

利用 cDNA-RDA 技术研究 BXSB 狼疮小鼠 差异表达的基因

韩文玲 李莹 杨高云 宋泉声 张颖妹 狄春辉 马大龙

(北京医科大学卫生部免疫学重点实验室, 北京 100083)

摘要 利用近年来发展起来的代表性差异分析 cDNA-RDA (cDNA-representational difference analysis) 技术筛选 BXSB 红斑狼疮小鼠发病相关基因, 发现了 3 个新的表达序列标签 (EST) 片段, 在 GenBank 中的登录号分别为 AF060113, AF060111, AF060110, 同时发现了一些已知与自身免疫病相关的基因如逆转录病毒衣壳蛋白、Line-1 逆转录酶等。通过 RDA 技术可能发现系统性红斑狼疮发病相关新基因, 为自身免疫病的理论研究提供新的思路和方法。

关键词 系统性红斑狼疮, 代表性差异分析, BXSB 小鼠

学科分类号 R371

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种侵犯多系统、多器官的自身免疫病。它的发病与遗传、病毒感染、环境等多种因素有关, 遗传因素起更重要的作用, 但目前对其发病相关基因的研究还比较少。小鼠 SLE 模型的出现, 大大促进了对其发病机理的研究, BXSB 小鼠是其中的一种模型, 其雄鼠发病早, 与人类 SLE 有相似的免疫学异常和病理表现^[1]。过继转移实验表明, BXSB 小鼠发病的细胞学基础在于骨髓或脾脏中的造血干细胞, 与细胞发育的微环境和体内的激素水平没有关系^[2]。目前, 对其发病相关基因的研究还比较少, 细胞转移及 Y 染色体转移实验表明: BXSB 雄鼠 Y 染色体上的突变基因 Yaa 基因 (Y chromosome-linked autoimmune accelerator) 能够加速自身免疫病的发生。但 Yaa 基因本身并不能使遗传背景正常的小鼠发病, 必须依赖于有自身免疫病发病倾向小鼠体基因的异常, 而 Yaa 基因与缺陷体基因相互作用的本质还不清楚。BXSB 小鼠是由雌性 C57-BL-6 和雄性 SB/Le 杂交而来, 二者有相同的组织配型^[3]。我们以 BXSB 小鼠骨髓细胞为实验组 (tester), 以 C57-BL-6 小鼠骨髓细胞为对照组 (driver), 利用 cDNA-RDA 技术, 探讨了 SLE 发病可能涉及的相关基因。

1 材料和方法

1.1 实验动物

BXSB 雄鼠, 购自美国 Jackson 实验室, 由免疫系动物室饲养。邓鸿业教授馈赠。C57-BL-6 雄鼠, 由北京医科大学实验动物部提供。

1.2 细胞制备

取 4 月龄 BXSB 和 C57-BL-6 雄鼠, 同时断颈处死, 分别无菌取其骨髓, 用 pH 7.2 Tris·NH₄Cl 溶解红细胞, 制备骨髓细胞悬液, 计数细胞, 调整 tester 和 driver 的细胞数, 使其一致, 达到 1×10^7 /ml。

1.3 细胞总 RNA 及 mRNA 的提取

细胞总 RNA 的提取采用 GIBCO BRL 公司的 TRIzolTM 试剂, 细胞 mRNA 的提取采用 Pharmacia 公司的 Quick Prep Micro mRNA Purification Kit, 所用细胞数为 1×10^7 个, 操作完全按试剂盒说明进行。

1.4 双链 cDNA 的合成

采用 SuperscriptTM Choice System for cDNA Synthesis Kit (GIBCO-BRL) 提供的试剂和酶, 分别利用上述 driver 和 tester mRNA 5 μ g 为模板, 进行单链及双链 cDNA 的合成。详细操作过程按说明进行。

1.5 RDA 方法中所用的寡核苷酸

以下是 RDA 方法中所用寡核苷酸的序列^[4,5]:
RBgl24, 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCAGCA-3';
RBgl12, 5'-GATCTGCCGCTGA-3'; JBgl24, 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3';
JBgl12, 5'-GATCTGTTCATG-3'; NBgl24, 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3';
NBgl12, 5'-GATCTTCCCTCG-3'.

