

RPL36A、RPL36B 和细胞衰老的关系

张玉罡

(南昌大学医学院 江西 南昌 330006)

【摘要】探讨酵母同源基因核糖蛋白 RPL36A、RPL36B 与细胞衰老的关系, 为研究细胞衰老机制提供参考。方法 培养酵母细胞, 提取总 RNA, 采用 qRT-PCR 检测法检测酵母细胞中的 RPL36A、RPL36B 水平, 探讨 RPL36A、RPL36B 与细胞衰老存在的关系。结果 RPL36A、RPL36B cDNA 浓度随着时间的延长而明显呈现增长趋势。结论随着时间的流逝, 酵母的繁殖速度将变慢; YMR193C-A 与 RPL36A 基因的存在一定的关系。但是 YPL250W-A 和基因 RPL36B 之间没有明确的关系。

【关键词】核糖蛋白; RPL36A; RPL36B; 衰老

作为一个复杂的生物过程, 衰老可导致和年龄相关的各种疾病, 包括糖尿病、心血管疾病、癌症以及神经退行性疾病等等。细胞衰老, 为稳定的增殖性停滞。这种不可逆的状态, 往往是以多种因素共同影响所致, 包括氧化应激、端粒缩短等等。衰老亦为当今生物医学研究中的重要方向和热点问题, 作为研究调控寿命机制的经典模式生物, 通过研究发现可知, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 存在多条保守进行寿命调控通路, 如 Ras/PKA、Sch9p, 这些信号通路和哺乳动物 CR 通路存在一定共通之处。为此, 通过以酿酒酵母为模式生物, 展开细胞寿命调控机制的相关研究, 可对高等生物细胞寿命的研究带来新的方向和机会。核糖蛋白 RPL36 存在 RPL36B, 和 RPL36A, 为酵母细胞双拷贝基因一类。RPL36 自低等真核生物到高等生物极为保守, 可作为今后研究同源核糖蛋白之间功能的差异的主要代。本文即探讨酵母细胞基因 RPL36A 与 RPL36B 与细胞衰老之间的关系, 具体报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

本文菌种为芽殖酵母 DBY746, 为野生型; 培养基为 SDC (Synthetic Dextrose Complete); RNA 提取 TRIzol 试剂盒购自 Qiagen 公司 (兔抗人) RPL36A、RPL36B 单克隆抗体、(兔抗人) A; 酵母总 RNA 提取试剂盒、T4 DNA 连接酶 购自 Takara。

PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养

实验斜面保藏的酵母经液体培养活化后, 在对数生长期时按照 5.0×10^4 cfu/mL 的接种浓度接入到 DC 培养基中, 培养条件为 28°C 、160 r/min。留取细胞样本备用。

1.2.2 qRT-PCR

取上培养备用的酵母细胞, 进行总 RNA 提取。按 OneStepRT-PCR Kit 作说明书进行 PCR 检测。RPL36A、RPL36B 引物序列如下:

RPL36A: 上游引物: $5' - \text{AACCCGCCGACTTTCTGT} - 3'$;
下游引物: $5' - \text{AGAACTGGATCACTTGGCCCT} - 3'$ 。

RPL36B: 上游引物: $5' - \text{TAGCCGGCGTAATGTCTCT} - 3'$;
下游引物: $5' - \text{TGCCCTGAATCAATTGGCCCT} - 3'$ 。

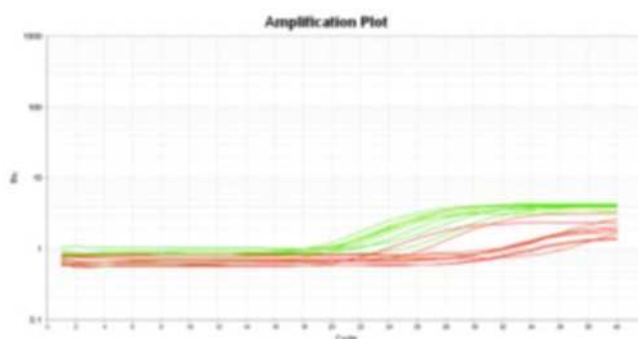
PCR 反应体系: 含 RNA10ng, 共 $12.5 \mu\text{l}$ 。反应条件为, 50°C 反应 30 分钟, 95°C 反应 15 分钟, 94°C 反应 20 分钟, 最后 56°C 退火 45 秒。共行 30 循环。

