

# 人 *Oligophrenin 1* 样 (*OPHN1L*) 基因的克隆\*

夏家辉 汤熙翔 唐冬生 崔峰 禹宽平  
潘乾 戴和平 廖晓东 龙志高

(湖南医科大学医学遗传学国家重点实验室,长沙 410078)

**摘要** 将人 *Oligophrenin 1* (*OPHN1*) 基因编码区 2406 bp 与 EST 数据库进行同源性分析,得到一个 363 bp 的 EST AA035622 与 *OPHN1* 基因编码区一致性为 62%,该 EST 与一个 cDNA 序列 AB014521 完全匹配. 在 AB014521 中设计引物与 cDNA 文库载体臂上引物行巢式 PCR 扩增并进行 5'RACE,在胎盘 cDNA 文库中获得 cDNA 序列 606 bp,与 AB014521 拼接成一个 6906 bp 的 cDNA 序列,其中包含一个 2442 bp 的开放阅读框,编码 813 个氨基酸. 该 cDNA 序列的 GenBank 登录号为 AF141884,并经 GDB 命名委员会命名为 *OPHN1L* 基因. *OPHN1L* 基因 3'端与大规模测序的 BAC 克隆 AC005348 及 AC004782 完全匹配,从而将该基因定位于 5q21.2 ~ q21.3,并由此获得它的部分基因组结构.

**关键词** *OPHN1* *OPHN1L* 基因克隆 同源性分析

Rho GTPase 属 Ras 超基因家族蛋白,其功能为细胞骨架及其因转录的调控因子,参预细胞运动、生长、发育、跨膜信号传导等<sup>[1,2]</sup>. 1998年,Billuart<sup>[3]</sup>等克隆了人 *Oligophrenin 1* (*OPHN1*) 基因,该基因编码的蛋白含 Rho-GTPase-activating protien (rhoGAP) 功能域,并在一个 X 连锁的非综合征型智力障碍家系中发现 *OPHN1* 基因的 rhoGAP 功能域缺失一个 T(1578delT),该突变与疾病共分离. 通过同源性分析结合 cDNA 文库巢式 PCR 扩增和 5'RACE,我们克隆了与人 *Oligophrenin 1* 基因高度同源的人 *Oligophrenin 1* 样 (*OPHN1L*) 基因,并将该基因定位在 5q21.2 ~ q21.3.

## 1 结果与讨论

### 1.1 EST 数据库的分析

利用 Genetics Computer Group 软件包将人 *Oligophrenin1* 基因编码区 2406 bp 对 EST 数据库进行 Blast 分析,得到一个 363 bp 的 EST AA035622,该 EST 来源于胎心,与人 *Oligophrenin 1* 基因编码区一致性为 62%. 将 AA035622 对 Genemle 数据库进行 Blast 分析,发现其与一个来源于成人脑的 cDNA 序列 AB014521 完全匹配. AB014521 长 6300 bp,含一个未完的 2262 bp 的开

1999-11-01 收稿,2000-02-28 收修改稿

\* 国家“八六三”重大项目(Z19-02-02-02),“九七三”重大项目(G1998051002)资助

放阅读框,并可见终止密码 TAA<sup>[4]</sup>. 将 AB014521 与 *Oligophrenin 1* 基因编码区进行 Fasta 分析,发现编码区核苷酸 945 bp 中 63.1% 一致,蛋白质 649 个氨基酸中 47.9% 一致.

## 1.2 AB014521 代表的基因在不同组织中的表达

在 AB014521 中设计一对引物 OPr/OPf(见表 1),在人的胎肝、胎肾、胎心、胎盘、脾、睾丸、胰腺、垂体 8 种 cDNA 文库(Clontech 公司)中 PCR 扩增. 结果在胎心、胎盘、睾丸和垂体 cDNA 文库中有 127 bp 特异扩增产物,表明 AB014521 代表的基因在上述组织中表达(图 1).

