浙 江 农 林 大 学 学 报，2013，**30**(3)：401 – 405
Journal of Zhejiang A & F University

日本蟾蜍皮肤胸腺素 α 原 cDNA 的克隆及序列分析

宋敏国，袁进强，杨仙玉，张姝芳，诸葛慧，徐　跃

（浙江农林大学 农业与食品科学学院，浙江 临安 311300）

摘要：为研究蟾酥、蟾衣、蟾皮中多肽类有效成分，通过菌落聚合酶链式反应(polymerase chain reaction，PCR)对日本蟾蜍 *Bufo japonicus formosus* 皮肤 cDNA 质粒文库进行了筛选，获得胸腺素 α 原(prothymosin-α，ProTα)全长 cDNA 序列，并对它们进行了生物信息学分析。日本蟾蜍 *ProTα* cDNA 全长为 1 480 bp，包括 339 bp 的完整开放阅读框(open reading frame，ORF)，5′端 125 bp 及 3′端 1 016 bp 的非翻译区(untranslated region，UTR)。根据 cDNA 序列推导的日本蟾蜍 ProTα 由 112 个氨基酸残基组成，无信号肽结构。氨基酸序列同源性分析显示，日本蟾蜍 ProTα 与食用蛙 *Rana esculenta* 同源性为 82%，与其他 11 种动物的同源性则介于 54%~73%。ProTα 具有显著的抗肿瘤作用。分析日本蟾蜍 *ProTα* cDNA 序列，可为研究其生物学功能和药物研发提供实验依据。图 4 参 17

关键词：动物学；日本蟾蜍；ProTα；基因克隆；序列分析

中图分类号：S865.9；Q959.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**2095-0756(2013)03-0401-05

Cloning and sequence analysis of prothymosin-α cDNA of *Bufo japonicus formosus*

SONG Minguo，YUAN Jinqiang，YANG Xianyu，ZHANG Shufang，ZHUGE Hui，XU Yue

(School of Agricutural and Food Science，Zhejiang A & F University，Lin'an 311300，Zhejiang，China)

Abstract：To study the polypeptide effective components included in the skin of *Bufo japonicus formosus* (Japanese toad) and their secretions，the full length cDNAs were screened from the plasmid cDNA library of adult Japanese toad skin using colony polymerase chain reaction with a pair of primers，SP6 (the upstream primer of the vector) and poly(T) (a self-designed primer recognizing the area connecting polyA tail of cDNA and the vector). Results showed that a prothymosin-α (ProTα) cDNA was obtained from 1 344 colonies checked，whose transcript was 1 480 bp in length consisting of 125 bp in the 5 prime untranslated region (5′ UTR) and 1 016 bp 3′ UTR with a complete open reading frame (ORF) of 339 bp encoding a polypeptide of 112 amino acid residues. The homologous analysis indicated a similarity between *B. japonicus formosus* and *Rana esculenta* of up to 82%，but for other species it was 54%–73%. Previous studies have shown significant anti-tumor effects of ProTα; therefore，this study could contribute to further studies on ProTα. [Ch，4 fig. 17 ref.]

Key words：zoology；*Bufo japonicus formosus*；ProTα；gene cloning；sequence analysis

胸腺素 α 原(prothymosin α，ProTα)是一种在哺乳动物细胞中广泛分布、结构保守的酸性小分子蛋白，是胸腺素 α1(thymosin α1，Tα1)的前体蛋白[1]。胸腺素 α 原在抗肿瘤方面具有显著的作用，如可降低鼠的膀胱癌发生率[2]，抑制 HeLa 细胞凋亡，诱导巨噬细胞产生干扰素和白介素等[3]。鉴于蟾酥、蟾衣、蟾皮等中药材广泛应用于临床抗肿瘤治疗[4-5]，本研究开展以日本蟾蜍 *Bufo japonicus formosus* 皮肤 cDNA 质粒文库为模板，通过菌落聚合酶链式反应(colony polymerase chain reaction，colony PCR)筛选具

