

高原藏羚羊胱硫醚- γ -裂解酶基因克隆与全序列测定*

李 肃, 格日力[△] (青海大学医学院高原医学研究中心, 西宁 810001)

【摘要】 目的 探讨克隆高原藏羚羊胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)基因编码区并检测其在成年高原藏羚羊组织中的表达,同时探讨高原藏羚羊低氧适应的分子生物学机制。**方法** 从高原藏羚羊组织中提取总 RNA,通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)获得高原藏羚羊 cDNA,并进行鉴定和测序。**结果** 将含有目的片段克隆后经测序和 Blast 分析,结果显示其部分编码序列与 GenBank 中牛 CSE 蛋白基因序列同源性 96.47%,表明本实验所克隆的序列为 CSE 蛋白基因。根据已知人、褐家鼠、小鼠、野猪、食蟹猴、家牛 CSEcDNA 序列和 Pnaman 软件设计高原藏羚羊 cse 基因的引物。**结论** CSE mRNA 可能在高原藏羚羊机体较为广泛的区域中发挥着作用,同时为高原低氧适应相关基因的研究提供了实验依据。

【关键词】 高原; 藏羚羊; 胱硫醚- γ -裂解酶; 基因序列; 低氧适应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.23.006 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)23-3099-03

Tibetan antelope cystathionine γ -lyase: complete cDNA sequences* LI Su, GE Ri-li[△] (The Plateau Medical Research Center, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China)

【Abstract】 Objective To identify the Cystathionine- γ -Lyase(CSE) genes coding sequences molecular cloning, exam the tissues expression spectrums and discuss the hypoxic adaptations mechanisms in Tibetan antelope. **Methods** The total RNA was extracted, and the cDNA was captured by reverse transcription RT-PCR, then identified, sequenced and cloned. **Results** There was 96.47% homology between the Tibetan antelope gene fragment containing the purpose gene and the cattle gene in gen banks, thus the result mean the gene which cloned before was CSE gene protein. The length of the CSE gene protein was been detected by designing primers according to the human, mous, wild boar, cattle CSEcDNA sequences, and the CSE gene primers of tibetan antelope which tesied by Pnaman. **Conclusion** CSE gene protein might play an important role in the body of the Tibetan antelope, which provide experiment basis to the gene study about adaptation in high altitude hypoxia environment, in the future.

【Key words】 plateau; Tibetan antelope; CSE; gene sequences; adaptation of hypoxic

藏羚羊为羚羊亚科藏羚属动物,是中国重要珍稀物种之一,国家一级保护动物。主要栖息于海拔 4 600~6 000 m 的荒漠草甸高原、高原草原等环境中。主要分布在新疆、青海、西藏的高原上,另有零星个体分布在印度地区。具有极强的低温、低氧耐受能力,主要通过高的静止代谢率和增加非颤抖性产热以及高的氧利用率来适应高寒、缺氧环境,因此被认为是研究高原低氧适应的代表性动物模型之一。

硫化氢(H₂S)是新近发现的继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)后的第 3 个内源性气体信使有很多生物学功能,如它参与低氧性肺动脉高压、感染性休克、急性肺损伤等多种疾病的病理生理过程^[1-3]。本研究室先期试验证明低氧状态下内源性胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)/H₂S 体系产生变化参与低氧适应。然而,关于 CSE 在高原缺氧状态下土著动物的抗缺氧功能学研究少见报道。本文旨在通过对高原藏羚羊 CSE 基因克隆与表达的研究,期能为进一步研究高原低氧环境的适应性问题奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 于 2009 年 3 月在青海省可可西里自然保护区(海拔 4 600 m)捕捉高原藏羚羊(雄性,10 只,45~56 g),就地解剖取高原藏羚羊各组织迅速投入液氮容器中,低温保存并运回西宁。Trizol 总 RNA 提取试剂购自 Invitroge 公司;RNAsin、OligodT15 购自 Promega 公司;M-MLV 反转录酶 Superscript

