

3 学术论文 3

小鼠脑特异表达基因 *Bsg4* 的克隆及表达³张 晶¹ 王 雷^{1,3} 陈 微² 薛 鹏¹ 陈 荣³ 慈宏亮^{1,3} 李亦平^{1,2,3,33}

1. 北京师范大学生命科学学院生物医学研究所, 北京 100875; 2. The Forsyth Institute, Boston 021152 USA;

3. 浙江赛尔生物医学研究院, 杭州 310006

摘要 利用消减差异筛选的方法获得在小鼠头部特异表达的基因 *Bsg4* (Brain Specific Gene 4), 基因全长 4308 bp. 应用生物信息学方法分析基因结构, 表明该基因定位于小鼠的第 3 号染色体, 包含 26 个外显子, 25 个内含子, 编码区长 3639 bp. 用 RT-PCR 方法扩增编码区, 并构建到 pBlue2 script SK(2) 载体上, 然后采用原位杂交技术研究了 *Bsg4* 基因在小鼠胚胎发育中的表达情况. 以 *Bsg4* 基因编码区为探针的原位杂交结果显示 *Bsg4* 基因在小鼠胚胎头部和成年小鼠脑的海马中有特异表达, 显示 *Bsg4* 基因与头部发育和海马的功能有密切关系. 对 *Bsg4* 基因的时间和空间表达模式的研究将有助于我们进一步深入地揭示它在脑发育中的作用.

关键词 脑特异基因 生物信息学 原位杂交

脑发育过程是一个由多基因参与调控的复杂过程. 许多基因仅在脑中特异表达, 参与神经系统的形成或调控. 如 *Hox*, *PAX*, *LIM*, *POU*, *Emx*, *Dlx* 等同源盒基因家族^[1], 都参与了脑和神经系统的发育. 在鼠中 *Hox* 家族中的 *Hoxc28*, *Hoxb24*, *Hoxa22*, *Hoxd23*, *Hoxd213* 等与神经系统的形成有关. 鼠的 *Pax12Pax9* 基因在发育过程中参与诱导特殊细胞形式的分化以及神经系统的形成. *LIM* 家族同源盒基因可能参与有关神经元细胞的生命过程和神经发生. 缺失 *lim21*, *otx22* 会使小鼠不产生前脑; 而 *Caspase23* 的缺失会造成小鼠前脑细胞数目的增生^[2]. 基因 *cerberus* 编码一个可分泌蛋白, 其 mRNA 注入卵母细胞可诱导脑结构发生异位^[3]. *En21*, 2 在中脑的发生中起重要作用. 缺失 *En21*, 2 基因会抑制小鼠顶盖和后脑的前半部分的形成. *En21*, 2 的表达也是中脑出现极性的标志. *Pax* 也与中脑的发生有关, *Pax25* 缺失的小鼠, 其脑峡不能发生.

一些基因表达的异常也与多种脑疾病发生有着密切的关系, 如 *ApoE2epsilon4*^[4], *pADHC29*^[5] 等许多基因与老年痴呆症相关. 因此研究脑的特异基因将为我们了解脑的早期发育、神经系统的构建奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

ICR 小鼠购自北京大学医学部实验动物中心. 逆转录酶、消减试剂盒和杂交缓冲液购自 Invitro2 gen. Sephadex G250 购自 Amersham Biosciences, Q12 Aquick Gel Extration Kit 购自 QIAGEN 公司, 小鼠胚胎的 cDNA 文库购自 Clontech, pBluescript SK(2) 载体购自 Stratagene, *Sal* I 和 *Kpn* I 购自 New England Biolabs, 高保真的 DNA 聚合酶购自宝生物工程大连有限公司. 地高辛标记与检测试剂盒购自 Roche 公司. 其他试剂为国产分析纯试剂.

2004204220 收稿, 2004206209 收修改稿

3 浙江赛尔生物医学研究院资助项目

33 通讯作者, E-mail: YPLi@forsyth.org

1.2 方法

1.2.1 消减差异筛选脑特异基因 收集 9.5 d 小鼠胚胎的头部, 用常规方法制备 mRNA. 取 5 μ g mRNA 为模板, 逆转录采用随机引物, 并掺入 32 P dCTP, 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h; 0.1 mol/L NaOH 重悬反应产物, 65 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 使 RNA 模板水解; 0.1 mol/L 醋酸中和探针, 探针用 Sephadex C250 纯化. 生物素标记的小鼠 9.5 d 胚胎躯干的 mRNA 使用消减试剂盒制备, 实验步骤按其说明书进行.

