人类肽-甲硫氨酸亚砜还原酶的 cDNA 克隆、组织表达谱特征及染色体定位

胡培蓉 余 龙* 张 民 郑利华 蓝 斐 傅 强 赵寿元

(复旦大学生命科学院遗传学研究所, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433. * 联系人)

摘要 蛋白质结构中某些氨基酸的氧化和还原是生物体内对蛋白功能的一种调控方式. 甲硫氨酸(Met)被氧化则变为甲硫氨酸亚砜(Met(O)), 它可导致所在蛋白质的生物学活性降低或丧失, 但肽-甲硫氨酸亚砜还原酶(peptide methionine sulfoxide reductase, msrA)则可使甲硫氨酸亚砜还原为甲硫氨酸, 使其所在蛋白质重新恢复活性. 为了研究人体中 Met 氧化还原的机制, 以牛 *msrA* cDNA 序列为信息探针, 筛选人 EST 数据库, 依据若干同源 EST 的信息从人 cDNA 分子库中克隆到一个长 1 255 bp 的人 *MSRA* cDNA. 该 cDNA 包含一个长 705 bp 的可读框, 它编码了 235 个氨基酸残基. 同源性比较表明, 该基因与牛和大肠杆菌的 *msrA* 基因的氨基酸一致性分别为 88%和 61%. 表达谱分析发现, 该基因在人体大多数组织中均有一条长约 1.6 kb 的转录本, 并在肾中呈高表达. 应用辐射杂种细胞株定位系统(radiation hybrid mapping panel, RH mapping)将该基因精确定位在人染色体 8p22～23 区带的 D8S518 和 D8S550 位标之间, 由于此前已有 Keratolytic winter erythema 和小头畸形两种遗传病的基因位点被连锁定位于该区带, 因而 *MSRA* 基因亦有可能是它们的候选基因之一.

关键词 肽-甲硫氨酸亚砜还原酶 cDNA 克隆 表达谱分析 人染色体 8p22～23

蛋白质结构中某些氨基酸的氧化和还原是生物体内对蛋白质功能的一种调控方式, 这种氧化多由生物体需氧代谢过程产生的含氧原子副产品所介导. 这些物质有过氧化阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、氢氧根离子(OH^-)和次氯酸盐离子(OCl^-)等[1], 而氧化氨基酸的还原则多由特定的还原酶来完成, 使得因氧化而降低生物活性的蛋白质恢复正常功能. 甲硫氨酸(Met)可以被氧化为甲硫氨酸亚砜(Met(O)), 而当一些蛋白质中存在 Met(O)则会导致其生物学活性的降低或丧失[1]. 例如, α-1-蛋白酶抑制因子中的 Met 被氧化为 Met(O)可导致或促进吸烟者肺气肿的发生[2], 同时也与成人型呼吸窘迫综合征[3]和风湿性关节炎[4]的形成有密切关系; 又如在老年性核性白内障[5]病人的晶状体核蛋白中也发现 Met 被氧化为 Met(O), 并随着病情的加重而氧化程度加大. 进一步研究发现, 经氧化形成的 Met(O)可以被肽-甲硫氨酸亚砜还原酶(peptide methionine sulfoxide reductase, msrA)催化逆转而使蛋白重新恢复活性[6～10]. 迄今, 已在大肠杆菌[11]、牛[12]、酵母[13]等模式生物中克隆到 *msrA* 基因, 但尚未见人甲硫氨酸亚砜还原酶(MSRA)基因克隆的报道, 为了进一步研究人体对蛋白质中 Met 的氧化还原机制及与之相关的疾病, 本研究利用 *msrA* 基因在不同物种中的进化保守性, 以"同源筛选"的策略, 进行了克隆人类 *MSRA* cDNA 的研究. 从人的肾、脾等组织中克隆到了与牛 *msrA* cDNA 高度同源的基因转录本. 基于该 cDNA 中可读框推导的氨基酸序列与牛 msrA 蛋白一致性高达 88%, 我们将其作为人的 *MSRA* cDNA, 在国际 GenBank 数据库中登录, 编号为 AF086925. 它在各种组织中的表达特征及染色体定位也在本文中予以报道.

1 材料与方法

(ⅰ) 同源信息筛选. 利用 NCBI(National Center for Biotechnology Information)的 BLASTN

信息途径，以牛 *msrA* 基因的 cDNA 序列为探针在国际 GenBank 人 EST 数据库中作同源序列筛选，获得若干与之有高度同源的人 EST，利用 GCG 中 ASSEMBLY 程序构建了如图 1 所示的 EST-重叠群.

