

金黄地鼠 PrP 基因组织特异性表达的研究*

宁章勇, 赵德明**, 杨建民, 崔亚利, 孟丽平, 吴长德, 秦秀慧, 马李颖

(中国农业大学动物医学院, 国家动物传染性海绵状脑病实验室, 北京 100094)

The Study on Prion Gene Tissue-specific Expression of Golden Hamster*

NING Zhang-yong, ZHAO De-ming**, YANG Jian-min, CUI Ya-li, MENG Li-ping,
WU Chang-de, QIN Xiu-hui, MA Li-ying

(National Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Laboratory, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Golden hamster is one of the favored experimental models for studying mechanisms of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). We used the real-time fluorescent RT-PCR technique, constructing the standard plasmid and curve to quantify the *PrP* gene expression. Total RNA was isolated from four different regions of the brain and six peripheral organs to quantify the gene expression after the reverse transcript. The results showed that high mRNA levels were present in all four regions of the brain examined. In peripheral organs examined, inguinal lymph node showed high level of expression similar to that in brain, spleen, heart, liver and lung showed moderate levels of the expression and kidney showed the lowest expression. Our results provided the basic data of the function of the *PrP* and the effect of different organs in prion diseases.

Key words: Golden Hamster; Prion; Gene expression

摘要: 金黄地鼠是研究动物传染性海绵状脑病的理想模型动物之一, 我们利用实时荧光定量 RT-PCR 技术, 构建标准重组质粒制备标准曲线, 对中枢神经系统的 4 个不同部位及外周 6 个组织提取总 RNA, 反转录后进行 *PrP* 基因表达的定量。结果发现, 脑的四个检测部位都呈现高的表达量; 在外周器官中, 淋巴结的表达量和全脑相当, 脾脏、心脏、肝脏和肺脏呈现中等程度的表达, 肾脏的表达量最低。本研究的结果对于探讨朊蛋白的基本功能和不同组织在传染性海绵状病发生中的作用, 提供了基础数据。

关键词: 金黄地鼠; 朊蛋白; 基因表达

中图分类号: Q 939.4

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)02-0184-05

传染性海绵状脑病 (Transmissible spongiform encephalopathies, TSEs) 是一类动物和人的神经退行性疾病, 包括疯牛病 (Bovine spongiform encephalopathy, BSE)、羊痒病 (Scrapie)、传染性水貂脑病 (Transmissible mink encephalopathy, TME)、猫科动物海绵状脑病 (Feline spongiform encephalopathy, FSE) 以及人类的克雅氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)^[1]。细胞型朊病毒蛋白^[2] (Cellular Prion Protein PrP^C) 是通过糖基化位点^[3] 锚定于多

种细胞表面的糖蛋白^[4-9]。传染性海绵状脑病的发生是由机体正常编码的 *PrP* 基因表达的细胞型朊蛋白发生构象的变化而导致^[10], 在疾病发生过程中, PrP^{SC} 作为模板诱导基础分子 PrP^C 发生构象的改变, 导致 PrP^C 形成具有蛋白酶抗性的 PrP^{SC} 并在中枢神经系统聚集, 引发动物传染性海绵状脑病发生^[1,2,11]。在构象上, PrP^C 具有高的 α -螺旋结构, 而 PrP^{SC} 具有高的 β -折叠结构, 在 PrP^C 转化成 PrP^{SC} 的过程中, 没有其它的病原和核酸参与这一过程^[10]。

收稿日期: 2004-19-27, 修回日期: 2004-11-15

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30371062); 教育部博士点基金 (No. 20020019006)

作者简介: 宁章勇 (1978-), 男, 在读博士生, 主要从事动物传染性海绵状脑病研究。

** 通讯作者: 赵德明 (1958-), 男, 教授, 国家动物传染性海绵状脑病实验室主任。

Corresponding author: Tel: 010-62732980, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn.

