DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.016
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)18-1629-03

论著

新基因RS1在辐射损伤小鼠的组织表达谱研究

王锋超,高京生,粟永萍,王军平,闫国和,刘晓宏,章 波 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨新基因RS1在辐射损伤小鼠的组织表达谱情况,为RS1的克隆和功能研究提供更多的线索。方法 利用半定量RT-PCR的方法研究RS1在辐射损伤小鼠肠上皮、肝、肾、脾脏的表达情况,利用原位杂交的方法观察RS1在辐射损伤小鼠肝、肾、脾脏和心肌的表达情况。结果 RS1在辐射损伤小鼠除在肠上皮表达以外,在肾、肝、脾等多处表达,其中脾脏和肾脏的表达较高。结论 RS1具有广泛的组织表达谱。可以利用肾脏和肝脏来源的,RS1表达丰度高的总RNA为模板进行全长cDNA克隆。

关键词:RS1基因;组织表达谱
中图法分类号:R394.3;R818.02 文献标识码:A

A study of the expression profile of the new gene RS1 in radiation-injured mouse tissues

WANG Feng-chao, GAO Jing-sheng, SU Yong-ping, WANG Jun-ping, YAN Guo-he, LIU Xiao-hong, ZHANG Bo (Research Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression profile of RS1 in different radiation-injured mouse tissues for the purpose of providing basis for the studies of full length cDNA cloning and functions of RS1. Methods The expressions of RS1 in the intestinal epithelium, liver, kidney and spleen of the mouse exposed to γray were determined by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *In situ* hybridization was employed to examine the expressions of RS1 in the liver, kidney and spleen of radiation-injured mice. Results Expression of RS1 was found in the intestinal epithelium. But there was higher expression in the liver, kidney and spleen of the radiation-injured mice. Conclusion The expression profile of RS1 is wide in mouse tissues. The total RNA extracted from the kidney and liver is the optimal sample applied to clone the full length cDNA of RS1.

Key words: RS1 gene; tissue expression profile

应用DD-RTPCR、代表性差别筛选法(RDA)、抑制消减杂交法(SSH)等差异显示方法可以获得大量差异表达EST(Expressed seqence tags, EST)序列[1,2]。利用表达序列标签可以对靶基因行染色体定位,进行组织表达谱和生物信息学分析等,获得大量相关资料[3,4]。

我们在研究12 Gy γ射线辐射前后小鼠小肠上皮细胞间差异表达基因情况时,克隆到一尚未报道的EST序列RS1[5],为了给RS1的全长cDNA克隆和功能研究提供更多的线索,我们采用了半定量RT-PCR和原位杂交的方法对RS1进行了组织表达谱分析。

1 材料和方法

1.1 动物模型建立和取材

健康雄性昆明小鼠15只,体质量20~25 g,予以^{60}Coγ射线12 Gy全身一次照射。照射距离1.5 m,照射剂量率为2.0 Gy/min,照射后3 h颈椎脱臼致死,采用Evans等[6]的方法分离小肠上皮细胞,显微镜下观察细胞形态并记数。取适量肝、肾、脾组织,液氮保存。

1.2 总RNA的提取和鉴定

参照罗氏公司的Tripure试剂说明书,组织匀浆法提取肝、肾、脾组织及小肠上皮细胞的总RNA,通过紫外分光光度仪检测和1%琼脂糖甲醛变性凝胶电泳对总RNA进行定量定性分析。

1.3 逆转录和PCR检测

各样本取1 μg总RAN做模板,20 μl体系42 ℃进行逆转录2 h合成cDNA第一链,稀释两倍取1 μl作为PCR的模板,同时以RS1质粒稀释液为模板作为阳性对照。

根据已知的RS1序列设计引物,由大连Takara公司合成。

P1 Sense: 5′--TTC CCT TCT TCC CTA CCA GTA GGT ATC C-3′

P2 Antisense: 5′--GGA AGG AAT AGG TGG GAG CAG TCG-3′

扩增条件为:94 ℃预变性2 min然后94 ℃变性40 s 64 ℃退火40 s 72 ℃延伸1 min,扩增30个循环。最后72 ℃延伸10 min,P1P2扩增的目的片段为290 bp与预想一致。