将 32 P 标记的 cDNA 探针与 10 倍过量的生物素标记的 mRNA 进行杂交. 离心沉淀探针混合物并用 20 μ L 水重悬, 100 $^{\circ}$ C 热变性 1 min. 加入等体积 2 $\times$ 杂交缓冲液, 65 $^{\circ}$ C 杂交 20~24 h. 加入等体积 HEP2 ES 缓冲液 (10 mmol/L HEPES, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA), 20 μ g 链霉亲和素, 冰上孵育 10 min. 生物素化的 RNA 和 RNA2cDNA 与链霉亲和素形成的复合物用酚2氯仿抽提除去, 水相中的 cDNA 探针用乙醇沉淀法纯化, 在相同条件下进行第二轮消减杂交.

我们用 7.5 d 小鼠胚胎的 cDNA 文库中的 5 $\times$ 10⁵ 个克隆进行筛选. 每个 145 mm 的平板上约 10⁴ 个克隆, 每板制两张膜用于与第二轮消减杂交得到的 cDNA 探针杂交. 杂交、洗膜和曝光将按照常规的方法进行^[6]. 为纯化克隆, 还要在低浓度的条件下进行第二轮杂交. 所得到的克隆进行测序验证.

1.2.2 Bsg4 基因序列特征分析 将所得序列在 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov) 上用 BLAST (basic local alignment search tool) 方法与已知序列进行比对, 以确证所得序列为一新序列. 用 ORF (open reading frame) finder 预测该基因的编码框. 使用 Mouse Genome 数据库做 BLAST 分析, 找到 Bsg4 基因在小鼠基因组上的定位及分布, 对其外显子和内含子进行分析. 使用 Vector NTI8.0 软件对小鼠的 Bsg4 基因与人的 KIAA0476^[7] 基因的氨基酸序列进行同源性比较. 用 NCBI 数据库的 CCD (conserved domain database) 对蛋白的结构域和可能的功能进行预测.

1.2.3 RT-PCR 克隆 Bsg4 的全长编码区序列 根据 Bsg4 的 cDNA 序列用软件设计一对引物, 在 5' 端引物加入 Sal I 酶切位点, 在 3' 端引物加入 Kpn I 酶切位点. 两引物序列为:

P1: 5' TCCGGTCGACTGAACCTATTACAGA2

TGTGGCA 3'

P2: 5' ATTAGGTACCGCATTTCCAGAGGTGCTCCAAA 3'

提取小鼠胚胎的总 RNA 为模板, 经 M2MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一条链. 使用高保真的 DNA 聚合酶扩增 Bsg4 cDNA 序列. 采用 100 μ L 的 PCR 反应体系, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 55 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 经过 30 次循环后, 于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行分离, 并用 QIA quick Gel Extraction Kit 纯化和回收后将 PCR 产物克隆至 pBluescript SK(2) 载体上. 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 筛选重组子, 制备质粒 DNA, 经测序验证为 Bsg4 全长编码区序列.

1.2.4 原位杂交 按照参考文献[8]中的方法进行原位杂交. 收集 8.5, 9.5 d 小鼠胚胎, 用 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定过夜. 之后用 PBS 洗涤胚胎, 甲醇系列脱水 (25%, 50%, 75%, 100%), 甲醇洗涤 2 次, 再反向系列甲醇进行水合. 依次用 PBS 洗涤胚胎, 6% 的 H₂O₂ 胚胎漂白 1 h, PBS 洗涤胚胎, 10 μ g/mL 蛋白酶 K 处理 15 min, 2 mg/mL 甘氨酸处理 5 min, 0.2% 戊二醛/4% 多聚甲醛再固定 20 min, 60 $^{\circ}$ C 预杂交 8 h. 成年小鼠脑切片用常规方法进行石蜡包埋和切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇进行水合, 经 0.2 mol/L HCl 和蛋白酶 K (15 μ g/mL) 处理, 4% 多聚甲醛固定, 室温预杂交 2 h.