本文目的基因 RPL36A、RPL36B, 由 invitrogen 公司合成。取 $5 \mu\text{l}$ PCR 扩增产物, 行琼脂糖凝胶电泳。分析凝胶图像并拍照, 计算 RPL36A、RPL36B 基因的 mRNA 水平的相对表达量 (F 值), 即检测基因与 Actin 条带荧光强度比值

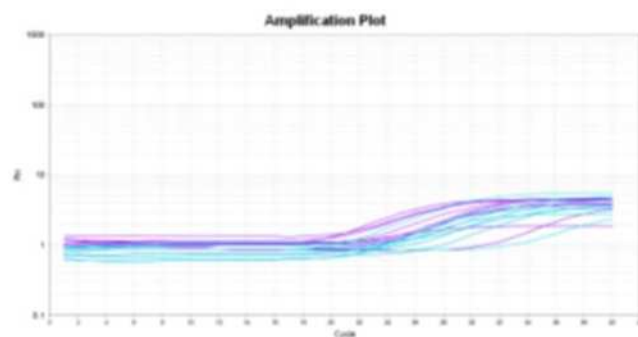
1.2.3 统计学分析

本文数据采用 SPSS22.0 进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准表示, 组间比较行方差 ANOVA 分析。分析结果以 $p < 0.05$ 为差异有意义。

2 结果

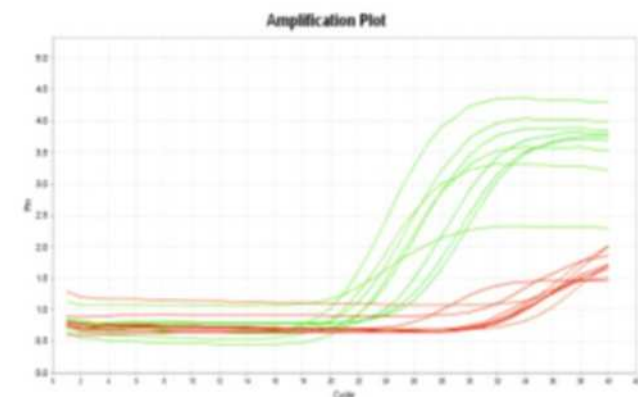


36A(red) and actin(green) in sample



36B(blue) and actin(purple) in sample

图 1 各个样本中 RPL36A、RPL36B cDNA 浓度



193c(red) and actin(green) in sample

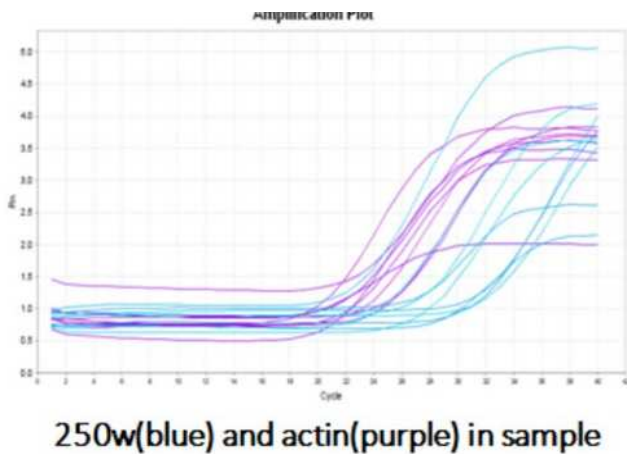


图 2 各个样本中 YMR193C、YPL250WcDNA 浓度

如图 1 所示, 可知在各个样本中 RPL36A、RPL36BcDNA 浓度随着时间的延长而明显呈现增长趋势。YMR193C-A 与 RPL36A 基因的存在一定的关系。但是 YPL250W-A 和基因 RPL36B 之间没有明确的关系。