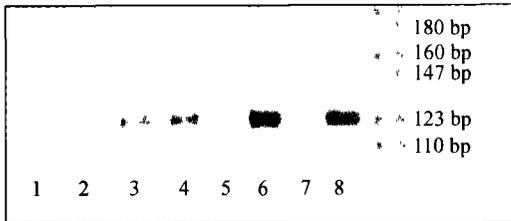


图 1 AB014521 代表的基因在不同组织中的表达泳道 1~8 代表引物 OPr/OPf 在人的胎肝、胎肾、胎心、胎盘、脾、睾丸、胰腺、垂体 8 种 cDNA 文库进行 PCR 扩增

## 1.3 含完整编码区的 cDNA 的克隆

在 AB014521 的 5' 端设计一对巢式引物 OPA/OPB(见表 1),在胎心、胎盘、睾丸、垂体 4 种 cDNA 文库中与载体臂巢式引物 gt10-5'/λgt10-5' 行巢式 PCR 扩增,结果在胎盘 cDNA 文库中获得一个 382 bp 片段,将 AB014521 向 5' 端延伸了 160 bp,但开放阅读框仍未完整. 在获得的 160 bp 中再设计一对巢式引物 OPC/OPD(见表 1),在胎盘 Ready cDNA (Clontech 公司)中与接头引物 AP1/AP2 行 5' RACE 反应,得到一个 587 bp 特异性产物,将

AB014521 又向 5' 端延伸了 437 bp. 测序结果最终与 AB014521 拼接成一个 6906 bp 的 cDNA 序列,其中含一个 2442 bp 的阅读框,编码 813 个氨基酸. 起始密码符合 Kozak 一致序列 AC-CAUGG<sup>[5]</sup>,起始密码前 45 bp 即为终止密码 TGA. 该 cDNA 序列已被 GenBank 收录,登记号为 AF141884,并经 GDB 命名委员会正式命名为人 *Oligophrenin 1* 样(*OPHN1L*)基因.

表 1 主要引物表

名称	序列	用途	位置
OPf	5'cagaacagatgatgagatg 3'	检测 AB014521 代表的基因	647-668 nt, 正向
OPr	5'tccaaggaggatgatggtcac 3'	在不同组织中的表达	754-773 nt, 反向
OPA	5'gagtgatgagcacctcctgctggc 3'	在 cDNA 文库中扩增	745-766 nt, 反向
OPB	5'cttcaagattcctgaggacagtggc 3'	<i>OPHN1L</i> 基因 5' 端	694-718 nt, 反向
OPC	5'ttccgcttcgctgaagacaattc 3'	进行 <i>OPHN1L</i> 基因 5' RACE	576-599 nt, 反向
OPD	5'ccgtccttgatgagctccttgatg 3'		528-551 nt, 反向
gt19-5'	5'gccaaagagctgacgcaagtctgg 3'	cDNA 文库载体臂巢式引物	gt10-5' 位于 λgt10-5' 外侧
λgt10-5'	5'ttgagcaagttcagctggttaagt 3'		
AP1	5'ccatcctaatacagctcactatagggc 3'	Ready cDNA 接头引物	AP1 位于 AP2 外侧
AP2	5'actcactataggctcagcggc 3'		

## 1.4 基因结构和基因定位

将 *OPHN1L* 基因与 Genemle 数据库做 Blast 分析,发现它的 3' 端与两个大规模测序的 BAC 克隆 AC005348, AC004782 序列完全匹配,并从中比较获得了 *OPHN1L* 基因最后 12 个外显子的基因组结构,其内含子-外显子交界均符合“GT-AG”法则. 将 AC004782 与 STS 数据库进行 Blast 分析,发现其中含一个 STSD5S2378(G11143),该 STS 距 *OPHN1L* 基因 50 kb. 以 D5S2378 查寻 GDB 的 Comprehensive Map Chromosome 5,从而将 *OPHN1L* 基因定位于 5q21.2~q21.3. 查寻 GENATLAS 中 5 号染色体的 Disease Map 及 OMIM Gene Map 上定位于 5q21.2~q21.3 的疾病,在该区域未发现候选疾病.