(200 U/ μ L)和限制性内切酶 EcoRI、10 $\times$ PCR Buffer、2.5 mmol/L dNTP Mix、Taq DNA 聚合酶、Ex Taq 聚合酶、DNA 限制性内切酶、DL-2000 Marker、5' RACE、3' RACE 购自 TaKaRa 公司;SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司;QIA quick Gel 回收试剂盒购自 QIAGEN 公司;Tryptone、Yeast Extract 购自 Oxoid 公司;全部引物由上海英骏生物工程公司合成;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及鉴定 按照 Trizol 试剂盒说明随机提取 7 号高原藏羚羊各组织总 RNA,溶于 20 μ L DEPC 水中,并用 DU800 核酸蛋白含量检测仪(Beckman 公司产品)测定 A260/A280 值及浓度,并进行 1%甲醛变性凝胶电泳检测其质量,置-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.2 目的基因扩增及序列测定 (1)引物设计:利用人(Homo sapiens; BC015807.2)、褐家鼠(Rattus norvegicus; BC078869.1)、小鼠(Mus musculus; AY083352.1)、野猪(Sus scrofa; DQ499449.1)、食蟹猴(Macaca fascicularis; AY879312.1)、家牛(Bos taurus; BT021485.1) CSE cDNA 序列和 Dnaman 软件设计原藏羚羊 CSE 基因的引物,其上游引物序列为(CSE-F):5'-GTA TAG CCG TTC TGG AAA TCC-3',下游引物序列为(CSE-R):5'-AGC AAG ACT TTC GTA TCC TCC-3'。引物由上海英骏生物技术有限公司合成,扩增

* 基金项目:国家“973”资助项目(2006CB504100)。 [△] 通讯作者, E-mail: geriligao@hotmail.com。

长度为 801 bp 左右,使用浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。(2)目的基因的扩增:取总 RNA 2.0 μg ,按照 AMV 逆转录酶试剂盒逆转录合成 cDNA 第一链。聚合酶链反应(PCR)体系为模板 cDNA 1 μL ,PCR Mix 15 μL ,Taq DNA 聚合酶 0.25 μL ,引物 CSE-F 及 CSE-R 各 0.25 μL ,加水补足至 25 μL ;扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μL 进行 1.2% 的 EB 琼脂糖凝胶电泳,采用紫外凝胶成像分析系统记录电泳结果。(3)PCR 产物的回收、纯化及序列测定:用 QIAquick Gel 回收试剂盒回收纯化 801 bp PCR 扩增片段并连接到 pGEM-T Easy 载体上。通过蓝白斑筛选实验挑取白斑单克隆,接种后 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,然后提取质粒,用 EcoR I 酶切,选出含有目的片段的阳性克隆送北京奥科生物技术有限公司进行序列测定。将获得的序列在 GenBank 上进行 Blast 初步比较分析和在 DNAMAN 上进行物种同源性比较。

1.2.3 cDNA 5'端快速扩增(5'RACE)和 cDNA 3'端快速扩增(3'RACE)。5'RACE 严格按照 5'-Full RACE Kit(TaKaRa)试剂盒说明书操作,严格按照 TRIzol 总 RNA 分离试剂说明书操作,用 TRIzol 总 RNA 分离试剂分离出无蛋白和 DNA 污染的未降解的总蛋白。用 Calf intestine Alkaline 磷酸酶去除 mRNA 5'端磷酸根;用 Tobacco Acid 焦磷酸酶去除 mRNA 5'端帽子结构,并保留 1 个磷酸根。目标 mRNA 5'端扩增通过 5'RACE 连接引物(5'RAPouter,5'RAPiner),用 T_4 RNA 连接酶连接。使用 9 格随机引物,用 2 μg 总 RNA 使用逆转录酶 M-MLV(Rnase H⁻)合成的 cDNA。根据前面已经被证实的序列为 5'RACE 设计 2 个反义基因特有引物(5'GSPouter,5'GSPiner)。5'RACE Outer PCR 反应体系:1 $\times$ cDNA 稀释缓冲液 II,10 $\times$ LA PCR 缓冲液 II (Mg^{2+} free), Mg^{2+} (25 mmol/L), TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL),5'RAPouter,5'GSPouter;扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,20 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 后保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。5'RACE Iner PCR 反应体系:5'RACE Outer PCR 产物,10 $\times$ LA PCR 缓冲液 II (Mg^{2+} free), Mg^{2+} (25 mmol/L),TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶[5 U/ μL ,dNTP Mixture(2.5 mmol/L each)],5'RAPiner,5'GSPiner;扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 后保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。5'RACE Outer PCR 和 5'RACE Iner PCR 产物将送北京奥科生物技术有限公司进行序列测定。

