

Lims A : 一个新的 LIM 同源域基因的克隆和初步分析

陈曦¹, 赵沐子², 李建民², 刘庆淮¹

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (No. 30000088)

作者单位: ¹(210029) 中国江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院眼科; ²(210029) 中国江苏省南京市, 南京医科大学细胞生物学与医学遗传学系

作者简介: 陈曦, 女, 在读硕士研究生, 主要从事眼底病的研究。

通讯作者: 刘庆淮, 男, 博士研究生导师, 教授, 主任医师, 主要从事眼底病的研究。liuqh@njmu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-27 修回日期: 2009-05-15

Lims A : molecular cloning and characterization of a novel splice variant of the LIM domain-family gene

Xi Chen¹, Mu-Zi Zhao², Jian-Min Li², Qing-Huai Liu¹

Foundation item: National Natural Science Foundation, China (No. 30000088)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ²Department of Cell Biology and Medical Genetics, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Qing-Huai Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. liuqh@njmu.edu.cn

Received: 2009-04-27 Accepted: 2009-05-15

Abstract

• AIM: To clone and analyze the different splicing variant of *Lims* gene in rat.

• METHODS: Splicing variants of *Lims* gene were amplified by RT-PCR from rat cDNA and inserted into PinPoint™ Xa-1T vector, the position clones selected by PCR were sequenced.

• RESULTS: *Lims A*, a novel splicing variant with a 1 014bp open reading frame (ORF), encoding a 338-amino acid (AA) protein was cloned.

• CONCLUSION: Comparative genome analysis displayed *Lims A*, a novel variant of *Lims* gene was confirmed in rat and established the foundation for further to studying the function of *Lims A* in proliferative vitreoretinopathy.

• KEYWORDS: *lims* gene; gene expression; gene splicing; proliferative vitreoretinopathy

Chen X, Zhao MZ, Li JM, et al. *Lims A*: molecular cloning and characterization of a novel splice variant of the LIM domain-family gene. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(6):1036-1040

摘要

目的: 克隆与分析大鼠不同剪切的 *Lims* 基因。

方法: 应用巢式 RT-PCR, 以 SD 大鼠 cDNA 为模板, 扩增 *Lims* 基因不同剪切子, 构入 PinPoint™ Xa-1T 质粒, 测序鉴定。

结果: 测序表明克隆了新的 *Lims* 基因变异剪切体 *Lims A*, 该变异剪切体编码区为 1 014bp, 编码 338 个氨基酸。

结论: 比较基因组学分析显示, 成功地克隆了一新的大鼠 *Lims* 基因剪切子 *Lims A*, 为进一步探索 *Lims* 基因在增生性玻璃体视网膜病变中的功能奠定基础。

关键词: *Lims* 基因; 基因表达; 基因剪切; 增生性玻璃体视网膜病变

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.06.008

陈曦, 赵沐子, 李建民, 等. *Lims A*: 一个新的 LIM 同源域基因的克隆和初步分析. 国际眼科杂志 2009;9(6):1036-1040

0 引言

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是视网膜增殖一类病变的总称, 常发生于视网膜脱离时, 也发生在视网膜复位手术后^[1], 是造成牵拉性视网膜脱离乃至失明的重要原因, 常使视网膜脱离术后复发而失败^[2], 目前仍是眼科临床治疗的难题之一。其病理过程实质是以视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞为主的多种细胞发生的炎症反应、异常增生及其增殖膜的收缩牵拉。然而, 关于 PVR 的研究仍集中在组织学和病理生理学的方面, 对于 PVR 发生的分子生物学机制仍不是十分清楚, 特别是 PVR 的发生牵涉到哪些基因的表达与调控, 是目前 PVR 研究的热点^[3]。LIM 结构域由两个串联重复的种间高度保守 LIM 基元组成^[4,5]。目前研究表明, 含有 LIM 结构域的基因编码的蛋白广泛表达于人体眼部尤其是 RPE 细胞、脑、肿瘤等多种组织中, 其功能包括通过激活转录参与细胞命运的决定, 通过调节转录来控制细胞的异常增生, 参与细胞骨架的组织等^[6]。而 RPE 细胞的异常增生、迁移正是 PVR 的发生、发展的关键环节^[7], 为进一步研究 *Lims* 基因功能与它在眼部疾病尤其是 PVR 发生发展中的作用, 我们应用巢式 PCR 技术, 从 SD 大鼠睾丸中克隆了一个新的 LIM 同源盒 (homeobox) 全长基因, 命名为 *Lims A* (LIM and senescent cell antigen-like domains A), 该基因的同源 EST 在人或小鼠的眼、脑、肾等组织, 及多种肿瘤组织中广泛表达。