以 3.6 kb 的小鼠 Bsg4 编码区的 cDNA 为模板, 根据 DIG Nucleic Acid Labeling Kit 制备 DIG 标记的 RNA 探针, 并把探针加入预杂交液, 与胚胎和切片在 60~65 $^{\circ}$ C 下进行杂交. 杂交过夜. 杂交后经多次洗涤和 RNase 处理后, 加入 BCIP/NBT 显色. 小鼠胚胎用 4% 多聚甲醛固定, 脑切片用 50%, 70%, 95%, 100% 浓度梯度乙醇进行脱水. 二甲苯处理后, 树脂封片, 显微镜下拍照.

2 结果

2.1 消减差异筛选脑特异基因

利用消减差异筛选的方法对 7.5 d 小鼠胚胎的 cDNA 文库进行筛选, 克隆到脑特异表达的基因 Bsg4 (GenBank 登录号: AY512564). 测序结果显示, Bsg4 长 4308 bp. 把 Bsg4 在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 结果证实 Bsg4 是一新基因.

26 个外显子, 25 个内含子(图 2). 小鼠 *Bsg4* 基因和人 KIAA0476 基因的氨基酸序列的同源性比较结果显示两者的同源性为 81.2 % (图 3). 对 *Bsg4* 基因结构域的分析显示该基因从 N 末端 39~223 氨基酸含有一个 DENN 结构域, 287~361 氨基酸为一个 dDENN 结构域. 这些结构域提示 *Bsg4* 基因可能具有调节信号传递的作用(图 4).

