

·论著·

# 抗辐射小鼠 cDNA 文库的全长 cDNA 功能鉴定

王芹 刘晓秋 徐畅 杜利清 孙志娟 王彦 刘强 宋力 李进 樊飞跃

**【摘要】目的** 鉴定 IRM-2 小鼠 cDNA 文库的全长 cDNA 功能。**方法** 以 IRM-2 小鼠的 21 条表达序列标签为引物进行 PCR, 从 IRM-2 小鼠全长 cDNA 文库中测定 cDNA 克隆的序列。观察小鼠胚胎成纤维细胞经 6.5 Gy  $\gamma$  射线照射后全长 cDNA 的表达和全长 cDNA 转染对辐射敏感细胞共济失调性毛细血管扩张症(AT)5B1VA 细胞生长的影响。**结果** 小鼠胚胎成纤维细胞经照射后, IRM-2 小鼠 4 号、5 号和 2 号 cDNA 表达水平高于其亲本 ICR 小鼠和 615 小鼠。将全长 cDNA 转染 AT5B1VA 细胞, 经照射后 4 号、5 号和 2 号 cDNA 细胞存活率较高。**结论** IRM-2 小鼠 4 号、5 号和 2 号全长 cDNA 具有较强的抗辐射功能。

**【关键词】** 寡核苷酸序列分析; 基因文库; IRM-2 小鼠

**The function analysis of full-length cDNA sequence from IRM-2 mouse cDNA library** WANG Qin, LIU Xiao-qiu, XU Chang, DU Li-qing, SUN Zhi-juan, WANG Yan, LIU Qiang, SONG Li, LI Jin, 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: LIU Qiang, Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn

**【Abstract】Objective** To identify the function of full-length cDNA sequence from IRM-2 mouse cDNA library. **Methods** Full-length cDNA products were amplified by PCR from IRM-2 mouse cDNA library according to twenty-one pieces of expressed sequence tag. The expression of full-length cDNAs were detected after mouse embryonic fibroblasts were exposed to 6.5 Gy  $\gamma$ -ray radiation. And the effect on the growth of radiosensitivity cells AT5B1VA transfected with full-length cDNAs was investigated. **Results** The expression of No.4, 5 and 2 full-length cDNAs from IRM-2 mouse were higher than that of parental ICR and 615 mouse after mouse embryonic fibroblasts irradiated with  $\gamma$ -ray radiation. And the survival rate of AT5B1VA cells transfected with No.4, 5 and 2 full-length cDNAs was high. **Conclusion** No.4, 5 and 2 full-length cDNAs of IRM-2 mouse are of high radioresistance.

**【Key words】** Oligonucleotide array sequence analysis; Gene library; IRM-2 mice

IRM-2 小鼠是我所培育的近交系小鼠品系, 我们通过对 IRM-2 小鼠及其亲本 ICR 小鼠与 615 小鼠比较, 结果发现, IRM-2 小鼠突出的生物学特性是具有较强的辐射抗性<sup>[1]</sup>。通过 mRNA 差异显示分析已获得的 21 条表达序列标签与已知小鼠基因非同源<sup>[2]</sup>, 提示 IRM-2 小鼠体内可能存在辐射抗性相关基因和某种保护机制。本研究从构建的全长 IRM-2 小鼠 cDNA 文库<sup>[3]</sup>测定 cDNA 克隆的序列, 对得到的全长 cDNA 进行功能鉴定, 分析全长

cDNA 在 IRM-2 小鼠辐射抗性中发挥的作用, 从分子水平上揭示抗辐射特性的本质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠胚胎成纤维细胞由本实验室原代培养<sup>[4]</sup>, 共济失调性毛细血管扩张症(ataxia telangiectasia, AT)5B1VA 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。质粒小提试剂盒和琼脂糖由美国 Promega 公司提供, TRizol 试剂、pDNR-lib 载体和 pGM-T 载体由美国 Invitrogen 公司提供, 21 对引物由上海生工生物工程技术服务有限公司提供, 大肠杆菌 E.coli DH5 $\alpha$  由北京天根生化科技有限公司提供, Rediprime II Random Prime Labelling System 和杂交

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.05.002

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: 刘强(Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn)

液由美国 Amersham Biosciences 公司提供。主要仪器有 PCR 仪(美国 MJ 公司)真空印迹装置和 Gel Doc 1000 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源由加拿大 Nurdion 公司提供, 紫外分光光度计由美国 Beckman 公司提供。

