

## · 基础研究 ·

## 荧光差异显示 PCR 克隆大鼠脑缺血相关基因 KIAA0280

臧林泉, 银巍, 皮荣标, 邱鹏新, 苏兴文, 颜光美

(中山大学基础医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

**摘要** 【目的】研究大鼠急性局灶性脑缺血时缺血组织与非缺血组织中基因表达的差异, 克隆出与脑缺血相关的基因。【方法】应用荧光差异显示 PCR (FDD PCR) 从同一例大鼠大脑皮层缺血组织和非缺血组织中筛选出有表达差异的基因片段, 经反向 Northern blot 杂交, 将杂交阳性的片段且经 RT-PCR 反复验证, 选取差异明显的片段进行克隆测序; 经生物信息学分析处理, 选取同源性低的 EST 片段 R6, 利用 cDNA5' 端快速扩增 PCR (5' RACE 法) 进行基因全长的克隆。【结果】利用 5' RACE 法成功地克隆 EST 片段 R6 至编码区, 扩增并获取全长 4 821 bp 及完整的可读框 (ORF), RT-PCR 及 Northern blot 印迹结果证实了克隆的结果, 同源性分析发现该基因 ORF 与人大脑中已知的 KIAA0280 基因高度同源, 同源性 96%, 编码 166 个氨基酸, 为结构及功能未明确蛋白质, 该基因定位于大鼠第 11 号染色体长臂 (11q. 13)。【结论】应用荧光差异显示 PCR 成功地自大鼠体内克隆到与人 KIAA0280 相似的基因, 其在大鼠急性局灶性脑缺血中明显上调, 该蛋白质结构及功能均未见报道及研究, 其显著地差异表达提示其在脑缺血病理过程中具有重要作用。

关键词 差异显示 PCR; 大鼠; 脑缺血; 基因

中图分类号: R743. 302

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)02-0097-05

## Identification of Rat Ischemia Related Gene KIAA0280 by Fluorescence Differential Display PCR

ZANG Lin-quan, YIN Wei, PI Rong-biao, QIU Peng-xin, SU Xing-wen, YAN Guang-mei

(Department of Pharmacology, Preclinical Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract** : 【Objective】To study the differences in gene between acute focal ischemia and non ischemia tissues in rat so as to clone the related gene of brain ischemia. 【Methods】The fluorescence differential display was applied to screen the differential expression gene between focal brain ischemia and non ischemia region. After identification by reverse Northern blot and RT-PCR, the full length of the target EST R6 that was not highly homologous with the known gene was cloned by 5'RACE. 【Results】R6 in 4 821 bp full length was successfully cloned by 5'RACE and the open reading frame (ORF) was obtained. The results of Northern blot and RT-PCR were accorded with the cloned results. Homologous analysis showed that ORF of R6 was highly homologous (96%) with human brain gene KIAA0280, which encoded 166 amino acids. Nevertheless, the protein structure and function of KIAA0280 was unknown. This KIAA0280 gene was located in 11th Chromosome (11q. 13) of rat. 【Conclusion】The gene similarity to KIAA0280 is successfully cloned by fluorescence differential display from rat focal brain ischemia. It is up regulated in rat focal ischemia. The structure and function of KIAA0280 has not been reported. Its markedly differential expression suggests that it plays an important role in the pathogenesis of brain ischemia.

收稿日期: 2003-10-08

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (39625022); 美国中华医学会 CMB 基金资助项目 (98-677); 国家自然科学基金资助项目 (39900181); 广东省重点科研基金资助项目 (ZKM028091)

作者简介: 臧林泉 (1965 - ) 男, 河南确山人, 博士, 副研究员, 颜光美 教授, 博士生导师, 课题负责人. E-mail: zanglq@yahoo.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

**Key words:** differential display PCR ;rat ; cerebral ischemia ; gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(2): 97 ~ 101]

差异显示技术广泛应用于多种组织中 mRNA 的差异表达<sup>[1]</sup>。该方法具有高效、安全、快速、灵敏、可靠等优点。我们使用此种方法来筛选与急性局灶性脑缺血过程中相关差异表达的基因。中风与其他原因引起的急性局灶性脑缺血是目前威胁人类生命健康的重大疾病之一。各种病因引起的急性局灶性脑缺血,其病理生理过程均有共同的表现,缺血缺氧及再灌注引起的脑细胞凋亡是一个多步骤、多因素、序贯的复杂过程,涉及到多种基因及其产物的相互作用,多种信号通路相互调节和拮抗,深入了解急性脑缺血发生过程中的分子机制对于提高病人生存水平,推动脑缺血的预防和治疗的研究是十分必要的。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的制备