1 tggtgattacttlttggtggctgggcttgcaggaaatggagcgccata
51 cctgaggagagatgggttcccgagcctacggcgccctcgccgccctccg
101 gccagtgaaacctattacagatgtggcagtcctcagggaactggcg
151 agggagtgcgccacagggtatcatagcattcagacttctgcgtggccac
201 cctctggagctcagtgctggagctcctgggtggaactcaaccagtcactg
251 ctaccgcaggggcggtgacaaagccccctcgcttgagctgggggtttat
301 atgaaggaggaggaacgacccaagtttggttccaaagtctgacacgaca
351 ccgtatagccactagccaatttggccctccaggccggccggccggccg
401 cacctacactcatgtatcggcggcagcagaaggaggaggctgcatgcc
451 tgggcatacactgacctctgctgttctgcggcagaagggtgaaggatc
501 tctcatacttactcggcggtacccggcaacctcaaacctggcatgtgggg
551 ccagcagttgtacctgtgtcacaaggtaggcctggccaaggccaacacac
601 tggttgtatggcagcttctatgaagcctccggagggcaggctcaga
M R Q F Y E A F P R A R L S E
651 gaggcaggcaccggcactggcctgatgagtcactggaacggcgggg
R Q A R A L G L M S A V E R G R
701 cgtctggaggcccgagctgtgcccagccgacgacgcatagctgtcttc
A L G G R A V R S R R A I A V L S
751 cgtctgcctctcctccagcctcccgagccttccctaccttccittaccg
R W P A F P A F R A F L T F L Y R
801 atactcgtctcaggcccccactgtctgccttgcggacgacacatcccc
Y S V S G P H R L P L E A H I S
851 acttcattcacacgctccattccactccccacagagaccacgcatccta
H F I H N V P F P S P Q R P R I L
901 gtgcagatgtctccctatgacaacctgctcctctgcaacctgtctctc
V Q M S P Y D N L L L C Q P V S S
951 accctgcgccctcagttggtgacttittgacgtgctgcgaacactgg
P L P L S G A S F L Q L Q N L
1001 gccaggaactgcttattacattctgctggctgtgctcacagagacaaa
G P E L A I T L L L A V L T E H K
1051 ctgctgtccactcgtcggccagatctgctcacacagctgttcaggcg
L L V H S L R P D L L T S V C E A
1101 ccttgtctcgtgatcttccctctgcatlggcagtgctcctacatccat
L V S M I F P L H W G C P Y I P
1151 tgtcccgctagtgtgcggcagtgctgagtgccccctgccttcatt
L C P L V L A D V L S A P V P F I
1201 gtggctatccactccagtttctgctgcatgaccacactcgtgact
V G I H S S Y F D L H D P P A D V
1251 catctgttgttcttgataccaacagcgtcttcaggagggaagaagaagc
I C V D L D T N L T F Q E E K
1301 cctctccgctargactccgcccggaagcacaacagcttatttggcc
P L S A R C T L P R R P Y K L L L A
1351 accctgacaagtctgtaccagcagctggaccagacttacaactggaccaga
T L T S L Y Q L D Q T Y T G P E
1401 ggaaggggcctcctggaattcctgdcagacagactaggctgtgtgtg
E E A S L E F L T D Y E A V G
1451 gcccgaggactcgcctggaacgggaagtccaggaggccttctgccttc
G R T R L R L E R E V Q G A F L R F
1501 atggcctgtctgtcacaaggcttacccgaacttctccgtctctcagca
M A C L L K G Y R N F L R P L T Q
1551 ggccccctctgagggtctcagagatttgacaacctttttacctcagg
A P S E G S R D V D N L F Y L Q
1601 gtttctcgaagtccgggagcgtcgaagccacaagctgtactctcagctg
G F L K S R E R S S H K L Y S Q L
1651 ctgcacacacagatgttctcacagttcatogagggaatgctcttttgctc
L H T Q M F S Q F I E E C S F G S
1701 cgccggcgacgcagcctggaattctttgacttgttttgacaaggttc
A R H A A L E F F D S C V D K V
1751 acccagagcaggagaagccgaaccaacccctagtggagctggaggaa
H P E Q E K P E P T P L V E L E E
1801 ctatcgaagaagtgcactgctctttatcacaccccagaggaaaccacc
L S G S E L T V F I T P P E E P P
1851 agtactggaaggcagtgagttactcctcagctactgttatgattgggttc
V L E G S E S T P Q Y C Y D G F
1901 cagagctaaaggctgagctatttgagttctctcaggaaacaaggaggcc
P E L L K A E L F S P Q E Q Q G A
1951 ctccctgtgcaggcccatcccgagtgctccagagctcctgcacctg
L P V P G P S R S A P S S P A P R
2001 ccgaaccaacacaggagatgaaggttcacagcgaagtgcacagaagtcag
R T K Q E M K V A Q R M A Q K S
2051 ccactgtcgtcagctgtggggccgggtgctgtgggtcactgctacgga
A T V P E L W A R C L L G H C Y G

```

2101 ctgtgttcttatgctgcccgcctacgtggttccgtacccctccgggt
L W F L C L P A Y V R S V P S R V
2151 gctgtcattacatacggcctaccacgtgttacgggaatggagaaccgca
R A L H T A Y H V L R E M E N R
2201 aggtgtgtctccctgatgaggtgtgtaccgctgctgatcagctctgc
K V V L P D E V C Y R V L M Q L C
