

一种新的 cDNA 克隆的分析及可能功能推测

赵贵军¹, 黄玉珊¹, 向孟清², 钟肖芬¹, 徐安龙¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 美国新泽西州州立大学, 美国 NJ08854)

摘要: 筛选胎儿心脏文库时发现一个新 cDNA, Genbank 搜索和 BLAST 表明该新 cDNA 和蛋白激酶 A 锚定蛋白 AKAP95 有 71% 的蛋白质相似性, 且在 3' 端存在一个锌指结构和 AKAP 基因特有的 RII 结合区域, 因此初步判定该新 cDNA 为一种 AKAP 基因; 该 cDNA 和人类 19 号染色体的一段区域相同, HGP 计划标明在 cosmid R33907 和 cosmid F20900 上, 而该两粘粒定位在 19 号染色体的 q13.1 处, 因此将该新基因定位于人第 19 号染色体的 q13.1 处, 并且同 AKAP95 相邻。

关键词: 新 cDNA; PKA; AKAP; BLAST

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 02-0098-03

本实验室通过筛选人心脏 cDNA 文库, 并用 BLAST 与 GenBank 的数据库比较, 发现一个新的 cDNA 序列, 软件分析及检索表明它可能编码一种新的蛋白激酶 A 锚定蛋白 (A kinase anchor protein, AKAP). 本文将报道这一发现以及该基因的初步研究。

1 材料和方法

(1) 含 cDNA 序列的载体由本室构建及鉴定, 克隆到 pCDNA3 载体上, 该 cDNA 来源于人心脏 cDNA 文库。

(2) 测序: 送大连宝生物公司 ABI377 自动测序仪测序, 正反各测 2 次。

(3) BLAST 应用: 见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2 结果

2.1 cDNA 的序列及预测氨基酸序列 标有下划线的氨基酸为锌指结构区域, 方框为 RII 结合结构域。

2.2 序列分析 上面的 DNA 序列有 POLY (A), 预测的氨基酸序列中存在终止密码子, cDNA 长 987, 编码 290 个氨基酸, 5' 端可能不完整, 提交 Genbank 得到的 ACCESSION NUMBER 是 AF053536. 和 Genbank 比较的结果表明, 该 cDNA 可能是 AKAP 家族的一分子, 在新基因的 3' 端发现了一个 AKAP 蛋白普遍存在的区域特征, 即和 PKA RII 调节亚基相结合的结构域, 从而分析该新基因很可能是一种 AKAP 基因。它和

G Q T K R K L Q A G K K S Q D K Q
1 ggccagacca agcgcaagtt gcaggcaggc aagaagagtc aggcacaagca
K K R Q R D R M V E R I Q F V C S
51 gaaaaagcgg cagcgagacc gcatgtgtga aaggatccag ttgtgtgtt
L C K Y R T F Y E D E M A S H L
101 ctctgtgcaa ataccggacc ttctatgagg acgagatggc cagccatctt
D S K F H K E H F K Y V G T K L P
151 gacacgaagt tccacaagga acactttaag tacgtaggca ccaagctccc
K Q T A D F L Q E Y V T N K T K K
201 taagcagaac gctgacttcc tgcaggagta cgtactaac aagaccaaga
T E E L R K T V E D L D G L I H
251 agacagagga gctccgaaaa accgtggagg accttgatgg cctcatccac
Q I Y R D Q D L T Q E I A M E H F
301 caaatctaca gagaccagga tetgaccagg gaaattgcc tggagcattt
V K K V E A A H C A A C D L F I P
351 tgtgaagaag gtggaggcag cccattgtgc agcctcgac ctcttcattc
M Q F G I I Q K H L K T M D H N
401 ccatgcagtt tgggatcacc cagaagcacc tgaagaccat ggaacacac
R N R R L M M E Q S K K S S L M V
451 cggaaccgca ggetcatgat ggagcagtec aagaagtcct ccctcatggt
A R S I L N N K L I S K K L E R Y
501 ggcccgagct attctcaaca acaagctcat cagcaagaag ctggagcgct
L K G E N P F T D S P E E E K E
551 acctgaaggg cgagaacctc ttcaccgaca gccccgagga ggagaaggag
Q E E A E G G A L D E G A Q G E A
601 caggagggagg ctgagggcgg tgccttgagc gagggggccc agggcggaagc
A G I S E G A E G V P A Q P P V P
651 ggcaggagtc tggagggcgg cagaggggct gccggcgag cctcccgctc
P E P A P G A V S P P P P P P
701 cccagagacc agcccccggg ggcgtgtgc cgcaccgcc gccggcccca
E G G G G G R R G P C W E G R C N
751 gaaggaggag gagaggggcg ccglggccct tgcaggagg ggcgtgcaa
A R S A A S R A S T W R T T R K K
801 gcggagatcc gcggcatccc gggcctcgac gtgaggagac acgaggagaa
G G G G A P *
851 agggcgggcg gggcgccccg tgaccccgag ctggggcggg gccggagccc
901 gcgtggccga agctgggaac caaacctaat aaagtittcc catcccaaaa
951 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39800073)
收稿日期: 2000-01-25; 作者简介: 赵贵军 (1971—), 男, 讲师; 通讯联系人: 徐安龙.
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