取每只体质量为 250 ~ 280 g 雄性大鼠 10 只,用 100 g/L 的水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉,尼龙线栓塞大脑中动脉(MACO)。动物手术苏醒后,以出现 Horner 氏症(眼裂变小),提尾左前肢内收屈曲或爬行时向左侧划圈者为手术成功的标志,20 g/L 2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色证实模型成功<sup>[2]</sup>。将动物放置在有保暖措施的环境(37 ± 0.5) °C 中,待缺血 120 min 后取脑组织进行液氮贮存或者立即用 Invitrogen 公司的 Trizol RNA 抽提试剂盒提取缺血和非缺血组织的 RNA。

### 1.2 mRNA 差异显示

采用 Genomex HIEROGLYPH mRNA Profile Kit 进行荧光差异显示逆转录聚合酶链反应(FDD RT-PCR),包括 12 个 3' 锚定引物和 20 个 5' 端随机引物及用四甲基罗丹明(TMR)标记的另一套相同的 12 个 3' 端锚定引物,包括:①缺血区和非缺血区组织中 RNA 提取;② RNA 质量鉴定;③逆转录反应(RT);④聚丙烯酰胺 3000 V 高压电泳;⑤ PCR 切胶回收差异条带;⑥ TA 克隆;⑦测序等。

### 1.3 反向 Northern blot

以  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (北京亚辉生物工程公司) 作为反应底物,利用反转录酶将 RNA 样品反转录成带

$\alpha^{32}\text{P}$  标记的 cDNA,胶回收试剂盒纯化探针。分别与缺血与非缺血脑组织所提取的 RNA 样品进行杂交,常规方法进行预杂交、杂交、曝光(36 h)显影定影,并行灰度分析。

### 1.4 cDNA 5' 端快速扩增(5'RACE)法

采用 Takara 公司的 5'RACE 试剂盒,RACE 是基于 PCR 技术,由已知部分 cDNA 顺序进行 PCR 扩增来获得完整 cDNA 5' 和 3' 端的方法<sup>[3]</sup>。由于 EST(expression sequence tag) 片段是从 3' 端反转录得到的,故仅利用 5'RACE 克隆未知全长即可得到未知基因全长,首先利用基因特异性引物和 Invitrogen 公司的 Superscript II 反转录酶将总 RNA 反转录成 cDNA,用 RNA 连接酶将其连接环化,再利用已知序列设计的两对 PCR 引物进行巢式 PCR(nest PCR) 扩增,即可扩增出未知片段部分,将克隆出的片段测序,RT-PCR 和 Northern blot 确认 RACE 结果。

### 1.5 RT-PCR

应用 RACE 扩增出的可读框(ORF) 序列(406 bp)设计上下游引物 F 和 R, $\beta$ -actin(250 bp) 作为参照,随机选取 6 只雄性大鼠进行线栓法制作局灶性脑缺血模型,将缺血及非缺血区反转录得到的 cDNA 作为 PCR 反应模板,PCR 参数为 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 1 min; 30 个循环; 72 °C, 10 min; 取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,对 KIAA0280 和  $\beta$ -actin 的 RT-PCR 产物进行灰度扫描,计算二者条带体积(条带面积乘以条带图像灰阶强度值) 比值。

### 1.6 Northern 杂交

Northern blot 试验采用 Roche 公司的 DNA Start DIG Labeling Kit II 标记和显色。以克隆出片段的 ORF 为模板,以地高新标记的 dUTP 作为荧光标记物,按照试剂盒说明标记 cDNA 探针,常规方法进行预杂交、杂交、显色。

### 1.7 序列同源性分析

输入 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的核酸库,用 Blastn 软件与 nr, dBEST 数据库比较,寻找感兴趣的 ESTs,判断基因的同源性及其特性,再在 UniGene 中查找相应的定位信息。

### 1.8 ORF 识别及编码氨基酸的相似性分析

对 RACE 扩增出的序列进行 ORF 识别, 将其编码的氨基酸序列利用 Blast 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) 进行相似性分析以初步了解所克隆基因的功能, 使用 DNASTar, Block (<http://www.blocks.fhere.org>) 和 PredictProtein (<http://cubic.bioc.columbia.edu/pp>) 对所克隆基因可能存在的结构域及可能的蛋白质结构进行预测。

## 2 结 果

### 2.1 RNA 含量及纯度

从缺血区脑组织中提取的 RNA 含量为  $2.53 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 其 A260/280 比值为 1.96。非缺血区(正常)RNA 含量为  $3.31 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 其 A260/280 比值为 1.92。通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 28S 和 18S 处 RNA 比值为 2:1。检测结果表明所提取的 RNA 含量较高, 并且没有 RNA 降解。