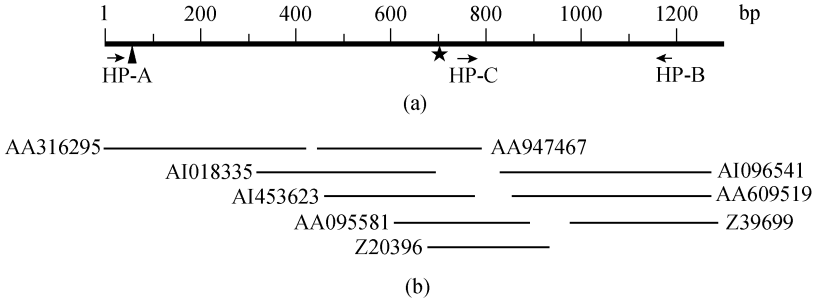


图 1 人 *MSRA* cDNA 及其 ESTs 重叠群

(a) 应用牛 *msrA* cDNA 为信息探针从 GenBank 人 EST 库中筛选同源序列. 图中显示由同源 ESTs 整合形成的人 *MSRA* cDNA，全长约 1300 bp，“▲”示起始密码子(ATG)位置，“★”示终止密码子(TAA)位置，“→”示设计的 PCR 扩增引物位置及方向; (b) 显示 9 个 EST 序列的名称及其与 *MSRA* cDNA 的对应关系

(ⅱ) cDNA 的分离与鉴定. 以 EST-重叠群图为基础，在 EST 拼接序列上设计引物 HP-A: 5′-CTGCGGCTCCGCTGCCGGTAGCG-3′，HP-B: 5′-TTTCTCTGCACAGAGAGGGCTG-3′，用单向锚定 PCR 富集法[14]在人肾、肝、胎盘、脑、睾丸、脾、心、肺等 8 种 cDNA 分子库(Gibco 公司)中扩增. PCR 扩增产物经低熔点凝胶回收纯化后，用 PCR 产物直接测序法(ABI 377 自动测序仪)测序验证，并装载进 pGEM-T 载体(Promega 公司).

(ⅲ) 同源性比较. 将该 cDNA 序列输入国际 NCBI 数据库检索并在 GenBank 注册，用 PC-GENE 软件将该基因与牛和大肠杆菌的 *msrA* 进行氨基酸同源性比较. 利用 BLASTP 和 Prodom 软件，在已有的蛋白数据库中进行不同物种 msrA 蛋白的同源性比较.

(ⅳ) Northern 杂交. 采用随机引物标记法用α-^{32}P-dATP (Amersham 公司)标记上述 cDNA，与载有人的 16 种组织(心，脑，胎盘，肺，肝，骨骼肌，肾，胰腺，脾，胸腺，前列腺，睾丸，卵巢，小肠，结肠，外周血白细胞)mRNA 样品的 MTN 膜(multiple tissue northern, Clontech 公司产品)进行 Northern 杂交，然后以标记同位素的 *b-actin* 探针杂交相同的 Northern 膜，杂交条件参照其操作手册. 各组织间的基因表达剂量比较采用凝胶扫描成像分析系统(UVP)进行分析，即分别对来自同一组织 mRNA 样品的 *MSRA* 探针的杂交带(A)和 *b-actin* 探针的杂交带(B)进行剂量扫描，将扫描结果带入公式 DR(Dosage ratio) = *A*/*B*，根据 DR 值相对地评价 *MSRA* 在各种组织中表达量的多少.

(ⅴ) 辐射杂种细胞株基因定位系统制图. 采用辐射杂种细胞株定位系统(radiation hybrid mapping panel, RH mapping)进行染色体定位分析. 在前述 cDNA 序列 3′ UTR 内设计引物 HP-C(5′- ATGGTGGGCCTTTGAGGTTC-3′), 与前述引物 HP-B 搭配扩增人基因组 DNA 和仓鼠基因组 DNA，并设空白和阳性对照(空白: 无模板 DNA，阳性: *MSRA* cDNA 为模板). PCR 体系和 PCR 反应条件参照产品推荐条件. 待在人基因组中扩出与阳性对照相同的条带，测序验证. 以相同条件扩增 Stanford 大学人类基因组中心的 RH Genebridge 4 panel Ⅰ(含 93 种 DNA 样品，Research Genetic 公司). PCR 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，结果按两次扩增均出现阳性特异条带

记为 1、阴性记为 0，两次扩增结果不一致记为 2 的标准记录结果并进行统计，将统计结果输入国际 Sanger 中心 RH 定位系统(http://sanger.ac.uk/Rhserver/Rhserver.shtml)进行定位分析.

