

外源小鼠核酸促电离辐射损伤的同系小鼠 肠腺细胞修复的相关基因克隆

崔大祥¹ 曾桂英² 王 枫² 郭晏海¹ 任东青²
田芙蓉² 闫小君¹ 赵 涛² 苏成芝¹

¹(第四军医大学全军基因诊断技术研究所 陕西 710032)

²(第四军医大学放射医学教研室 陕西 710032)

摘要 为研究克隆外源核酸促电离辐射损伤的小鼠肠腺细胞修复的相关基因。建立 BALB/c 小鼠电离辐射后给予外源 RNA 与生理盐水治疗的 6、12、24h, 4d 和 8d 的模型, 收集空肠组织标本后采用消减杂交基础上的 LD-PCR 技术, 获取与受照射小鼠肠腺损伤修复相关的基因克隆, 对其进行全自动测序与 GeneBank 检索, 新基因递交给基因库。获取了 90 个与肠腺修复相关的基因, 杂交证实核酸治疗组与生理盐水治疗组之间呈差异表达, 其中 18 个是新基因, GeneBank 接受号为 AF240164-240181。获取了 90 个可能与外源核酸促肠腺修复相关的基因克隆, 其中 18 个是新的相关基因。

关键词 电离辐射, 修复, 表达基因, 克隆

中图分类号 R823. 7

核事故条件下大剂量电离辐射引起肠腺细胞的死亡是肠道辐射损伤的关键, 严重时可发生肠型放射病而引起机体死亡。从 60 年代起, 国内外进行了多项研究, 但至今仍未见有效治疗措施的报道。为了增强肠腺细胞的存活率, 我们自 70 年代起就开展了如何提高受照射小鼠肠腺细胞存活与机理的研究。实验证实, 正常小鼠肠腺细胞悬液和多种组织器官粗提液中含有提高受照射小鼠肠腺存活率的因子, 并证实此因子的化学成分为核酸 (DNA、RNA) 及其前体, 进一步实验证实外源核酸对受照射小鼠肠腺的修复是由它在体内的酶解产物 (包括单独一种单核苷酸、核苷和碱基) 作用所致^[1-6]。但是, 核酸及其前体促进辐射损伤的肠腺细胞修复的分子机理仍不清楚。本课题首先建立 BALB/c 小鼠电离辐射后给予外源 RNA 与生理盐水治疗的模型, 分别于治疗后 6、12、24h, 4d 和 8d 采集空肠组织标本, 采用消减杂交基础上的 Long Distance-PCR 技术, 克隆了外源核酸对受照射小鼠肠腺损伤修复相关的表达基因, 进行了测序与检索分析, 初步探讨了外源核酸促电离辐射损伤的肠腺修复的分子机理。

1 材 料 和 方 法

1. 1 材料

mRNA 提取采用 Promega 公司 PolyAtract® System 1000 试剂盒, 反转录采用 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech), PCR 产物纯化采用 Promega 公司 Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System, LD-PCR 采用 Advantage²PCR Kit (Clontech);

“211”工程基金 (98X207) 与国家自然科学基金 (38970279) 资助

第一作者: 崔大祥, 男, 1967 年 2 月出生, 1990 年毕业于第二军医大学, 副教授, 生物与分子生物专业

收稿日期: 初稿 2000-04-20, 修回 2000-10-30

PCR 扩增仪采用 PE-5700 型定量 PCR 仪, PGEM®-T easy Vector System 购自 Promega 公司, α - 32 PdATP 购自北京福瑞公司, 化学试剂购自原平公司。