1.4 TA克隆和测序

PCR产物克隆到T载体(参照promega PGMT-easy system说明),蓝白筛选,挑取白色菌落过夜培养,以菌液为模板,引物

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970232,30230360)
作者简介:王锋超(1977—),男,河北省安平县人,硕士,助教,主要从事小肠辐射损伤与修复的分子机制方面的研究。电话:(023)68752355,E-mail:wangfengchao@yahoo.com.cn
通信作者:粟永萍,王军平,电话:(023)68752009,E-mail:suyping@yahoo.com
收稿日期:2003-02-17;修回日期:2003-05-02

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

P1、P2 做PCR 鉴定后，送大连 Takara 公司测序。

1.5 cDNA 探针制备

以 RS1 质粒为模板，经 BLAST 对比分析，设计 RS1 特异探针PCR 引物序列，扩增400 bp片段，产物纯化后乙醇法沉淀，稀释为100 ng/μl，参照罗氏公司的随机引物标记试剂盒说明书进行地高辛标记。

1.6 原位杂交检测

肝、肾、脾组织液氮速冻后冰冻切片 10 μm，贴片，经 Triton X-100 和蛋白酶 K 处理，多聚甲醛固定后，乙酸酐及 SSC 处理，42 ℃预杂交0.5 h，探针变性后 42 ℃杂交 24 h，Anti-Dig-AP 抗体（按 1∶500 稀释）37 ℃孵育 3 h 。NBT/BCIP 暗处显色，核固红衬染，脱水，DPX 封片。

2 结果

2.1 组织总 RNA 分离鉴定结果

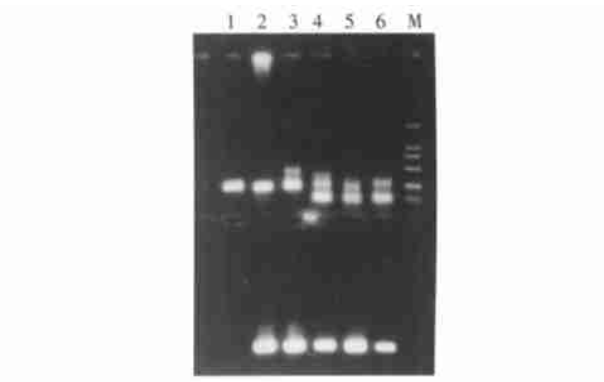
紫外分光光度仪检测 $A_{280}/_{260}$ 值大于 1.8。经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析，可见清晰的 28、18、5 s 3 条带以及介于它们之间呈云雾状的 mRNA，表明 RNA 完整性好，没有发生降解。

2.2 逆转录PCR 结果

以辐射小鼠的肝、肾、脾组织及小肠上皮细胞总 RNA 逆转录产物以及 RS1 质粒为模板，P1、P2 为引物进行 PCR 扩增，GAPDH 作为内参照。结果表明 RS1 在放射小鼠各种组织中均有表达，其中肾脏和脾脏表达量较高，见图 1。

2.3 TA 克隆的鉴定和测序结果

挑取白色菌落过夜摇菌，菌液为模板，引物 P1、P2 做 PCR。结果有 239 bp 的预期分子量产物条带出现，送大连 Takara 公司公司测序，结果与已知的 RS1 序列完全一致。