2 结果

2.1 EST-重叠群图

以牛 *msrA* 基因的 cDNA 序列为探针，在 GenBank EST 数据库中进行步移筛选，获得若干与之高度同源的人类 EST，利用 GCG 的 ASSEMBLY 程序构建 EST-重叠群(图 1)，拼接出一条长 1 359 bp 的 cDNA 序列.

2.2 含完整 ORF 的 cDNA 的获得及测序

以单向锚定 PCR 富集法在人肾、肝、胎盘、脑、睾丸、脾、心、肺等 8 种 cDNA 分子库中进行 PCR，在肾、胎盘、肝、心等 4 个 cDNA 分子库中，均获得一条长约 1.2 kb 的特异扩增带. 分别用引物 HP-A 和 HP-B 进行 PCR 产物直接测序，所得序列与预期序列完全一致. 该序列中包含一个长 705 bp 的可读框，共编码 235 个氨基酸残基(图 2).

```
-65   TCCGGCTGCTGGCTCCGCTGCCGGTAGCGCCGTCCCCCGGGACCACCCTTCGGCTGGCG  -8
 -7   CCCTCCCATGCTCTCGGCCACCCGGAGGGCTTGCCAGCTCCTCCTCCTCCACAGCCTCTT  53
  1         M  L  S  A  T  R  R  A  C  Q  L  L  L  L  H  S  L  F   18
 54   TCCCGTCCCGAGGATGGGCAACTCGGCCTCGAACATCGTCAGCCCCCAGGAGGCCTTGCC  113
 19     P  V  P  R  M  G  N  S  A  S  N  I  V  S  P  Q  E  A  L  P   38
114   GGGCCGGAAGGAACAGACCCCTGTAGCGGCCAAACATCATGTCAATGGCAACAGAACAGT  173
 39     G  R  K  E  Q  T  P  V  A  A  K  H  H  V  N  G  N  R  T  V   58
174   CGAACCTTTCCCAGAGGGAACACAGATGGCTGTATTTGGAATGGGATGTTTCTGGGGAGC  233
 59     E  P  F  P  E  G  T  Q  M  A  V  F  G  M  G  C  F  W  G  A   78
234   TGAAAGGAAATTCTGGGTCTTGAAAGGAGTGTATTCAACTCAAGTTGGTTTTGCAGGAGG  293
 79     E  R  K  F  W  V  L  K  G  V  Y  S  T  Q  V  G  F  A  G  G   98
294   CTATACTTCAAATCCTACTTATAAAGAAGTCTGCTCAGAAAAAACTGGCCATGCAGAAGT  353
 99     Y  T  S  N  P  T  Y  K  E  V  C  S  E  K  T  G  H  A  E  V  118
354   CGTCCGAGTGGTGTACCAGCCAGAACACATGAGTTTTGAGGAACTGCTCAAGGTCTTCTG  413
119     V  R  V  V  Y  Q  P  E  H  M  S  F  E  E  L  L  K  V  F  W  138
414   GGAGAATCACGACCCGACCCAAGGTATGCGCCAGGGGAACGACCATGGCACTCAGTACCG  473
139     E  N  H  D  P  T  Q  G  M  R  Q  G  N  D  H  G  T  Q  Y  R  158
474   CTCGGCCATCTACCCGACCTCTGCCAAGCAAATGGAGGCAGCCCTGAGCTCCAAAGAGAA  533
159     S  A  I  Y  P  T  S  A  K  Q  M  E  A  A  L  S  S  K  E  N  178
534   CTACCAAAAGGTTCTTTCAGAGCACGGCTTCGGCCCCATCACTACCGACATCCGGGAGGG  593
179     Y  Q  K  V  L  S  E  H  G  F  G  P  I  T  T  D  I  R  E  G  198
594   ACAGACTTTCTACTATGCGGAAGACTACCACCAGCAGTACCTGAGCAAGAACCCCAATGG  653
199     Q  T  F  Y  Y  A  E  D  Y  H  Q  Q  Y  L  S  K  N  P  N  G  218
654   CTACTGCGGCCTTGGGGGCACCGGCGTGTCCTGCCCAGTGGGTATTAAAAAATAATTGCT  713
219     Y  C  G  L  G  G  T  G  V  S  C  P  V  G  I  K  K  -        235
714   CCCCACATGGTGGGCCTTTGAGGTTCCAGTAAAAATGCTTTCAACAAATTGGGCAATGCT  773
774   TGTGTGATTCACAATCGTGGCATTTAAAGTGCACAAAGTACAAAGGAATTTATACAGATT  833
834   GGGTTTACCGAAGTATAATCTATAGGAGGCGCGATGGCAAGTTGATAAAATGTGACTTAT  893
894   CTCCTAATAAGTTATGGTGGGAGTGGAGCTGTGCGGTTTCCTGTGTCTTCTGGGGTCTGA  953
954   GTGAAGATAGCAGGGATGCTGTGTTCACCCTTCTTGGTAGAAGCTAAGGTGTGAGCTGGG 1013
1014  AGGTTGCTGGACAGGATGGGGGACCCCAGAAGTCCTTTATCTGTGCTCTCTGCCCGCCAG 1073
1074  TGCCTTACAATTTGCAAACGTGTATAGCCTCAGTGACTCATTCGCTGAAATCCTTCGCTT 1133
1134  TACCAAATCTAGACATACATAAGGGACTTTCTCTCCCTTTTCAGCCCTGTCTGTGCCAGAG 1193
1194  AAAAGATGTGAGTCCGCTTGATGAATTCTAATGCTTTGCTTAGAGCTATGAGAAATGTTT 1253
1254  GTTTTAATAAAAACCTACAGTCCAATAAAAAAAAAAAAAAA                     1294
```