1.2 方法

按文献 [4] 的方法从 LACA 正常小鼠小肠中提取总 RNA。取 90 只 BALB/c 雄性小鼠, 10-12 周龄, 体重 18-22g, 实验前于实验室内饲养 2 周以适应环境。照射前根据随机数字表将小鼠按体质量随机分成 4 组, 用 $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠 ($40\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 麻醉, 固定于有机玻璃照射盒内, 以 ^{60}Co γ 射线进行腹部 1 次照射, 剂量率为 $151.1-149.47\text{cGy}\cdot\text{min}^{-1}$, 照射剂量为 1150cGy 。照射时, 除小鼠腹部外, 躯体的其余部位用 5cm 厚的铅块屏蔽, 照射源至动物中心的距离为 1.7m。小鼠实验当天, 用生理盐水将小肠 RNA 稀释成 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的注入液。小鼠接受照射后 2h 内, 采用局部肠腔扩张注入法给实验组每只小鼠局部空肠腔内注入 0.4mL 的小肠 RNA 注入液, 称为小肠 RNA 组 (IRNA 组); 照射对照组只注入 0.4mL 生理盐水 (IS 组)。实验后, 小鼠常规饲养。分别于照射后 6、12、24h, 4d 和 8d 采用颈椎脱臼法活杀小鼠, 快速取出小肠空肠段组织, 用生理盐水冲洗净内容物, -70°C 冻存待处理。为了避免个体差异, 实验组 6、12、24h, 4d 和 8d 的小肠标本, 相同条件的混合在一起, mRNA 的提取、反转录、消减杂交、LD-PCR 按 Clone Tech 说明书进行, PCR 产物克隆入 T 载体、反向打点杂交鉴定按文献 [6] 进行。质粒的提取采用 VIOGENE 公司的 plasmid DNA purification miniprep kit, 质粒的定量采用紫外分析仪进行, 测序由上海生工生物工程技术有限公司采用 Model 377 型全自动序列分析仪双向测序完成。测序结果借助连网计算机进行检索分析, 新基因递交给 GeneBank。

2 结果

2.1 与 RNA 促肠腺修复的表达基因克隆结果

PCR 产物与 T 载体连接并转化 JM109 后, 共获得 90 个与损伤肠腺修复相关的基因克隆, 实验组 6、12、24h, 4d 和 8d 的克隆表达基因数分别为 18、22、25、13、12 个。所获克隆用 BstZ1 酶切后证实含有相应片段 (见图 1)。

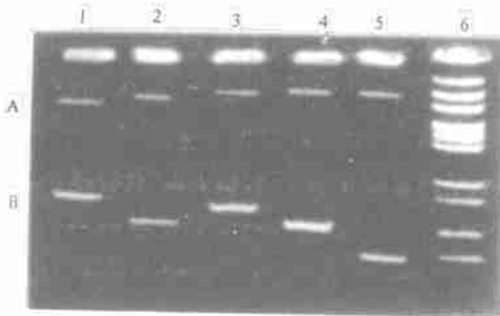


Fig. 1 Partial electrophoresis results of cloned plasmids cut by BstZ1 enzyme in 1% agarose gel
1-5 A: T vector fragments
1-5 B: cloned PCR product fragments
6 λ DNA HindIII Molecular Marker

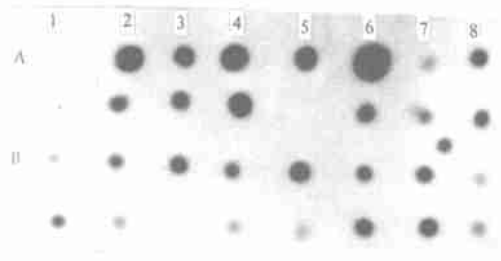


Fig. 2 Partial results of dot blot assays
A1, B1 negative control

A, B partial results of hybridization with cDNAs from test group
C, D partial results of hybridization with cDNAs from control group

2.2 杂交鉴定结果

所获基因克隆质粒煮沸变性后, 立即点于处理好的尼龙膜上烤干, 与带标记的实验组和

对照组的 cDNA 探针杂交，洗膜后立即进行图像扫描和定量分析，结果显示：所获基因在实验组与对照组之间呈差异表达（见图 2）。

2.3 新基因序列结果

GeneBank 分析表明：90 个序列中，18 个是与肠腺的损伤修复密切相关的新序列，GeneBank 接受号为 AF240164—AF240181。实验组 6、12、24h，4d 和 8d 的新表达基因数分别为 4、4、5、3、2 个。部分序列如下：