2251 tcacactatgggcagcccttctgtctgtgctgagtcagtagagatgcg
S H Y G Q P V L S V R V M L E M R
2301 acgggcaggtattgtcccaacaccatcacttacggttactacaacaagg
R A G I V P N T I T Y G Y Y N K
2351 cagtgtcggaaagcaaatggcctctgttactccgggtggagcctacgc
A V L E S K W P S G T P G G R L R
2401 tggccaagctccggaatgttgcctgggggctgctcagttccgcccagcc
W A K L R N V V L G A A Q F R Q P
2451 ctaaaaggaccgaaggcagcaacagcagcagcagcagcagcagcagc
L K D R R Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q
2501 agaagcaacagacagccctatctgagcgtccctcccaacgcgcct
Q K Q Q T E P Y L E R P S P T R P
2551 cttcagcgcagactacttggctggcggaagtctacgggaaccatcttc
L Q R Q T T W A G R S L R E P S S
2601 acccatggggccttggtcaagagtggttagcctaggcagtgccctggga
P M G R L V K S G S L G S A R G
2651 cacagcccaggtggaagctgtgtgctcacatgatagggccttggg
T Q P T V E A G V A H M I E A L G
2701 gtcttgaaaccccgatcacctgtccttggcagcagcgaagcctctc
V L E P R G S P V P W Q D G S L S
2751 agacctgagctgtacaggggaagaatggcacctggagcagccctggg
D L S L T G E E M A P G G S P G
2801 gctcaggtccgcctgagtgccagtcactgagccctagaaggagata
G S G S A L S A Q S T E A L E G I
2851 agtggcggttccaaactagtggatgacggaggagtggtggcactcc
S G R G S K T S G C Q E E V G T P
2901 cagaaagggtggtgcccgcctccacagctgctcaccccttccgcc
R K G L G A R L Q Q L L T P S R
2951 gcgcctctgttccgcctcccccacgtggttgcctctgacctcct
R A S A S R I P P P E L P S D L P
3001 cctcggcccggaagtcctatggatagccttctgtggcccgagaagc
P A A R R S P M D S L L W P R E R
3051 ccccgatccactgtcttctgagagctctgttcttggcagtgagtg
P G S T A S E S S A S L G S E W
3101 atatctcagagcttccctcagcagcctgagctcgccttccctcagag
D I S E S S L S S L S L R R S S E
3151 cgtctcagtgacacccctggggcttccagccaccctctctggaattct
R L S D T P G A F Q P P S L E I L
3201 gatgtctagctgttcttgtgtcatgacctgtattccctggtgtacgat
M S S C S L C H A G D S L V Y D
3251 aggaatcatgctgctggcgcccgatgacttaaccttaatacaact
E E I M A G W A P D D S N L N T T
3301 tgtcccttctgcgcctgtcacttgtccctgtcagtgccagactct
C P F C A C H F V P L L S V Q T L
3351 tgattctgacccagtcacctagtcacaaagtcttcccttgcctggcca
D S R P S A P S P K S S L A G A
3401 gtgctgcaaatgtctcctgcccctggggcccttggcctgtgtcagt
S G C K D A P A P G G P G P V L S
3451 gaocggaggttctgcttgcctggatcagcccaagctctgcaatggca
D R R F C L A L D Q P Q L C N G H
3501 tatgggagtgcttccggcgagtgagaatgggcagtggtgctacctga
M G S A S R R V E N G A W A Y L
3551 gccctctggtctgctgaaggaaactggagtccttggtagagaatgaggo
S P L V L R K E L E S L V E N E G
3601 agcgaagtgctggcggttacctgaactgctgctgcccaccctatcatt
S E V L A L P E L P A A H P I I F
3651 ctggaacctcgtgtgtatttccacggctacgctgctcctagtgtttac
W N L L W Y F Q R L R L P S V L
3701 caggcctggtgttgccctcctgtaattggcccccaccagcagctctcc
P G L V L A S C N G P P P S Q L S
3751 cagggaacctcctatgctaacccctgatccagcttctgtgcatgtgca
Q G P S P W L T P D P A S V H V
3801 tctgtctgggatgctgacccctgatcccaacagctgcccacctctct
L L W D V L T P D P N S C P P L
3851 acgtgctctggagggtccacagcagatccacagcgggtggtatggcca
Y V L W R V H S Q I P Q R V V W P
3901 ggccagtagccctcatgtcttagcttggcattactgagtcagtcgtgog
G P V P S C L S L A L L E S V L R
3951 ccacgtcggactcaacgaggttcataaagctgttgggtcttctgtggaga
H V G L N E V H K A V G L L L E
4001 cgtagggcccccctccaccggcctgacccacagaggggaatcaccgt
T L G P P P T G L H L Q R G I Y R
4051 gagatcttattcctgacctgctgctgtggcgaagaccagctggatat
E I L F L T M A A L G K D H V D I
4101 agtggccttcgacaagaagtacaagtctgcctttaacaagctggccagca
V A F D K K Y K S A F N K L A S
4151 gcattggcaaggaggaaactgagcagcggcgccacagatcccacitccc
S M G K E E L R Q R R A Q M P I P
4201 aaggccatcagctgccgaagtgttttgagcacctctggaatgtaggg
K A I D C R K C F G A P L E C *
4251 acccttaagctccctctccagccttgagtgagaggtgcggaagagtg
attotaga
4301