收稿日期：2012-06-13；修回日期：2012-08-04

基金项目：国家自然科学基金资助项目(31071181)；浙江省科技创新活动计划(新苗人才计划)项目(2011R412042，2010R412003)

作者简介：宋敏国，从事动物学研究。E-mail：smguo@qq.com。通信作者：杨仙玉，教授，博士，从事纤毛原生动物发育学和中药多肽类有效成分基因克隆研究。E-mail：xianyu-yang@hotmanil.com。

有完整开放阅读框(open reading frame，ORF)的全长 cDNA 的工作。本研究筛选到日本蟾蜍 *ProTα* 全长 cDNA 序列，并运用多种软件对其编码的蛋白质进行了生物信息学分析，构建系统进化树，为进一步研究日本蟾蜍 ProTα 蛋白的功能及其药物研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

日本蟾蜍皮肤 cDNA 质粒文库通过材料转让协议，由日本产业技术总合研究所(AIST，Tsu-kuba，Japan)授权浙江农林大学使用(作者杨仙玉在日本 AIST 博士后工作期间制备)。该文库使用的载体为 pSD64TR，上游和下游克隆位点分别为 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ，载体上游和下游引物为 SP6(5′-ATTTAGGTGACACTATA-GAA-3′)和 S.D.A.(5′-TTATGTAGCTTAGAGACTC-3′)，cDNA 的长度介于 500~2 000 bp。

大肠埃希菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5α，PCR 反应试剂盒，2×PCR 混合试剂(master mix)等购自天根生化科技有限公司，DNA 梯状核酸片段(ladder)和质粒小量抽提试剂盒购自碧云天生物技术研究所。引物合成与 DNA 测序委托上海生工生物技术有限公司或上海桑尼生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *日本蟾蜍皮肤 cDNA 质粒文库转化* 将 cDNA 质粒文库 0.2 μL 电击转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞中(40.0 μL)，然后迅速加入 37 ℃预热的 160.0 μL LB 培养液，37 ℃恒温振荡复苏 45 min，取 2.0 μL 转化液均匀涂布于 LB 平板(含 Amp^+100 mg·L^{-1})，并在 37 ℃恒温培养 12~15 h。

1.2.2 *全长 cDNA 筛选* 从平板上随机挑取单菌落接种于 10.0 μL 的 LB 液体培养基中，以此菌液为模板实施菌落聚合酶链式反应。使用的引物是载体上游引物 SP6 和自行设计的含 ploy(T)的 cDNA 下游引物(5′-AGATCTCTCGAGTTTTTTTTTTTT-3′)。反应体系如下：菌液 0.5 μL，2×PCR master mix 5.0 μL，SP6 和 ploy(T)引物(2 μmol·L^{-1})各 1.0 μL，补加灭菌超纯水至 10.0 μL。为了防止聚合酶链式反应期间的水分蒸发，在反应体系中补加矿物油 10.0 μL。反应条件为：94 ℃/5 min，(94 ℃/30 s，50 ℃/30 s，72 ℃/120 s)×30 循环，72 ℃/8 min，4 ℃/∞。聚合酶链式反应结束后，取 5.0 μL PCR 产物经 10.0 g·kg^{-1} 琼脂糖凝胶电泳分析，将扩增出介于 500~2 000 bp 聚合酶链式反应产物的菌落初步确定为阳性。

1.2.3 *质粒回收和 DNA 测序* 将通过菌落聚合酶链式反应初步确定为阳性克隆的菌液 0.2 μL 接种于 3.5 mL LB 培养液中(含 Amp^+ 100 mg·L^{-1})，在 37 ℃恒温振荡培养 12~15 h，然后使用试剂盒进行质粒回收并对其进行 DNA 限制性内切酶(*Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ)消化(双酶切)，进一步确定阳性克隆及质粒浓度。首先委托公司将阳性克隆质粒使用载体上游引物(SP6)对 cDNA 进行正向测序。测序结果利用 DNAstar/EditSeq 查找 cDNA 的完整开放阅读框，推导氨基酸序列，对具有合理完整开放阅读框的克隆继续委托公司使用载体下游引物(S.D.A.)进行反向测序。