No. 1 sequence (AF240164)

```

1 caggctatcc cgtggtttcg gttcgtetta ttcgtgcacc ggaecgaaag tgcagcgttg
61 gactgaagca acgctttctt attgacggca gccccacaa tggcaagcgt ctctttctt
121 ggcatthtct tcggaagtag attaacctaa tcgacctcc tcctccattc gagagcatgc
181 accatcagca aaagtgatgt tgcgggtggt gaggtatttg gagagggttt taaaggctcc
241 ttactagta attgaccaca tcccaccacc cgatgctggc cttgacctgt caagggaact
301 gggetgtaaa ccgccaanaag ggggtgtgcaa atggagggtg gcatgaactg ggtgetcaaa
361 gagecgtatg aagggtttgt gtgaaccaa gtgccggtgt ggggtaaagg tgtg

```

No. 2 sequence (AF240165)

```

1 ccacgcgtcc ggcagtatat gacacaaatg ttataattag tgttatttct ttccacact
61 gagtcaaaaga ttattcaca gctatttcaa ctttttagat atcataatc tgaccataac
121 actttaaaat attgtattta ttcatcaca atcattgaa aaatcacatg ctattatatt
181 aaaattatgt gattatttta caaattaga ctacagaaa agaactattt cctacccaaa
241 aagetgtatg tttatatgca gcatgttttc aaaaaaaaa aaaaaggg

```

No. 3 sequence (AF240166)

```

1 tatgcggccc agccggccat ggcccagggtg aaactgcacc agtcaggacc tgaagtggta
61 aagcctgggg cttcagtga gctgtcctgc aaggcttcag gctacatctt cacaagtat
121 gatatagact ggggtaggca gacgcctgaa cagggacttg agtggattgg atggatttt
181 cctggagagg ggagtactga atacaatgag aagttcaagg gcagggccac actgagtgtg
241 gacaagtctc ccagcacagc ctatatggag ctcactagge tgacatctga ggactctgt
301 gtctatttct gtgctagagg ggactactat aggcctactt ttgacttctg gggccaaggg
361 accacggtea ccgtctctc aggtaccaag ctggagctga aacggggcgc cgcaggtgct
421 ccggtgccc atccggatcc gctggaaccg cgtgccgcat aga

```

No. 4 sequence (AF240167)

```

1 tatgcggccc agccggccat ggcccagggtg aaactgcacc agtcaggacc tgaagtggta
60 aagcctgggg cttcagtga gctgtcctgc aaggcttcag gctacatctt cacaagtat
120 gatatagact ggggtaggca gacgcctgaa cagggacttg agtggattgg atggatttt
180 cctggagagg ggagtactga atacaatgag aagttcaagg gcagggccac actgagtgtg
240 gacaagtctc ccagcacagc ctatatggag ctcactagge tgacatctga ggactctgt
300 gtctatttct gtgctagagg ggactactat aggcctactt ttgacttctg gggccaaggg

```

360 accacggtea cegtctecte aggtaccaag ctggagetga aacggggcgc cgcaggtgcg
420 cgggtgccgt atccggatcc gctggaaccg cgtgccgcat aga

No. 5 sequence (AF240168)

1 ccacgcgtcc ggtgtatgtt ctgccaate ccagcacagt tetacaaagt aaaatattg
61 gccgtgaatt catattaaca gatggaacat gaaattaaca cgTTTTTgct tcgctaatic
121 acagttcttt taatagcta attetaaate acctgttctg actttgacag gctacagaca
181 cctgtttggg gtaatatcc acagetaatt attacatgag aaattcagtt teacaacaaa
241 gagttctgt gtgaaattgc cattgtgggt aacaaattaa tatcaactat atacaatac
301 atttctgatg tcttaattta aatacagcta atatactact catctataac taaagaatgg
361 tatataaaaa ctaagactgt cctcttagtg tttgaattct gtctgtcaca ctttacacca
421 tgggtgcaact gatcaagtea gaatgttctt cccagtagca gtaatttact gtaatactgt
481 attttaaatg gcaggaaaag agtatagaat tttcaagtgg ctggaaaaat tectaactgt
541 atgttaaaaa tgactcagga gagttaaaaa agaaaaatc tgactggaga gagaaaaaaa
601 agtagatggg cggggcgctt tagaaggate caagettacg tccgcgtgca tgccaaggca
661 taactctct atcgggcacc taaattcaat tctggggcgc cggttacacg gccgggactg
721 gga

No. 6 sequence (AF240169)