```

图1 Bsg4 cDNA全序列及预测的氨基酸序列

起始密码子(ATG), 终止密码子(TAG)用下划线标出

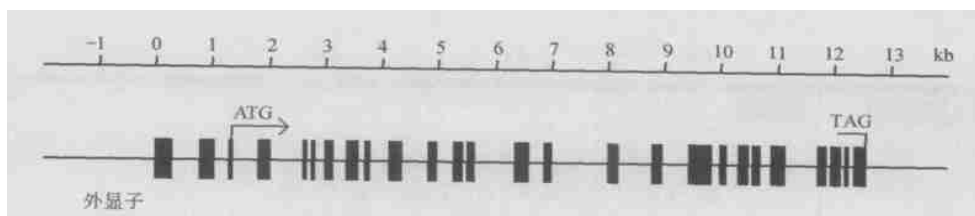


图 2 小鼠 Bsg4 基因在染色体上的分布

26 个外显子和 25 个内含子分布在染色体上 13 kb 的范围。

实体方块部分代表外显子。起始密码子 ATG，终止密码子 TAG

KIAA0476	(1)	1	100
Bsg4	(1)	1	100
Consensus	(1)	1	100
KIAA0476	(101)	101	200
Bsg4	(1)	101	200
Consensus	(101)	101	200
KIAA0476	(201)	201	300
Bsg4	(39)	201	300
Consensus	(201)	201	300
KIAA0476	(301)	301	400
Bsg4	(139)	301	400
Consensus	(301)	301	400
KIAA0476	(401)	401	500
Bsg4	(238)	401	500
Consensus	(401)	401	500
KIAA0476	(501)	501	600
Bsg4	(338)	501	600
Consensus	(501)	501	600
KIAA0476	(601)	601	700
Bsg4	(438)	601	700
Consensus	(601)	601	700
KIAA0476	(701)	701	800
Bsg4	(538)	701	800
Consensus	(701)	701	800
KIAA0476	(801)	801	900
Bsg4	(636)	801	900
Consensus	(801)	801	900
KIAA0476	(901)	901	1000
Bsg4	(723)	901	1000
Consensus	(901)	901	1000
KIAA0476	(1001)	1001	1100
Bsg4	(823)	1001	1100
Consensus	(1001)	1001	1100
KIAA0476	(1101)	1101	1200
Bsg4	(1101)	1101	1200
Consensus	(1101)	1101	1200
KIAA0476	(1199)	1199	1300
Bsg4	(1023)	1199	1300
Consensus	(1201)	1199	1300
KIAA0476	(1296)	1296	1391
Bsg4	(1123)	1296	1391
Consensus	(1301)	1296	1391

图 3 小鼠 Bsg4 和人的 KIAA0476 氨基酸序列同源性的比对

阴影部分为同源序列，它们具有 81.2% 的相似性

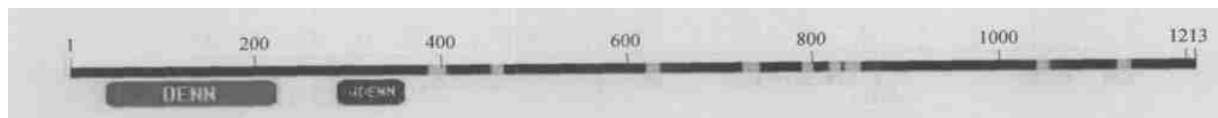


图 4 Bsg4 基因的预测结构域

第一个是 DENN 结构域, 第二个是 dDENN 结构域

2.3 Bsg4 基因全长编码区的克隆

通过 RT2PCR 我们获得了 *Bsg4* 基因全长编码区的序列, 并将它克隆至 pBluescript SK(2) 载体上. 通过测序验证, 所得到的全长编码区的序列用于原位杂交探针的制备.

2.4 原位杂交

原位杂交结果显示, 在 8.5 d 的小鼠胚胎中, *Bsg4* 基因主要在头部的神经褶和神经管中表达(图版 IA). 在 9.5 d 小鼠胚胎, 脑中的表达信号最强. 成年小鼠脑石蜡切片的原位杂交结果显示, *Bsg4* 主要在小脑皮层和海马结构中表达(图版 IB). 这些结果暗示 *Bsg4* 在神经系统的发育和执行脑功能中发挥重要作用.

3 讨论

脑是生物体中最复杂, 调控最为精密的器官, 与其他器官相比脑具有独特的基因表达谱. 很多基因是在脑中特异表达的, 由于这些基因的表达丰度都很低, 用常规方法研究比较困难, 所以人们对这些基因的表达情况知之甚少. 我们将消减差异筛选的方法应用于小鼠脑中特异基因的寻找, 克隆到了一个在小鼠脑中特异表达, 并且在海马中表达的新基因 *Bsg4*. 该基因定位在小鼠的第 3 号染色体上, 含有一个 3639 bp 的完整阅读框, 编码一个包含 1213 个氨基酸的蛋白质. 与人 KIAA0476 基因的氨基酸序列同源性比较显示两者同源性达到 81.2%, 说明在不同种属中 *Bsg4* 具有一定的保守性, 暗示 *Bsg4* 在生物体内可能发挥着重要的作用.