### 1.5 基因序列和蛋白质序列分析

将 *OPHN1L* 基因的编码区与 *Oligophrenin 1* 基因的编码区进行 Fasta 比较, 结果在 1142 bp 中 63.9% 一致; 将 *OPHN1L* 基因编码的蛋白质序列与 *Oligophrenin 1* 基因编码的蛋白质序列进行比较, 结果在 711 氨基酸中 49.5% 一致. 对 *OPHN1L* 编码的蛋白进行一级结构的分析, 显示该蛋白是一个理论等电点为 6.62 的酸性蛋白, 其理论分子量约 92.2kD. 亲疏水性 (Peppplot) 分析表明该蛋白是一个亲水性蛋白. 功能域 (Motif) 分析表明该蛋白第 765 ~ 771 位氨基酸

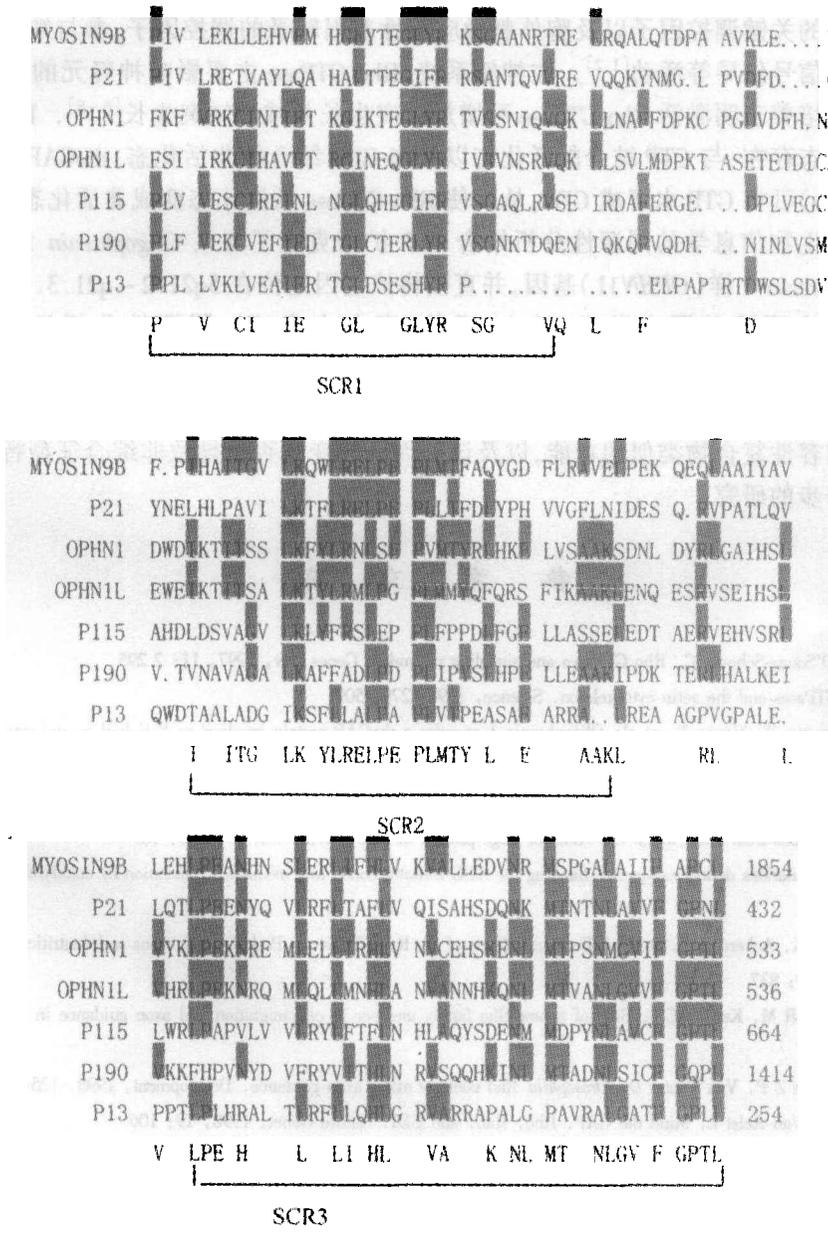


图 2 *OPHN1L*, *OPHN1*, *myosin9b*, *P21*, *P115*, *P190*, *P13* 基因编码的蛋白质 Pileup 分析结果

YACKAEH(酷-丙-半胱-赖-丙-谷-组)具有免疫球蛋白及人组织相容性复合物 C 末端围绕半胱氨酸的一个保守区,该区参与肽链间二硫键的形成. 将 *OPHN1L* 基因编码的蛋白质与 *Oligophrenin 1* 基因及其他几个 rhoGAP 基因(*myosin9b*, *P21*, *P115*, *P190*, *P13*)编码的蛋白质进行 Pileup 分析,发现 *OPHN1L* 基因具有典型的 rhoGAP 功能域,包括 3 个结构保守区(图 2).

### 1.6 讨论

Rho GTPase (包括 RhoA、Rac、Cdc42)为小的 G 蛋白,属 Ras 超基因家族蛋白,其功能为肌动蛋白细胞骨架的关键调控因子以及胞外刺激应答性基因转录的调控因子,参与细胞的运动、生长、发育、跨膜信号传导等活动<sup>[1,2]</sup>. 在神经系统,Rho GTPase 主要影响神经元的加工,动物实验及体外细胞培养表明激活 Rho GTPase 可增加树突生长并减少轴突生长<sup>[6~8]</sup>. Rho GTPase 在体内以两种状态存在:与 GTP 结合的活化态以及与 GDP 结合的非活化态,rhoGAP(Rho-GTPase-activating protien)可将 GTP 水解成 GDP,从而使 Rho GTPase 从活化态变成非活化态<sup>[9]</sup>.