早期的研究表明,动物传染性海绵状脑病的病理改变主要发生在中枢神经系统,在传染性海绵状脑病的亚临床阶段早期的研究表明,动物传染性海绵状脑病的病理改变主要发生在中枢神经系统,在传染性海绵状脑病的亚临床阶段,外周器官在疾病的发生过程中起着重要作用^[12,13],并且在淋巴器官内有较高的 PrP 的表达。

对 *PrP* 基因在外周和中枢组织中的表达定量,有利于探讨各器官在该病发生过程中的作用。到目前为止,对于 PrP^{Sc} 从外周组织向中枢神经系统的传播的路径和方式仍然不清楚^[14]。免疫器官在 PrP^{Sc} 的聚集和传播过程中起着重要的作用^[15,16]。*PrP* 基因表达的量 and 随后的翻译在疾病的起始阶段中起着重要的作用, *PrP* 基因高表达的组织有较高的转化成 PrP^{Sc} 并蓄积的危险。

目前,国际上对基因表达的检测通用的是荧光定量 PCR 方法^[17],荧光定量 PCR 可以非常可靠的、高灵敏度的对 mRNA 进行绝对定量。其定量的原理是利用标准重组质粒制备标准曲线,基于此标准曲线,对待检测样品进行可靠性非常高的定量^[18]。

PrP 基因表达的定量是研究动物传染性海绵状脑病发生的出发点,对探索动物传染性海绵状脑病的发生机理具有重要的意义。同时,组织特异性的表达模式也是对 PrP^C 在组织器官内的基本功能认识的有效途径。金黄地鼠是研究动物传染性海绵状脑病的理想实验动物,具有发病快,症状典型的特点,对于实验性传播海绵状脑病的研究具有重要意义^[12,19-21]。本研究利用实时荧光定量 RT-PCR 的方法,对金黄地鼠中枢神经系统和外周器官的 *PrP* 基因 mRNA 的表达进行了定量,为阐释海绵状脑病模型中 *PrP* 基因的表达和动物传染性海绵状脑病发生的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 金黄地鼠(150 日龄)由中国科学院遗传与发育所实验动物中心提供。*E. coli* DH₅ 株由本实验室保存。TRIZOL RNA 提取试剂盒(Gibco 公司)、dNTPs (TaKaRa 公司)、Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司)、M-MLV 逆转录酶(Promega 公司)、DEPC (Promega 公司)、RNASEOUT Ribonuclease (Promega 公司)、SYBR Green qPCR Kit (FINNZYMES 公司)、*ECOR* (TaKaRa 公司)、质粒快速提取试剂盒(博大泰克公司)、pGEM - T

Easy Vector Systems (Promega 公司)、E. Z. N. A Gel Extraction Kit (Promega 公司)、PCR 仪(PTC-150 型, MJ Research 公司)、实时荧光定量 PCR 仪(OPTICON 2 型, MJ Research 公司)。

1.2 组织 RNA 提取

金黄地鼠麻醉、处死后,迅速取大脑、小脑、丘脑、脑干、脾脏、腹股沟浅淋巴结、心脏、肝脏、肺脏、肾脏。各样品立即放入液氮中 2h,然后转入到 -86 超低温冰箱内。称取 100mg 组织,采用 TRIZOL RNA 提取试剂盒,按照说明书进行 RNA 的提取。提取的 RNA 于 -86 保存备用。

1.3 组织总 RNA 的 RT-PCR

按照已经发表的金黄地鼠 *PrP* 基因 mRNA 序列(GenBank 登录号为 K02234),分析并选择其保守序列区段,利用 Primer Primer5.0 软件,设计并选出一对引物。上游为 P1: 5-GACCGCTACTACCGTGAA-3',下游引物为 P2: 5-ACCATCAGG AAGATGAGAAA-3',产物大小为 320bp。

取 RNA 10 μ L,加入 10mmol/L dNTPs 2 μ L、Oliga dT₁₈ 2 μ L、DEPC 处理灭菌三蒸水 7 μ L 置于 PCR 仪 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min,迅速置冰上 5 min 后,加入 RT 反应液 12 μ L,于 PCR 仪上 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,70 $^{\circ}$ C 15min 灭活 M-MLV 逆转录酶。RT 反应液成分为:RT 5 \times buffer 8 μ L、RNAsin 2 μ L、M-MLV 逆转录酶 2 μ L (50U/ μ L)。

利用获得的反转录模板进行 PCR 反应,总体积 25 μ L,体系成分为:10 \times buffer 2.5 μ L、dNTPs 2 μ L、P₁ 和 P₂ (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L、Ex Taq 酶 0.2 μ L、cDNA 2 μ L、灭菌三蒸水 17.3 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s、50 $^{\circ}$ C 退火 30s、72 $^{\circ}$ C 延伸 40s,共 36 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 8min。