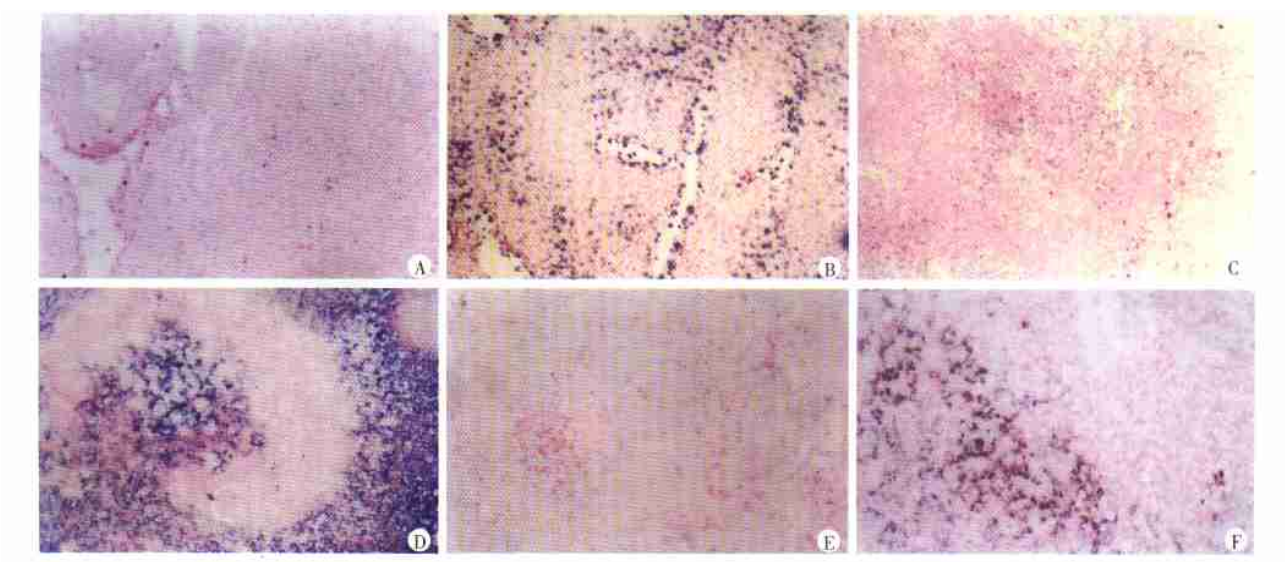
M：DL2000 marker；1：RS1 plasmid；2：Spleen；3：Kidney；4：Liver；5，6：Intestinal epithelium

图 1 半定量 **RT-PCR** 检测 **RS1** 基因在辐射损伤小鼠多种组织内的表达情况

Fig 1 Expression of RS1 in different tissues identified by the semi-quantitative RT-PCR

2.4 肝、脾和肾原位杂交结果

根据 RS1 已知序列设计特异双链 cDNA 探针，与放射小鼠的肝、脾脏和肾切片进行分别进行原位杂交。在放射小鼠的肝小叶及中央静脉区、脾脏红髓及中央动脉区和肾皮质区和等处均可见阳性着色，而阴性平行对照组小鼠的各组织中未见明显阳性着色，见图 2。



A：Liver(Control group)；B：Liver(RS1 group)；C：Spleen(Control group)；D：Spleen(RS1 group)；E：Kidney(Control group)；F：Kidney(RS1 group)

图 2 **RS1** 基因在不同组织的原位杂交结果 （× 200）

Fig 2 Results of RS1 expression in different tissues by *in situ* hybridization （×200）

2 讨论

我们在前期应用 mRNA 差异显示的方法研究小鼠肠上皮的辐射反应分子机制的研究工作中，分离到一EST 序列 RS1，和 Gene Bank 比对后未发现同源序列[5]，于是应用 RACE（cDNA 末端快速扩增）[7] 技术克隆其全长序列，但是结果不理想。用 RT－PCR 的方法分析，发现 RS1 在小肠的表达较低，同时考虑到肠上

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

皮细胞处于 RNAase 丰富的环境中, 提取高纯度的总 RNA 较困难, 影响了高质量的逆转录单链 cDNA 文库的构建, 导致基因克隆困难。RS1 在其它组织脏器的表达如何呢？是否存在高表达的、RNA 易提取的组织呢？为给进一步的基因克隆和功能研究提供线索和依据, 我们进行了 RS1 的组织表达谱分析。用逆转录 PCR 和原位杂交等方法证实了 RS1 可以在放射小鼠小肠上皮、肝脏、肾脏和脾脏等多种组织中表达, 而且在肾脏、脾脏等组织的表达丰度较高。这提示我们在应用 RACE 技术克隆全长基因时, 可以选择 RNA 易提取, 靶基因 mRNA 丰度高的肾脏、脾脏组织进行逆转录合成第一链 cDNA 模板, 提高 RACE 的成功率, 一定程度上避免非特异扩增。目前, 我们根据此策略, 在 RS1 cDNA 3′末端的克隆方面取得了很好的进展。