我们利用生物信息学的方法预测了 *Bsg4* 编码的蛋白质, 它包含了一个 DENN 结构域和一个 dDENN 结构域. 现在已知 DENN 结构域存在于调节 Rab 介导过程以及调节 MAPKs 通路的某些蛋白质中. 对 Rab6IP1 进行的结构分析, 以及后来的研究显示 DENN 结构域在调节 GDP/ GTP 转换的活

性中发挥了作用^[9,10], 但现在对于 DENN 的确切功能了解得仍然不清楚^[11]. dDENN 结构域是一个伴随 DENN 结构域而存在的结构. 在 Rab6IP1 和 Rab3GEP 中进一步分析相关的序列发现 DENN 结构域旁边都会出现 dDENN 结构域, 但其功能还不清楚, 不过可以看出它对于 DENN 结构域的功能非常重要^[12]. *Bsg4* 基因上的这些重要的结构域提示 *Bsg4* 可能对信号传递具有调节作用, 从而参与基因的表达调控, 并在胚胎发育过程发挥重要作用.

胚胎的整体原位杂交和切片的原位杂交结果显示, *Bsg4* 基因在胚胎发育中主要在头部表达. 在胚胎发育早期, 神经系统发育还不完全, 8.5 d 胚胎刚刚形成神经管, 到了 9.5 d 胚胎脑腔形成, 之后直到出生整个神经系统逐渐发育成熟, 脑的结构才发育完整^[13]. 这提示 *Bsg4* 基因可能在胚胎发育中与头部的发育有关, 尤其是在脑中的强烈表达显示 *Bsg4* 基因可能对于脑的发育具有重要的信号调节作用. 此外, *Bsg4* 基因还在成年小鼠的海马结构和小脑皮层中有强烈表达. 这表示到神经系统发育成熟后, *Bsg4* 基因的表达集中在海马和小脑皮层中. 海马是学习和记忆的重要物质基础, 与情绪活动及内脏反应也有着密切关系, 并且是免疫调节的高级中枢之一, 与许多疾病有着密切的关系, 切除双侧海马区后, 患者会产生严重的“新近记忆”紊乱^[14]. 小脑是负责维持身体平衡和运动的协调的重要中枢, 小脑病变与许多运动性疾病有密切关系, 小脑皮层的萎缩会造成“散发性退化性运动失调”. 我们的 *Bsg4* 基因表达的结果说明在成年小鼠中 *Bsg4* 也在发挥作用. *Bsg4* 很可能是一个在脑和神经系统的发育, 海马和小脑皮层结构功能的发挥上起到重要作用的基因. 对 *Bsg4* 基因的研究将有助于我们进一步揭示脑和神经系统的发育, 以及相关疾病的分子机制.