### 2.2 mRNA 差异显示结果

反应产物行高分辨率变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经激光扫描后得到差异表达图谱。从图上我们按照左右灰度比大于 2.0 或小于 0.5 扣胶回收, 共扣胶 27 条; 再扩增后电泳验证共得到差异条带 27 条, 其中在缺血侧上调表达的有 17 条。经过筛选、测序行序列分析后, 得到 15 个序列(含两个相同序列, R10 与 R17), 其中 3 个为低同源性序列, 12 个为已知序列。R6 为低同源性序列之一, 其在缺血区和非缺血区中差异显著, 在缺血区条带 R 中明显上调表达, 在非缺血区中基本看不到条带(图 1)。

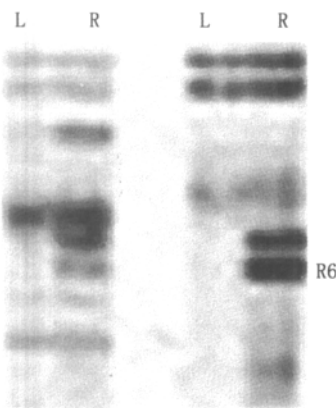


图 1 大鼠脑缺血相关基因 FDD PCR 差异部分图谱

Fig. 1 Partial map of FDD PCR in Rat brain ischemia

The high expression of R6 in ischemia. L. Non ischemia; R. Ishemia

### 2.3 反向 Northern 杂交结果

图 2 是反向 Northern 杂交的结果, 左边是非缺血侧的 mRNA 合成的探针杂交的结果; 右边是缺血侧的 mRNA 合成的探针杂交的。RNA 上样量和探针量均为相同剂量且缺血侧与非缺血侧样本均来自同一动物, 从图中可见, R6 两个点均可见阳性杂交斑点, 且缺血区斑点信号强度高于非缺血区信号, 表明 R6 为阳性片段, 且在急性缺血中上调表达, 验证了差异显示的结果。

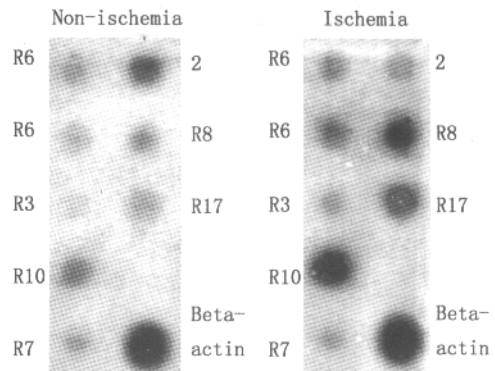


图 2 大鼠脑缺血相关基因反向 Northern blot 杂交结果分析

Fig. 2 The results analysis of reverse Northern blot in rat brain ischemia

On the left: The non ischemia hybridized results is obtained from probe synthesized from mRNA of non ischemia area; on the right: The ischemia hybridized results is obtained from probe synthesized from mRNA of ischemia area

### 2.4 5'RACE 全长克隆

根据 5'RACE 的原理, 利用已知的 EST 片段设计出片段特异性的 RT 引物和两对 PCR 引物, 提取缺血区总 RNA, 经反转录后进行环化, 再进行两轮 PCR 反应(巢式 PCR), 两轮反应均分别以上、下游单边引物和空白模板作为对照排除假阳性扩增和非特异性扩增, 结果测序, 待完全找到引物及重叠片段之后, 制备 DNA 探针进行 Northern blot 杂交分析, 确定片段大小, 若未得到全长, 继续在获得片段的 5'端设计引物进行新一轮的扩增直至得到全长, 结果得到 4 821 bp 的片段。与 Northern blot 杂交信号基本一致。同源性检索分析发现与从人大脑克隆出的 KIAA0280 基因相似, 同源性高达 98%, 开放阅读框含 166 个氨基酸, 但是其结构和功能尚未明了。对 KIAA0280 所编码的氨基酸序列进行功能预测, prosite 软件提示 KIAA0280 末尾第 115 - 134 氨