1 ttggggecca gccggccatg gcccaggtga aactgcagca gtcaggacct gaactgaaga
60 agcctggaga gacagtcagg atctctgca aggcttctgg atatacttc acaactgctg
120 gaatgcagtg ggtgcaaaag atgccaggaa agggtttgaa gtggattggc tggataaaca
180 cccactctgg agtgccaaag tatgcagaag agttcaaggg acgctttgcc ttctctttgg
240 aaacctctgc cagcaactgca tattacaga taagcaacct caaaaatgag gacacggcta
300 cgtattctg tatgagatgg gattacagc gggggtttgc ttactgggce caagggacca
360 cggtcaccgt ctctcaggt ggaggcgggt caggcggagg ttgctctggc agtggcggat
420 cggacatcgt gctcaccag tctccagctt ctttggctgt gtctctaggg cagagggcca
480 ccactctctg cagagccagc gaaagtgtg ataatttgg cattagttt atgaactggt
540 tccagcagaa accaggacag ccaccaaac tctctctc tgetgcatcc aagcaaggat
600 cgggggtccc tgcaggttta ctggcaagtg ggtctgggac agatttccag ctcaacat
660 atctatgga g

No. 7 sequence (AF240170)

1 tctatcggc acgcggttcc agcggatccg gatacggcac cggcgcacct gcggcgcgcc
60 gtttcagctc cagcttggta cctgaggaga cgggtgaccgt ggteccctgg cccacaagt
120 caaagtagcg cctatagtag tcccctctag cacagaata gacagcagag tctcagatg
180 tcagcctagt gagetccata taggctgtgc tggaggactt gtctacactc agtgtggccc
240 tgcctttaa cttctcattg tattecgtac tcccctctcc aggaaaaac catccaatcc
300 actcaagtcc ctgttcagge gtctgctca cccagtctat atcataactt gtgaagatg
360 agcctgaagc ctgacggac agcttctctg aagccccagg ctttaccact tccagctctg

420 actggtgcag ttcacctgg gccatggcgg gctgggccc atagaagga acaactaaagc
 480 gaattgcgaa taataatttt ttacggtga aaatctcaa aaaaaagget ccaaagcttg
 540 gcgtaatcat ggcatagct gtttctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac
 600 aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gctgggggtg cctaagagt gagctaac
 660 acattaattg cc

No. 8 sequence (AF240171)

1 aacagtctat gggcacgcg gttccagegg atccggatac ggcaccggcg cactgcegge
 60 egcccgtttg atttccaget tgggtccccc tgggtagctc gattccgac cgcaccgccc
 120 agagccacct ccgctgaac cgcctccacc tgaggagacg gtgaccgtgg tccttgggc
 180 ccagtagtca aagtaataaa aactaccgta gtaagcccct cttgcacagt aatagatggc
 240 agaatcatca gatgtcaatc tggcaagtt catatagget gtaatggagg atttgtaac
 300 agtcatagtg gccttgccct taaacttctg gttgtagttt gtattaccat cgtaagtact
 360 aataattcca atccacteta gactctgtge atgattcacc ttcagccagt gcatagaata
 420 atcagtgaat gtgtagecgg aacccttga ggaatcttc actgagacc caggcctcac
 480 cacctcaggt cctgactgct gcagtttca cttgggcatg gceggctggg ccgcatagaa
 540 aggaacaact aaaggaattg cgaataataa ttttttcaeg ttgaaaatc ccaaaaaaaa
 600 ggctcaaaa gcttggcgta atcatggta tagctgntn ctgtgtgaaa ttggtatcg
 660 ctcaaatc cacacaat

No. 9 sequence (AF240172)