组织表达谱分析有多种形式, 可以应用 RT－PCR、原位杂交、Northern 杂交等多种手段, 各有优缺点。很多研究者在进行新基因的功能探索时应用 Clontech 等公司的 Multiple Tissue Northern Blots[8~10] 对相关基因在各组织的表达情况进行快速分析。但是原位杂交也有其不可替代的优势, 不仅可以初步了解新基因在各种组织的表达情况, 而且对表达阳性的细胞类型有一比较和估计。从本研究的初步结果来看, 在各种脏器的内皮细胞可能均有表达, 这提示我们可寻找相应的内皮细胞株进行表达鉴定, 建立体外模型, 应用 RNAi 等技术对其进行功能分析。另外, 原位杂交组织表达谱分析还可以将基因的表达和组织器官类型、细胞类型以及暴露、处理条件等多种因素联系起来, 为研究新基因的功能提供大量信息和线索。辐射对各种细胞的损伤实质基本相同, 主要是以基因组 DNA 和生物模为标靶, 并以此为信号诱导一系列的基因表达和生化级联反应, 最终导致细胞结构和功能的改变, 决定细胞的死亡、修复、存活和转化。但是不同组织和类型的细胞的辐射敏感性不同, 启动的信号转导途径也不同[11], RS1 在多种组织和细胞的辐射反应中起什么作用仍是值得研究和探讨的问题。总之, 对 RS1 的组织表达谱分析为我们进行下一步的基因克隆和功能研究提供了线索和基础, 同时对于类似的 EST 序列研究提供了一定的借鉴。

参考文献：

[1] Chakrabarti R, Robles L D, Gibson J, *et al*. Profiling of differential expression of messenger RNA in normal, benign, and metastatic prostate cell lines[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2002, 139(2): 115－125.

[2] Diachenko L, Lukyanov S, Lau Y F, *et al*. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes [J]. Methods Enzymol, 1999, 303: 349－380.

[3] Milla M A, Butler E, Huete A R, *et al*. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. Plant Physiol 2002, 130(4): 1706－1716.

[4] Wistow G, Bernstein S L, Ray S, Expressed sequence tag analysis of adult human iris for the NEIBank Project: steroid-response factors and similarities with retinal pigment epithelium[J]. Mol Vis, 2002, 15(8): 185－195.

[5] 王军平, 胡川闽, 粟永萍, 等. 辐射小鼠肠上皮细胞损伤基因的初步鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(6): 387－189.

[6] Evans E M, Wrigglesworth J M, Burdett K, *et al*. Studies on epithelial cells isolated from guinea pig small intestine[J]. J Cell Biol, 1971, 51(2): 452.

[7] 王锋超, 高京生, 粟永萍. 由 EST 到全长 cDNA-RACE 及相关技术进展生命的化学[J]. 2002, 3(22): 294－297.

[8] Tetsuya Okuda, Satoka Mita, Shinobu Yamauchi, *et al*. Molecular cloning, expression, and chromosomal mapping of human chondroitin 4-sulfotransferase, whose expression pattern in human tissues is different from that of chondroitin 6-Sulfotransferase[J]. Biochem, 2000, 128: 763－770.

[9] Tapan K, Maitra B R, Iavarone C, *et al*. PATE, a gene expressed in prostate cancer, normal prostate, and testis, identified by a functional genomic approach Proc[J]. Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 3058－3063.

[10] Orti R, Rachidi M, Vialard F, *et al*. Characterization of a novel gene, C21orf6, mapping to a critical region of chromosome 21q22.1 involved in the monosomy 21phenotype and of its murine ortholog orf5[J], Genomics, 2000, 64(2): 203－210.

[11] 夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 153－177.

（编辑　张大春）

欢迎订阅《中国医学文摘·儿科学》

《中国医学文摘·儿科学》是卫生部主管的国内医学文摘系列之一, 创刊于 1982 年, 先后 5 次荣获全国科技情报检索刊物评比三等奖。

本刊引用国内医学期近 260 余种, 文体采用文摘、提要、题录及综述形式。目录按疾病分类编排, 年终附有主题索引和作者索引。集儿科学术之精华, 展儿科进展之全貌, 具有言简意赅, 检索方便的特点, 是儿科临床、教学、科研工作者必备读物。中国标准刊号: ISSN-1001－1358, 国内统一刊号: CN21-1160/R, 国外总发行: 中国国际图书贸易公司, 邮发代号: 6787BM。双月刊, 大 16 开本, 64 页, 单价 6.30 元, 全年定价 37.8 元。邮发代号 8-162。全国各地邮局均可订阅, 亦可与我刊编辑部订购。

地址: 沈阳市苏家屯区乔松路 2 号《中国医学文摘·儿科学》杂志社魏赤平收　　邮编: 110101

电话: (024)89800910, 89800434　　传真: (024)89800920　　网址: Ekxbjblin @yahoo.com.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net