

## 大鼠心肌缺血预适应相关基因 5 的克隆与特性分析

王建设, 袁 灿, 王慷慨, 王尧玲, 刘梅冬, 刘 可, 肖献忠

(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; 心肌缺血预适应; 电子克隆; 生物信息学; 基因, 心肌缺血预适应相关基因 5 (MIP5)

[摘要] 目的 采用生物信息学分析表达序列标签 AW918640 以获得其所代表基因的全长序列, 并对该基因进行初步的特性分析。方法 利用基因银行(GeneBank)数据库, 通过 BLAST 比对等生物信息学方法进行电子克隆, 采用逆转录聚合酶链反应和基因测序等技术进行鉴定, 采用 map viewer 软件进行染色体定位, ExPASy 和 SMART 软件对获得的全长基因进行翻译和蛋白质功能结构分析。结果 AW918640(基因银行登录号)为一个在大鼠心肌缺血预适应后 3 h 表达升高的表达序列标签序列, 通过电子克隆得到其所代表基因的全长, 且为一新基因, 经逆转录聚合酶链反应和基因测序证实后, 将其命名为心肌缺血预适应相关基因 5(MIP5), 并在基因银行数据库上登录, 登录号为 AY553870。心肌缺血预适应相关基因 5 最大开放读码框为 909 bp, 编码 302 个氨基酸, 含有 6 个 kelch 重复基序。结论 心肌缺血预适应相关基因 5 为一与大鼠心肌缺血预适应相关的新基因。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Cloning and Characterization of Myocardial Ischemic Preconditioning Associated Gene five (MIP5) in the Rat

WANG Jiarr She, YUAN Can, WANG Kang-Kai, WANG Yaor-Ling, LIU Mei-Dong, LIU Ke, and XIAO Xiarr Zhong  
(Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Myocardial Ischemic Preconditioning; Cloning; Bioinformatics; MIP5 gene

[ABSTRACT] **Aim** To obtain the whole gene represented by the expressed sequence tag (EST) AW918640 and analyse its elementary characteristic. **Methods** Alignment, assembling and other bioinformatics programs were used to perform in silico cloning from GeneBank data base. RT-PCR and gene sequencing were performed to identify it. Localization in chromosome, sequence of amino acid and functional domain were identified by map viewer, ExPASy and SMART software respectively.

**Results** AW918640 is an EST sequence that expressed highly at 3 h after myocardial ischemic preconditioning in rat. We got the whole nucleotides sequence represented by AW918640 using in silicon cloning. The result from gene BLAST in GeneBank suggested that the whole nucleotides sequence express a new gene. We named this novel gene myocardial ischemic preconditioning associated gene-5 (MIP5, GenBank accession number: AY553870). Furthermore, the nucleotide sequence of MIP5 was confirmed by RT-PCR and sequencing. MIP5 contained a single open reading frame (ORF) of 909 base pairs with the potential to encode a protein of 302 residues containing 6 kelch repeat motif predicted by map viewer, ExPASy and SMART software respectively. **Conclusion** MIP5 is a novel gene which is correlative with myocardial ischemic preconditioning in rat.

随着人类、小鼠和大鼠等生物全基因组测序工作的完成<sup>[1,2]</sup>, 新基因搜寻和蛋白质功能研究成为当今生命科学的热点。本实验室利用大鼠心肌缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)模型, 用基因芯片检测缺血预适应后不同时间点大鼠心肌组织基因表达谱的变化, 发现其中一个表达序列标签(expressed sequence tag, EST)序列: AW918640 在经心肌缺血预

适应处理后大鼠心肌组织中表达明显升高, 3 h 时间点达顶峰, 然后回落<sup>[3]</sup>(图 1)。这种表达特性, 预示着其代表的基因可能在心肌缺血预适应中具有重要的调节或保护功能。本研究采用 BLAST 比对、序列拼接、开放阅读框(open reading frame, ORF)查询等方法电子克隆了 AW918640 代表的新基因, 将其命名为心肌缺血预适应相关基因 5(myocardial ischemic preconditioning associated gene-5, MIP5), 并通过逆转录聚合酶链反应及测序证实。进一步通过 Spidey 比对、ExPASy、SMART 等多种生物信息学软件对其核酸和蛋白质特性进行了初步分析, 为深入探讨 MIP5 的生物学功能奠定了基础。

[收稿日期] 2004-12-27 [修回日期] 2006-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30400152); 国家 973 重点项目(G2000056908)