1 材料和方法

1.1 材料 焦碳酸二乙酯 (DEPC, 德国 Serva 公司), PolyAT tract_Series9600™, mRNA Isolation System 试剂盒、逆转录酶 (AMV)、末端转移酶 (TdT)、Taq DNA 聚合酶均购自美国 Promega 公司。Expand™ Long Template PCR System, (大连 TAKARA 公司), JM109 菌株, PinPoint™ Xa-1T 质粒载体 (美国 Promega 公司), SD 大鼠购自南京医科大学动物研究中心。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据在 NCBI 数据库中的人同源序列 NM_004987 和大鼠同源序列 NW_047601 设计引物,巢式 PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成,外巢式上游引物 F 为:5'-ACTGAGGCACAGACTGACCCGG-3',下游引物 R1 为:5'-AGAACCATTCTCTCTAATGCTTTGATACAG-3',片段大小为 1 157bp,内巢式上游引物与外巢式引物 F 相同,下游引物 R2 为:5'-CAGTTTTAAGCAAAAGTAGATGAGGGTGG-3',片段大小为 1 130bp。

1.2.2 大鼠睾丸总 RNA 抽提 按照本实验室改良的组织总 RNA 快速提取方法分别提取两只 SD 大鼠的睾丸组织总 RNA,取 2 μ L 经 10mg/mL 琼脂糖凝胶电泳观察总 RNA 的完整性,并用紫外分光光度计测定 260,280nm 波长的吸光度 A 之值,检测总 RNA 的纯度,余下样品保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱内。

1.2.3 反转录扩增大鼠睾丸 cDNA 用 2 μ g mRNA 反转录合成单链 cDNA。20 μ L 的反应液含有 50mmol/L KCl, 3mmol/L MgCl₂, 10mmol/L Tris-HCl pH8. 3, 1mmol/L DTT, 5 μ mol/L oligo d(T)17, 500 μ mol/L dNTPs, 26U RNAsin, 8U AMV, 42 $^{\circ}$ C 反应 90min, 反转录合成第一链。反应结束后,加 RNAase H, 37 $^{\circ}$ C 30min 降解 RNA。

1.2.4 PCR 扩增目的基因 用所设计的引物,以上述大鼠 cDNA 为模板扩增特异性片段。PCR 体系总体积为 30 μ L, 含 50mmol/L KCl, 3mmol/L MgCl₂, 10mmol/L Tris-HCl pH8. 3, 200 μ mol/L dNTPs, 0. 5U Taq DNA 聚合酶, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 40s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20min。用 10mg/mL 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收和纯化靶 DNA 片段,根据产物大小,收集预测的片段进行第 2 次 PCR 扩增,退火温度提高到 55 $^{\circ}$ C, 其他条件不变,获得大鼠 LIM 基因全长开放式阅读框(ORF)。

1.2.5 PCR 产物的克隆和鉴定 PCR 扩增产物用直接 T/A 克隆法克隆到 PinPointTM Xa-1T 质粒载体,转化大肠杆菌 JM109 菌株,在含有氨苄青霉素的平板上 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养过夜。挑取白色克隆摇菌,用引物 SP6 和 PinPoint PCR 鉴定阳性克隆,阳性克隆抽提质粒送上海博亚公司测序。

1.2.6 序列分析 用 NCBI 中的 Blast 对序列进行同源性分析,并与大鼠基因组序列比对,分析所测定序列的准确性和可靠性。

2 结果

2.1 大鼠新的 *Lims* 剪接变体 *Lims A* 的扩增 以大鼠睾丸组织 cDNA 为模板,用设计的外巢式上下游引物 F/R1 经 RT-PCR 扩增得到一条弱的 1 157bp 片段,经琼脂糖凝胶电泳和切胶纯化后,该片段用内巢式引物 F/R2 做第 2 次 PCR 扩增,得到一条较强的 1 130bp 的条带,其大小与预期相符,未发现非特异扩增条带(图 1)。