AKAP95 具有 71 %的氨基酸序列相似性. 该基因和 AKAP95 在同一条染色体上紧密相邻, 编码方向相对, 显示是不同 DNA 链的翻译产物, 而且方向相反, 在表达调控上这两个基因有什么联系, 功能上有什么区别尚待研究.

MY AKAP	LMVARSILNNKLISKK LERYIK
AKAP95	LHVAKSVLNNRHIVKMLEKYL
AKAP75	LIEAASLVKNAIQLSIEQL
AKAP84	IKQAAFQLISQVILEA TEEL

新 AKAP 可能基因的 3'端氨基酸序列与其他 AKAP 的比较, 粗体字母表示 AKAP 家族中 R II 结构中的保守氨基酸. 下面是预测的氨基酸序列和 AKAP95 的比较, 采用 NCBI 的 BLAST2 工具, Query 为预测的序列, Sbjct 为 AKAP95 的蛋白质序列, 中间为相同或相似的氨基酸:

Query:27	ERIQFVCSLCKYRTFYEDMASHLDSKFHKEHFKYVGTLPKQT	70
	+RIQF CS+CK+R+R++E+ HL SKFHKE +++ TKLP +T	
Sbjct:386	DRIQFACSVCKFRSFDDDEIQHLSQSKFMKELRIFISTKLDPKT	429
	ADFLQEYVINKTKKTE ELRKYVEDLGLIHQLYRDQDLTQ	110
	+FLQEY+ N+ KK E+ R+ + + + D +	
	VEFLQEYIVNRNKKIE KRRQELMEKETAKPK——PDPFK	469
	ELAMEHFVKKVEAAHCAACDLFIPMQFGIIQKHLKTMHNN	150
	I EHF KK+EAHAC ACD+ IP Q ++Q+HL ++DHN	
	GIGQEHFFKK IEAAHCLACDMLTPAQQLLQRILHSVDHN	505
	RNRRIIMMEQSKKSSLMVARSILNNKLISKKLEERYLKGENPFT	192
	NRRIL EQ KK+SL VA+S+LNN+ I K KE+VYKGE+PFT	
	HNRRLAAEQFKKTSLVAKSVLNNRHIVKMLEKYLKGEDPFT	547

2.3 染色体定位 基因库中搜寻可知, 该 cDNA 与 19 号染色体上的序列具有很大的相似性. 同时我们的 AKAP 序列与粘粒 R33907 和 F20900 序列完全一致 (如图 1 所示), 而且这两个粘粒在序列上重叠, 同时定位于第 19 号染色体上的 q3.1 处. 因此我们预测我们的 cDNA 定位于第 19 号染色体上的 q3.1 处.

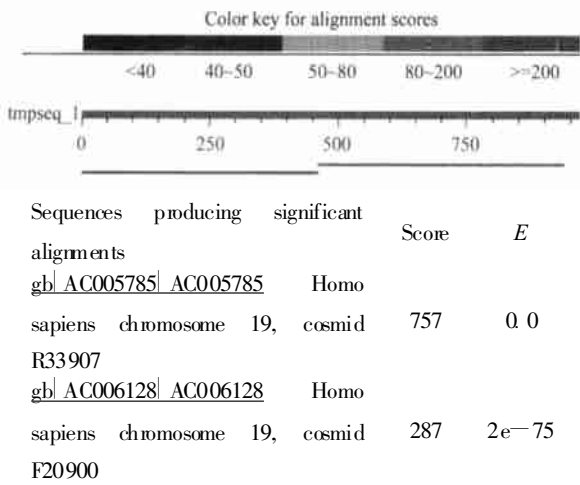


图 1 cDNA 的染色体定位图

3 讨论

用文库筛选的方法得到了一个新的 cDNA 克隆, 测序结果共有 987 个核苷酸, Genbank Search 及 EST BLAST 表明是一种新的 cDNA 序列, 人类基因组计划 (HGP 计划) 标明该基因定位于人第 19 号染色体的 q13.1 处, 并同 AKAP95 有最大序列相似性, 据此初步判断该基因可能为一个新的 AKAP 家族基因. 由此可见, HGP 计划和生物信息学为新基因的确定和功能等预测提供了强有力的工具.