Tel: (010) 62091417, E-mail: masong@sun.bjmu.edu.cn

收稿日期: 1999-06-28, 修回日期: 1999-12-21

划线部分为每对寡核苷酸之间互补的区域。所有寡核苷酸均由上海生工公司合成。

1.6 RDA 差异分析

操作过程见参考文献 [6], 经过三轮反应后, 将所得产物在 1.5% TAE 琼脂中电泳, glassmilk (Clontech) 方法回收纯化, 克隆到 pGEM-T easy 载体中, 转化大肠杆菌 XL-1, 挑白色克隆, 培养细菌, PEG 沉淀纯化质粒, 测序。

1.7 质粒 DNA 序列测定

所提质粒用 ALF™ DNA Sequencer (Pharmacia Biotech) 测序仪测序。测序反应按操作说明进行。所用酶及其他试剂均由 Pharmacia Biotech 提供。

1.8 在 GenBank 中进行序列比较并登记新基因

将测序所得到的序列通过电子邮件或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 在 GenBank 中进行同源性比较, 与 nr 和 dbest 均无高度同源性的序列定为新基因, 通过 GenBank 中的 www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt 功能进行新基因登记。

1.9 RNA 狭缝杂交

基本操作按分子克隆指南, tester 和 driver 总 RNA 定量后, 对应狭线孔各加入 20 µg 总 RNA, 利用 GIBCO-BRL 公司抽滤点膜装置 HYBRISLOT™ 将总 RNA 点于 DUPONT 公司的 Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane 上。探针的标记和杂交操作参照 DUPONT 公司的 Random Primer Fluorescein Labeling Kit With Antifluorescein-HRP (Dupont NEN NEL 803) 试剂盒说明书, 一般 X 片压膜 2 h 或过夜后显影, 定影。

2 结 果

2.1 RDA

在进行的三轮杂交中, tester 和 driver 的比例分别为 100: 1, 400: 1 和 4000: 1。图 1 表明在进行 RDA 之前及每一轮 RDA 后, 扩增产物的带型发生变化, 随着杂交过程的进行, tester 和 driver 中共同条带大部分消失, 部分条带加强, 这些可能是 tester 特异表达或高表达的基因。

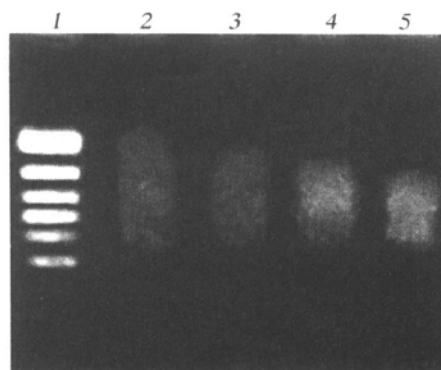


图 1 利用 RDA 技术研究 BXS B 小鼠差异表达基因片段的电泳结果

1: PCR 分子质量标准 (1545, 994, 695, 515, 377, 237 bp); 2: BXS B 小鼠 DNA 连接后 PCR 扩增产物; 3: 第一轮 RDA 杂交后的 tester cDNA PCR 扩增产物即 DP1; 4: 第二轮 RDA 杂交后的 tester cDNA PCR 扩增产物即 DP2; 5: 第三轮 RDA 杂交后的 tester cDNA PCR 扩增产物即 DP3。

2.2 测序及同源性比较结果

将所得序列通过 e-mail 或 www.ncbi.nlm.nih.gov 进行同源性比较, 结果如表 1。

表 1 利用 RDA 技术研究 BXS B 小鼠发病相关基因

克隆号	测序长度	同源性	已知序列	杂交结果
RB1 ¹⁾	175	73% (57/78)	小鼠睾丸特异性蛋白质	H
B2	131	95%	小鼠补体 C4 基因	NH
B3	316	97%	有转化活性的 Gallus 基因	NH
B4	268	96%	小鼠 Line-1 逆转录酶	H
B6	390	98%	小鼠 9 号染色体	ND
B7	246	97%	小鼠逆转录病毒衣壳蛋白	H
B8	236	99%	小鼠皮肤来源的 cDNA	ND
B9 ¹⁾	154	81% (60/74)	T 细胞受体基因	NH
RB14 ¹⁾	157	91% (41/45)	小鼠 Bruton's 酪氨酸激酶基因	H
B15	198	98%	单纯疱疹病毒早期转录调控蛋白	ND
B16	324	97%	小鼠浆细胞 cDNA	NH
B17	364	96%	小鼠恶性肿瘤 cDNA	ND
B18	198	97%	小鼠蛋白酪氨酸磷酸酶	NH
B19	210	95%	小鼠 MOPC P-1-450 基因	ND