2.2 *Lims A* 剪接变体重载体的构建和鉴定 在 T4 DNA 连接酶的作用下,将前面克隆得到的片段插入 PinPointTM Xa-1T 质粒载体中。从平板上挑取白色克隆以 PinPointTM Xa-1T 质粒载体上游的 PinPoint: 5'-GTGACGCGGTGCAGGGCG-3' 和下游的 SP6: 5'-CATACGATTTAGGTGACAC-3' 引物进行 PCR 鉴定。这两个引物到 EcoRV 克隆位点的距离之和为 144bp,因而重组子克隆应扩增约 1 270bp 的片段(图 2)。另外,随机挑取 3 个阳性克隆测序,发现不同克隆的碱基序列一致。此碱基序列对应的氨基酸序列经分析比对证实与 *Lims A* 类似,暂命名为 *Lims A*。

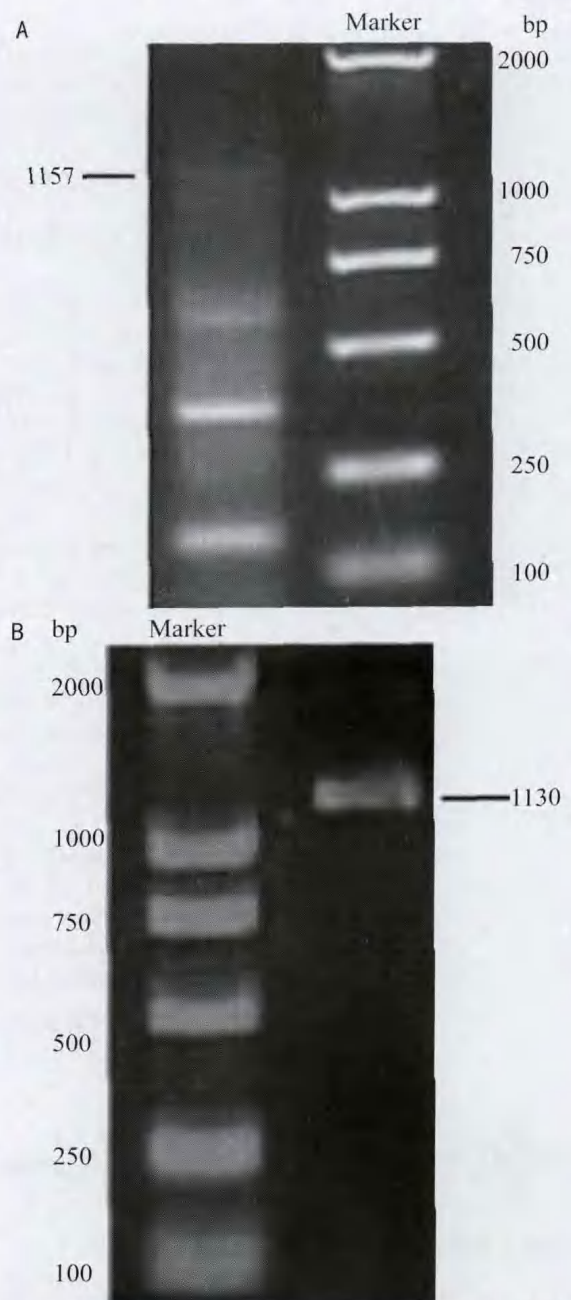


图 1 巢式 PCR 扩增大鼠睾丸 cDNA A:大鼠 cDNA 首次扩增结果,如横线所指,其它为非特异性反应;B:大鼠 cDNA 第二次扩增结果,如横线所指

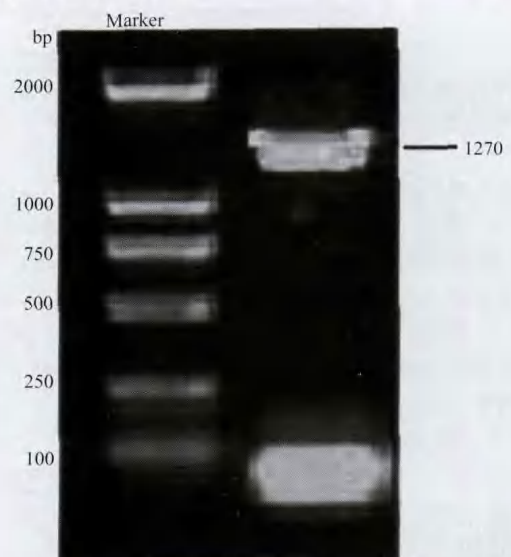


图 2 PCR 鉴定 *Lims A* 重组克隆

```

M L G V A A G M T N S
ACTGAGGCAC AGACTGACCC GGCGTGGACC GCGGAGATCC TGGGCGTGGC GGCCGGAATG ACCAACAGCA
N M A N A L A S A T C E R C K G G F D P A E K I
ACATGGCCAA TGCTTTGGCC AGTGCCACGT GTGAACGCTG CAAGGGGGGC TTTGACCCTG CTGAGAAGAT
U N S N G E L Y H E Q C F V C A Q C F Q Q F P
CGTGAACAGT AATGGTGAGC TGTACCATGAA CAGTGTTCGT GTGTGCTCAG TGCITCCAGC AGTTCCAGCA
E G L F Y E D E G R K Y C E H D F Q M L F A P
AGGACTCTTT TATGAGTTTG AAGGAAGAAA GTACTGTGAG CATGATTTCC AGATGCTCTT TGCTCCCTGC
C C H Q C G E F I I G R V I K A M N N S W H P E
TGCCACCAGT GTGGTGAATT CATCAITGGC AGGGTTATCA AAGCCATGAA CAACAGCTGG CATCCTGAGT
C F R C D L C Q E V L A D I G F V K N A G R H
GCTTCAGAT TGACCTCTGC CAGGAAGTGC TGGCAGACAT AGGGTTTGTG AAGAATGCTG GCAGACACCT