1.2.4 *序列分析* 利用 DNAstar/EditSeq 寻找完整开放阅读框，推导其编码蛋白的氨基酸序列并分析其理化性质，运用 NCBI 的 Blast 功能在 GenBank 中查找并下载其他物种同源蛋白的氨基酸序列，运用 MegAlign 7.1 软件进行同源性比较，并构建系统进化树。

2 结果

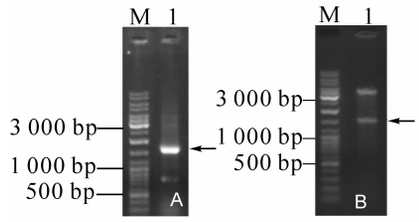
2.1 cDNA 的筛选

将日本蟾蜍皮肤 cDNA 质粒文库转化 *E. coli* 感受态细胞 DH5α 获得的菌落，以 SP6 和 ploy(T)为引物，实施菌落聚合酶链式反应。10 g·kg^{-1} 琼脂糖凝胶电泳分析显示，在 1 500 bp 左右出现一特异性聚合酶链式反应条带(图 1A，箭头所示)，在 500 bp 左右出现一非特异性聚合酶链式反应条带。将此菌液进行扩大培养和质粒回收，并对质粒进行 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切和 10 g·kg^{-1} 琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示该质粒含有 1 500 bp 左右的 cDNA(图 1B，箭头所示)，与菌落聚合酶链式反应的结果吻合。将此质粒委托 DNA 测序公司进行了正、反双向测序。

2.2 序列分析

2.2.1 *测序结果分析及其编码蛋白的理化性质* 使用 DNAstar/EditSeq 对测序结果进行分析，表明该 cDNA 全长 1 480 bp，ORF 为 339 bp，5′ 端 125 bp 及 3′ 端 1 016 bp 的非翻译区。完整开放阅读框中三

磷酸腺嘌呤脱氧核糖核苷和三磷酸胸腺嘧啶脱氧核糖核苷(A+T)的质分数为 53.10%，三磷酸鸟嘌呤脱氧核糖核苷和三磷酸胞嘧啶脱氧核糖核苷(G+C)的质量分数为 46.90%，共编码 112 个氨基酸(图 2)，其中酸性氨基酸(D+E)55 个，大部分成簇集中于序列中部，碱性氨基酸(R+K)13 个，极性氨基酸(N，C，Q， S，T，Y)16 个，疏水性氨基酸 18 个，缺乏芳香族氨基酸和含硫氨基酸。其等电点(PI)理论值为 3.554，蛋白质分子质量为 12.345 kD，是一种高度酸性的亲水性多肽。同源性比较发现，该 cDNA 编码的蛋白与其他物种的 ProTα 具有较高的同源性，故命名为日本蟾蜍 ProTα。



M. DNA ladder; A: 1. 菌落聚合酶链式反应产物; B: 1. 双酶切产物; 箭头: 蟾蜍皮肤*ProT*α 全长cDNA

图 1　pSD64TR-ProTα 菌落聚合酶链式反应产物(A)和重组质粒 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切(B)产物的琼脂糖凝胶电泳

