

- [7] 倪志宇, 丛斌, 李淑瑾, 等. CCK-8 对 LPS 攻击小鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10 表达的影响. 中国病理生理杂志, 2007, 23(2): 331-335.
- [8] 路璐, 王月英, 李德冠, 等. LPS 对辐射暴露后小鼠血清 IL-10、IL-6 和 TNF- α 水平的影响. 中国辐射卫生, 2010, 19(3): 265-266.
- [9] 李德冠, 王月英, 路璐, 等. 辐射对小鼠免疫系统损伤远期影响的研究. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(12): 1362-1363.

(收稿日期: 2012-04-04)

IRM-2 小鼠全长 cDNA 编码蛋白质分析

王芹 刘晓秋 李进 杜利清 孙志娟 王彦 刘强 宋力 樊飞跃

【摘要】 目的 分离和鉴定 IRM-2 小鼠辐射抗性相关基因。方法 以 IRM-2 小鼠的 21 条表达序列标签为模板进行 PCR 扩增, 从 IRM-2 小鼠全长 cDNA 文库中测定 cDNA 克隆的序列, 通过与 GenBank 进行同源序列信息比对, 对全长 cDNA 编码的蛋白质进行分析。结果 从 IRM-2 小鼠全长 cDNA 文库中获得 5 条全长 cDNA 序列, 与小鼠已知基因不同源, 得到了可能编码蛋白质的氨基酸序列和蛋白质的理化性质等信息。结论 通过对全长 cDNA 编码的蛋白质进行分析, 提示 IRM-2 小鼠体内可能存在目前尚未发现的辐射抗性相关基因。

【关键词】 文库; 表达的序列标记; 数据库; 核酸; IRM-2 小鼠

Analysis of proteins encoded by full-length cDNA sequence from IRM-2 mouse WANG Qin, LIU Xiao-qiu, LI Jin, DU Li-qing, SUN Zhi-juan, WANG Yan, LIU Qiang, SONG Li, FAN Fei-yue. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: FAN Fei-yue, Email: faithyfan@yahoo.com

【Abstract】 **Objective** To screen and isolate radioresistance-related genes from IRM-2 mouse. **Methods** Full-length cDNA products were amplified by PCR from IRM-2 mouse cDNA library according to twenty-one pieces of expressed sequence tags. The property of proteins encoded by full-length cDNA were analyzed by comparing with GenBank database. **Results** Five pieces of full-length cDNA which were not the same source as the known mice genes were found out from IRM-2 mouse cDNA library. Amino acid sequence and property of proteins encoded by these five pieces of full-length cDNA were obtained. **Conclusion** Proteins encoded by full-length cDNA imply that unknown radioresistance-related genes may exist in IRM-2 mouse.

【Key words】 Library; Expressed sequence tags; Database; Nucleic acid; IRM-2 mice

IRM-2 小鼠是我所培育的近交系小鼠品系, 其突出的生物学特性是具有较强的辐射抗性^[1]。根据 mRNA 差异显示分析获得的 21 条表达序列标签 (expressed sequence tags, EST) 与已知小鼠基因非同源^[2], 本研究利用 IRM-2 小鼠全长 cDNA 文库^[3]测定 cDNA 克隆的序列, 通过与 GenBank 进行同源序列信息比对, 分析全长 cDNA 编码蛋白质的性质, 为从分子水平上揭示 IRM-2 小鼠抗辐射特性

的本质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

IRM-2 小鼠全长 cDNA 文库^[3]由我所构建并保存。质粒小量提取试剂盒和琼脂糖购自美国 Promega 公司, pDNR-lib 载体和 pGM-T 载体购自美国 Invitrogen 公司, 21 对引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 大肠杆菌 DH5 α 购自北京天根公司, 氨苄青霉素、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷和 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷购自美国 Roche 公司。主要仪器包括美国 Thermo 公司生产的 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司生产的 Gel Doc

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1673-4114.2012.03.009

基金项目: 国家自然科学基金(30870583); 中国医学科学院放射医学研究所学科发展基金(SF0822)

作者单位: 300192 天津, 北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 樊飞跃 (Email: faithyfan@yahoo.com)

1000 凝胶成像仪。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及 PCR 扩增

从已构建好的 IRM-2 小鼠全长 cDNA 文库混合甘油菌中抽提质粒, 根据已知的 21 条 EST 部分序列设计 21 对引物。以文库质粒 pDNR-lib 为模板, 分别与 pDNR-lib 载体上多克隆位点两侧的通用引物 M13+ 和 M13- 配对进行 PCR 扩增全长。PCR 扩增的条件为 94 °C 变性 30 s, 40 °C 退火 2 min, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环。

1.2.2 文库中 cDNA 克隆的序列测定

切胶回收 PCR 产物中长度为 500~1000 bp 的片段, 纯化 PCR 产物, 将 PCR 产物接入 pGM-T 载体, 并转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经氨苄青霉素、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷和 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷筛选, 挑取阳性克隆进行培养并抽提质粒, 使用 pGM-T 载体通用引物 T7、SP6 进行序列测定。