L C R P C H N R E K A R G L G K Y I C Q K C H
GTGTGCCCA TGTCATAATC GTGAAAAGGC CAGAGGCCIT GGAAAATACA TCTGCCAGAA ATGCCATGCC
A I I D E Q P L I F K N D P Y H P D H F N C A N
ATCATTGATG AACAGCCTTT GATTTTCAAG AACGACCCTT ACCACCCAGA CCACTTCAAC TGTGCCAAT
C G K E L T A D A R E L K G E L Y C L P C H D
CGCGGAAGGA GCTAACTGCT GATGCTCGGG AGCTGAAAGG GGAGCTATAC TGCTGCCAT GTCATGATAA
K M G V P I C G A C R R P I E G R V V N A M G
GATGGGGTTC CCTATCTGTG GCGCCTGCCG GAGGCCAAT GAAGGGCGAG TAGTGAATGC CATGGGCAAG
K Q W H V E H F V C A K C E K P F L G H R H Y E
CAATGGCATG TGGAGCAITT TGTTTGTGCC AAATGTGAAA AACCATTTCT TGGACATCGC CAITATGAGA
R K G L A Y C E T H Y N Q L F G D V C F H C N
GGAAGGCIT GGCCTATTGT GAGACTCACT ATAATCAGCT AITTTGGTGAT GTTTGTTTCC AITGCAACCG
R V I E G D V V S A L N K A W C V S C F A C S
TGTCATAGAA GGTGACGTGG TCTCTGCCCT CAACAAGGCC TGGTGTGTGA GCTGCTTTC CTGTCCACT
T C N T K L T L K N K F V E F D M K P V C K K C
TGCAATACCA AACTAACACT CAAGAATAAT TTGTGGAGTT TGACATGAA ACCAGTCTGT AAGAAGTGT
Y E K F P L E L K K R L K K L S E T L G R K
ACGAGAAAT TCCTTTGGAG CTGAAGAAA AGACTTAAGA AACTATCTGA GACCTTAGGA AGGAAAATAC
TTTTGGTGTG TTTTCTCT TTTTCTAAC CAATATFACT TAACCTGATC CACCCTCATC TACTTTTGT
TAAAACGTGA TCAAAGCAIT AGAGAGAATG GTTCTCTGTA TCAAAGCAIT AGAGAGAATG G T T C T
    
```