氨酸和 119-128 氨基酸为跨膜区 ,且在 118 - 132aa 处为螺旋状二级结构。

### 2.5 Northern blot 杂交

Northern blot 杂交表明我们克隆的大鼠 KIAA0280 分子为 4 821 bp , 与 RACE 获得的序列基本一致 图 3。

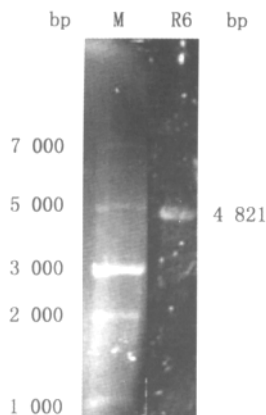


图 3 大鼠脑缺血相关基因 Northern blot 分析

Fig. 3 Northern blot analysis in rat brain ischemia

Northern Blot analysis was performed in cerebral ischemia area, which shows only one specific band (4 821 bp band in R6 lane). This result conformed the full length of the gene we got is 4 821 bp (M lane is maker)

### 2.6 RT-PCR

以克隆 ORF 长度为模板设计出一对引物 ,以  $\beta$ -actin 作为参照 ,随机选取 6 只大鼠制作急性局灶性脑缺血模型 ,结果可见缺血区与非缺血区差异有统计学意义 ,进一步证实了差异显示的结果图 4。KIAA0280 与  $\beta$ -actin RT-PCR 扩增条带的灰度扫描体积比值 ( $V_{R6}/mm^3/V_{\beta\text{-actin}}/mm^3$ ) 见表 1 ,  $t$  检验显示其差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

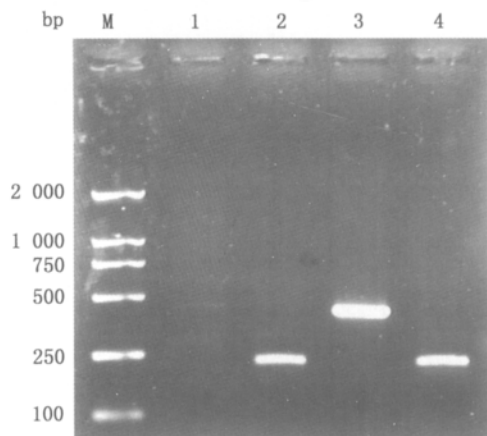


图 4 大鼠脑缺血相关基因 KIAA0280 RT-PCR

Fig. 4 RT-PCR Result of KIAA0280 in Rat brain ischemia

M: DNA marker; Lane 1: KIAA0280 in non ischemia rat brain; Lane 2:  $\beta$ -actin band in non ischemia rat brain; Lane 3: KIAA0280 in ischemia rat brain; Lane 4:  $\beta$ -actin in ischemia rat brain

表 1 R6 与  $\beta$ -actin RT-PCR 扩增产物的灰度扫描体积比值

Table 1 The volume ratio of R6 and  $\beta$ -actin band in RT-PCR

	<i>n</i>	$V_{R6}/mm^3$	$V_{\beta\text{-actin}}/mm^3$	$V_{R6}/mm^3 / V_{\beta\text{-actin}}/mm^3$
Ischemia	6	382 910 $\pm$ 5 892	201 876 $\pm$ 2 374	1. 896 8 $\pm$ 0. 235 6
Non-ischemia	6	109 823 $\pm$ 1 562	213 875 $\pm$ 3 122	0. 513 5 $\pm$ 0. 102 1

Compare of ischemia and non-ischemia with student test , $t = 0.000 186 P < 0.001$

## 3 讨 论

大量研究表明 ,脑缺血后差异表达的基因参与脑缺血损伤过程并起到一定的关键作用。研究脑缺血后基因差异的表达可以探明缺血后脑或神经元损伤的机理 ,而且可能为预防和治疗缺血性脑疾病开辟一条新途径。基因的差异表达可以通过简单的成熟技术鉴定 ,如 Northern 杂交、RT-PCR、原位杂交等。这类技术只适用于特异的有限的已知基因 ,不适合研究大量起关键作用的未知基因。随着分子生物学技术发展 ,对于脑缺血基因差异表达谱分析可采用近年来发展成熟的新方法 ,如消减文库/消

减杂交法 (subtractive libraries / subtractive hybridization) 、代表性差异分析法 (representational differential analysis) 、差异显示 (differential display) DNA 芯片(DNA chip) 等。使用这些技术不仅可以研究已知的基因 ,而且可以发现未知的基因。荧光差异显示 PCR 方法具有高效、安全、快速、灵敏、可靠等优点 ,可以高效地克隆出不同病理生理条件下差异表达的基因。但是 mRNA 差异显示方法有假阳性率较高的特点 [4] ,为克服这些缺点 ,我们采用反向 Northern 杂交确定阳性片段 ,多次 RT-PCR 对阳性片段进行再验证其在缺血与非缺血侧的差异表达 ,基本排除了假阳性差异片段和片段假性差异表达的可能性 ,经克隆测序后将同源性低