1.4 重组标准质粒制备

按照 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 的操作说明对 PCR 产物进行纯化、回收。按照 pGEM - T Easy Vector Systems 试剂盒的说明书将纯化产物与 pGEM - T-easy 载体连接,连接体系为 10 μ L,其反应组分为:pGEM - T Easy Vector (50ng) 5 μ L、PCR 产物 1.5 μ L、T₄DNA 连接酶 1 μ L、灭菌三蒸水 1.5 μ L,同时设定阴性和阳性对照。将连接体系置于 4 $^{\circ}$ C 水浴中过夜后加入到 200 μ L 感受态大肠杆菌 DH₅ 中,热击转化后,加入 Amp^r LB 液体培养基活化 1h,低速离心后涂于 Amp^r、X-Gal 和 IPTG 处理的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 4h。参照菌落 PCR 的结果,挑取单菌落白斑, Amp^r LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C、200r/min 过夜培养。

按照质粒快速提取试剂盒的操作要求提取质粒,并进行质粒 PCR、酶切和测序鉴定。

1.5 实时荧光定量 RT-PCR

1.5.1 标准模板的定量:对经 RNase 消化的质粒和所有的样品反转录模板测定 A_{260} 光吸收值,计算质粒和样品反转录模板的量。

1.5.2 荧光定量 RT-PCR:在 OPTICON 2 型实时荧光 PCR 仪上对样品的反转录 cDNA、5 个标准质粒模板进行定量。反应总体积 25 μ L,反应条件同常规 PCR,在反应过程中加入了与荧光数据读取和分析的步骤,即在每个循环内加入读板步骤,总延伸结束后,加入溶解曲线的制备(65 ~ 95 范围内,每 0.2 读板一次、停留 1s)步骤。由 Opticon analysis software(version 2.01) 荧光分析软件显示自动计算模板的拷贝数。

1.6 统计学分析

每个样品重复三次,由 Opticon analysis software(version 2.01) 荧光分析软件自动进行定量。不同组织的 *PrP* 基因 mRNA 的数量由 SPSS10.0 医学分析软件进行 T-检验, $p < 0.05$ 即为差异显著。

2 结果

2.1 组织 RNA 提取和目的基因片段的扩增

组织提取的总 RNA 紫外分光 A_{260}/A_{280} 为 1.8 ~ 2.0 之间,电泳结果表明 RNA 分子保持完整。经 RT-PCR 扩增,获得 320bp 左右的目的条带。序列测定表明,获得的目的条带同原始序列的同源性为 100%。

2.2 标准模板的鉴定

对提取的质粒进行 *EcoR* 酶切,在 pGEM-T Easy 载体的插入片段的两侧均有 *EcoR* 酶切位点,经酶切后,含插入片段的大小为 325bp,剩余质粒片段为 2 956bp(见图 1)。对质粒 DNA 进行 PCR

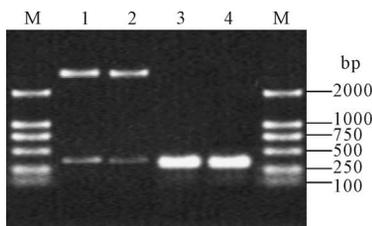


图 1 重组质粒酶切鉴定和质粒 PCR 扩增

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of recombinant T-easy-vectors following digestion with *EcoRI*

M, marker DL2000; 1 and 2, *EcoRI* digested recombinant T-easy-vectors; 3 and 4, products of PCR using recombinant T-easy-vectors as template.

扩增,获得 320bp 左右大小片段,和组织 mRNA 经 RT-PCR 扩增片段大小一致。对质粒 DNA 进行序列测定后,插入 DNA 片段的序列经 Pubmed blast 过程分析和原始序列的片段的同源性为 100%。说明质粒连接、转化成功,标准质粒构建成功。

2.3 标准曲线

通过反应模板为 1×10^7 - 1×10^1 个的标准重组质粒制备标准曲线,通过对其动力学曲线进行分析,发现在本反应体系和反应条件下,该标准曲线检测的灵敏度为 1×10^2 个模板,通过对其回归曲线进行分析,发现其相关性良好,相关系数 $r^2 = 0.999$ (图 2A)。

2.4 扩增产物特异性

对标准重组质粒和样品的扩增产物进行了 65 ~ 95 每 0.2 读板一次的溶解曲线分析,发现溶解曲线为单峰,且峰值单一,说明反应特异(图 2B)。经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳发现其长度为预期的 320bp,无引物二聚体出现。

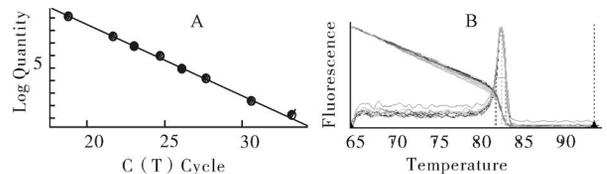


图 2 *PrP* mRNA 实时荧光 RT-PCR 定量示例

Fig. 2 Example of real-time PCR for quantification of *PrP* mRNA

(A) Example of real-time PCR amplification standard curves obtained by plotting fluorescence data against their cycle number. $y = -0.29x + 11.88$ ($r^2 = 0.999$) (the black is standard and the grey is sample). (B) Example of real-time PCR amplification melting curves obtained by plotting fluorescence data against their cycle number. The T_m is 83 °C, the production is specific.

