多病毒都精通于刺激宿主静止期细胞使其进入细胞周期开始分裂增殖,并通过操纵此过程为自身的增殖提供所需环境。已有研究证实,病毒可通过与细胞周期蛋白的相互作用来对细胞周期产生影响。Zerfass 等证实腺病毒的 E1A 基因在缺乏外源性生长因子的条件下和 P107 结合来激活 Cyclin A 基因的转录^[25]。Hardwick 提出,疱疹病毒基因组可以编码表达一组细胞周期蛋白模拟物,通过这组模拟物对细胞周期进行调控^[26]。这些结论都提示 Cyclin A 在病毒感染的过程中可能也扮演了重要角色。

作者成功克隆到新基因——猪源细胞周期蛋白 A,并验证了其生物学功能,为今后开展病毒感染对猪细胞周期蛋白 A 影响的研究奠定了基础。

参考文献:

[1] DORÉE M. Control of M-phase by maturation-pro-

- moting factor[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1990, 2(2): 269-273.
- [2] LEW D J, REED L S. A proliferation of cyclins[J]. *Trends Cell Biol*, 1992, 2(3):77-80.
- [3] PETER M, HERSKOWITZ I. Joining the complex; cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle[J]. *Cell*, 1994, 79(2):181-184.
- [4] PINES J. Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle[J]. *Biochem Soc Trans*, 1993, 21(4):921-925.
- [5] SHERR C J. Mammalian G1 cyclins[J]. *Cell*, 1993, 73(6):1059-1065.
- [6] SHERR C J. G1 phase progression: cycling on cue [J]. *Cell*, 1994, 79(4):551-555.
- [7] GIRARD F, STRAUSFELD U, FERNANDEZ A, et al. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts[J]. *Cell*, 1991, 67(6):1169-1179.
- [8] PAGANO M, PEPPERKOK R, VERDE F, et al. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle[J]. *EMBO J*, 1992, 11(3):961-971.
- [9] QUELLE D E, ASHMUN R A, SHURIEFF S A, et al. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts[J]. *Genes Dev*, 1993, 7(8):1559-1571.
- [10] WALKER D H, MALLER J L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication[J]. *Nature*, 1991, 354(6351):314-317.
- [11] BARLAT I, FESQUET D, BRÉCHOT C, et al. Loss of the G1-S control of cyclin A expression during tumoral progression of Chinese hamster lung fibroblasts[J]. *Cell Growth Differ*, 1993, 4(2):105-113.
- [12] VOLM M, KOOMAGI R, MATTERN J, et al. Cyclin A is associated with an unfavourable outcome in patients with non small cell lung carcinomas[J]. *Br J Cancer*, 1997, 75(12):1659-1664.
- [13] SHOJI M, DOBASHI Y, MORINAGA S, et al. Tumor extension and cell proliferation I adenocarcinomas of the lung [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(3): 909-918.
- [14] MICHALIDES R J. Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, prognosis and treatment of cancer [J]. *J Clin Pathol*, 1999, 52(8): 555-568.
- [15] YASMEEN A, BERDEL W E, SERVE H, et al. E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2003, 3(5): 617-633.
- [16] YANG X J, LIU J, YE L, et al. HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression [J]. *Virus Res*, 2006, 121(2):134-143.
- [17] ZHANG H L, DENG H, ZHANG R F, et al. In silico cloning of the human *TECTB* gene [J]. *Acta Genet Sin*, 2003, 30(4): 317-320.
- [18] ZHANG D L, DING P G, LING L J, et al. In silico cloning of C17orf32, a novel human gene and verification of its coding region by RT-PCR[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29(4): 543-548.
- [19] 何建锋, 张彦明, 段会娟, 等. 人天然免疫基因 BCL10 的猪同源物的识别、克隆与初步表达分析[J]. *遗传学报*, 2008, 30(6): 747-754.
- [20] LIU D, MATZUK M M, SUNG W K, et al. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse[J]. *Nat Genet*, 1998, 20(4): 377-380.
- [21] MURPHY M, STINNAKRE M G, SENAMAUD-BEAUFORT C, et al. Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(1):83-86.
- [22] WANG J, CHENIVESSE X, HENGLEIN B, et al. Hepatis B virus integration in a *cyclin A* gene in a hepatocellular carcinoma [J]. *Nature*, 1990, 343(6258):555-557.
- [23] 于弄影, 史承广, 朱继江, 等. 细胞周期素 A 的表达与非小细胞肺癌增殖及预后的关系[J]. *癌症*, 2001, 20(1):38-40.
- [24] 张 益, 彭志海, 裘国强, 等. 周期蛋白 A 在原发性肝癌中的表达及意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(4):353-355.
- [25] ZERFASS K, SPITKOVSKY D, SCHULZE A, et al. Adenovirus E1A activates cyclin A gene transcription in the absence of growth factors through interaction with p107 [J]. *J Virol*, 1996, 70(4): 2637-2642.
- [26] HARDWICK J M. Cyclin' on the viral path to destruction[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(11): E203-E204.