1.2.3 文库中 cDNA 克隆的序列分析

使用 Phred 软件去除低质量序列和屏蔽载体序列, 使用 Phrap 软件进行序列拼接, 导出拼接序列。将拼接序列放入 GenBank 数据库中进行比对, 寻找同源序列信息。对获得的全长 cDNA 克隆进行序列分析, 预测可能编码蛋白质的氨基酸序列及结构, 在 Zepfan 数据库中寻找 cDNA 的隶属家族。

2 结果

2.1 全长 cDNA 编码蛋白质的序列

根据已知的 21 条 EST 序列, 以文库质粒 pDNR-lib 为模板进行 PCR 扩增全长, 通过 PCR 产物的拼接, 获得了 5 条全长 cDNA 序列。经与 GenBank 数据库进行比对, 发现其与小鼠已知基因不同源。经 GenBank 数据库分析, 得到可能编码蛋白质的氨基酸序列如下:

①第 1 条全长 cDNA 编码蛋白质的氨基酸序列:
MSIMDHSPPTTGVTIVILIAIALGALILGCWCYLR
LQRISQSEDEESIVGDGETKEPFLVQYSAK GPCVE
RKAKLMPNGPEVHG

②第 2 条全长 cDNA 编码蛋白质的氨基酸序列:
MAAVSVFQPPVGGFSFDNCRRAVLEA DFAK KGF
KLPKARKTGTTIAGVVYKDGIVLGADTRATEGM VV
ADKNCSKIHFI SPNIYCCGAGTAADTDMTTQLISSNL
ELHSLTTGRLPRVVTANRMLKQMLFRYQGYIGAAL

VLGGVDVTGPHLYSIYPHGSTDKLPYVTMCGSGLAA
MAVFEDKFRPDMEEEEAKKLVSSEAIAAGIFNDLG S
GSNIDLCVISKSKLDLFRPFSVPNKKGTRLGRYRCEK
GTTAVLTEKVTPLEIEVLEETVQTMDTS

③第 3 条全长 cDNA 编码蛋白质的氨基酸序列:
MTQGV TENKKIQYQDNQTTTGLQFIETRAVLTLRSV
EEMSIGEMAGSY SFFPPPP

④第 4 条全长 cDNA 编码蛋白质的氨基酸序列:
MPLPVQVFNLQGA VEPMQIDVPQEDPQNAPDVNY
VVENPSLDLEQY AASYSGLMRIERLQFIADHCP TLR
VEALKMALS FVQRTFNVD MYEEIHRKLSEATR SSIR
ELQNAPDAIPESGVEPPALDTAWVEATRKKALLKL
EKLD TDLKNYKGN SIKESIRRGHDDLGDHYLD CG
DLSNALKCYSRARDYCTSAKHVINMCLNVIKVS VY
LQNWSHVSIVS KAESTPEIAEQRGERDSQTQAILT
KIKCAAGLAELAARKYKQA AKCLLLASFDCDFPE
LLSPSNVAIYGGLCALATFDRQELQRNVISSSS FKL F
LELEPQVRDIHFKFYESKYASCLKMLDEM KDNLLD
MYLAPHVRTLYTQIRNRALI QYFSPYVSADMHRMA
AAFNTTVA ALEDEL TQLILEGLISARVDSH SKILYAR
DVDQRSTTFEKSLLMGKEFQRRAKAMMLRAA VLR
NQIHVKSPPREGSQGE LTPANSQSRMSTNM

⑤第 5 条全长 cDNA 编码蛋白质的氨基酸序列:
MAAAVVDPPQSVVMRVANLPLVSSTYDLVSSAYVS
TKDQYPYLR SVCEMA EKGVKTVTSAAMTSALPHIQK
LEPQIAVANTYACKGLDRMEERLPILNQPTSEIVASA
RGAVTGAKDVVTTMAGAKDSVASTV SGVVDK TK
GAVTGSVERTKSVVNGSINTVLGMVQFMNSGVDNA
ITKSELLVDQYFPLTQEELEMEAKKVEGFDMVQKPS
NYERLESLS TKLCSRAYHQALSRVKEAKQKSQETIS
QLHSTVHLIEFARKNMHSANQKIQAQDKLYVSWV
EWKRSICYDDTDESHC VEHIESRTLAIARNLTQQ LQ
TTCQTVLVNAQGLPQNTQDQAKHLGVMAGDIYSVF
RNAASFKEVSDGVLTSKQGLQKMKESLDEVMDFY
VNNTPLNWLVPFYPQSTEVNKASLKVQQSEVKAQ