的片段 R6 利用 5'RACE 再进行全长克隆。

结果我们成功地克隆了该基因,其结果经 Northern blot 证实,含有完整的 ORF,同源性分析发现其与人大脑中克隆出的 KIAA0280 基因高度同源。该基因定位于大鼠第 11 号染色体长臂 11q.13,蛋白质结构及功能预测表明该蛋白质具有一跨膜区,且本区域附近同时也富含螺旋状二级结构,表明其为一重要的结构域,其功能可能与生物膜转运通道或者膜上受体有关,氨基酸同源性分析表明 KIAA0280 编码的蛋白质与已知蛋白质未见同源性,为未知蛋白质,其结构及功能尚待研究阐明。总之,大鼠体内 KIAA0280 表达的蛋白质可能为胞膜上一新的蛋白质,它在胞浆中以何种形式存在及作为胞膜一种受体怎样传递信号及传递何种信号尚待深入研究。

生物信息学分析研究还发现, KIAA0280 在人体内有两条 mRNA 序列,其长度分别为 6 909 bp 和 6 837 bp;也定位于第 11 号染色体。大鼠体内与 KIAA0280 同源性在 95% 以上的 mRNA 序列有 8 条之多,分子大小分别为 1 445、2 660、2 674、3 273、4 068、4 137、6 329 bp,我们克隆的片段大小为 4 821 bp,它们在 5'端和蛋白质编码区一致性很好,3'端差异却很明显,说明蛋白质的编码序列可能具有高度的保守性,这与多基因家族的特点相吻合<sup>[5,6]</sup>。我们自大鼠体内克隆得到的 KIAA0280 基因就可能是某种多基因家族中的一个成员。

RACE 技术的主要优点是快速、灵敏,短时间内即可获得新基因的 cDNA 全长,如果一个基因是多基因家族的成员,用基因特异性引物(GSP)可能同时扩增几个高度同源的 cDNAs<sup>[7]</sup>。但是,我们是从 3'端设计引物进行 RACE 扩增,3'UTR (untranslated region)很少含有内含子和如编码区内的保守序列,更能确切地代表基因<sup>[8]</sup>,在进行 RACE 时从缺血区脑组织中仅扩增出一条产物,还是有相当高的特异性的。尽管如此,RACE 方法扩增的片段受到反转录阶段的影响比较大,反转录长度不同就得到不同长度的 cDNA,RACE 扩增出的片段长度也不等。使用高保真、高效地扩增长片段的逆转录酶就显得十分重要,在本实验中,我们采用 Invotrogen 公司的 Supers Cript II 反转录出的产

物进行 RACE 扩增,一次就可以扩增出 2.4 kb 的片段,最多经过 1~3 次 RACE 扩增即可得到目的片段。

我们现在正在进行其正义表达载体及 RNAi 表达载体的构建,导入原代培养的大鼠皮层和小脑颗粒细胞中,观察对由于缺氧、谷氨酸兴奋性和低钾诱导神经细胞凋亡后的影响,检测 KIAA0280 被阻断后对细胞生长表形的影响,纯化 KIAA020 蛋白质制备单抗,检测其在神经组织中的蛋白质水平的表达和定位情况。

#### 参考文献:

- [1] Verkoczy L K, Berinstein N L. Isolation of genes negatively or positively co-expressed with human recombination activating gene 1 (RAG1) by differential display PCR (DD RT-PCR)[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(19): 4497-507.
- [2] 雷万隆,袁群芳,张怀波,等. 脑缺血性半影区胶质细胞和神经元重组的形态学观察[J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(1): 29-32.
- [3] Wang X, Young W S. Rapid amplification of cDNA ends [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 226(1): 105-16.
- [4] Sompariyac L, Jane S, Burn T C, et al. Overcoming limitations of the mRNAs differential display technique [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 33(7): 4738-9.
- [5] Koonin E V. Cell cycles and apoptosis: possible role of Gadd45 and MyD118 proteins inferred from their homology to ribosome proteins[J]. *J Mol Med*, 1997, 75(4): 236-8.
- [6] Hardiman G, Kastelein K A, Bazan J F. Isolation, characterization and chromosomal location of human WNT10B[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1997, 77(27): 278-82.
- [7] Makalowski W, Zhang J, Boguski M S. Comparative analysis of 1 196 orthologous mouse and human full length mRNA and protein sequences[J]. *Genome Res*, 1996, 6(9): 846-57.
- [8] Diffenbach C W, Dveksler G S. PCR primer: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. 8. 61-8. 63.

(编辑 张敏瑞)