

SHR 与 WKY 大鼠肾脏组织基因表达差异分析*

李新波 朱依纯 姚 泰¹⁾

(上海医科大学生理学教研室, 医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 为了观察 SHR 与 WKY 大鼠肾脏组织的基因表达的差异, 用 T11G、AP6 引物对 12 周龄的 SHR 与 WKY 大鼠肾脏 mRNA 进行了差异显示, 得到了一条在 SHR 大鼠肾脏组织中高表达的差异显示条带, 进一步分析证明这一差异显示条带含有 170 bp, 与 GenBank 收录的已知的核苷酸序列的同源性低于 80%, 可能为未知基因的 cDNA 片段, 并定位于 SHR 大鼠的肾小管上皮细胞内.

关键词 自发性高血压大鼠, mRNA 差异分析, 肾脏
学科分类号 Q781

原发性高血压的发病机理至今仍未完全阐明. 在诸多与原发性高血压发病有关的因素中, 肾脏是一个重要的环节^[1]. 自发性高血压大鼠 (SHR) 是从正常血压的 WKY 大鼠中选择血压较高的个体交配, 在其子代中再选择血压较高的个体交配, 如此代代重复, 最终得到 SHR. 目前 SHR 的高血压表型已被稳定地保存下来, 并被认为是与人原发性高血压最接近的动物模型, WKY 为其正常血压的对照. 我们的实验证实: 将 12 周龄 SHR 大鼠的左侧肾脏移植于 12 周龄的 WKY 大鼠 5 周后, 受肾 WKY 大鼠动脉血压显著升高 (未发表资料). 为了观察 SHR 与 WKY 大鼠肾脏组织的基因表达是否有差异, 对 12 周龄 SHR 大鼠与 WKY 大鼠的肾脏组织进行差异显示及分析.

1 材料与方法

SHR 与 WKY 大鼠由上海市高血压研究所提供.

1.1 总 RNA 抽提

取材: 大鼠麻醉、断头后, 快速取出左侧肾脏, 用液氮冷冻后放置在 -70℃ 或 -80℃ 深低温冰箱保存.

肾脏组织中总 RNA 的抽提按照 Chomezynski^[2] 的异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法进行, 并计算 A_{260}/A_{280} 比值, 实验要求此比值在 1.80 以上.

1.2 mRNA 差异显示

mRNA 差异显示技术参见文献 [3]. 其中所用锚式引物 T11G 的碱基序列为: 5'-AAGCTTTTTTTTTT-3', 随机引物 AP6 的碱基序列为: 5'-AAGCTTGCACCAT-3'.

1.3 T-A 克隆载体的构建

用 pBluescript (+) 质粒自制 T-A 克隆载体.

1.4 RNA 印迹

cDNA 探针标记: 将从重组 pBS 质粒中经酶切获得的 cDNA 探针 (包括从重组 pBS 质粒中经酶切获得的 β -肌动蛋白 cDNA 探针), 用随机引物法进行标记, 由于差异 cDNA 探针较短, 延长标记反应的时间为 2 h.

预杂交、杂交、洗膜、放射自显影参见文献 [4]. 其中用 β -肌动蛋白标记的探针进行杂交的尼龙膜自显影 24 h 后即可冲洗底片, 而用其他探针进行杂交的尼龙膜自显影 1~4 周后才可冲洗底片.

1.5 重组质粒的核苷酸序列测定

以 pBS 质粒的多克隆位点中固有的 T7 启动子序列为引物, 用 ABI PRISM™ 377DNA Sequencer 对重组质粒进行核苷酸序列测定, 去除载体中固有的核苷酸序列, 即得到插入 cDNA 片段的序列.

1.6 原位杂交

根据宝灵曼试剂盒说明书进行. 用随机引物法利用 Klenow 酶及 DIG-11-dUTP 标记差异 cDNA 探针, 在标记反应中, 由于所得到的差异显示的 cDNA 探针仅有 100~200 个碱基, 故将标记反应的时间由 1 h 改为 24 h, 增加标记效率. 对多聚甲醛灌流并处理的肾脏进行冰冻切片 (30 μ m 厚), 经杂交预处理、杂交、DIG 免疫化学显色反应而获得

* 国家教委博士点基金 (1332104)、美国纽约中华医学基金会基金 (90-527)、上海市曙光计划 (97GS15) 资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-08-08, 修回日期: 1999-02-23

结果.