2.5 样品定量

组织中提取的总 RNA 有显著的差异,波动范围为最低值脑干 584ng/mg 到最高值淋巴结 3904ng/mg,差异显著(表 1)。不同样品的 RT 产物 cDNA 的定量差异在 5% ($n = 10$) 以内,同一样品在同一次实时荧光定量结果的差异在 2% 以内。同一组织的不同反转录模板之间的定量无显著差异。在进行统计分析时不考虑动物之间的差异。

每 ng 总 RNA 中 *PrP* 基因 mRNA 的拷贝数有明显差异,定量的结果见表 1。每 ng 总 RNA 中 *PrP* 基因 mRNA 的拷贝数最高的为脑干,最低的为肾脏。在中枢神经系统中,每 ng 总 RNA 中 *PrP* 基因 mRNA 的拷贝数最高的为脑干,中枢神经的其他部位无显著性差异。在其它器官中,淋巴结 *PrP* 基因 mRNA 的拷贝数最高。每 mg 组织 *PrP* 基因

mRNA 的拷贝数最高的为脑干,最低的为肾脏,中枢神经系统的大脑、小脑和丘脑无显著差异(资料未显示)。每 ng 总 RNA 中 PrP mRNA 拷贝数的对比见表 2。

表 1 金黄地鼠合组织总 RNA 和 PrP mRNA 的定量
Table 1 Quantification of total RNA and PrP mRNA in golden hamster tissues

Tissues	No. of samples (ng/ mg tissue)	Total RNA	CV (%)	PrP mRNA	CV (%)
		(ng/ mg tissue)		copies/ ng RNA	
Neocortex	8	584	10.8	59 068	35.40
Cerebellum	8	726	20.4	41209	27.60
Thalamus	7	657	35	9106	54.10
Obex	8	988	27	66920	27.90
Spleen	8	2800	36	8428	59.1
Lymph node	7	3904	49	28186	65.3
Heart	8	964	17	5601	48.3
Lung	8	1507	25	1393	65.5
Liver	8	995	34	3517	54.10
Kidney	8	1420	27	119	36.10

表 2 1ng 总 RNA 中 PrP mRNA 拷贝数的对比
Table 2 Tissue-specific contrasts in PrP mRNA copy number in 1 ng of Total RNA.

P<0.05	Neocortex	Cerebellum	Thalamus	Obex	Spleen	Lymph node	Heart	Lung	Liver	Kidney
Neocortex	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Cerebellum	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Thalamus	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Obex	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Spleen	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Lymph node	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Heart	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lung	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Liver	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kidney	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(The sign + indicates presence of significant ($p < 0.05$) difference, - vice versa.)

3 讨论

利用实时荧光定量 RT-PCR 技术对基因 mRNA 的表达水平进行研究非常可靠^[14],研究结果具有可比性和可重复性。本研究对金黄地鼠中枢和外周器官 PrP mRNA 表达实时荧光定量采用的荧光染料是 SYBR Green I,该染料可以在 PCR 产物形成的过程中结合到双链 DNA 上,利用这种染料可以避免使用昂贵的特异性水解探针。但是,SYBR Green I 即可以和特异性的 PCR 产物相结合,也可以和非特性的产物(如引物二聚体)相结合。在研究中,我们通过优化 PCR 的反应条件,分析产物的溶解曲线等方法,有效的避免了这种情况的发生。对于 PrP 基因 mRNA 的定量我们采用了每 ng 总

RNA 中的拷贝数来表示,这样可以了解不同组织中 PrP^C 表达的潜能,对于了解朊病毒病的早期发病原因具有至关重要的作用。

我们检测到的淋巴结 PrP 基因的表达水平较高,与 Cashman 提出的朊蛋白在免疫系统中的作用相一致^[16],也印证了 Aucouturier 提出的朊蛋白和免疫系统的相互关系^[15]。Robakis 在鼠的脾脏内没有检测到^[22],我们的结果与其有很大的差别,但 Robakis 是采用原位杂交和 Northern Blot 的方法进行检测的。我们的实验结果与 Ales Tichopad^[14]采用荧光定量的方法对牛的定量结果相似。对脾脏 PrP 基因表达的绝对定量,有待于进一步研究。