[作者简介] 王建设, 硕士, 主要从事分子心血管病研究。袁灿, 副教授, 主要从事分子心血管病研究。通讯作者肖献忠, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病及败血症休克分子机制研究, 联系电话 0731-2355019, E-mail 为 xiaoxianzhong@xysm.net。

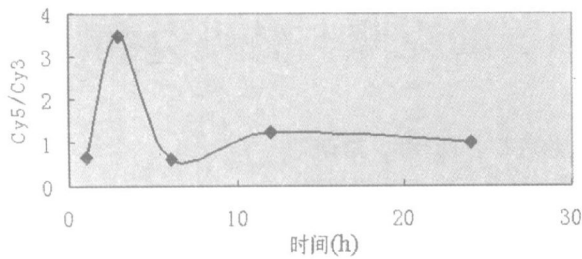


图1. 表达序列标签序列 AW918640 在缺血预适应处理后大鼠心肌组织中的表达特性

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

体重约 250 g 的 Wister 雄性大鼠由本校实验动物中心提供; Trizol 试剂购自 Gibco BRL 公司; Pyrobest™ 高保真 DNA 聚合酶和 AMV 逆转录酶为大连宝生物工程公司产品; 1 kb DNA Marker 购于北京田英伦生物技术公司; PCR 产物纯化试剂盒为 Qiagen 公司产品; pGET-T 载体购自 Promega 公司。用于 PCR 扩增含 MIP5 基因 ORF 片段的引物由上海博亚公司合成, 上下游序列分别为 5'-CTG CGT ACT AGC GAG TAG CC-3', 5'-AAG CCT GTT AGT TTG GGG TTC-3', 扩增片段长度为 1 365 bp。

### 1.2 新基因的电子克隆

将 AW918640 在 dbEST 数据库中作同源搜寻, 经不断与 dbEST 数据库 BLAST 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 将同源重叠的大鼠 EST 组装成序列重叠群 (contig), 此重叠群序列进行开放阅读框查询 ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), 以确定此 cDNA 序列 ORF 的完整性, 并与非冗余数据库 (non-redundant database, nr) 进行比对。

### 1.3 新基因的逆转录聚合酶链反应及测序证实

大鼠心肌 RNA 的提取按 Gibco BRL 公司的相应说明进行, 将提取的 RNA 定量后, 取 1 μg 逆转录成 cDNA, 取 1 μL 逆转录产物为模板做 PCR, PCR 反应条件为 94 °C 预变性 2 min 后; 94 °C 变性 30 s → 58 °C 退火 30 s → 74 °C 延伸 1 min, 28 次循环后 74 °C 再延伸 10 min。产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 mg/L EB 染色 15 min 后, 紫外投射仪下观察并照相。PCR 产物经 Qiagen 公司 PCR 产物纯化试剂盒纯化后与 pGET-T 载体连接, 转化 DH5α 感受态细胞, 在加入 IPTG 和 X-gal 培养皿中过夜培养后挑选白色菌落, 扩大培养并经 PCR 初步鉴定后送上海博亚生物公司测序。

## 1.4 新基因的核酸和蛋白质特性分析

将 MIP5 核酸序列与大鼠基因组序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html>) 进行比对, 并用 map viewer 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) 将其在染色体上定位。ExPASy 的 translate 程序 (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) 翻译基因 MIP5 编码氨基酸序列, SMART (simple modular architecture research tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析 MIP5 蛋白功能域。

## 2 结果

### 2.1 新基因的克隆

对 AW918640 序列在 dbEST 数据库中作同源搜寻, 构建序列重叠群, 最终得到长 2 608 bp 的 MIP5 cDNA 序列。ORF 分析显示 MIP5 的 5-UTR (untranslated region, 非翻译区) 为 791 bp, 3-UTR 为 1 063 bp, 开放读码框为 909 bp, 其起始密码子前面同一相位存在终止密码子, polyA 尾前多处出现相对少见的加尾信号 ATTTAA (图 2)。MIP5 序列与 nr 数据库比对, 没有已命名基因与之高度同源 (图 3)。设计引物 PCR 扩增大鼠心肌组织 cDNA, 得到预计片段 (图 4), 并经克隆入 pGET-T 载体测序证实。

