

文章编号: 0529-6579 (2000) 03-0135-02

中国人磷酸核糖焦磷酸合成酶-1 假基因的克隆与测序^{*}

薛爱群, 张 宏, 王晓卿, 方向平, 周 勤

(中山大学生物工程研究中心, 广东 广州 510275)

关键词: PRS1; 假基因; DNA 测序与分析

中图分类号: R3 394 文献标识码: A

自从第一个假基因被鉴定以后^[1], 有关假基因的性质与发生正在被阐明. 假基因基本上分为两类: 非加工的假基因和被加工的假基因. 被加工的假基因通常与活跃基因序列比较同源性高达 90%~99%, 不含内含子, 具有 poly (A) 尾巴, 可以转录, 但由于在它们内部有许多终止子、插入或缺失造成的移码突变, 大多数不能进行 RNA 编辑和翻译^[2].

磷酸核糖焦磷酸合成酶 (Phosphoribosylpyrophosphate Synthetase PRS) 是嘌呤核苷酸合成代谢途径中的关键酶. 在人中已发现了 PRS 的 3 个同功异构体 (PRS1, PRS2, PRS3)^[3]. Roessler 等人^[4]发现, 当 PRS1 的活性发生异常时, 将导致原发性痛风. 在进行中国人 PRS 基因克隆的课题中, 我们首次克隆到中国人 PRS1 基因被加工的假基因, 并进行了 DNA 测序.

1 材料与方法

1.1 血液样品 在中山医科大学和本校校医院的协助下, 从前来就医的痛风病人中选择 2 个原发性痛风家族, 作为痛风患者取血对象, 正常人的血液样品由本单位志愿者提供.

1.2 人血淋巴细胞 mRNA 的制备和 RT-PCR 采取新鲜血液, 用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, 然后按常规方法纯化 mRNA 和逆转录 (RT). PCR 反应: 变性: 95 °C 1 min; 退火: 57 °C 1 min; 延伸: 72 °C 1.5 min; 循环数: 30; 补平, 72 °C 5 min.

1.3 DNA 序列测定和分析 RT-PCR 反应产物直接克隆至 pGEM-T 载体, 获得 pGEM-TPRS1, 经酶切电泳分析后, 进行序列测定和分析 (ABI PRISM™ 377DNA Sequencer).

2 结果与讨论

2.1 PRS1 被加工的假基因 cDNA 的克隆

根据 Roessler 等^[4]发表的人 PRS1 的 cDNA 序列及不同人种 PRS1 cDNA 的保守序列特征, 设计了 PRS1 特异性引物: 正向引物序列为 5'-GTA GTT GGC CAG GAT GCC GAA TAT C-3'; 反向引物序列为 5'-GCC GGG TCT TCT GCT GAA TTT GTC ATC-3'. 本实验用 Oligo (dt) 作引物进行逆转录 (RT), 所获 cDNA 用 PRS1 特异引物作 PCR 扩增, 得到一条约 1000 碱基对左右的条带. 采用限制性内切酶鉴定, 中国正常人和痛风病人的此基因扩增

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770354)

收稿日期: 2000-04-01; 作者简介: 薛爱群 (1957~), 女, 副教授.

片段结果完全一致.

为了验证此假基因的获得不是引物设计错误或其它物质污染的结果, 通过对不同人种的 PRS1 基因的比较, 在其高度保守区域又设计了另一对引物, 该正向引物一直延伸到 PRS1 的启动子区域. 在作 RT-PCR 前, 对总 RNA 进行了 DNase 消化. 测序结果仍与前一致, 说明从中国人中获得的确为该序列, 而不是其它原因造成的.

2.2 PRS1 被加工的假基因的测序和序列分析

DNA 测序表明, 我们首次利用 RT-PCR 扩增得到了正常中国人和痛风患者的类似 PRS1 片段, 长度为 985 bp, 与国外发表序列的同源性为 89.7%. 但有多处发生点突变, 在 366 bp 和 648 bp 处分别缺失 5 bp 和 8 bp, 这些缺失又造成相应的移码突变, 致使在第 123, 420, 423, 486, 516, 531, 630, 741, 801, 804, 834, 855, 870 碱基处出现 13 个 stop codon.

由于 PCR 是以 cDNA 为模板, 说明此类似 PRS1 片段可以转录, 从其 cDNA 序列可知其至少具有全长的 mRNA 序列, 这些都符合被加工的假基因的特征, 因此, 我们认为此片段属于 PRS1 被加工的假基因.

参考文献:

- [1] JACQ C, MILLER J R, BROWNLEE G G. A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis* [J]. Cell, 1977, 12: 109 ~ 120.
- [2] CARLTON M B L, COLLEDGE W H, EVANS M H. Generation of a pseudogene during retroviral infection [J]. Mamm Genome, 1995(6): 90 ~ 95.
- [3] BECKER M A, HEIDLER S A, BELL G L, et al. Cloning of cDNAs as for human PRS 1 and 2 and X chromosome localization of PRS1 and PRS2 genes [J]. Genomics, 1990(8): 555 ~ 561.
- [4] ROESSLER B J, NOSAL J M, SMITH P R, et al. Human X-linked phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity is associated with distinct point mutations in PRS1 gene [J]. J Biol Chem, 1993, 268(35): 26476 ~ 26481.

Cloning and Sequencing of Phosphoribosylpyrophosphate Synthetase-1 Processed Pseudogene in Chinese

XUE Ai-qun^{*}, ZHANG Hong, WANG Xiao-qing, FANG Xiang-ping, ZHOU Qin

Abstract: A processed pseudogene cDNA of PRS1 was first cloned from lymphoblast cells of normal persons and primary gout patients among Chinese. The full length of the pseudogene cDNA was 985 bp, which possessed approx. 89.7% homology with the published sequence. Except many point mutations, two frame-shift deletion of 5 bp and 8 bp were also found at the location 366 bp and 648 bp of the pseudogene cDNA, respectively. All led to 13 stop codons, so that fragment can't translate. According to these characteristics, the fragment was thought as a processed pseudogene of PRS1.

Keywords: PRS1; pseudogene; DNA sequence and analysis

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China