## 1.2 方法

### 1.2.1 21 对引物的 PCR 扩增

在已构建好的全长 IRM-2 小鼠 cDNA 文库中<sup>[3]</sup>混合从甘油菌中抽提的质粒, 根据已知的 21 条表达序列标签部分序列设计 21 对引物<sup>[5]</sup>, 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 扩增条件为 94 °C 30 s, 40 °C 2 min, 72 °C 30 s, 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 500~1000 bp 片段, 纯化 PCR 产物, 将 PCR 产物连接入 pGM-T 载体, 转化 DH5 $\alpha$  感受态大肠杆菌, 经氨苄、异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷/5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -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 进行测序。

### 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 软件进行拼接, 导出拼接序列。将拼接序列放入 GenBank 数据库进行比对, 寻找同源序列信息, 对获得的 5 条全长 cDNA(随机编号为 1~5 号)克隆进行序列分析。

### 1.2.4 小鼠胚胎成纤维细胞经照射后全长 cDNA 的表达

培养 IRM-2 小鼠、亲代 ICR 小鼠和 615 小鼠胚胎成纤维细胞至对数生长期, 经 6.5 Gy  $\gamma$  射线照射后提取总 RNA, 对 30  $\mu\text{g}$  总 RNA 进行 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 将凝胶真空印迹转至尼龙膜上。按 Rediprime II Random Prime Labelling System 的说明书上的操作步骤, 用 1.85 MBq  $^{32}\text{P}$  脱氧胞苷三磷酸标记的文库筛选时使用的特异引物的 PCR 产物为探针, 进行 Northern blot 杂交, 以  $\beta$ -actin(北京中杉金桥公司)为内参。用 2 $\times$ SSC(主要成分为氯化钠和柠檬酸钠), 0.1% 十二烷基硫酸钠洗膜后, 将膜放在暗盒里进行放射自显影, 洗片。用 Doc1000 凝胶成像系统采集图像, 用 Molecular Analysis<sup>TM</sup> 软件分析 DNA 条带分布及灰度关系。

### 1.2.5 全长 cDNA 转染 AT5B1VA 细胞

将全长 cDNA 克隆至 pMD20-T 表达载体, 转染 AT5B1VA 细胞。待 AT5B1VA 细胞处于对数生长期时, 胰酶消化后将细胞接种于 100 mm 培养皿中, 每皿 3000 个细胞。待细胞贴壁后进行 6.5 Gy  $\gamma$  射线照射, 将培养皿置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 14 d, 可观察到有克隆形成。倒去上清液, 用磷酸盐缓冲液洗涤, 加入 75% 甲醇固定液固定 5 min。弃去固定液, 加入 0.5% 结晶紫染色液(北京普博欣公司)染色 5 min, 在显微镜下计数克隆, 以每团细胞数大于 50 个时作为一个克隆。克隆形成率(%)=集落数/接种细胞数 $\times$ 100%

### 1.2.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠胚胎成纤维细胞经照射后全长 cDNA 的表达结果

IRM-2 小鼠、亲代 ICR 小鼠和 615 小鼠胚胎成纤维细胞经 6.5 Gy  $\gamma$  射线照射后, 全长 cDNA 表达水平由高到低的顺序是 4 号、5 号、2 号、1 号、3 号。IRM-2 小鼠 4 号、5 号和 2 号 cDNA 表达水平均高于其亲本 ICR 小鼠和 615 小鼠, 其中 IRM-2 小鼠 2 号 cDNA 表达水平显著高于其亲本 ICR 小鼠和 615 小鼠 ( $F=20.17$ ,  $P < 0.05$ ;  $F=25.19$ ,  $P < 0.05$ ); IRM-2 小鼠与其亲本 ICR 小鼠和 615 小鼠相比, 1 号和 3 号 cDNA 表达无明显差异, 见图 1。