1 tcgatagctg gtaccctgc aggtaccggt ccggaattcc egggtcgacc cacgcgtccg
 60 gtgtatgttc ttgccaatcc cagcacagtt ctacaaagta aaatattgg ccgtgaatc
 120 atattaacag atggaacatg aaattaacac gtttttgett cgtaattca cagttctttt
 180 aatacgetaa tttaaatca cctgttctga ctttgacagg ctacagacac ctgtttgggg
 240 taatattcca cagtaatta ttacatgaga aattcagttt ccaacaaaag agtttctgtg
 300 tgaaattgcc attgtggta acaaatat atcaactata tacaataca tttctgatgt
 360 ctaatttaa atacagctaa tatactactc atctataact aaagaatggt atataaaaac
 420 taagactgtc ctcttagtgt ttgaattctg tctgtcacac ttacaccat ggttgcactg
 480 atcaagtcag aatgttctc ccagtagcag taatttactg taatactgta ttttaaatgg
 540 caggaaaaga gtatagaatt tcaagtgge tggaaaaatt cctaactgta tgttaaaaa
 600 gactcaggag agttaaaaaa gaaaaattc gactggagag agaaaaaaa gtagatgggg
 660 ggggcgtttt agaaggatcc aagcttaccg ccgcgtgcat gccaaaggcat aactctcta
 720 tgggacact aaattcaatt cctgggccc ggttacacgg ccgggaactgg ga

No. 10 sequence (AF240173)

1 tctatgggc acgcggttcc agcggatccg gatacggcac cggcgcacct gcggcgcgcc
 60 gtttcagctc cagcttggte ccccctccga acgtgtaagg aacctctta ctttggtagc
 120 agaaatacac tgcaggatca tectecteca taggatata gttgaggetg aaatctgtcc
 180 cagaccact gccagtaaac ctggcaggga ccccggatcc ttgcttggat gcagcataga

240 tgaggagttt ggggtgctgt cctggtttct getggaacca gttcataaaa etaatgcaa
 300 tattatcaac acttctctgt gctctgcagg agatggtggt cctctgccct agagacacag
 360 ccaagaagec tggagactgg gtgagcaega tgtccgatcc gccactgcca gagccacctc
 420 cgctgaacc getccactg aggagacggg gacctgggtc ccttggccca gtaagcaaac
 480 cccccgtcgt aatcccatct catacagaaa tacgtagecg tgcctcatt tttgaggtt
 540 gcttatctgt aatatgcaa gtgcctggca gaggtttcca aagagaagge aaagccctcc
 600 ctttgaacte ttctggcata cttttggcac ttcagagtgg gtngtttatt ccagccaatc
 660 cactcaaaa ccccttctct tgg

No. 11 sequence (AF240174)

1 taccggctcg gaattccggg gtcgaccac gcgtccggca gtatatgaca caaatgttat
 60 gattagtgtt atttctttc cacactgagt caagattat ttcacageta ttcaacttt
 120 ttgatataca taattctgac cataaacactt taaaatattg gattattca ttcaaaatc
 180 attgaaaaat cacatgctat tatattaaaa ttatgtgatt attttcaaaa attagactta
 240 cagaaaagaa ctatttcta cccaaaaage tgtatgttta tatgcageat gttttcaaaa
 300 aaaaaaaaa aggggcgccg ctctagagga tccaagetta cgtaccgctg catgcgacgt
 360 catagctctt ctatagtgtc acctaaatc aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt
 420 gactgggaaa accctggcgg ttaccaact taatgcctt gcagcacatc ccccttgcg
 480 cagctggcgt aatagegaag aggccegcac cgatcgccct tccaacagt tgcgcagct
 540 gaatggcgaa tgggaccgag ccctgtageg ggcgattaag ccggggcggg tgtggtggtt
 600 acgcgcagcg tgaccgtaca cttggcagcg ccctatcgg ccgcttctt tegtttct
 660 tcccttctt tttttggca cgttctgcce nggtttccce gteaagctct aaatccgggg
 729 ggctccctt taagggttcc gganttaang gttttaccgg nncncgac cccg

No. 12 sequence (AF240175)

1 cacagtaata gatggcagaa tcatcagatg tcaatctggc aagtccata taggctgtaa
 60 tggaggattt gtaacacgtc atagtggcct tgccttaaa cttctggttg tagtttgtat
 120 taccatgta agtactaata attccaatcc actctagaact ctgtgeatga ttcatttca
 180 gccagtgcac agaataatca gtgaatgtgt agecgggaacc cttgcaggaa atcttactg
 240 agaccccagg cctcaccacc teaggtctg actgctgcag ttacactgg gccatggcgg
 300 gctgggcccgc atagaaagga acaactaaag gaattgcgaa taataatttt ttcacgttga
 360 aaatctccaa aaaaaaggct ccaaagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctctg
 420 tgaattggtt atcctctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa
 480 gctgggggtg cctaatgagt gagetaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgt
 540 ttccagctcg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tgggnaaacg cgcgggggag
 600 aggcggtttg cgtatt