Figure 1　Agarose gel electrophoresis of colony PCR product (A) and enzyme digestion product of recombinant plasmid of pSD64TR-ProTα

```
AAAAAAGCCATCTTTGCATTGTTCCCGCACCAGCCTGCCCGCTCCTCCGCGTCCCCGGATCTACCTGCACGTTTCTTTTT  80
TATTTTCCCCATCTCTAGGCTAGGTTCTCTCTTCTTCCATTCACCATGTCAGACACCGCAGTGGACGCCAGTGTGGAGAA  160
                                               M  S  D  T  A  V  D  A  S  V  E  K
GACCACCAAGGACCTGGTGAAGGCAAAAGAAAAGGAAGTTGTTGAAGAAACAGAAAATGGGAAGGAGAAGCCCGCCAATG  240
 T  T  K  D  L  V  K  A  K  E  K  E  V  V  E  E  T  E  N  G  K  E  K  P  A  N
GAAATGCAGAGAATGAAGAGAACGGAGATGATGCAGGAGACAATGATGAAGAGGAAGAGGTTGATGAGGAAGATGAGGAG  320
G  N  A  E  N  E  E  N  G  D  D  A  G  D  N  D  E  E  E  V  D  E  E  D  E  E
GATGAAGTAGAAGGAGATGATGATGAGGGTGATGAAGATGAAGAAGCAGATGGCGCCACTGGGAAAAGAGCAGCAGAAGA  400
 D  E  V  E  G  D  D  D  E  G  D  E  D  E  E  A  D  G  A  T  G  K  R  A  A  E  D
CGACGATGACGACGATGAAGATGACGTTGAAACAAAGAAGCAGAAAAAGGATGAAGATGACTAGAGGGGCCATTCCCTGT  480
 D  D  D  D  D  E  D  D  V  E  T  K  K  Q  K  K  D  E  D  D  .
CTCAAAATAAATTCTATATATAATCCTTCTCCACAGCCTCCCCACCCTTTTCACGCTCAGAACATGGTCACCGAAAGTGA  560
TGCATCCGTCCCCCCTCcCCCCCTCACACAGGCTCCCATGACCCTTTTCTCCGTCCTCGCACGTTACTGCGTCTGAGGCG  640
CAAGTTGATGTGCCCTTGGTGCATTCTTTTTAAGCAGCCCCTGGTCCTCTTTAAGTTGAGTGGGCCAACCCTTTCACTGC  720
CAGTTTGGGTTGCATTTACTTGCTGTCCTCCCCAGTCGTGAGAGGGGAAAAAAGGGGCGAGATTCATAACGGCAAAAAAA  800
AAGTTTAGCTTTTCCTTTTTAAATTTCTGAATGGGATACGAAGAAACACCTTTGGATGGGGTTCCTATGTTTGTATTTTT  880
TATTTACATTTTATATTTTTGTACATATTGGTATACAGCTGTCCTTTTTcTGTACCGGGAATcCGGCTGACAGGGTGTGG  960
GGCTTTTAAATTACaCATTTTACGTTATTTTATTTTAAAAAATTGCaCCTGTAGATTTcTGCCAATGAAACCCTGATGTA  1040
TTTTGTTCAGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTcTTCTGGGCGGGGTGGCGGGCAGGGTGGAGTAAGACCAGGGCTGTT  1120
TcGTCTCCAAGGGGAGCAAATGGAGAAATCTTTACAAAAAAAAGAAAAAAGTTGTTACAAAAAAACCTAAATAAATAAGA  1200
CAAAATTCCCATATAAGAAAAAATATTcTGATCATTCCAGTAACTTTTTACTTTTTTTTTTGAGCATATTTTTAGCTGTA  1280
CTTTAGATGGGTTTGGATGAGTTAAATGGCCAAAGATATAATTTTTTTTTTTGTTTTGTCTGAAGTTGCTGTTTACTTTG  1360
TCATTTCTTGGCCTGGCTGGATGTGTGCGGCAGTATTGTCAATAAAACTGCAATTTTAATTTGCAGGCTTTCTTTTTTGT  1440
TCTAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                          1480
```

▭：起始密码子和终止密码子；___：poly(A)添加信号；阴影：poly(A)尾

图 2　日本蟾蜍 *ProTα* 全长 cDNA 序列及其 ORF 编码的氨基酸推导序列

Figure 2　Full length cDNA of *ProTα* and its deduced amino acid sequence of *Bufo japonicus formosus*