¹⁾ 可能为新基因。H 或 NH 表示在 BXS B 小鼠中高表达或不高表达; ND 表示没有检测。

从以上结果可见, 其中有 1、9、14 克隆与其他基因没有明显同源性, 可能为新基因, 将这 3 个片段以 dbest 形式登录到 GenBank 并被接收, 登记

号分别为 AF060113, AF060111, AF060110, 分别命名为 RB1, RB9, RB14, 序列请见图 2.

RB1

GATCATAACCATTAGGAGATGTGACTTATGGGATGTGATTAAGTCATAAGAGTAGAACC
CTTATGAATAAAATTAGTTCTTGA AAAAGATACTCAGAGAGTAGCTAACTCCTTCCAG
TTTATGAGGATGCTGAAGAAAGATAGATGACCCCTTTCAAAAAGCAGACCCCTTGATC

RB9

GATCAAAGTATCTACACTCCGGTCTTCTAGTTCTTGAGGTTTAGGTTTTCTGCAAATTG
AATCTTGGATATTCTTCAGGTTCTCGGCTAATATCCACTCTATCACTGTCAGCATATCATG
TGTGTTYCCTTGGTGATTGGTTTACCCTGGAGT

RB14

GATCAGTCAGTGCTCTTAATCGCTGAGCCATCTCACCAGCCCCTGAATAAATCTTTTTTA
AAATTAGGACATTTACTTTCTTGAGCCTTTTTTTGTTCTGTTTGTAAATTTCTATGAA
TACACTGTAGCTGTCTTCAGACACACCAGAAGAGATC

图 2 新基因 RB1, RB9, RB14 的核酸序列

2.3 mRNA 狭缝杂交

通过狭缝杂交的方法检测了 9 个片段在 BXSB 和 C57-BL-6 小鼠骨髓细胞的表达水平, 发现其中 4 个为高表达或特异性表达 (图 3).

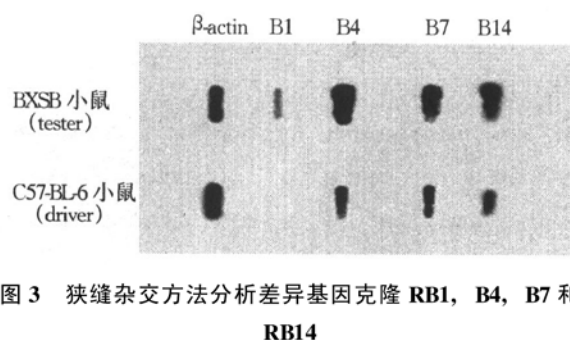


图 3 狭缝杂交方法分析差异基因克隆 RB1, B4, B7 和 RB14

3 讨 论

cDNA-RDA 技术是建立在 PCR 技术上的一种新的减数杂交方法, 能快速得到表达差异基因, 对研究自身免疫病有重要用途, 但目前尚无利用 cDNA-RDA 技术研究 BXSB 小鼠差异表达基因的报告. 考虑到 BXSB 小鼠的发病与造血细胞有关, 我们以 BXSB 小鼠骨髓细胞为材料, 采用 cDNA-RDA 技术, 研究了在 BXSB 小鼠发病中可能起作用的基因. 我们的结果表明, 在 BXSB 小鼠的骨髓细胞中, 有一些已知的与自身免疫有关的基因是高表达的, 如逆转录病毒衣壳蛋白, 内源性逆转录酶等, 对这些线索进行深入研究可能有助于揭示 SLE

的发病机理. Sekigawa 等^[7]报道逆转录病毒与 SLE 的发生有密切关系, 逆转录病毒的致病机理可能在于: 逆转录病毒基因表达产物与自身细胞成分有相同的抗原决定簇, 或者充当超抗原, 引起自身免疫应答, 导致自身免疫病的发生; 逆转录病毒具有转座子活性, 可引起插入突变, 导致重要基因功能丧失或激活其他基因, 引起疾病. 研究发现 MRL-lpr/lpr 小鼠的 lpr 突变乃由于 Fas 基因第二个内含子中插入了一个逆转座子使 Fas 基因不能转录, lpr 小鼠缺乏功能性 Fas 蛋白表达, 导致细胞凋亡的调节发生异常, 因而不只使胸腺选择失常产生自身反应性 T 细胞, 而且阻止自身反应性 B 细胞发生抗原诱导性凋亡, 使其功能性寿命延长, 最终导致 SLE 的发生^[8]. 目前关于逆转录病毒与 BXSB 小鼠之间的关系还没有类似的报道, 本文结果为这一领域的研究提供了新的线索, 可能具有重要的理论研究意义.