我们通过生物信息学的同源性分析结合 PCR 扩增克隆了与人 *Oligophrenin 1* 基因高度同源的人 *Oligophrenin 1* 样(*OPHN1L*)基因,并将该基因定位在 5q21.2~q21.3. AB014521 的 PCR 扩增结果表明该基因在胎盘、胎心、垂体、睾丸中表达. 同源性分析显示该基因与 *Oligophrenin 1* 基因高度同源,并具有典型的 rhoGAP 功能域,为一个新的 rhoGAP 家族成员. 该基因编码的蛋白质是否具有将 Rho GTPase 结合的 GTP 水解成 GDP 的活性,是否具有免疫球蛋白及人组织相容性复合物类似的功能,以及该基因的突变是否也导致非综合征型智力障碍,这些还需做进一步的研究.

### 参 考 文 献

- 1 Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, 1997, 11: 2 295
- 2 Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 1998, 279: 509
- 3 Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, et al. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature*, 1998, 392: 923
- 4 Ishikawam K, Nagase T, Suyama M, et al. Prediction of the sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large protein *in vitro*. *DNA Res*, 1998, 5: 169
- 5 Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, 44: 283
- 6 Luo L, Hensch T K, Ackerman L, et al. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell exons and dendritic trunks and spines. *Nature*, 1996, 379: 837
- 7 Zipkin I D, Kindt R M, Kenyon C J. Role of a new Rho family member in cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Cell*, 1997, 90: 883
- 8 Kaufmann N, Wills Z P, Van Vactor D. *Drosophila* Rad controls motor axon guidance. *Development*, 1998, 125: 453
- 9 Antonarakis S E, Van Aelst L. Mind the GAP, Rho, Rab, and GDI. *Nature Genet*, 1998, 19: 106