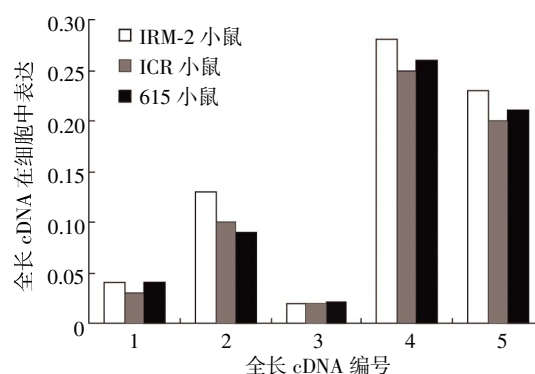


图 1 5 条全长 cDNA 在小鼠胚胎成纤维细胞中的表达

### 2.2 全长 cDNA 转染对 AT5B1VA 细胞生长的影响

经 6.5 Gy  $\gamma$  射线照射后, 4 号 cDNA 细胞存活率最高(18%), 5 号次之(16%), 2 号居中(11%),

1号和3号最低(2%~3%),见图2。结果提示,4号、5号和2号cDNA具有较强的抗辐射功能。

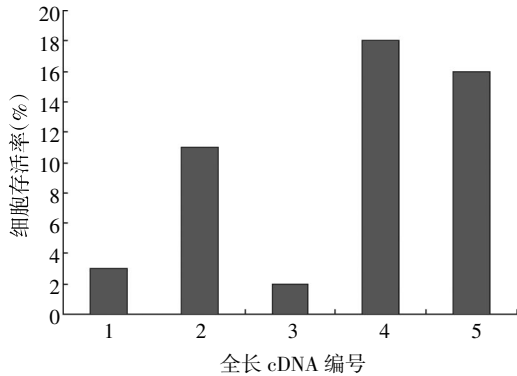


图2 5条全长cDNA转染后共济失调性毛细血管扩张症5B1VA细胞的存活率

### 3 讨论

自20世纪70年代首例cDNA克隆问世以来,从cDNA文库中获得全长cDNA和大规模测序发掘新基因是目前cDNA文库最广泛的用途<sup>[6-8]</sup>。目前国内外文献常常通过分析照射后差异表达基因的变化来研究基因的抗辐射功能<sup>[9-11]</sup>。我们在前期研究中通过mRNA差异显示获得与已知小鼠基因非同源的21条表达序列标签,从构建的全长IRM-2小鼠cDNA文库中获得了5条全长cDNA序列。经与GenBank数据库进行比对,发现与小鼠已知基因不同源。通过预测可能编码蛋白质的氨基酸序列,得到5条全长cDNA编码蛋白质的性质<sup>[4]</sup>。

本研究中我们用全长cDNA转染AT5B1VA细胞,经照射后发现4号、5号和2号cDNA细胞存活率较高。小鼠胚胎成纤维细胞经照射后发现,IRM-2小鼠4号、5号和2号cDNA表达水平均高于其亲本ICR小鼠和615小鼠。全长cDNA表达水平和抗辐射功能的结果均提示4号、5号和2号cDNA具有较强的抗辐射功能。

利用全长cDNA文库不仅能获得目的基因完整的序列和功能信息,还有利于后期蛋白质表达及功能分析。我们获得的全长cDNA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。下一步我们将把具有抗辐射功能的4号、5号和2号

cDNA导入到辐射敏感小鼠中,观察小鼠是否具有抗辐射特性。同时检测小鼠体内4号、5号和2号cDNA编码蛋白的表达水平,希望通过数据库能检索到人类同源蛋白。辐射敏感性研究一直是放射生物学领域的研究热点<sup>[11-12]</sup>,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。

### 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链断裂及断裂链修复. 中国辐射卫生, 2007, 16(1): 17-20.
- [2] 王芹,李进,岳井银,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): 39-42.
- [4] 王芹,李进,张恒,等. IRM-2小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养和生物学特性. 苏州大学学报: 医学版, 2010, 30(3): 1-3.
- [5] 王芹,刘晓秋,李进,等. IRM-2小鼠全长cDNA编码蛋白质分析. 国际放射医学核医学杂志, 2012, 36(3): 157-159.
- [6] Xiong YH, Xu Y, Lai WH, et al. Cloning and sequence analysis of the full-length cDNA of a novel yp05 gene associated with citrinin production in *Monascus aurantiacus*. Biomed Environ Sci, 2007, 20(2): 135-140.
- [7] Qi JL, Zhang WJ, Liu SH, et al. Expression analysis of light-regulated genes isolated from a full-length-enriched cDNA library of *Onosma paniculatum* cell cultures. J Plant Physiol, 2008, 165(14): 1474-1482.
- [8] Gao PF, Cao GQ, Zhao HT, et al. Molecular cloning and characterization of pigeon (*Columba livia*) ubiquitin and ubiquitin-conjugating enzyme genes from pituitary gland library. Int J Biol Sci, 2009, 5(1): 34-43.
- [9] 饶亚岚,陈肖华,王琳,等. 7Gy射线照射后4h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.
- [10] 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.
- [11] Thacker J, Zdzienicka MZ. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. DNA Repair (Amst), 2003, 2(6): 655-672.
- [12] 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.
- [13] 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: 2012-09-07)