参 考 文 献

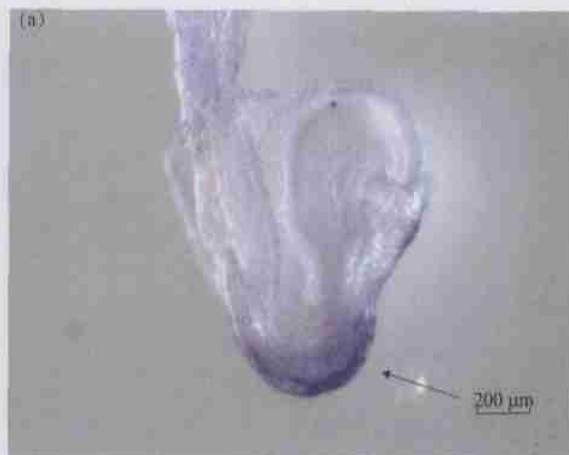
- 1 蔡文琴, 等. 发育神经生物学. 北京: 科学出版社, 1999

- 2 Momoi T, et al. Strain2specific caspase232dependent programmed cell death in the early developing mouse forebrain. *Neuroreport*, 2003, 14(1): 111
- 3 Lupo G, et al. Induction and patterning of the telencephalon in *Xenopus laevis*. *Development*, 2002, 129: 5421
- 4 Parasuraman R, et al. The apolipoprotein E gene, attention, and brain function. *Neuropsychology*, 2002, 16(2): 254
- 5 May P C, et al. Altered gene expression in Alzheimer's disease brain tissue. *Can J Neurol Sci*, 1989, 16(4 Suppl): 473
- 6 Li Y P, et al. Cloning and complete coding sequence of a novel hu2 man cathepsin expressed in giant cells of osteoclastomas. *J Bone Min Res*, 1995, 10: 1197
- 7 Seki N, et al. Characterization of cDNA clones in size2fractionated cDNA libraries from human brain. *DNA Res*, 1997, 4(5): 345
- 8 Wilkinson D G, *In situ* hybridization. In: *Essential Development Biology: A Pratical Approach*. Oxford: IRL Press, 1993
- 9 Janoueix2Lerosey I, et al. Two2hybrid system screen with the small GTP2binding protein Rab6. Identification of a novel mouse GDP dis2 sociation inhibitor isoform and two other potential partners of Rab6. *J Biol Chem*, 1995, 270(24): 14801
- 10 Tanaka M, et al. Role of Rab3 GDP/ GTP exchange protein in synaptic vesicle afficking at the mouse neuromuscular junction. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(5): 1421
- 11 Wada M, et al. Isolation and characterization of a GDP/ GTP ex2 change protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J Biol Chem*, 1997, 272(7): 3875
- 12 Levivier E, et al. uDENN, DENN, and dDENN: Indissociable do2 mains in Rab and MAP kinases signaling pathways. *Biochem Bio2 phys Res Commun*, 2001, 287(3): 688
- 13 Nagy A, et al. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. 3rd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2002
- 14 Scoville W B, et al. Loss of recent memory after bilateral hippocam2 pal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiat*, 1957, 20: 11

微生物学 1993 —2003 年被引频率位列前 20 位的期刊

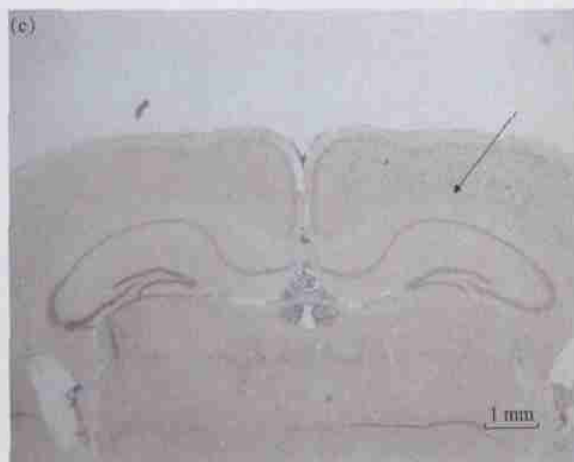
排序	期刊名称	论文数	总被引	平均被引
1	Microbiol Rev	120	21817	181.81
2	Science	283	34789	122.93
3	Nature	203	24405	120.22
4	Microbiol Mol Biol Rev	214	14569	68.08
5	Annu Rev Microbiol	289	17401	60.21
6	Clin Microbiol Rev	376	19778	52.60
7	Proc Nat Acad Sci USA	1698	75440	44.43
8	Fems Microbiol Rev	536	14658	27.35
9	Mol Microbiol	5100	126784	24.86
10	J Virol	13552	330217	24.37
11	Int J Syst Bact	1214	27103	22.33
12	Parasitol Today	683	14144	20.71
13	Trends Microbiol	879	17271	19.65
14	J Bacteriol	10981	198841	18.11
15	Appl Environ Microbiol	9003	151513	16.83
16	Antimicrob Agents Chemother	6597	110017	16.68
17	Virology	6413	105484	16.45
18	Microbiology2U K	2705	40374	14.93
19	J Gen Virol	4178	60968	14.59
20	Mol Biochem Parasitol	2298	29814	12.97

(摘自《英语科技论文撰写与投稿》)



A 小鼠胚胎的原位杂交

(a) 基因在 8.5d 胚胎神经管处(箭头所示)特异表达; (b) 基因在 9.5d 胚胎头部(箭头所示)特异表达



B 小鼠脑切片的原位杂交

基因在小鼠海马((a)中箭头和(b)左边箭头所示)和小脑皮层((b)右边箭头所示)表达