3'RACE 严格按照 3'-Full RACE Kit(TaKaRa)试剂盒说明书操作。第一段 cDNA 用总 RNA 通过 3'RACE 连接引物(3'RAPouter,3'RAPiner)。根据前面已经被证实的序列为 3'RACE 设计 2 个反义基因特有引物(3'GSPouter,3'GSPiner)。3'RACE Outer PCR 反应体系:1 $\times$ cDNA 稀释缓冲液 II,10 $\times$ LA PCR 缓冲液 II (Mg^{2+} free), Mg^{2+} (25 mmol/L),TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL),3'RAPouter,3'GSPouter;扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,20 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 后保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。3'RACE Iner PCR 反应体系:3'RACE Outer PCR 产物,10 $\times$ LA PCR 缓冲液 II (Mg^{2+} free), Mg^{2+} (25 mmol/L),TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶[5 U/ μL ,dNTP Mixture(2.5 mmol/L each)],3'RAPiner,3'GSPiner;扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 后保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。3'RACE Outer PCR

和 3'RACE Iner PCR 产物将送北京奥科生物技术有限公司进行序列测定,并将上述序列进行连接。

2 结 果

2.1 目的基因的 PCR 扩增及测序结果分析 利用 DNAMAN 软件设计兼并引物,扩增高原藏羚羊肺组织 CSE 编码区部分序列,引物序列可靠,所扩增片段长度与预期一致约 801 bp(图 1)。将目的片段的测序结果经 NCBI 数据库 Blast 搜索,显示高原藏羚羊 CSE 的编码区部分序列与 GenBank 中的人、褐家鼠、小鼠、野猪、食蟹猴、家牛等的 CSE 基因的同源性都在 96.47% 以上。

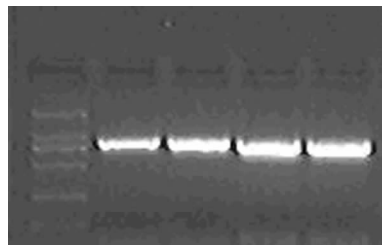


图 1 扩增高原藏羚羊肺组织 CSE 编码区 cDNA 序列 1.5% 琼脂糖凝胶电泳

2.2 5'RACE 和 3'RACE 扩增及测序结果分析 根据前面已经被证实的序列为 5'RACE 设计 2 个反义基因特有引物(5'GSPouter:5'-GTA CCT CCA TAC ACA TCC-3';5'GSPiner:5'-AGT GGC TGC TAA ACC TGA AGC-3')。3'RACE 设计 2 个反义基因特有引物(3'GSPouter:5'-AGC AGT TCC ATC TCC TAT TGA C-3';3'GSPiner:5'-TGC CTT CTC ATC CTC AGC ATG-3')。连接高原藏羚羊 CSE 编码序列 PCR 产物序列、高原藏羚羊 CSE 3'RACE 产品序列和高原藏羚羊 CSE 3'RACE 产品序列。得到一个含有 1 876 bp 的高原藏羚羊 CSE cDNA 全序列,其中家牛 CSE cDNA 全序列的同源性为 86.56%。CSEcDNA 全序列如下,其中下划线片段为连接片段。