2 结 果

2.1 SHR 与 WKY 大鼠肾脏组织基因表达差异显示

本实验用 T11G 及 AP6 引物进行了 mRNA 差异显示, 结果表明, 每一组引物组合在单一电泳道上可显示数十条基因表达条带, 其中 SHR 和 WKY 之间绝大多数代表肾脏基因表达的条带是相同的, 但有一些出现了差异 (表现为条带的有无或条带密度的明显差异), 但在 SHR 大鼠之间以及 WKY 大鼠之间, 代表肾脏基因表达的条带基本是相同的. 将同一水平位置上 SHR 大鼠肾脏存在而 WKY 大鼠肾脏不存在或表达明显减弱的条带作为差异条带, 按照以上标准, 观察到有一条带在 SHR 大鼠肾脏中的表达明显高于 WKY 大鼠肾脏中的表达, 称其为差异条带 1, 如图 1 所示.

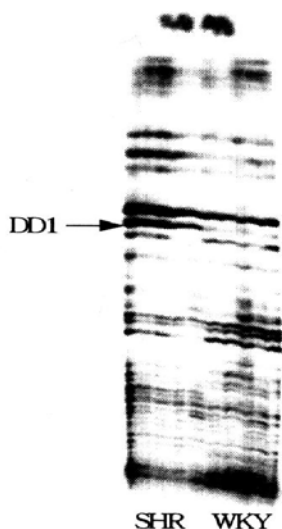


图 1 用 T11G、AP6 引物对 5 只 SHR 大鼠及 5 只 WKY 大鼠的左侧肾脏进行的 mRNA 差异显示
DD1 为差异条带 1.

2.2 差异产物的克隆及 RNA 印迹

为了对得到的差异条带进行进一步的研究, 对差异条带 1 进行扩增后经 2% 琼脂糖凝胶电泳验证, 并用柱离心式胶回收试剂盒进行回收, 并将其重组于 pBluescript SK (+) T-A 克隆载体.

克隆于自制 T-A 载体后进行蓝白斑筛选及酶切鉴定的结果显示, 从白斑中提取的质粒用限制性内切酶 *EcoR* I 及 *Hind* III 酶切后得到了单一的 DNA 条带, 而从蓝斑中提取的质粒用相同的限制性内切酶酶切后则无相应的 DNA 条带 (图 2). 表明 cDNA 片段均重组入自制的 T-A 载体.



图 2 差异 cDNA 产物 1 克隆入 T-A 载体后的酶切结果
1: λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III; 2~6: 白斑质粒/*EcoR* I + *Hind* III; 7, 8: 蓝斑质粒/*EcoR* I + *Hind* III.

RNA 印迹结果显示, 差异显示的 cDNA 片段 1 在 12 周龄的 SHR 大鼠肾脏组织中的表达明显强于 12 周龄的 WKY 大鼠的肾脏组织的基因表达; 同样, 它在移植于 WKY 大鼠并存活 5 周的 SHR 大鼠的肾脏组织中的表达也明显强于移植于 WKY 大鼠并存活 5 周的 WKY 大鼠的肾脏组织的基因表达 (图 3).

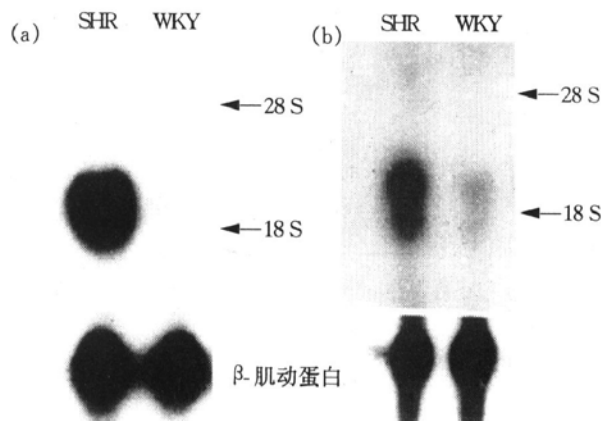


图 3 用差异显示的 cDNA 片段 1 作探针进行 RNA 印迹的结果

(a) 从 12 周龄的 SHR 与 WKY 大鼠的肾脏中抽提的总 RNA; (b) 从移植于 WKY 大鼠并存活 5 周的移植 SHR 或 WKY 大鼠肾脏抽提的总 RNA.

2.3 差异显示的 cDNA 片段测序及原位杂交

利用 T7 启动子序列及 ABI PRISM™ 377DNA Sequencer 对含有插入 cDNA 片段的重组质粒进行核苷酸序列测定.

将所得的差异显示的 cDNA 片段的序列与 GenBank+ EMBL+ DDBJ+ PDB 序列进行了对比, 结果如下:

差异条带 1 含有 170 个碱基, 其碱基序列为: AAGCTTTTTT TTTTGGATTA AGTGTTCTAT AGATAACTGT TAAAACGATT TAT-TTCATAA CTTCTGTTAG TTTCATTGTG TCTCTGTTTA ATTTCTGTTT CTATGATCTA TCTATTGATG AGAGTGGAGT GTT-TAAGTCA CCCATTATTA TTATGTATGG TGCAAGCTTA. 其与已知核苷酸序列的最高同源率为 72%.