图 2　人 *MSRA* 基因的 cDNA 序列和推导氨基酸序列

扩增引物 HP-A (5′ -CTGCGGCTCCGCTGCCGGTAGCG-3′)、HP-B (5′ -TTTCTCTGC-ACAGAGAGGGCTG- 3′)和 HP-C(5′ -ATGGTGGGCCTTTGAGGTTCCAG- 3′)以阴影标出;起始密码子(ATG)、终止密码子(TAA)和加尾信号 AATAAA 以下划线标出；在 *msrA* 家族中存在的一致氨基酸序列(66 ~ 222 aa)以下划线标出

2.3 推导蛋白质及其功能域的同源性比较

将该基因推导的氨基酸序列与牛和大肠杆菌的同源基因编码的氨基酸序列进行同源性比较，该基因与牛和大肠杆菌 *msrA* 基因的氨基酸序列一致性分别为 88%和 61%(图 3). BLASTN 分析结果显示，在 20 多种不同物种(如原核生物中的古细菌、大肠杆菌；低等真核生物酵母；植物中的油菜、拟南芥；哺乳动物中的牛等)均含有 msrA 同源蛋白. 利用 Prodom (99.1)分析发现，在所有相关蛋白中均存在一段相当保守的氨基酸序列，相当于人 MSRA 蛋白的第 68~222 aa 位，该区域在 Prodom 中 Domain ID 为 3489，登录号为 PD003489. 表 1 中列出不同物种相关蛋白与人 MSRA 保守区域的同源比较结果.

```
human MSRA   MLSATRRACQLLLLHSLFPVPRMGNSASNIVSPQEALPGRKEQTPVAAKH   50
bovin msrA   MLSVTRRA---LQLFHSLFPIPRMGDSAAKIVSPQEALPGRKEPLVVAAKH   48
Ecoli  msrA  M-----------------SLF--------DKKHLVSPADALPGRNTPMPVATLH   29
             *                 ***        .  ..***..*****...  **. *

human MSRA   HVNGNRTVEPFPEGTQMAVFGMGCFWGAERKFWVLKGVYSTQVGFAGGYT   100
bovin msrA   HVNGNRTVEPFPEGTQMAVFGMGCFWGAERKFWTLKGVYSTQVGFAGGYT   98
Ecoli  msrA  AVNGH-SMTNVPDGMEIAIFAMGCFWGVERLFWQLPGVYSTAAGYTGGYT   78
              ***. ...  *.* ..*.*.******.** ** * *****..*..****

human MSRA   PNPTYKEVCSEKTGHAEVVRVVYQPEHMSFEELLKVFWENHDPTQGMRQG   150
bovin msrA   PNPTYKEVCSGKTGHAEVVRVVFQPEHISFEELLKVFWENHDPTQGMRQG   148
Ecoli  msrA  PNPTYREVCSGDTGHAEAVRIVYDPSVISYEQLLQVFWENHDPAQGMRQG   128
             *****.****..*****.**.*..*.  .*.*.**.********.******

human MSRA   NDHGTQYRSAIYPTPAKQMEAALSSKENYQK-VLSEHGFGPITTDIREGQ   199
bovin msrA   NDHGSQYRSAIYPTSAEHVGAALKSKEDYQK-VLSEHGFGLITTDIREGQ   197
Ecoli  msrA  NDHGTQYRSAIYPLTPEQDAAARASLERFQAAMLAADDDRHTTTEIANAT   178
             ****.******** .... .**  * * .*  .*....   ***.* .

human MSRA   TFYYAEDYHQQYLSKNPNGYCGLGGTGVSCPVGIKK                235
bovin msrA   TFYYAEDYHQQYLSKDPDGYCGLGGTGVSCPLGIKK                233
Ecoli  msrA  PFYYAEDDHQQYLHKNPYGYCGIGGIGV-C-LPPEA                212
             .****** ***** *.* ****.**.** * .  .
```