AKAP 是在由 cAMP 介导的 PKA 信号传导系统中的重要组成部分. 它与 PKA 相结合, 具有一个普遍存在的 PKA 调节亚基 RII. 与其它 AKAP 蛋白序列的比较可知, 我们发现的新 AKAP 在 N 端也具有 RII 的调节亚基序列, 从而提供了它可能是 AKAP 家族的一分子的证据. 而且, 在保持亚基结构稳定性方面具有重要作用的疏水性的保守氨基酸残基在新 AKAP 中也是高度保守的.

至于该 cDNA 的确凿功能, 还需要实验进一步提供证据.

参考文献:

[1] RUBIN C S. A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP[J] . Biochim Biophys Acta, 1994, 1224: 407— 479.

[2] SCOTT J D, McCARINEY S. Localization of A— kinase through anchoring proteins[J] . Mol Endocrinol, 1994, 8: 5— 11.

[3] PAWSON T, SCOTT J D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins[J] . Science, 1997, 278: 2075— 2080.

[4] LEISER M, RUBIN C S, ERLICHMAN J. Differential binding of the regulatory subunits (RII) of cAMP-dependent protein kinase II from bovine brain and muscle to R II-binding proteins[J] . J Biol Chem, 1986, 261: 1904— 1908.

[5] LIN R Y, MOSS S B, RUBIN C S. Characterization of S— AKAP84, a novel developmentally regulated a kinase anchor protein of male germ cells[J] . J Biol Chem, 1995, 270: 27804— 27811.

[6] COGHLAN V, PERRINO B A, HOWARD M L K, et al. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein[J] . Science, 1995, 267: 108— 111.

Sequence Analysis and Characterization of a Novel cDNA Clone

ZHAO Gui-jun¹, HUANG Yu-shan¹, XIANG Meng-qing², Zhong Xiao-fen¹, XU An-long¹

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Pediatrics, Center for Advanced Medicine,

The State University of New Jersey at Rutgers, New Jersey. USA)

Abstract: A novel cDNA was discovered through the screening of a human fetal heart library. Genbank searching and blasting suggested that the cDNA sequence probably encodes a novel protein belonging to A—Kinase Anchoring Protein (AKAP) family and its predicted protein sequence shows 71% similarity with AKAP95. RII—binding site in its 3' terminal was also found by Blasting with Genbank database. The sequence was found to be included in Cosmid R33907 and F20900 originated from Q13.1 locus in Chromosome 19, suggesting that this gene locate in Q13.1 on Chromosome 19 and interestingly neighbors with AKAP95.

Keywords: novel cDNA; PKA; AKAP; BLAST

(上接第 74 页)

参考文献:

- [1] 梁国栋. 白细胞介素-12 的研究进展[J]. 病毒学报, 1997, 13(3): 291—295.
- [2] HEESSEN C, SIEVERDING F, SCHOSER B G, et al. Interleukin-12 is detectable in sera of patients with multiple sclerosis: association with chronic progressive disease course? [J]. Eur J Neural, 1999, 6(5): 519—596.
- [3] SAM H, STEVENSON M M. Early IL-12 p70, but not p40, production by splenic macrophages correlates with host resistance to blood-stage plasmodium chabaudi AS malaria[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 117(2): 343—349.

- [4] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning[M]. A laboratory manual, 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory.
- [5] MCGREW J T, LEISKE D, DELL B, et al. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: Use of a rapid method to detect high-level expressing transformants[J]. Gene, 1997, 187: 193—200.
- [6] CREGG J M, HIGGINS D R. Production of foreign protein in yeast *Pichia pastoris*[J]. Canadian J, 1995, 73(Batary Supp): 5981—5987.
- [7] 邱荣德, 李士云, 陈俊刚, 等. 重组人血清白蛋白在 *Pichia pastoris* 中的表达与纯化[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 33(1): 59—62

Expression of Human IL—12 P40 Subunit in *Pichia pastoris*

CHEN Xin-hua¹, YANG Lin¹, CHEN Qu-hou², WANG Xun-zhang¹, LONG Qing-xin¹

(1. State Key Lab for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Institute of Entomology, Central-China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: A 940 bp coding fragment of human IL-12 p40 gene was amplified via PCR technique and then cloned into *Pichia pastoris* expression vector pPICZαC. After transforming the linearized recombinant expression vector into the yeast strain X-33, we obtained the engineered yeast strain *Pichia pastoris* X-33/p40. The p40 gene was secretly expressed after induction with 0.5% methanol. Both the result of SDS-PAGE and Western-blotting proved a 44 000 protein band in the supernatant of medium. Gel scanning revealed the expression product accounted for 47% of the total supernatant protein.

Keywords: hIL-12 P40 subunit; *Pichia pastoris*; expression