### 2.2 大鼠心肌缺血预适应相关基因 5 的核酸和蛋白质序列分析

心肌缺血预适应相关基因 5 基因序列与大鼠基因组序列比对, 显示 MIP5 属 13 号染色体 NW\_047397 重叠群, 定位于 13q21 (图 5), 预计编码 302 个氨基酸 (图 6)。SMART 对 MIP5 蛋白结构域分析显示含 6 个 kelch 串联重复基序, 属 kelch 蛋白家族。

## 3 讨论

心肌损伤在临床上十分常见, 如冠状动脉粥样硬化、心肌梗死所致心肌细胞的缺血性损伤, 心梗融栓治疗和体外循环下行开胸心脏直视手术后导致的缺血再灌注损伤等。1986 年 Murry 等<sup>[4]</sup>首先发现心肌反复短暂缺血可以限制随后较长时间缺血所致的心肌梗塞范围, 提出了心肌缺血预适应的概念。研究表明缺血预适应可以保护心肌细胞免于发生坏死和凋亡, 并能够降低再灌注所致心律失常发生率, 加快顿抑心肌的复苏, 改善微血管灌注<sup>[5]</sup>。近些年来, 尽管对缺血预适应的内源性保护机制进行广泛的研究, 但 IP 确切的分子机制仍然不很清楚。我室假设 IP 能引起细胞内多种基因或蛋白质的表达发生变化, 这些基因或蛋白可能不乏新基因, 在 IP 中可能

ccacgcgcccgaagatgtttattcaaacagtgccattatcttcaaagggtgaaccattccgtttttattgaaatatgttacttaagaatctatgtgtgactata  
 cgtttttcttaatgacacataatagaagctctggaacaatgaagatttcttcaagccaatcaagccaaggactgactcttcagccagtattagaagattttgatttga  
 tcttgattttgtttttgtttgtttcgttttactatttactactatgacatgtttttcttgcacgggatcctgccagagtaagatgcaagacgcacactggagg  
 ttacctgaggcggtgtgtaactctgctactagcagtagccatggtgacagtagccacatgggtgttctgttctgtttgacagttcaaaccttgactactcagc  
 tgatcacaaagctgctgatgggaaccactagatggacaggctgaggtgttggcagtgatgatgaccacattcagtttgacagaaaaagccaccctgagaa  
 tggccataagcagataaagtgacgttccactggatgctctcttccaaatgctcagtgcaagtcctaaagcatgagtgaaaatcgttgcctcagaaaagactc  
 aaataacacttactgtgctggctgtgctggatggtacattctgtgctatttcttctatggcggcaacagtcaccagactccaacaagactccaactgag  
 caagatttaagctttagatgagcagccagatgagctcctagaaaagcctatgtctccatgcagtagcacggctggactggggacagcagagatgaatggca  
 aactcatagctgcaggtgttataacagagaggtgtcttcgaacagttgaatgctatgaccacacagatcactggctctccttgcctccatgagaacacca  
 agagcccgttccagatgctgtgctgatggacagctttatgtgtgggtggaatgacacactccgatgacctgagctgtggagagatgatgacccgagc  
 attgatgactggacccctgtgccagagctgagaactaacctgtaatgacaggagtgctgtctgaatgggaaactgtacattgttgggctctgatccatggt  
 eaaaaagcctgaaaaattgtgatatttgaatcctgtaacaaagtcaggaacagctgtgctctttaaacttcgtagacaccagctcagtttgaacttggg  
 gttattgtatataaattgaggtgcagaacttggaaattgtctgaatacagtagaacgatacaactcctgaaaacaacacctggactttaaattgacccatgaatgtggct  
 agcgagagctggcgtcgtgtctgatgaaaactgtttagggcgttggcttggatggttctcatgccatcagttgttagagatgatgacccaaccaggaa  
 gaatggaagatgatggaaaatgacttcaccaagagcaacgctgggatcaacttagggaaacaccattatcagtgaggagattgatggcaatgagttt  
 ctgaataccgtggaagctacaacctgagtcgaatgagtgagcccttacacaagattttcagtttaacaatttcagaaccccaactaacaggcttagtga  
 gtaattgtgtagtagaggtacactgtgaataaggagggtgggtgggtagatgttctaagtcacacaaagcttctgcatattgcatattataaacatgctgt  
 acatacttttgtttgaaacggatgcaagatgaaggctgttgtgaattcttaagacatcgttggtttacttttgaagttgatactgtaaaagaataaacca  
 caaattgattggaaacatctttaaagagtcctctcctcctcattgtttgccattgacataaatgactcttccctcagttcttcttaagaggcaagagggt  
 agggttacacgtaggcagttggctttaaaggcccctttaaactggaacactctataaacagatacttattaaatagataaacatgactattttgttttataa  
 aagaaaagttcacatgctaccaatatttagcttttattgattacatttataacttttatttctcagcagagtgctttatctgttgaagtaaatgtgacagattcaggt  
 atcaaacgagagtgccagaggaaaggatgcagagtggggtgttctttaaagctcagaacgaaacttagcatttcccgagctgctccttttctttctgttga  
 gagtgcagtagatgtttatttggatggagttgaatagtaacagtaataaactcaaacccaggtttagaattactgactactgaaacatttaaactgtcttattatca  
 ctaaccaacaattgtaagtgaagcctttagtgaacaataaactgactgggttggactgcacccttccagaaggttttgcagcttcttactcacctgga  
 ttgactggtgggggtgactcgtgtgtgtagtgcacacctaattatggtgccaaatgagcaaatctaatgcttgcagatgcaaacattaaaggtacttt  
 gcagtaaaaaaaaaaaaaaaaa