TAG CTC TTG TGC CTC GCC TTG TGA TTC ACC
TGA TTC TTC CGT CTT TTT CTT CCC TGA TTT TCA
GTT TCA TAG TTT TAT CTT CCT CGC TCT TTT TCT
CTT TCC TTT CTT CCC TTC TTT TCA TGC AGG AAA
AAC AAG CCT CCC CAA GAA GAT TCC TGC CTA GGT
TCC TTC ATT TCG CCA CGC CAG CCA TCC ACG TGG
GCC AAG AAC CGG AGC AAT GAA CTT CCC AGG CTG
TAG TGC CCC CCA TCT CGC TGT CCC ATC GTT CAA
GCA AGG GGC TCC TGG ACA GCA CTC CTG GTT AGA
ACA TAG CCG TTC TGG AAA TCC CAC CCG GAA TTG
CTT GCA AAA AGA ATT GGC GGA AAT GGA TGG GGC
TAA TGA CAG GTG GGC TTT TGC TTC AGG TTT AGC
AGC CAC TGT GAC CAT TAC CCA TCT CTT AAA AGC
AGG AGA CCA AAT TAT TTG TAT GGA TGA TGT GTA
TGG AGG TAC AAA CAG GTA CTT CAG GCA GGT GGC
AAC TGA ATT TGG ATT AAA GAT TTC TTT TGT TGA
TTG TTC CAA AAC CAA ATT GCT AGA GGC AGC TAT
TAC ACC AAA AAC AAA GCT TGT TTG GAT TGA AAC
CCC CAC AAA CCC TAG CTT GAA GAT GAT TGA CAT
TGA AGC TTG TGC ACA TAT GGT CCA TAA ACA TGG
AGA CAT CAT TTT GGT CGT GGA TAA CAC TTT TAT
GTC AGC ATA TTT CCA GCG GCC TTT GTC TCT GGG

AGC TGA TAT TTG TAT GTA TTC AGC AAC AAA ATA
CAT GAA TGG CCA TAG TGA TGT TGT AAT GGG CTT
AGT GTC GCT GAA TTC TGA GAG CCT TCA TAA CAG
GCT CCG TTT CTT GCA AAA TTC TCT TGG AGC AGT
TCC ATC TCC TAT TGA CTG TTA CCT CTG CAAT CGA
GGT CTG AAG ACT CTA CAA GTC CGC ATG GAG AAG
CAT TTT GAA AAT GGA ATG GCA GTT GCT CAG TTT
TTG GAG TCG AAT CCT CAG GTG GAA AAG GTT ATT
TAT CCT GG GC TGC CTT CTC ATC CTC AGC ATG AGC
TGG CCA AGC GTC AGT GCA CAG GTT GCC CCG GAA
TGA TCA CCT TTT ACA TCA AGG GCT CTC TTC ACC
ATG CTG AAA CTT TCC TCA AGA ACC TAA AGT TAT
TTA CTC TGG CTG AGA GCT TGG GAG GAT ACG AAA
GTC TTG CTG AGC TTC CGG CAA TCA TGA CCC ACG
CAT CAG TGC CTA AGA GTG ACA GAG AGG TCC TTG
GCA TTA GTG ACA CAC TTA TTC GAC TCT CAG TGG
GCC TAG AGG ATA AAC AAG ACT TAC TGG ATG ATC
TAG ATC AAG CTT TGA AGG CAG CTC ACT CTC CAA
ATG CAA GTT CCA ACT AGC ATC CCA GAA CTG CTA
TTG GTG ACT GCT TCC TGA GAC GAT CAA ATC TGA
ATA ATT GAA TGG ACC ATT AAT GAG CCT CCA CAG
AAT TTT CAA ATG AAA ATT TTA AG GCA CCT CGT
TAC CTT TCA CAG CTG TCA TCT TCC TGG GAT CAT
CCC TGT TAA AAA ATT TCC TCT CCT TAT TGT
AAC TGA CAG GTC AAT TCT GTT CAG ATC TTT TTA
TTA ATT TTG ATA TAC ATG TGC CTC TGA AGG AGG
TGA GAT TTG TGA TGC TAT TGG GGA TTA TAT TCT
TTT TTT CAA GTT CAA GAT TTA TAT TGA TTA TGT
TTA CAA TAT AAA TTT TTG ATG TTT TAC TAA GAA
ATT AAA TTA TTG AAT GAG TGT GCT TAA TTC AAG
TGG GAT TTT GGT GTT GTT GAA GAT AAC ACT CAA
AGC AAT GGG TTA GGC TTA ATT ATC ATA AGC CAA
AGC AAA ATA TAT GAA CCG TAA GAG GAC GGG
AGA TTC TTG AGG TTG AAA GGA TCA TTT TTT TTT
TTT TTA AAA AAT ACT CAT TCC CCC ACA AAA AAA
AAA CCC CTT CTG AAA GCC。