2.2.2　氨基酸序列同源性分析和系统进化树构建　将日本蟾蜍 ProTα 氨基酸序列和美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站上的其他物种的 ProTα 氨基酸序列进行同源性比较。结果显示，与食用蛙 *Rana esculenta* 同源性高达 82%，与牛 *Bos taurus*，狨猴 *Callithrix jacchus*，智人 *Homo sapiens*，恒河猕猴 *Macaca mulatta*，小鼠 *Mus musculus*，穴兔 *Oryctolagus cuniculus*，黑猩猩 *Pan troglodytes*，食蟹猴 *Macaca fascicularis*，褐家鼠 *Rattus norvegicus*，大西洋鲑 *Salmo salar*，非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 等 11 种动物的同源性为 54%~73%(图 3)。通过 MegAlign 7.1 软件邻接法进行不同物种的氨基酸序列比对以及构建系统进化树。9 种哺乳类动物分属 1 支，日本蟾蜍和食用蛙等两栖类分属 1 支，大西洋鲑分属 1 支(图 4)。整个进化树表明：ProTα 的进化史遵循传统动物进化规律。

3　讨论

本实验成功克隆到日本蟾蜍 *ProTα* 的全长 cDNA(图 1~2)，编码 112 个氨基酸残基组成的蛋白，其中酸性氨基酸(D+E)55 个，其等电点(PI)理论值为 3.554，甚至在中性 pH 的溶液中也带有大量负电荷，被认为是真核生物中酸性最强的肽类之一[1]。由于大量酸性氨基酸主要集中在其序列中部，使得 Pro-

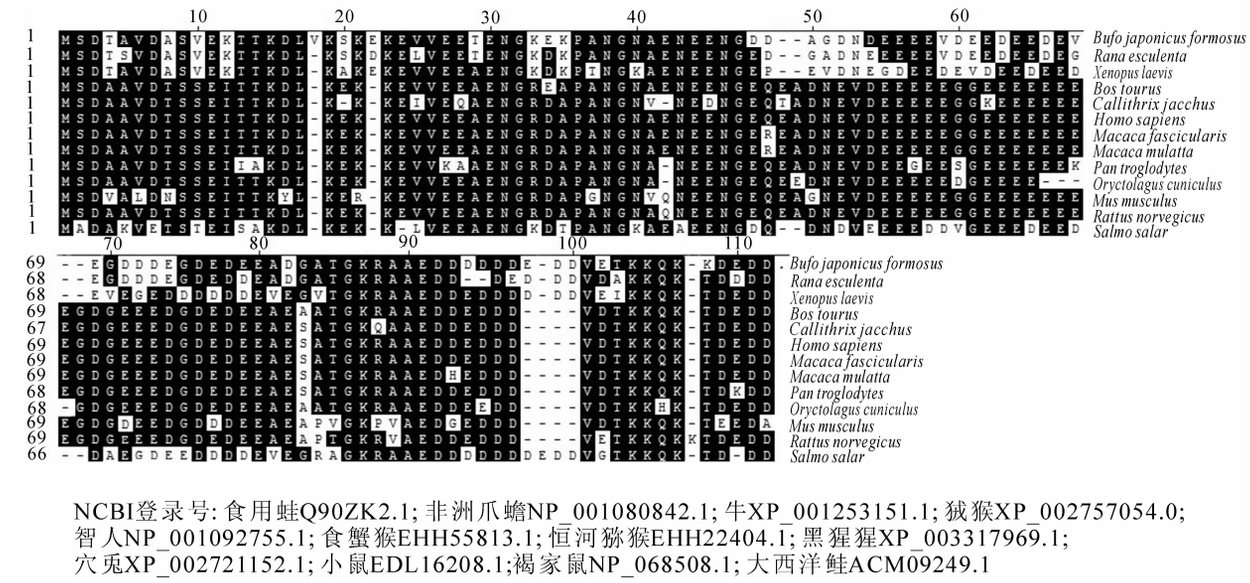


图 3 不同物种间 ProTα 氨基酸序列比对

Figure 3 Multiple alignment of ProTα amino acid sequences among different species