原位杂交结果显示, 差异条带 1 定位于肾小管上皮细胞, 在 SHR 大鼠肾脏有阳性信号, 而在 WKY 大鼠肾脏则无阳性信号 (图 4).

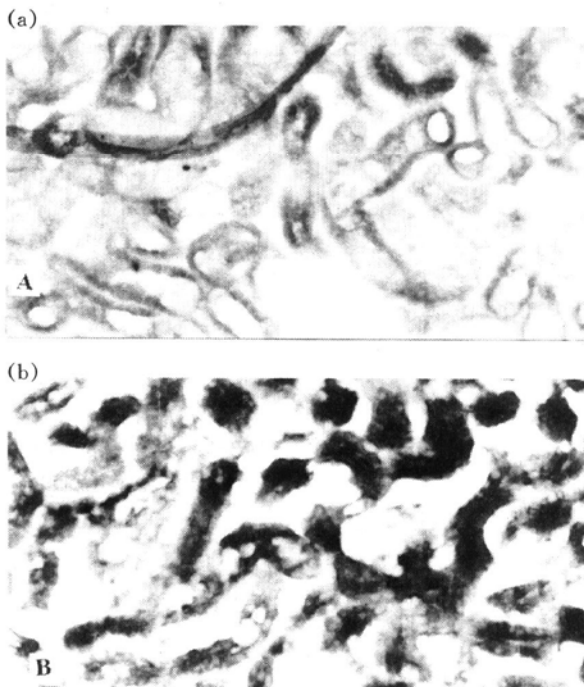


图 4 用 DDI 作探针进行原位杂交的结果
(a) WKY 大鼠肾脏; (b) SHR 大鼠肾脏.

3 讨 论

在本实验中, 我们用 mRNA 差异显示方法对 12 周龄的 SHR 及 WKY 大鼠肾脏组织的基因表达进行了差异显示, 初步观察到 SHR 与 WKY 大鼠之间存在 1 条差异表达条带.

考虑到实验样本之间的个体差异, 在进行差异显示时, 我们对实验方法进行了改进, 即对多个 SHR 大鼠与多个 WKY 大鼠的肾脏组织进行差异显示, 而以往的许多研究都仅用一个实验标本与一个对照标本进行差异显示, 这样不可避免地存在个体差异的干扰, 而增加样本量后, 可显著减少由个体差异产生的误差.

本实验中 RNA 印迹结果证实, 差异条带 1 在 12 周龄的 SHR 大鼠肾脏组织中高表达, 而在 12 周龄的 WKY 大鼠的肾脏组织中表达明显减弱; 它在移植于 WKY 大鼠的 SHR 肾脏中仍然高表达. 表明此差异片段在 SHR 肾脏组织中的表达明显强于 WKY 大鼠. 结合我们进行的肾脏移植实验, 可以认为此差异显示的 cDNA 片段所代表的基因可能在 SHR 大鼠血压升高过程中起一定的作用. 但怎样确定这些 SHR 与 WKY 大鼠肾脏组织中有差异表达的 cDNA 片段所代表的基因与高血压有关, 则须在今后借助于转基因技术或基因敲除 (knock out) 技术来加以鉴别.

从所查 Genbank 的结果来看, 所得的这个 RNA 印迹为阳性且表达有差异的 cDNA 片段可能是未知基因的片段. 而经 DD-RT PCR 所筛选出的差异片段只是全长基因的一部分, 且这些差异片段通常位于全长基因的 3' 端非翻译区. 要确切知道这些差异片段所代表的基因的全长序列, 可采用建立并筛选 cDNA 文库来分离克隆所要寻找的目的基因或 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 来获取完整的 cDNA 序列, 得到全长 cDNA 序列后, 可进一步研究分析这些未知基因编码的蛋白质或多肽的生理功能.

本实验中原位杂交的结果显示, 差异条带 1 定位于肾小管上皮细胞, 在 SHR 大鼠肾脏有阳性信号, 而在 WKY 大鼠肾脏则无阳性信号; 关于肾小管上皮细胞在高血压中的作用已有人报道. Cusi^[5] 认为肾脏中细胞骨架蛋白 (cytoskeletal protein) adducin 的多态性可通过影响肾小管上皮细胞的离子转运功能而参与血压的调整, 并与肾脏移植后的血压水平有关. 但它通过何种机制而引起动脉血压的变化, 还没有阐明. 我们实验中得到的差异条带 1 是否参与以上过程的调节, 尚需进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Rettig R, Schmitt B, Pelzl B, *et al.* The kidney and primary hypertension: contributions from renal transplantation studies in animals and humans. *J Hypertens*, 1993, **11** (9): 883~ 891
- 2 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, **162**: 156~ 159
- 3 李新波, 赵小松, 朱依纯, 等 (Li X B, Zhao X S, Zhu Y C, *et al.*). 用 mRNA 差异显示法比较 SHR 和 WKY 大鼠肾脏组织的基因表达. *上海医科大学学报 (Acta Academiae Medicinae Shanghai)*, 1998, **25** (3): 226~ 229
- 4 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等. 基因工程实验技术, 第二版. 长沙: 湖南科学出版社 (Peng X L, Yuan H Y, Xie Y, *et al.*