除已知基因外, 我们发现另外两个新基因表达水平也明显增加, 其中 RB1 与睾丸特异蛋白局部有较高同源性, RB14 与小鼠酪氨酸激酶局部有较高同源性. Scher 等^[9]报道 SLE 的发生与 Bruton's 酪氨酸激酶的异常有关, 本实验所得的 RB14 与小鼠酪氨酸激酶局部有较高同源性, 可能与 Bruton's 酪氨酸激酶为同一家族, 且表达水平明显增高, 其作用机制可能在于调控免疫球蛋白的类别转换, 使

致病性免疫球蛋白产生增多, 导致 SLE 的发生. 1 号克隆与睾丸特异蛋白局部有较高同源性, 而在 BXSB 小鼠发病过程中, Yaa 基因必须与其他缺陷体基因相互作用, 才能促进 SLE 的发生, 该基因可能是缺陷的体基因, 参与疾病的发生.

总之, 我们首次运用 cDNA RDA 技术研究 BXSB 小鼠的自身免疫发病机理, 证明了逆转录病毒等基因与 SLE 之间有一定的相关性, 同时得到了两个可能的疾病相关的新基因, 为进一步研究 SLE 的发病机理提供了新的思路和方法.

致谢 BXSB 小鼠由免疫系邓鸿业教授馈赠, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Izui S, Theofilopoulos A N, Dixon F J, *et al.* The role of the yaa gene in lupus syndrome. *Int Rev Immunol*, 1994, **11** (3): 211~230
- 2 Kunisuke H, Robert A. Marrow transplantation from tolerant donors to treat and prevent autoimmune diseases in BXSB mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (7): 2235~2239
- 3 Murphy E D, J B Roths. A Y chromosome associated factor in strain BXSB producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation. *Arthritis Rheum*, 1979, **22** (11): 1188~1194
- 4 Hubank M, Schatz D G. Identifying difference in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (25): 5640~5648
- 5 Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between Two complex genomes. *Science*, **259** (5097): 946~951
- 6 Liu H T, Wang Y G, Zhang Y M, *et al.* TFAR 19, a novel apoptosis related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor with drawal. *Biophys Biochem Communi Res*, **254** (1): 203~210
- 7 Sekigawa I, Ogasawara H, Kaneko H, *et al.* Sytemic lupus erythematosus (SLE) and retrovirus. *Nippon Rinsho*, 1997, **55** (6): 1492~1497
- 8 Adachi M, Watanabe Fukunaga R, Nagata S. Aberrant trscription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 1756~1761
- 9 Scher I. The CBA/N mouse strain : an experimental model illustrating the influence of the X-chromosome on immunity. *Adv Immunol*, 1982, **33**: 1~5

Isolation of the Differentially Expressed Genes in the BXSB Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus by cDNA-RDA Technique. HAN Wen-Ling, LI Ying, YANG Gao-Yun, SONG Quan-Sheng, ZHANG Ying-Mei, DI Chun-Hui, MA Da-Long (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract In order to isolate the related genes in the development of systemic lupus erythematosus (SLE) in BXSB mice, bone marrow cells were separated from the BXSB and C57-BL-6 mouse, poly (A) RNA was extracted, the cDNAs were synthesized by reverse transcription, and the differentially expressed genes were cloned by cDNA-representational difference analysis (RDA). Three novel genes were isolated, their accession numbers in GenBank are AF060113, AF060111, AF060110; at the same time, some genes that have been reported to be related to the development of SLE such as endogenous retrovirus and Line -1 reverse transcriptase were found. This can provide a novel method to do further research about autoimmune diseases.

Key words systemic lupus erythematosus, representational difference analysis, BXSB mice