2.2 全长 cDNA 编码蛋白质的理化性质

通过 GenBank 数据库预测可能编码蛋白质的氨基酸序列, 得到 5 条全长 cDNA 编码蛋白质的理化性质信息(表 1)。

2.3 全长 cDNA 的隶属家族

利用 Zepfan 数据库, 寻找 5 条全长 cDNA 的隶属家族, 其中, 3 号和 4 号 cDNA 在数据库里没有查到隶属家族(表 2)。

表1 IRM-2 小鼠 5 条全长 cDNA 编码蛋白质的理化性质

编号	氨基酸残基数(个)	相对分子质量	氨基酸平均相对分子质量	等电点	电荷数(pH=7.0)
1	88	9 497	107.9	4.99	-2.0
2	277	29 891	107.9	8.11	4.0
3	55	6 169	112.2	4.41	-2.0
4	491	55 536	113.1	6.73	1.5
5	425	46 646	109.7	6.87	1.5

表2 IRM-2 小鼠 5 条全长 cDNA 的隶属家族

编号	隶属家族
1	此家族成员含有一个能部分结合到磷脂双分子层的螺旋结构,它与磷脂双分子层表面相互作用,通过结合自由的连接域参与凋亡的启动
2	此蛋白酶体是一种新型的细胞内复合物,具有 15 个蛋白水解作用的亚单位。这些亚单位的同类物位于主要组织相容性复合物的两个转运蛋白之间,通过水解细胞内抗原参与抗原递呈
3	Zepfan 数据库里未查到
4	Zepfan 数据库里未查到
5	属于围脂滴蛋白家族成员,此家族包括脂滴相关蛋白和脂肪分化相关蛋白

3 讨论

cDNA 文库构建是用于基因分离、克隆及筛选新基因进而开展基因功能研究的基本手段^[4-5]。利用全长 cDNA 文库不仅能获得完整的目的基因序列和功能信息,还有利于后期蛋白质表达及功能分析。基因差异表达分析是研究相关基因功能的重要手段^[6-7]。本研究通过 mRNA 差异显示获得与已知小鼠基因非同源的 21 条 EST,从构建的 IRM-2 小鼠全长 cDNA 文库中获得了 5 条全长 cDNA 序列。经 GenBank 数据库分析,发现与小鼠已知基因不同源,得到了可能编码的蛋白质的氨基酸序列。通过 GenBank 数据库预测得到了 5 条全长 cDNA 编码蛋白质的理化性质,为从分子水平上揭示 IRM-2 小鼠抗辐射特性的本质奠定了基础。

物种表现出较强的辐射抗性是极其复杂的生物学过程,除了与修复功能因素有关外,不排除辐射抗性基因或抗性相关基因的表达。本研究在利用 Zepfan 数据库寻找 5 条全长 cDNA 的隶属家族时,发现 3 号和 4 号 cDNA 在数据库里没有查到隶属家族。提示 IRM-2 小鼠体内可能存在目前尚未发现的辐射抗性相关基因,参与其辐射抗性的形成。通过对辐射敏感性的研究来探讨辐射损伤及其机制是放射生物学研究的热点课题^[8-9],辐射抗性相关基因的发现将对辐射损伤及其修复机制研究提供新的

理论依据。在下一步的研究中,我们将观察小鼠胚胎成纤维细胞经照射后全长 cDNA 的表达和全长 cDNA 转染对辐射敏感细胞生长的影响,深入探讨全长 cDNA 在 IRM-2 小鼠抗辐射机理中发挥的作用。

参 考 文 献

[1] 王芹,岳井银,李进,等.电离辐射诱发小鼠脾细胞 DNA 链断裂及修复.中国辐射卫生,2007,16(1):17-20.

[2] 王芹,岳井银,李进,等.辐射抗性小鼠与其亲代差异基因的表达序列标签.苏州大学学报:医学版,2009,29(1):1-3.

[3] 王芹,李进,宋力,等.IRM-2 小鼠全长 cDNA 文库的构建及鉴定.中华放射医学与防护杂志,2010,30(3):274-278.

[4] Zheng D, Zhou Y, Zhang Z, et al. 3C vector-primer plasmid for constructing full-length-enriched cDNA libraries. Anal Biochem, 2008, 380(1): 149-151.

[5] Choi YL, Kaneda R, Wada T, et al. Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. Leuk Res, 2007, 31(2): 203-209.

[6] 饶亚岚,陈肖华,王琳,等.7 Gy γ 射线照射后 4 h 小鼠骨髓差异表达基因的初步研究.国际放射医学核医学杂志,2007,31(4):245-247.

[7] 李智恒,李雨. C57 小鼠受照后胸腺细胞基因表达谱的变化.国际放射医学核医学杂志,2007,31(4):240-244.

[8] 史芳,王芳. ATM 基因与 AT 细胞辐射敏感性的研究进展.国际放射医学核医学杂志,2007,31(4):248-250.

[9] 郭阳. DNA 链间交联的修复与辐射敏感性.国际放射医学核医学杂志,2007,31(6):371-372.

(收稿日期:2012-03-28)