No. 13 sequence (AF240176)

1 tggaaacattt tatttaaatg tcttgtgttc ccttttaacc aacacaaaa agagaatta
 60 aaattttttt ctttttttct tttctttttt ttttttgetat tccaacagg ggagctcgtt

120 cagtgaaggg ttggcgagtc tetggagctg ggtggggagt gtgtgectec tgtccggctg
 180 ggttggtctt cccagctgg ccacctggg tagacagcca accceggagg tggettctctg
 240 ggagtctcac cctgagcaga cctggtcttc cctccaggga ggggtgggtt gagggactgg
 300 ctgtgactat gggaccagct gttccagaga gaaggggtag gggagagaag gtcagatctg
 360 gaatgttcca tgatggttgc aggggtctgga gagtatattt ggtagaaaaa taaggtgctt
 420 tgggaatctg cgcagctctg gtectgcccg cccaagagag aaaccceccc tgtggcccaa
 480 aaggcagtga atatagaaac aaccggcaga gccaggaate ctacceacgg agggttccgg
 540 gcggaagtga ggcaggtage caaactctg ttcctgctcg aggttgctcg gggcctcccc
 600 gttgattgtg ggtcgggtca gttggcatgg cacaaaaggg gagggggagc cggtttgctc
 660 atttgtgggc tttttgtggg tacctggcgg ctgcaaaaac atggttgccc tgtgggggaa
 720 caccaacca atggaaatca atcggggccc cctgggggag gggettggte ttag₁tac

No. 14 sequence (AF240177)

1 ggcgaccgtg gtcccttggc ccagtaage aaacccccg tcgtaatccc atctcataca
 60 gaaatacgtg gccgtgtcct ctttttgag gttgcttacc tgtaaataatg cagtgtctgga
 120 agaggtttcc aaagagaagg caaagcgtcc ctgtaactct tetgcatact ttggcactcc
 180 agagtgggtg tttatecage caatccactt caaaccttt cctggcatct tttgaccca
 240 ctgcattcca gcagttgtga aggtatatcc agaagccttg caggagatec tgactgtctc
 300 tccaggettcc ttcagttcag gtectgactg ctgcagtttc acctgggcca tgccggctg
 360 ggccgcgatg aaaggaacaa ctaaaggaat tgcgaataat aatttttca cgttgaaaa
 420 ctcaaaaaa aaggtccaa agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa
 480 attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct
 540 ggggtgceta atgagtgage taactcacat taattgctt gcctcactg cccgctttcc
 600 agtcgggaaa cctgtctgct cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagggc
 660 gtttgcgtat tgggcctctc tc

No. 15 sequence (AF240178)

1 aatctgaacg attgggcccg acgtcgcctg ctcccggccg ccatggcccg cgggatattc
 60 ggctgcgaga agacgacaga atttttttt tttttttt tttttttt ggagaggggg
 120 gtttctctat agccccggtc gtccgtggaac tcaactatga gaccaggetg gcttccagct
 180 cacagaaatg cttttgctc tgctcctga gtgctgggtt taagggactc tgcgttgta
 240 ccaactgetta atcaactagt eggcgcctg caggtegacc atatgggaga gctcccaacg
 300 cgttggatgc atagcttgag tattctatag tgtcacctaa atagcttggc gtaatcatgg
 360 teatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcaca tccacacaa catacgagcc
 420 ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgc taatgagtga getaactcac attaatggc
 480 ttgcctcac tgcctgctt ccagtcggga aacctgctg gccagctgca ttaatgaate
 540 ggccaacgcg eggggagagg cggtttgcgt attgggcctc ctccgcttc g

No. 16 sequence (AF240179)