图3 *Lims A* 基因碱基及蛋白质编码



图4 *Lims A* 基因结构域 SMART 分析

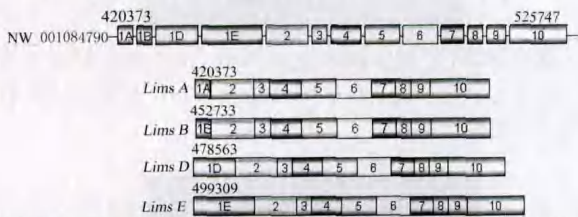


图5 *Lims* 基因不同的变异剪切子在大鼠 20 号染色体上结构示意图(对应的基因组序列为 NW_001084790)

2.3 *Lims A* cDNA 序列分析与基因结构分析 我们克隆的 *Lims A* cDNA 全长 1186bp, 开放阅读框为 37 ~ 1050bp, 编码 338 个氨基酸(图3)。其编码的蛋白质属于 LIM 同源盒基因, 具有典型的 LIM 基因 C-X2-C-X16-23-H-X2-C-X2-C 结构。与所有的 LIM 一样, 其 LIM 同源盒两侧的序列随机变化, 无同源性。大鼠 *Lims A* 与人的蛋白同源率为 99%。蛋白质功能结构分析显示, *Lims A* 具有 5 个 LIM 结构域(图4)。基因组结构 Blast 分析显示, *Lims A* 基因为单拷贝基因, 有 10 外显子, 定位在大鼠 20 号染色体, 对应的基因组序列为 NW_00108479, 基因全长约为 22197bp(图5)。在 20 号染色体上, *Lims A* 与另一 LIM 同源盒基因 *Lims E* 蛋白共用同一 LIM 决定簇, 显示 LIM

同源盒基因与同源盒基因 ANTP 一样, 可由同一转录单位经不同剪切产生功能相异又相关的特异蛋白(图5,6)。同时, 这也在一定程度上解释了 LIM 同源盒以外的基因序列不同的原因。比较基因组分析发现, 相同的基因结构也存在于人的 10 号染色体上, 并存在相同的转录变异剪切子。不同的剪切子主要是蛋白质的 N 端不同。

3 讨论

同源异形基因是指具有共同 DNA 片段的一类基因, 其相同的 DNA 序列叫同源盒基因, 编码的蛋白质叫同源结构域蛋白质。通常都是重要的转录调节因子, 反式调节细胞的发育与分化、决定细胞转移的种类和频率^[8,9]。迄今已发现 100 多种同源盒基因, 按其所编码氨基酸序列的差异可分为多个亚家族, 其中之一的 LIM 同源盒基因家族, 通过其 LIM 结构域介导蛋白质与蛋白质相互作用^[5,10], 可与核内广泛分布的 LIM 结构域结合蛋白或其他的转录调节因子结合, 启动特异基因的转录, 调节生物的发育和分化, 参与广泛的病理生理过程, 并与肿瘤的形成有关^[11]。LIM 结构域除了在同源异型结构域蛋白中出现外, 还在其它的蛋白中出现, 于是就将含有 LIM 结构域的蛋白归为一类, 称之为 LIM 蛋白。大多数的 LIM 蛋白含有一个以上的 LIM 结构域, 而且不同物种的同一 LIM 蛋白在进化上非常保守, 提示 LIM 结构域在这些蛋白中具有特异的重要作用。LIM 蛋白主要分 4 类: (1) 含有 LIM 结构域和同源异型结构域(HD)的 LIM 同源异型结构域蛋白(LHX); (2) 仅含 LIM 结构域的单纯 LIM 蛋白(LMO); (3) LIM 激酶; (4) 其他 LIM 蛋白^[6]。LHX 蛋白的