图 2. 心肌缺血预适应相关基因 5 核酸序列 (下划线部分为其开放阅读框)

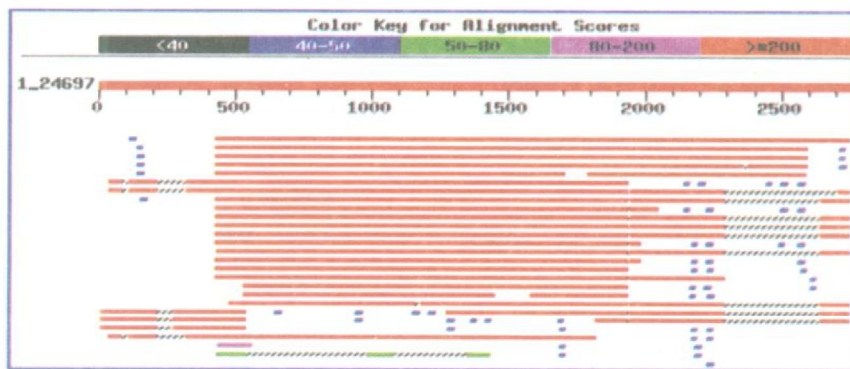


图 3. 心肌缺血预适应相关基因 5 核酸序列与非冗余数据库比对

发挥重要作用。因此采用 cDNA 微阵列和基因芯片技术研究发现多个表达上调或下调的基因, 其中不乏 EST<sup>[6,7]</sup>, 本实验研究对象 AW918640 EST 即其中表达上调的 EST 之一。

克隆新基因包括直接测序、引物步移、cDNA 末端快速扩增( rapid amplification of cDNA end, RACE) 和电子克隆等多种方法。其中电子克隆方法以相关数据库大量信息资源和简捷方便的软件为依托, 充分整合利用了现有的生物资源。本室以往也采用此类技术克隆了大鼠核不均一核蛋白 A2/B1 基因<sup>[8]</sup>。

本实验在以往的工作基础上采用这些方法克隆了 AW918640 EST 所代表的大鼠新基因 MIP5, 并经 RT-PCR 和测序证实; 进一步通过 BLAST, ExPASy 和 SMART 等软件对其特性进行了初步分析。发现 MIP5 的开放阅读框为一个含有 909 碱基对, 编码 302 个氨基酸残基的蛋白质。保守结构域分析 (SMART 软件) 发现其含 6 个串联重复 kelch 基序。kelch 蛋白具有广泛的生物学作用: 如通过与肌动蛋白相互作用, 参与细胞骨架稳定、细胞环状通道形成和细胞间物质的传递和运输; 通过与转录因子作用,

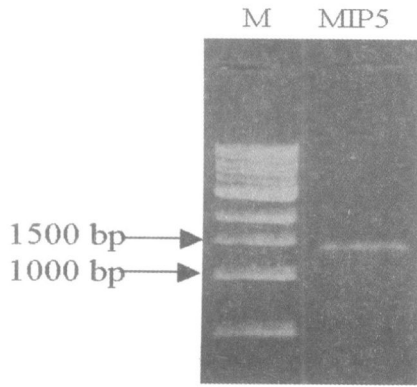


图 4. 逆转录聚合酶链反应扩增包含心肌缺血预适应相关基因 5 开放阅读框相应片段(M: 1 kb Marker, MIP5: 1 365 bp)