3 讨论

本文所选酿酒酵母是一种真核生物, 最早被用于研究人类的衰老相关研究, 也是最简单的研究生物^[3]。通过诸多研究, 打开了人们对于机体衰老机制的认识, 提供了富裕的研究线索。上文提过酿酒酵母, 是一种简单的真核生物, 是单细胞生物, 是单细胞真核生物。单细胞生物, 虽然可能与多细胞生物存在诸多方面的区别, 但经过研究其在细胞衰老相关过程上与多细胞生物存在较高的一致性。因此, 人体衰老的相关研究, 可以采用酿酒酵母作为研究生物。酿酒酵母本身基因组较小, 其繁殖快, 相关遗传实验操作便捷, 目前相关技术已经成熟, 诸多优点为其作为研究人体衰老机制提供可能性, 并且成为衰老机制研究的公认生物模型。

酿酒酵母中, 包含 137 个核糖蛋白基因, 其中核心核糖蛋白中包含诸多的拷贝基因编码, 双拷贝基因 59 对, 单拷贝基因 19 个。本文所研究的两个母的基因 RPL36A 与 RPL36B 就属

于 59 对双拷贝基因中的代表基因, 在核糖体的生成中发挥重要的作用, 是一个必不可少的组成部分。二者均是核糖蛋白, 且特别存在与真核生物中。RPL36 基因所处的染色体位置, 存在两个未知基因, 为反向重叠。在现有的基因序列实验中, 提出该基因中的两个可以开放阅读框不存在编码功能。因此, 将酵母菌基因组数据库 (SGD) 中与本文研究基因 RPL36A 反义重叠存在反义重叠的 YMR193C-A 基因命名为 A0193; 同样将数据库中与文中所研究的 RPL36B 反义重叠基因 YPL250W-A 命名为 B0250^[4]。

本文实验中 RPL36A、RPL36B 与肌动蛋白在不同时间段酵母细胞中的表达结果, 提示 RPL36A 的表达小于肌动蛋白, 但 YMR193C 的表达也小于肌动蛋白。因此, 我们可以得出结论, RPL36A 的表达受 YMR193C 调控。并且根据肌动蛋白的表达都相同, 但是这些细胞中 YPL250W 的表达彼此不同。而在这些细胞中存在 YPL250W 的表达增加, 但 RPL36B 的表达是不同的。考虑 RPL36B 和 YPL250W 之间没有明确的关系。根据这些结果, 我们可以得出结论, lncRNA 在调节基因表达中很重要, 但其中一些机制尚不清楚。如果我们想知道这些机制, 我们需要做更多的研究。

本文研究有助于学习 RPL36A 和 RPL36B 的功能和特性。在实验过程中, 通过研究酵母发现了一些衰老的特殊机制。我们发现, 随着时间的流逝, 酵母的繁殖速度将变慢。且反义 lncRNA YMR193C-A 与 RPL36A 基因之间存在密切联系。但是反义 lncRNA YPL250W-A 和基因 RPL36B 之间没有明确的关系。

参考文献:

- [1] Ovadya Y, Krizhanovsky V. Senescent cells: SASpected drivers of age-related pathologies[J]. Biogerontology, 2014, 15(6): 627-642
- [2] Kang C, Xu Q, Martin T D, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4[J]. Science, 2015, 349(6255): a5612.
- [3] 余祥单. 探讨酵母菌中与 RPL36A 和 RPL36B 重叠的 lncRNAs 的生理功能 [D]. 南昌大学, 2016.
- [4] 袁方. 酵母抗老化研究 [D]. 大连工业大学, 2014.