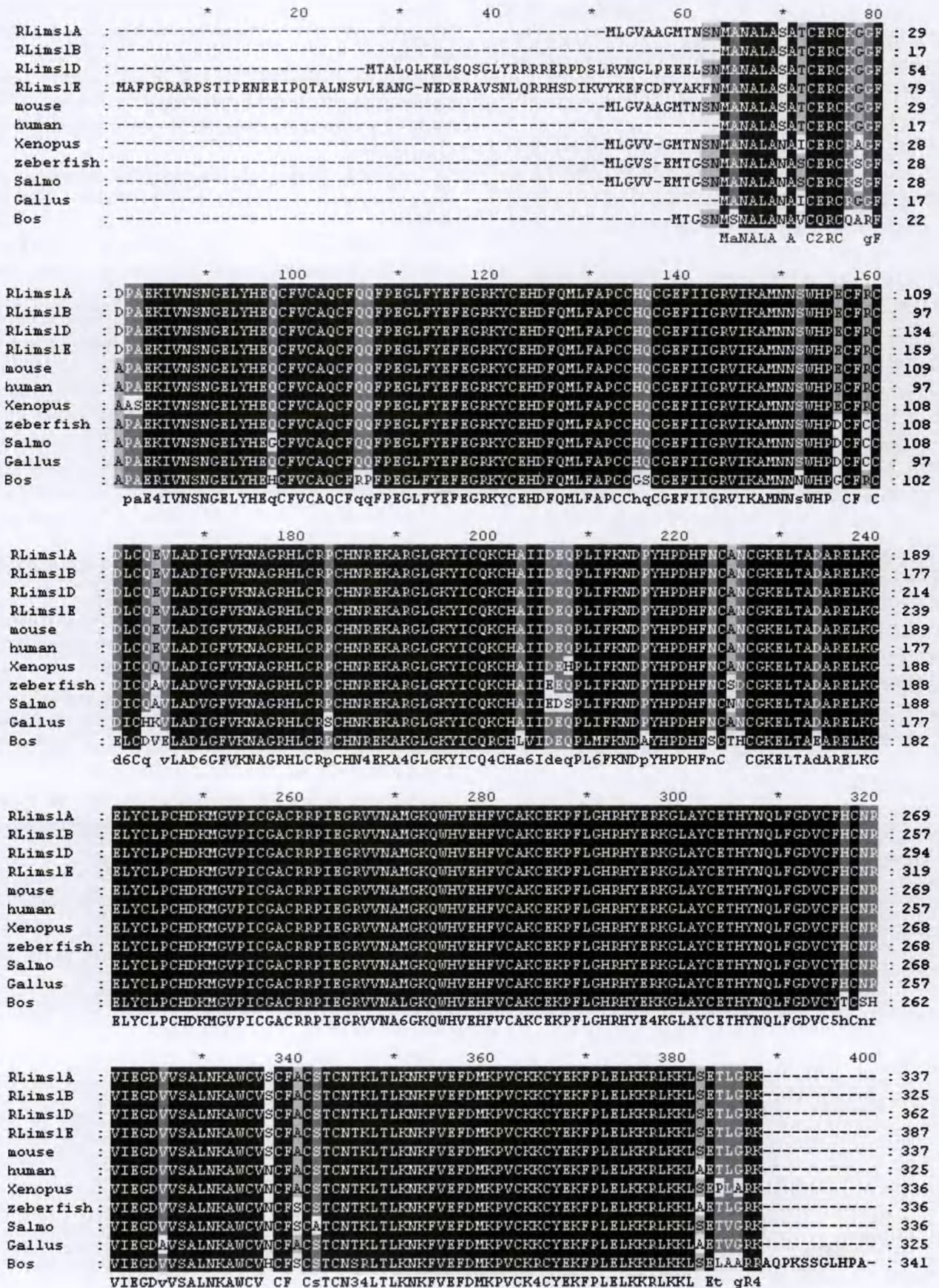


图6 大鼠 *Lims A* 与其不同剪接子及其同源蛋白序列的比较

功能主要是通过激活转录参与细胞命运的决定, LIM 同源盒基因通过不同的时空表达模式可参与包括视网膜、前脑、间脑、垂体和脊髓等多种神经系统组织的发育分化, 如将 *Lhx2* 基因敲除后发现, 突变后的小鼠在 E13.5 期仍未能形成晶状体和视网膜^[12]。LMO 蛋白的功能主要是通过

调节转录来控制细胞的异常增生, 如 LMO 4 特异性在乳腺中分布, 乳腺癌患者的该基因常常过表达^[6]。LIM 激酶的作用则是参与细胞骨架的组织, 目前研究表明 LIM K1 在调节细胞运动和分裂中发挥着不可替代的作用, 同时也可能是引起肿瘤细胞侵袭和转移的关键分子之

一^[6]。鉴于 LIM 蛋白上述作用,含有 LIM 结构域的基因极有可能通过调节转录来控制 RPE 细胞的异常增生, LIM 激酶则也可能在 RPE 细胞的迁移中发挥重要作用,从而从分子水平调控 RPE 细胞的行为,在 PVR 的发生发展中发挥作用。