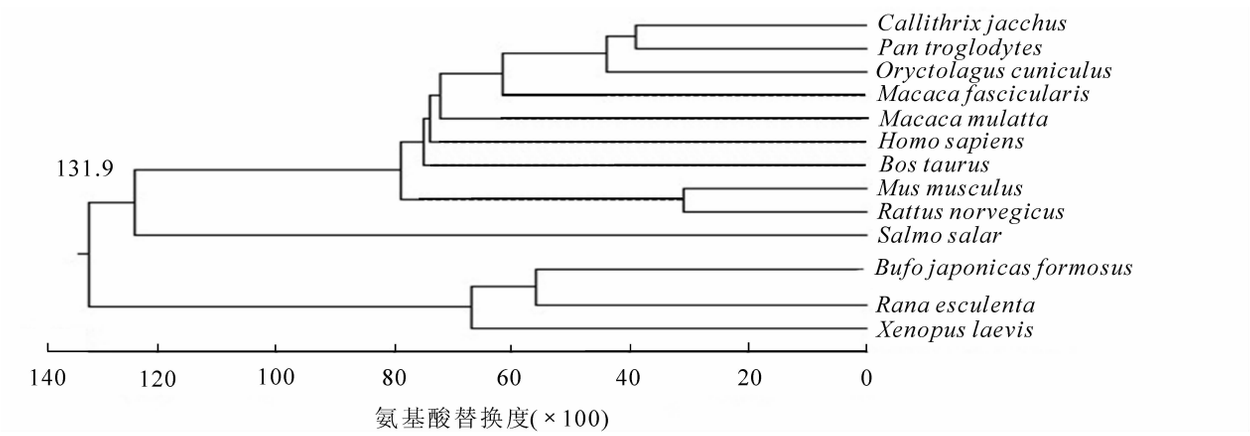


图 4 日本蟾蜍与其他物种 ProTα 的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of ProTα among different species

Tα不能形成高级结构，在生理条件下蛋白呈现无规则卷曲构象，即所谓的“天然无结构蛋白”[6-7]。中部序列能和组蛋白 H1 特异性相互作用，是促进细胞增殖的主要功能域[8-9]。ProTα 缺乏含硫氨基酸和芳香族氨基酸，不能在波长 280 nm 处形成吸收峰[1]；缺乏疏水性氨基酸，不可能形成信号肽结构，也就不能以限定途径分泌到胞外[1]。现已明确 ProTα 在细胞外具有抗肿瘤功能及其他免疫刺激功能，但它如何分泌到胞外，至今尚不明确，有待进一步深入研究。

ProTα 有 2 个方面功能：一是胞内促进细胞增殖。ProTα 在肝癌、乳癌、结肠癌和胃癌细胞中高表达，表明 ProTα 与肿瘤细胞的增殖密切相关[10-13]。这可能是由于在细胞周期中，ProTα 的高表达缩短了 G1 期[14]。二是胞外具有免疫刺激活性。ProTα 在细胞外，通过潜在的膜受体调节免疫应答，促进 IFN-y，TNF-α，IL-2 等细胞因子的产生，进而增强细胞和体液免疫应答，从而产生抗肿瘤作用[1]。另外 ProTα 作为免疫佐剂，在小鼠体内能够维持较高的抗体滴度，延长免疫保护的时间[15]。最近有报道，CD8+ T 细胞中的 ProTα 能够强烈抑制 HIV-1[16]。

ProTα 已作为一种新型的抗瘤药物进入到临床前期的研究阶段[17]。因此，构建合适的含 ProTα 全长开放阅读框(ORF)的表达载体，大量生产 ProTα 蛋白，对今后 ProTα 生物学功能的进一步研究具有参考意义。

参考文献：

[1] 杨晓征，吴军，熊凌霜. 胸腺素 α 原的研究进展[J]. 生物技术通讯，2006，**17**（3）：443 – 446.

YANG Xiaozheng, WU Jun, XIONG Lingshuang. Advances in research on prothymosin alpha [J]. *Lett Biotech*, 2006, **17** (3): 443 – 446.

[2] GOYA R G, BOLOGNANI F. Homeostasis, thymic hormones and aging [J]. *Gerontology*, 1999, **45** (2): 174 – 178.