1 ccggtcccca cgtcctgctc cccggccc atggcccgg gattatata atataata

60 atatatata atatatataa atcactagt eggccgctg caggtegacc atatgggaga
 120 gctccaacg cgttggatgc atagcttgag tattctatag tgtcacctaa atagcttggc
 180 gtaatcatgg tcatagetgt ttccgtgtg aaattgttat cegtcacaa ttccacacaa
 240 catacgagcc ggaagcataa agtgtaaage ctgggggtgce taatgagtga getaactcac
 300 attaattgcy ttgcgtcac tgeccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca
 360 ttaatgaate ggccaacgcy eggggagagg cggtttgcgt attgggcgt ctccgcttc
 420 ctcgtcact gactcgtgc gctcggctgt tcggtgagg egagcggat cagctcactc
 480 aaaggcggta atacggttat ccacagaate aggggataac cgcaggaaag aacatgtgag
 540 caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg ttttccata
 600 gctccgccc cctgacgagc atcacaaaa tccgacgctc aagtcagagg tggcgaaac
 660 cgacaggact ataagatac caagcgttc ccctggaag ctccctcgtg cgtctcctg
 720 ttccgacct gcccgttacc ggatacctgg nccgctttctc

No. 17 sequence (AF240180)

1 ctggttcgce tgcaggtaacc ggtccggaat tcccgggtcg acccaccgct cegcggagce
 60 gtgggceggac gcgtgggaaa agattgtgaa gctcgtgaaa gttcagctc cccgagttgg
 120 tggaaaacgc taaactggca gattagattt taaataaag attggattat aactctaaaa
 180 aaaaaaaaa aagggeggcc gctctagagg atccaagct acgtaccgct gcatgagcag
 240 tcatagetct tctatagtgt cacctaaatt caattcactg gccctcgttt tacaacgctg
 300 tgactgggaa aacctggcg ttaccaact taatcgcctt gcagcacatc ccccttgcg
 360 cagctggcgt aatagegaag aggccegcac cgateccct tccaacagt tgcgcagcct
 420 gaatggcgaa tgggacgcgc cctgtagegg cgcattaage gggcgggtg tgggtggtac
 480 gcgcagcgtg accgtacac ttgcagegcc ctagegccg ctctttgcg tttctccct
 540 tctttctcg ccacgttgc eggtttccc cgtcaagctc taaatcgggg ggtcccttt
 600 tagggtcega ttagtgctt tacggcact cgacccaaa aaaacttgat taggngtat
 660 ggttcacgta attgggcat cgccttgat agacggttt ttcgccctt gacggttga
 720 agtcccgtt tettaataag nggactnctt gttccaaacn tggaaacaaca cgtt

No. 18 sequence (AF240181)

1 gacgtcgeat gctcccggcc gccatggccc gegggatate actagtgcgg ccgctgcag
 60 gtegaccata tgggagagct cccaaccgct tggatgcata gcttgagtat tctatagtgt
 120 cacctaaata gcttggcgta atcatggtea tagctgttcc ctgtgtgaaa ttgttatccg
 180 ctcacaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtccata
 240 tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgcttcca gtcgggaaac
 300 ctgctgctcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagagcgg tttgcgtatt
 360 gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac tcgtgcgtt cggctgttc gctgcccga
 420 gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca
 480 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagca aaggccagga accgtaaaaa ggcgcgctt
 540 ctggcgtttt tccataggt ccgccccct gacgagcacc acaaaaa

3 讨论

消化道是电离辐射敏感组织,其中尤以小肠最为敏感。多年来,国内外对电离辐射后肠上皮干细胞的损伤、肠道组织形态和消化吸收功能的改变作了较多的研究^[1~10],但关于如何促进辐射损伤的肠腺细胞修复的报道较少。我们的大量实验表明,外源核酸对辐射损伤的肠腺具有较好的促进修复作用,而且与外源核酸进入体内的途径无关^[1~6],但具体的分子机理并不清楚。本实验拟从表达基因水平来探讨核酸促辐射损伤的肠腺修复的分子机理。

本实验获取的和外源 RNA 促受照小鼠肠腺损伤修复的相关表达基因 90 个,即实验组 6、12、24h, 4d 和 8d 的基因克隆数分别为 18、22、25、13、12 个,进行了克隆与杂交鉴定,证实这些基因在实验组与对照组之间呈差异表达,并进行了双向测序与 GeneBank 检索分析。