我们克隆的大鼠 *Lims A* 基因是 LIM 同源盒基因的一个成员。*Lims A* 是具有 LIM 功能结域的同源异形蛋白,主要特征是 C-端为 LIM 功能决定簇, N 端为特异性结构域。氨基酸序列分析显示,在 N 端与 C 端可分别形成两个 α 螺旋,疏水性分析表明, N 端具有很高的亲水性,可与特定的 DNA 极性基团形成 DNA-蛋白质水界面氢键,通过保守的 C 端 LIM 结构域调节转录。人与小鼠 *Lims A* 基因特异性 EST Blast 分析显示,已知的相同 EST 主要来自人或小鼠的眼、脑、肾等组织、乳腺癌、肺癌等肿瘤组织和胚胎干细胞,这说明该基因可能在多种组织中介导蛋白与蛋白的相互作用,在细胞的更新和凋亡中起着重要作用^[13,14]。同源的 EST 在胸腺、骨髓巨噬细胞及多种癌组织中的表达,提示 *Lims A* 可能与已发现的 LMO 蛋白功能类似,通过与其它调控因子的相互作用,调控细胞增殖^[15,16]。*Lims A* 同源的 EST 在眼部尤其是 RPE 细胞中也有较强表达,这提示其有可能在 RPE 细胞的增殖、凋亡中发挥调控作用。而 RPE 细胞的增殖、凋亡和迁移正是 PVR 发生发展的关键环节。我们成功克隆了一个新的 LIM 同源盒(homeobox)全长基因 *Lims A*,进一步研究 *Lims A* 基因的表达和功能,不仅对揭示 *Lims* 基因的功能,也对 *Lims* 基因是否参与眼部疾病尤其 PVR 的发病机制有着重要的理论价值和临床意义,为研究眼部增生性疾病的发病机制和基因治疗开辟一条新的途径。

参考文献

- 1 赵莺,柳林. 视网膜色素上皮细胞在增生性玻璃体视网膜病变中的作用. 国际眼科杂志 2003;3(3):59-62
- 2 Carrington L, Mcleod D, Boulton M. IL-10 and antibodies to TGF- β 2 and PDGF inhibit RPE mediated retinal contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1210-1216
- 3 王珍,刘庆淮,陈洁,等. NYD-SP15 基因的原核表达及多克隆抗体的制备. 国际眼科杂志 2007;8(3):483-486

- 4 Retaux S, Bachy I. A short history of LIM domains (1993-2002): from protein interaction to degradation. *Mol Neurobiol* 2002;26(2-3):269-281
- 5 Kadmas JL, Beckerle MC. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(11):920-931
- 6 李荣,张茹. LIM 蛋白的功能. 国外医学分子生物学分册 2003;25(3):131-134
- 7 Charttris DG. Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management and adjunctive treatment. *Br J Ophthalmol* 1995;79(10):953-960
- 8 Kania A, Johnson RL, Jessell TM. Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell* 2000;102(2):161-173
- 9 Varela-Echavarría A, Pfaff SL, Guthrie S. Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol Cell Neurosci* 1996;8(4):242-257
- 10 Chen Y, Lai M, Maeno-Hikichi Y, et al. Essential role of the LIM domain in the formation of the PKCepsilon-ENH-N-type Ca^{2+} channel complex. *Cell Signal* 2006;18(2):215-224
- 11 Grutz G, Forster A, Rabbitts TH. Identification of the LMO4 gene encoding an interaction partner of the LIM-binding protein LDB1/NLI1: a candidate for displacement by LMO proteins in T cell acute leukaemia. *Oncogene* 1998;17(21):2799-2803
- 12 葛学铭,范明. LIM 同源盒基因家族在神经系统中的作用. 中国神经科学杂志 2001;17(3):239-242
- 13 Sharma K, Sheng HZ, Lettieri K, et al. LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* 1998;95(6):817-828
- 14 Li F, Zhang Y, Wu C. Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J Cell Sci* 1999;112(24):4589-4599
- 15 Johannessen M, Moller S, Hansen T, et al. The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(3):268-284
- 16 Sum EY, O'Reilly LA, Jonas N, et al. The LIM domain protein LMO4 is highly expressed in proliferating mouse epithelial tissues. *J Histochem Cytochem* 2005;53(4):475-486