图 3 人 MSRA 蛋白与牛和大肠杆菌 msrA 蛋白的氨基酸同源性比较
相同的氨基酸以“*”显示，相似的氨基酸以“·”显示

2.4 人 *MSRA* 基因的组织表达谱分析

人 *MSRA* cDNA 探针与吸印有 16 种人体组织 mRNA 的 MTN 膜(MTNⅠ, MTNⅡ)进行 Northern 杂交(图 4)，转录本大小约为 1.6 kb，在 16 种组织中均有表达，在肾组织中表达量明显高于其他组织. 而在卵巢、肺等组织中表达量极低. *MSRA* 在人体 16 种组织中的表达剂量分析结果见表 2.

2.5 人 *MSRA* 基因的染色体定位

采用“RH mapping” 进行染色体定位. 引物 HP-C/HP-B 搭配在本室制备的人基因组 DNA 和 GB4 试剂盒的人基因组 DNA 样品中均扩增出一条约 0.5 kb 的条带，而在仓鼠基因组 DNA 样品和空白对照中未见扩增条带,PCR 产物经测序证实片段长 477 bp,与上述 cDNA 的 3′ 侧预

表 1 人 MSRA 与 23 个不同物种的 msrA 蛋白之间保守区域的同源比较

蛋白登录号	物种名	氨基酸数	保守区域	一致性/%	相似性/%
	Homo sapiens(人)	235	68 ~ 222	100	100
P54149	*Bos taurus* (牛)	233	66 ~ 220	90	95
BAA16624	*Synechocystis sp.*(蓝藻)	222	48 ~ 205	67	81
P27110	*Escherichia coli* (大肠杆菌)	212	42 ~ 200	65	75
CAA10143	*Erwinia chrysanthemi* (欧文菌)	213	43 ~ 201	61	75
CAA62760	*Brassica napus*(油菜)	257	95 ~ 235	49	62
AAB85041	*Methanobacterium theromoautotrophicum*(甲烷菌)	169	8 ~ 162	48	60
CAB36755	*Arabidopsis thaliana*(拟南芥)	258	96 ~ 236	47	59
AAC65608	*Treponema pallidum*(螺旋体)	291	128 ~ 281	46	62
P54152	*Fragaria x ananassa*(香甘菊)	185	20 ~ 163	44	57
P47648	*Mycoplasma genitalium*(支原体)	157	1 ~ 157	43	59
P54154	*Bacillus subtilis* (芽孢杆菌)	177	6 ~ 157	43	57
Q09859	*Schizosaccharomyces pomb* (裂殖酵母)	187	4 ~ 159	42	59
P54153	*Lycopersicon esculentum*(马铃薯)	196	30 ~ 182	42	53
P75188	*Mycoplasma pneumoniae*(支原体)	157	1 ~ 157	42	56
P14930	*Neisseria gonorrhoeae*(奈瑟菌)	521	223 ~ 350	42	59
BAA16815	*Synechocystis sp.*(蓝藻)	214	37 ~ 188	40	55
AAC15512	*Pseudomonas fluorescens*(假单胞菌)	209	6 ~ 156	37	54
P40029	*Saccharomyces cerevisiae*(酿酒酵母)	184	17 ~ 176	37	50
P45213	*Haemophilus influenzae*(嗜血杆菌)	353	42 ~ 193	37	51
P35593	*Streptococcus pneumoniae* (链球菌)	312	1 ~ 152	34	51
AAD05793	*Helicobacter pylori* (螺旋菌)	359	38 ~ 186	35	54
CAA28205[a)]	*Drosophila melanogaster*(果蝇)	255	41 ~ 174	40	55
AAC71122[a)]	*Caenorhabditis elegans*(线虫)	207	4 ~ 134	36	53