结果表明,外源核酸治疗辐射损伤的肠腺时,可引起一些功能基因的差异表达,我们所获取的 90 个克隆中 18 个是新序列,它们的具体功能还不清楚,但可能与辐射损伤的肠腺修复密切相关。我们相信:只有阐明这些基因的具体功能,设计调控措施,就有可能使辐射对肠腺的损伤减小到最低程度^[11,12]。

总之,我们的研究为进一步阐明外源核酸对辐射损伤肠腺细胞的修复机理提供了新的资料。这些基因与蛋白是如何促进修复,如何抑制凋亡,其信号转导过程如何,仍有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 周元恺,沈世仁. 生物化学与生物物理进展, 1979; (2): 73-76
ZHOU Y K, SHENG S R. Prog Biochem Biophys, 1979; 1 (2): 73-76
- 2 曾桂英,韩士臣,刘江等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1990, 8 (4): 228-230
ZENG G Y, HAN S C, LIU J *et al.* J Radiat Res Radiat Process. 1990, 8 (4): 228-230
- 3 崔大祥,曾桂英,王枫,等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, 18 (3): 203-207
CUI D X, ZENG G Y, WANG F *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2000, 18 (3): 203-207
- 4 曾桂英,陈炳复,刘爱平等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1993, 11 (1): 53-55
ZENG G Y, CHEN B F, LIU A P *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1993, 11 (1): 53-55
- 5 周元恺,刘爱平,曾桂英. 辐射研究与辐射工艺学报, 1994, 12 (2): 96
ZHOU Y K, LIU A P, ZENG G Y. J Radiat Res Process, 1994, 12 (2): 96
- 6 崔大祥,曾桂英,闫小君等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, 18 (1): 74-76
CUI D X, ZENGY, G Y, YAN X J *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2000, 18 (1): 74-76
- 7 Parshad R, Ning Y, Sanford K K. Cancer Genet Cytogenet. 2000, 118 (1): 72-75
- 8 Carlomagno F, Burnet N G, Turesson I *et al.* Int J Cancer, 2000, 85 (6): 845-849
- 9 St Clair W H, St Clair D K. Cancer Res, 1991, 51 (17): 4539-4543
- 10 Subramanian V, Meyer B, Evans G S *et al.* Differentiation, 1998, 64 (1): 11-18.
- 11 Lee J S, Collins K M, Brown A L *et al.* Nature, 2000, 404 (6774): 201-204
- 12 Bishay K, Ory K, Lebeau J *et al.* Oncogene, 2000, 19 (7): 916-923

**CLONING OF MOUSE GENES RELATED TO REPAIRING OF
INTESTINAL EPITHELIUM OF THE γ IRRADIATED
MICE BY TREATMENT WITH THE INTESTINAL
RNA OF MICE OF THE SAME STRAIN**

CUI Daxiang¹ ZENG Guiying² WANG Feng¹ GUO Yanhai¹ REN Dongqing²
TIAN Furong² YAN Xiaojun¹ ZHAO Tao² SU Chengzhi¹

¹(*Institute of Genetic Diagnosis of the Fourth Military Medical University, Shanxi 710032*)

²(*Department of Irradiation Medicine of the Fourth Military Medical University, Shanxi 710032*)

ABSTRACT To clone the new genes involved in the repair of radiation-damaged intestinal crypts of mice which were treated with the intestinal RNA of the mice of the same strain. As a test group, 45 mice which had been irradiated by γ rays were injected with intestinal RNA of mice of the same strain in 2h after irradiation and the specimens of the small intestine of these animals were collected at 6, 12, 24h, 4d and 8d after irradiation respectively. The other 45 mice, as a control group, were treated with irradiation and physiological saline, and the specimens were collected as those in the test group. The genes which expressed more highly in the test group than in the control were cloned into T vectors after subtractive hybridization and LD-PCR and then sequenced. The sequences obtained were aligned through GeneBank for the new gene search. 90 clones were found associate with the repairing of radiation-damaged mouse intestinal crypts, which was confirmed by RNA dot blot assays. Among the 90 clones, 18 were accepted by GeneBank as new genes with the acceptance numbers AF240164—AF240181. Obtained ninety clones may be correlated closely with repairing of intestinal epithelium of the γ -irradiated mice by treatment with the intestinal RNA of mice of the same strain.

KEYWORDS Irradiation, Repair, Intestinal gland cell, Cloning

CLC R823. 7