本研究中,金黄地鼠中枢神经系统各组织 PrP 基因 mRNA 的表达量与 Harris^[23]采用原位杂交和 Northern Blot 对鸡脑组织、Ales Tichopad^[14]采用荧光定量 PCR 对牛脑组织的研究结果相一致。但是,原位杂交和 Northern Blot 的检测方法是一种半定量方法,无论是精确度和可靠性均低于荧光定量检测。PrP 基因 mRNA 在中枢神经组织的高表达量和分布与朊蛋白的功能是相适应的^[23]。肾脏在所有检测组织中 PrP 基因的表达量最低,这也许与 PrP 基因翻译后调控有关。肝脏相对较高,可能与脾脏中含有枯否氏抗原提呈细胞有关。

参考文献

- [1] Liemann S, Glockshuber R. Transmissible spongiform encephalopathies [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 250:187-190.
- [2] Prusiner S B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie [J]. Science, 1982, 216:136-144.
- [3] Stahl N, Borchelt D R, Prusiner S B. Differential release of cellular and scrapie prion protein from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C [J]. Biochemistry, 1990, 29: 5405- 5412.
- [4] Kretzschmar H A, Prusiner S B, Stowring L E, et al. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons [J]. Am J Pathol, 1986, 122: 1-5.
- [5] Moser M, Colello R J, Pott U, et al. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells [J]. Neuron, 1995, 14: 509-517.
- [6] Brown D R. Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes [J]. J Neurochem, 1999, 73:1105-1113.
- [7] Brown D R, Besinger A, Herms J W, et al. Microglial expression of the prion protein [J]. Neuroreport, 1998, 9: 1425-1429.
- [8] Diomedea L, Sozzani S, Luini W, et al. Activation effects of a prion protein fragment [PrP^C(106-126)] on human leucocytes [J]. Biochem J, 1996, 320:563-570.
- [9] Brown D R, Schmidt B, Groschup M H, et al. Prion protein

- expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment [J]. *Eur J Cell Biol*, 1998, 75: 29-37.
- [10] Prusiner S B. Prions[J]. *Proc Natl Acta Sci USA*, 1998, 95: 13363-13383.
- [11] Brandner S, Isenmann S, Raeber A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity [J]. *Nature*, 1996, 379:339-343.
- [12] Kimberlin R H, Walker C A. Pathogenesis of scrapie (strain 263 K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly [J]. *J Comp Pathol*, 1986, 67:255-263.
- [13] Kimberlin R H, Walker C A. Incubation periods in six models of intraperitoneally injected scrapie depend mainly on the dynamics of agent replication within the nervous system and not the lymphoreticular system [J]. *J Gen Virol*, 1988, 69: 2953-2960.
- [14] Ales Tichpad, Michael W P faffl, Andrea Didier. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2003, 17:5-10.
- [15] Aucouturier P, Carp R I, Carnaud C, *et al.* Prion diseases and the immune system [J]. *Clin Immunol*, 2000, 96:79-85.
- [16] Cashman N R, Loertscher R, Nalbantoglu J, *et al.* Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation [J]. *Cell*, 1990, 61:185-192.
- [17] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods*, 2001, 25:386-401.
- [18] Walker N J. Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2001, 15:121-127.
- [19] choi S I, Ju W K, Eun-kyoung Choi Jin Kin, *et al.* Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brain of hamsters infected with the 263 K scrapie agent [J]. *Acta Neuropathol*, 1998, 96:279-286.
- [20] 孙宪锋,张保云,董小平,等. Scrapie 263 K 毒株感染金黄地鼠及其脑组织的组织学研究[J]. *病毒学报*, 2001, 16:48-53.
- [21] 张宝云,侯星生,高晨,等. 羊瘙痒病小鼠适应株 139A 可突破种属屏障颅内感染金黄地鼠[J]. *病毒学报*, 2002, 18(4): 337-341.
- [22] Robakis N K, Sawh P R, Wolfe G C, *et al.* Isolation of a cDNA clone encoding the leader peptide of prion protein and expression of the homologous gene in various tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83:6377-6381.
- [23] Collinge J, Whittington M A, Sidle K C, *et al.* Prion protein is necessary for normal synaptic function [J]. *Nature*, 1994, 370:295-297.