a) 表示文献中未明确命名为 msrA，但与人 MSRA 同源度较高的蛋白质

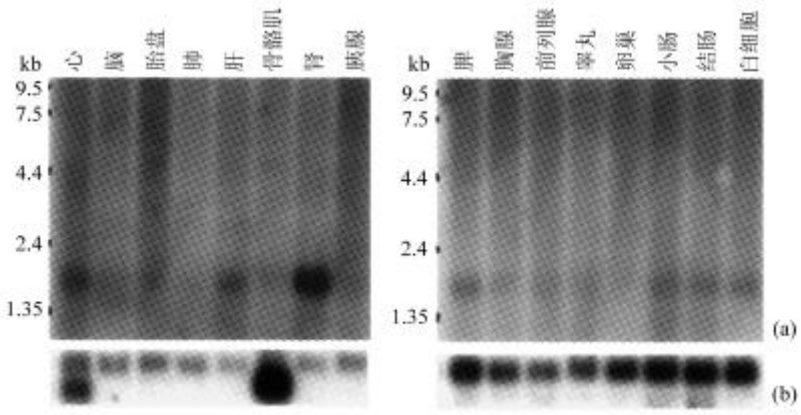


图 4 人 *MSRA* 基因的组织表达谱分析

(a) *MSRA* 基因在 16 种人体组织中的 Northern 杂交结果，显示 1.6 kb 的杂交带; (b)显示 *b -actin* DNA 探针的 Northern 杂交结果

期序列一致. 以相同条件扩增 RH GB4 panel, PCR 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，将统计结果输入国际 Sanger 中心 RH 定位系统进行统计分析. 使用 2-pt RHMAP 分析结果显示 *MSRA* 与 D8S550 (LOD = 16.50)紧密连锁. 进一步使用 multipoint RHMAPPER 分析，显示 *MSRA* 最可能的位置在 D8S518 和 D8S550 位标之间(与 2 个位标之间的距离分别为 6.29 和 2.53 cR). 结

合 GDB 的 comprehensive map 分析，最终将 *MSRA* 定位于人染色体 8p22 ~ 23 区带 (图 5).

表 2 *MSRA* 基因在人体 16 种组织中的表达剂量分析

序号	组织	杂交条带扫描值		DR 值 a)
		MSRA	*b-actin*	
1	肾	56 893.00	33 925.00	1.68
2	肝	16 550.59	20 563.00	0.80
3	心	15 778.00	33 153.13 b)	0.46
4	胰腺	10 448.00	23 140.00	0.45
5	骨骼肌	12 343.17	33 153.13 b)	0.37
6	脑	10 831.00	40 106.00	0.27
7	脾	9 795.30	47 382.00	0.21
8	外周血白细胞	8 453.83	49 696.00	0.17
9	胎盘	6 724.69	45 613.00	0.15
10	结肠	7 787.48	57 753.00	0.13
11	小肠	6 636.00	50 647.00	0.13
12	睾丸	3 522.09	32 323.00	0.11
13	前列腺	3 450.48	38 140.00	0.09
14	胸腺	3 748.00	44 009.00	0.09
15	肺	1 726.07	35 572.00	0.05
16	卵巢	1 445.30	41 187.00	0.04

a) DR = *A*/*B* (*A* 为 *MSRA* 在一种组织中杂交带的剂量, *B* 为 *b -actin* 在同一组织中杂交带的剂量); b) 心、骨骼肌中 *b-actin* 表达量偏高，故以同一张膜上其他 6 种组织中表达量的平均值计算