Experimental Technology of Genetic Engineering, 2nd. Changsha: Hunan Scientific Publishing House), 1997. 170~ 173

- 5 Cusi D, Binchi G. Renal mechanisms of genetic hypertension: from the molecular level to the intact organism. *Kidney Int*, 1996, 49 (6): 1754~ 1759

Differential Display Analysis of Gene Expression in Kidneys of SHR and WKY Rats. LI Xin-Bo, ZHU Yi-Chun, YAO Tai (Department of Physiology, State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China).

Abstract In order to observe the difference in gene expression in the kidney of SHR and WKY rats, mRNA differential display was undertaken to screen differently expressed genes in the kidney of SHR and

WKY rats aged 12 weeks by using T11G and AP6 primer. One cDNA fragment was identified in the kidney of SHR and was selected as interesting band. The techniques of T-A cloning, Northern hybridization, *in situ* hybridization and sequencing of the recombinant plasmid were used to determine the characteristics of differentially displayed cDNA fragment. The results indicate that it contains 170 base pairs and the incidence of homology with known genes is less than 80%, it was located in the renal tubule of SHR and no positive signal was found in the kidney of WKY.

Key words spontaneously hypertensive rat (SHR), mRNA differential display analysis, kidney

甲醇酵母 *Pichia pastoris* 高水平表达 有活性的辣根过氧化物酶

蒋太交 吉鑫松 章如安 黄艳红 吴祥甫 袁中一¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 表达有活性的辣根过氧化物酶 (HRP) 不仅可以深入揭示 HRP 结构与功能及其生理作用规律, 而且为 HRP 的广泛需要提供新的来源. 为了在甲醇酵母 *P. pastoris* 中成功表达, 将编码 HRP-C 成熟肽的 cDNA 构建到 pPIC9 上, 再转化到 *P. pastoris* 中, 筛选到了分泌表达非糖基化 HRP 和高糖基化 HRP (分子质量超过 100 ku) 两种主要产物的重组细胞株. 优化表达条件, 目标产物在摇瓶发酵液中高效表达, 可达 4~ 6 g/L. 并且直接从发酵液中可获得具有活性的高糖基化 HRP, 每毫升发酵液中酶活力约有 2 U, 经初步的纯化 HRP 具有最大吸收峰 403 nm.

关键词 辣根过氧化物酶, *Pichia pastoris*, 高糖基化
学科分类号 Q78

无论从应用还是从理论研究角度看, 辣根过氧化物酶 (HRP) 是一种非常重要的酶. 在理论上 HRP 的结构和功能已得到较为广泛和深入的研究, 而且仍是传统研究的素材; 另一方面, HRP 在临床、酶联免疫分析和组织化学中作为蛋白质的示踪剂而得到了普遍应用^[1]. 通常分离得到的并加以应用的天然 HRP 由多种同工酶组成. 要充分了解 HRP 的结构与功能, 就必须得到大量单一组分的酶. HRP 基因克隆与表达为 HRP 结构与功能的研究提供了新的来源, 特别是在微生物中表达天然 HRP 同工酶基因有助于揭示 HRP 各种同工酶的生理作用及它们之间的关系. 但 HRP 的表达是一个具有挑战性的工作. 它含有四对二硫键、一个血红

素辅基和两个钙离子, 且为糖蛋白^[1].

甲醇酵母 *Pichia pastoris* 是近年兴起的真核表达系统^[2], 和细菌相比, 它可以实施真核生物的加工过程, 例如蛋白质的糖基化、二硫键正确形成和蛋白质折叠等. 与 *Saccharomyces cerevisiae* 比较, *Pichia pastoris* 更适于表达真核蛋白, 它比前者更好地分泌外源蛋白. 迄今为止, 许多活性蛋白质用 *P. pastoris* 大量表达, 而且有效地分泌到胞外.

我们将天然辣根中克隆到的编码 HRP-C 成熟肽的 cDNA 构建到 pPIC9 上, 再转化到 *Pichia* 中, 获得的表达产物为非糖基化的 HRP 和高糖基化的

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-10-13, 修回日期: 1999-01-29