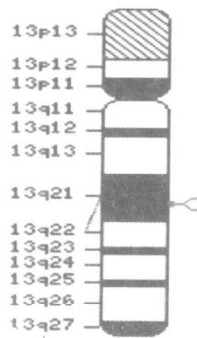


图 5. 心肌缺血预适应相关基因 5 在 13 号染色体定位

```

MQPDELLEKPMSPMQYARSLGTAEMNGKLIAGGYNREECLRT
VECYDPHTDHSFLAPMRTPRARFQMAVLMGQLYVVGCSNGHS
DDLSCGEMYDPSIDDWTPVPELRTNRCNAGVCALNGKLYIVGSD
PYGQKGLKNCIDVFDVPTKSWTSCAPLNIRRHQSAVCELGGYLYII
GGAESWNCLNTVERYNPENNTWTLIAPMNVARRGACVAVLDCGK
LFVGGGFDGSHAISCVEMYDPTREWKMMGNMTSPRSNAGITTV
GNITYAVGGFDGNEFLNTVEVYNLESNEWSPYTKIFQF
    
```

图 6. 心肌缺血预适应相关基因 5 氨基酸序列 (302 个氨基酸)

参与对多种基因表达的调节; 有的还具有酶的活性等<sup>[9-14]</sup>。因此我们认为 MIP5 为典型的 kelch 蛋白家族成员, 它可能通过与肌动蛋白相互作用起到稳定

心肌细胞骨架的作用, 也可能通过调节转录等机制在缺血预适应心肌内源性保护中发挥重要作用, 进一步通过基因转染, 反义或 RNA 干扰等技术对其进行深入研究, 将有利于更确切的阐明缺血预适应内源性保护的分子机制, 为心肌缺血性疾病的防治提供新的线索和思路。

[参考文献]

- [1] Venter JC, Adams MD, Myers EM. The sequence of the human genome [J]. *Science*, 2001, **291** (5507): 1 304-351
- [2] Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution [J]. *Nature*, 2004, **428** (6982): 493-521
- [3] 袁灿, 赵震宇, 刘瑛, 吕青兰, 王秋鹏, 肖献忠. cDNA 结合聚类分析探讨大鼠心肌缺血-再灌诱导的基因表达谱改变[J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2004, **29** (3): 252-256
- [4] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, **74** (5): 1 124-136
- [5] Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, Losano G. Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection [J]. *Life Sci*, 2001, **69** (1): 1-15
- [6] 袁灿, 吕青兰, 陈广文, 刘瑛, 王尧玲, 肖献忠, 等. 大鼠心肌缺血预适应诱导表达上调基因的筛选与鉴定[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (2): 390-394
- [7] 吕青兰, 袁灿, 张华莉, 陈广文, 王尧玲, 邓恭华, 等. 用 cDNA 芯片检测大鼠心肌缺血预适应后基因表达谱的改变[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (3): 189-193
- [8] 张华莉, 袁灿, 肖献忠. 用生物信息学方法克隆大鼠核不均一核蛋白 A2/B1 基因[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 249-253
- [9] Sasagawa K, Matsudo Y, Kang M, Fujimura L, Iitsuka Y, Okada S, et al. Identification of Ndl, a novel murine kelch family protein, involved in stabilization of actin filaments [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (46): 44 140-146
- [10] Hara T, Ishida H, Raziuddin R, Dorkhom S, Kamijo K, Miki T. Novel Kelch-like protein, KLEIP, is involved in actin assembly at cell-cell contact sites of MDCK cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, **15** (3): 1 172-184
- [11] Mai A, Jung SK, Yonehara S. hDKIR, a human homologue of the Drosophila kelch protein, involved in a ring-like structure [J]. *Exp Cell Res*, 2004, **300** (1): 72-83
- [12] McMahon M, Thomas N, Itoh K. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 domain and the redox-insensitive Neh6 domain [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (30): 31 556-567
- [13] Kutuzov MA, Andreeva AV. Protein Ser/Thr phosphatases with kelch-like repeat domains [J]. *Cell Signal*, 2002, **14** (9): 745-750
- [14] Kim IF, Mohammadi E, Huang RC. Isolation and characterization of IPP, a novel human gene encoding an actin-binding, kelch-like protein [J]. *Gene*, 1999, **228** (1): 73-83

(此文编辑 胡必利)