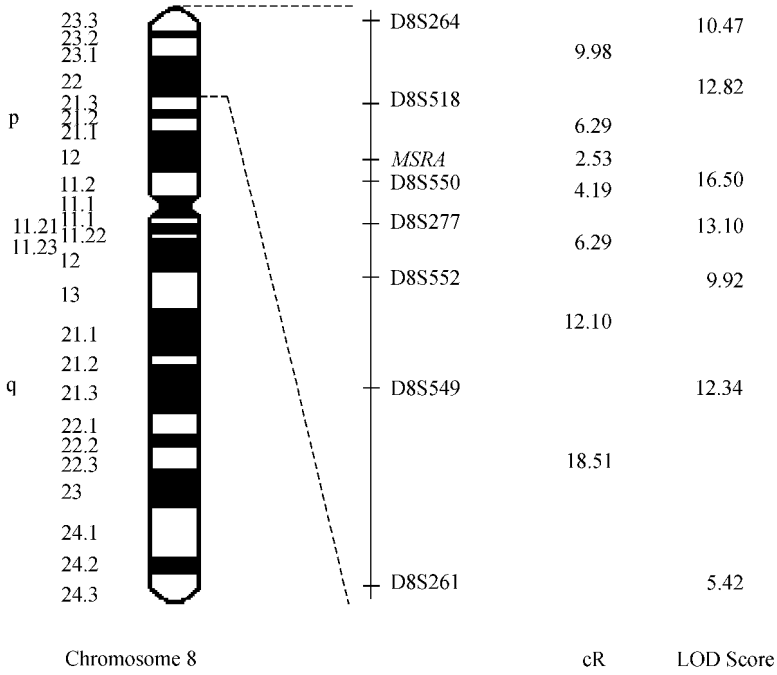


图 5 人 *MSRA* 基因的染色体定位结果

显示人 *MSRA* 与其他位标的位置关系，并显示位标之间的 cR 值及人 *MSRA* 与各位标的 LOD 值

3 讨论

肽-甲硫氨酸亚砜还原酶(msrA)能够还原蛋白质中被氧化的甲硫氨酸(Met(O)), 从而可以使因 Met 氧化而丧失或降低的蛋白质生物学功能得以恢复. 迄今, msrA 被证明存在于很多生物体中, 从进化上非常古老的古细菌、大肠杆菌到植物和哺乳动物中均有发现, 提示该基因是一种非常古老并且功能极其保守的基因, 其抗氧化作用对于生物体的生存具有特别重要的意义. 在低等生物如大肠杆菌中发现 *msrA* 基因的突变体对氧化损伤的敏感性要高于正常亲本菌株[15], 而在酵母中转入酵母 *msrA* 基因并高效表达和在人 T 细胞株转入牛的 *msrA* 基因并高效表达, 均可提高宿主细胞对氧化物的抗性[16], 从而提示 msrA 是一种存在于生物体中的抗氧化修复因子.

本研究利用该基因的进化保守性, 在国际 GenBank EST 数据库中以“同源筛选”的策略成功克隆了人 *MSRA* cDNA, 该 cDNA 包含一个长 705 bp 的可读框, 编码 235 个氨基酸残基. 同源性比较表明该基因与牛 *msrA* 基因在氨基酸水平的一致性高达 88%, 与大肠杆菌 *msrA* 的一致性为 61%. 国际数据库同源检索结果显示, 各物种中 msrA 的同源蛋白含有一段高度保守的氨基酸序列, 在古细菌、各类真细菌、酵母、哺乳动物和植物等 20 多种物种间的相似性保持在 50%以上. 从而进一步提示 msrA 蛋白是一种进化上极其保守的蛋白, 其具特征性的一段保守氨基酸序列则可能对该酶的功能具有重要的作用.

人体组织表达谱分析显示人 *MSRA* 基因在人体大多数组织中均有表达, 转录本大小约为 1.6 kb. 该基因在肾中高度表达, 在卵巢、肺等组织中表达量极低(图 4, 表 2), 这与牛 *msrA* 基因的 Northern 表达谱[12]类似. 已有研究表明, 在大鼠的肾中检测到的 msrA 酶活性最高[12], 这与本研究的结果也是相一致的. msrA 在肾中高度表达的机制有待进一步澄清.