[3] MOODY T, FAGARASAN M, ZIA F, *et al*. Thymosin alpha 1 down regulates the growth of human non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Cancer Res*, 1993, **53** (21): 5214 – 5218.

[4] 张飞春，孙文革，高晓玲，等. 蟾酥乙醇提取物抗肿瘤剂量效应关系实验研究[J]. 中国药业，2011，**20** (16): 23 – 24.

ZHANG Feichun, SUN Wenge, GAO Xiaoling, *et al*. Experimental studies of the relationship between dose-dependency of ethanol extract of toad venom and antitumor effects [J]. *J Chin Pharm*, 2011, **20** (16): 23 – 24.

[5] 缪珠雷，张康，杨鸣泽，等. 蟾蜕抗肿瘤及增强免疫效应研究[J]. 中国中药杂志，2010，**25** (2): 211 – 214.

MIAO Zhulei, ZHANG Kang, YANG Mingze, *et al*. Studies on anti-tumor and enhancing immunity activity of toad coat [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2010, **25** (2): 211 – 214.

[6] 刘俊珊，张冬梅，栗原博，等. 蟾酥及其活性成分抗肿瘤作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志，2009，**36** (2): 115 – 120.

LIU Junshan, ZHANG Dongmei, KURIHARA Hiroshi, *et al*. Antitumor effects of venenum bufonis and its active components [J]. *J Int Pharm Res*, 2009, **36** (2): 115 – 120.

[7] GAST K, DAMASCHUN H, ECKERT K, *et al*. Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation [J]. *Biochem*, 1995, **34** (40): 13211 – 13218.

[8] COVELO G, SARANDESES C S, DíAZ-JULLIEN C, *et al*. Prothymosin alpha interacts with free core histones in the nucleus of dividing cells [J]. *J Biochem*, 2006, **140** (5): 627 – 637.

[9] WILSON C L, MONTEITH W B, DANELL A S, *et al*. Purification and characterization of the central segment of prothymosin alpha: methodology for handling highly acidic peptides [J]. *Pept Sci*, 2006, **12** (11): 721 – 725.

[10] WU C G, HABIB N A, MITRY R R, *et al*. Overexpression of hepatic prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1997, **76** (9): 1199 – 1204.

[11] MAGDALENA C, DOMINGUEZ F, LOIDI L, *et al*. Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2000, **82** (3): 584 – 590.

[12] SHIWA M, NISHIMURA Y, WAKATABE R, *et al*. Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **309** (1): 18 – 25.

[13] 王梅，潘吉勇，安利佳. 胸腺素 α 原反义寡核苷酸对胃癌细胞生长的影响[J]. 现代生物医学进展，2009，**9** (11): 2051 – 2054.

WANG Mei, PAN Jiyong, AN Lijia. Effect of prothymosin alpaha antisense oligodeoxynucleotide on human gastric cancer in vitro [J]. *Prog Mod Biomed*, 2009, **9** (11): 2051 – 2054.

[14] WU Chaoliang, SHIAU Aili, LIN Cheinsheng. Prothymosin α promotes cell proliferation in NIH3T3 cells [J]. *Life Sci*, 1997, **61** (21): 2091 – 2101.

[15] 靳彦文，陈婷，李平，等. 胸腺素 α 原作为乙型肝炎表面抗原佐剂的研究[J]. 生物技术通讯，2008，**19** (4): 497 – 499.

JIN Yanwen, CHEN Ting, LI Ping, *et al*. Study of prothymosin alpha as adjuvant to HbsAg [J]. *Lett Biotechnol*, 2008, **19** (4): 497 – 499.

[16] MOSOIAN A, TEIXEIRA A, BURNS C S, *et al*. Prothymosin-α inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4 mediated type I interferon induction [J]. *PNAS*, 2010, **107** (22): 10178 – 10183.

[17] ECKERT K, GRUNBERG E, GARBIN F, *et al*. Preclinical studies with prothymosin alpha 1 on mononuclear cells from tumor patients [J]. *J Immunopharmacol*, 1997, **19** (9–10): 493 – 500.