3 讨 论

氧是哺乳动物正常新陈代谢所必需的。大气中的氧通过气体交换进入组织细胞后,一方面在细胞线粒体中作为电子传递链的最终电子接受者,参与细胞的氧化磷酸化和 ATP 的生成;另一方面,在过氧化物酶、微粒体等部位参与 ATP 生成无关的氧化还原反应。低氧可引起体内各层面的适应性反应。在器官水平有肺通气量的增加,呼吸中枢、呼吸肌以及胸腔结构的适应性变化;在组织水平,低氧可引起肺血管平滑肌细胞收缩;在细胞水平,低氧导致颈动脉体神经传递因子释放,肾脏和肝脏促红细胞生成素分泌增加;在分子水平,低氧诱导因子及其调节的各种相关基因的表达和释放等。所有这些对低氧产生适应性变化的机制中都需要一个细胞内氧感受机制,在氧分压变化时触发一系列的信号传导,激活特异性的功能反应。而机体是如何感受周围环境中氧浓度的变化及感受机制尚未

完全清楚^[4-7]。

目前,越来越多的证据支持内源性的 H₂S 是一种新的气体信号分子,这一发现扩大了气体分子信号的家族,但其细胞内信号转导途径仍未完全阐明。H₂S 与其他气体分子信号间和其他血管活性物质间的相互作用远未完全明了。H₂S 在心血管疾病中的病理生理学意义尚少见报道。内源性 H₂S 气体分子的研究是当前生物医学领域中的崭新课题,具有重要的理论和临床意义^[8-11]。

参考文献

- [1] Fraser J, de Mello LV, Ward D. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(8): 2977-2981.
- [2] Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation [J]. J Exp Biol, 2000, 203 (Pt 8): 1253-1263.
- [3] Roesner A, Hankeln T, Burmester T. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (Danio rerio) [J]. J Exp Biol, 2006, 209 (Pt 11): 2129-2137.
- [4] Fukumori K, Shakado S, Miyahara T, et al. Atypical manifestations of pancreatitis with autoimmune phenomenon in an adolescent female [J]. Intern Med, 2005, 44 (8): 886-891.
- [5] Pearson RK, Longnecker DS, Chari ST, et al. Controversies in clinical pancreatology: autoimmune pancreatitis: does it exist [J]. Pancreas, 2003, 27(1): 1-13.
- [6] Kamisawa T, Yoshiike M, Egawa N, et al. Treating patients with autoimmune pancreatitis: results from a long-term follow-up study [J]. Pancreatolgy, 2005, 5 (2-3): 234-238.
- [7] Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, et al. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues [J]. Anal Biochem, 2005, 341(1): 40-51.
- [8] Eto K, Kimura H. The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-L-methionine in mouse brain [J]. J Neurochem, 2005, 93(6): 80-86.
- [9] Eto K, Kimura H. A novel enhancing mechanism for hydrogen sulfide-producing activity of cystathionine-synthase [J]. Biol Chem, 2002, 277(45): 42680-42685.
- [10] Puranik M, Weeks CL, Lahaye D, et al. Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine-β-synthase [J]. J Biol Chem, 2006, 281(19): 13433-13438.
- [11] Taoka S, Banerjee R. Characterization of NO binding to human cystathionine-β-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme [J]. J Inorg Biochem, 2001, 87(4): 245-251.

(收稿日期: 2013-04-11 修回日期: 2013-07-27)