本研究将人 *MSRA* 基因定位在人染色体 8p22 ~ 23 区带, 而小鼠 *MsrA* 同源基因则被定位于小鼠 14 号染色体中部[17], 但以往对人与小鼠染色体同源分析结果显示人染色体 8p22 ~ 23 区带与小鼠 14 号染色体中部正好是相对应的[18]. 另外, 数据检索还发现已有两个尚未被克隆的人类遗传病基因也连锁定位于这个区带, 它们分别是: Keratolytic winter erythema 和小头畸形(Microcephaly, MCPH1). 其中, Keratolytic winter erythema 是一种常染色体显性皮肤病, 临床表现为间歇周期性手掌和足底显现红斑、脱皮, 严重时症状也出现在四肢和躯体, 该疾病与人染色体 8p22 ~ 23 区带的 D8S550 位标紧密连锁(Lod 值>7.4)[19]. 小头畸形遗传表现为常染色体隐性, 临床表现为异质型性状, 如身材矮小、痉挛性四肢麻痹、脑溢血或某些神经性障碍等, 该性状与 8p22 ~ 23 区带的 D8S277 位标高度连锁(Lod 值 = 8.1)[20]. 而 *MSRA* 定位在该区带, 并且与该区带的两个位标紧密连锁(Lod 值分别为 16.50 和 13.01(图 5)), 这提示 *MSRA* 亦可作为这两种遗传病的候选基因之一, 进一步研究它与这两种疾病之间的关系是有价值的.

致谢 本工作为国家“九七三”重大基础研究项目、国家“八六三”高技术项目(863-Z020401)和国家自然科学基金(批准号: 39525015, 39680019)资助项目.

参 考 文 献

1 Brot N, Weissbach H. Biochemistry of methionine sulfoxide: residues in protein. Biofactors, 1991, 3(2): 9 ~ 96

2 Travis J, Salvesen G S. Human plasma proteinase inhibitors. Annu Rev Biochem, 1983, 52: 655 ~ 709

3 Cochrane C G, Spragg R, Revak S B. Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Invest, 1983, 71(3): 754 ~ 761

4 Wong P S, Travis J. Isolation and properties of oxidized alpha-a-proteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. Biochem Biophys Res Commun, 1980, 96(3): 1449 ~ 1454

5 Truscott R J, Augusteyn R C. Oxidation changes in human lens proteins during senile nuclear cataract formation. Biochim Biophys Acta, 1977, 492(1): 43 ~ 52

6 Abrams W R, Weinbaum G, Weissbach H, et al. Enzymatic reduction of oxidized α-1-proteinase inhibitor restores biological activity. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(12): 7483 ~ 7486

7 Fliss H, Vasanthakumar G, Schiffman E, et al. Enzymatic reduction of oxidized chemotactic peptide N-formyl-L-methionyl-sulfoxide-L-leucyl-L-phenylalanine. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 109(1):194 ~ 201

8 Brot N, Weissbach L, Werth J, et al. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(4): 2155 ~ 2158

9 Tobler D H, Tschopp F A, Dembacher M A, et al. Identification and characterization of calcitonin forms in plasma and urine of normal subjects and medullary carcinoma patients. J Clin Endocrinol Metab, 1983, 57(4): 749 ~ 754

10 Lawrence D A, Loskutoff D J. Inactivation of plasminogen activator inhibitor by oxidants. Biochemistry, 1986, 25(21): 6351 ~ 6355

11 Rahman M A, Nelson H, Weissbach H, et al. Cloning, sequencing, and expression of the Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene. J Biol Chem, 1992, 267(22): 15549 ~ 15551

12 Moskovitz J, Weissbach H, Brot N. Cloning and expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(5): 2095 ~ 2099

13 Moskovitz J, Berlett B S, Poston J M, et al. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(18): 9585 ~ 9589

14 **郑其平, 余 龙, 姜春玲, 等. 用单向锚定** PCR **的方法富集低丰度转录本. 高技术通讯**, 1998, 8(10): 40 ~ 44

15 Moskovitz J, Rahman M A, Strassman J, et al. Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. J Biol Chem, 1995, 177(3): 502 ~ 507

16 Moskovitz J, Flescher E, Berlett B S, et al. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in Saccharomyces cerevisiae and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(24):14071 ~ 14075

17 Moskovitz J, Jenkins N A, Gilbert D J, et al. Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene and its differential expression in various tissue. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(8): 3205 ~ 3208

18 Debry R W, Seldin M F. Human/mouse homology relationships. Genomics,1996, 33(3): 337~351

19 Starfield M, Hennies H C, Jung M, et al. Localization of the gene causing keratolytic winter erythema to chromosome 8p22 ~ 23, and evidence for a founder effect in South African Afrikaans-speakers. Am J Hum Genet, 1997, 61(2): 370 ~ 378

20 Jackson A P, McHale D P, Campbell D A, et al. Primary autosomal recessive microcephaly (MCPH1) maps to chromosome 8p22-pter. Am J Hum Genet, 1998, 63(2): 541 ~ 546

(1999-10-23 **收稿**, 2000-04-10 **收修改稿**)