

## NRDRiso 酶 cDNA 的序列测定及生物信息学分析

杜 晶<sup>1,2\*</sup> 刘戈飞<sup>2</sup> 王桂玲<sup>2</sup> 徐晓琳<sup>2</sup> 王 博<sup>2</sup> 朱 莉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(沈阳医学院生化教研室 沈阳 110034)

<sup>2</sup>(中国医科大学细胞生物学教研室 沈阳 110001)

**摘 要** 通过鉴定分析人肝组织中辅酶 II 依赖性视黄醇脱氢酶不同剪接体全长 cDNA 核苷酸序列与氨基酸序列的结构特征,为今后进一步研究体内维甲酸的代谢情况奠定基础。根据人、小鼠 NRDR 编码区的一致性序列,设计一对引物,应用 RT-PCR 方法从人肝组织中得到一条 377bp 的新的 cDNA 片段。采用 RACE 法得到了 NRDR 新亚型 cDNA,并以生物信息学软件分析其生物学特征。测序得知该 cDNA 长为 1003bp,以 NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase short isoform(NRDRiso)登录 GenBank。其读码框为 525bp,拟编码 174 个氨基酸的蛋白。

**关键词** NRDRiso, cDNA 序列测定,选择性剪接,生物信息学

中图分类号 Q254 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0520-06

维生素 A 已被证明具有许多重要的生理功能,如调控特定上皮细胞的分化,对视觉、生长、繁殖的影响及抗感染作用等<sup>[1,2]</sup>。而诸多的研究表明,维生素 A 的这些作用大都是通过其活性代谢产物全反式维甲酸(all-trans retinoic acid)来完成的。全反式维甲酸(以后均称维甲酸)作为配体通过与靶细胞内的受体(类固醇/维甲类化合物/甲状腺素/维生素 D/孤儿受体超家族)结合来调控某些基因的表达从而发挥其生物学作用<sup>[3,4]</sup>。维甲酸在胚胎发育中的重要作用,在实验室中调节许多肿瘤细胞向正常细胞分化的作用及其在临床治疗急性早幼粒细胞所取得的效果使其受到了广泛的瞩目<sup>[5-7]</sup>。

维甲酸在体内主要是由维生素 A(Vitamin A)亦称视黄醇(Retinol)经两步氧化而得,中间产物为视黄醛(Retinal),由视黄醇生成视黄醛的反应是双向可逆性反应,由视黄醛生成维甲酸反应是单向非可逆反应。研究证明,维甲酸的体内生物合成过程较为复杂,每一步都可能多种酶参与其合成,或者说在不同的组织由不同的酶执行功能<sup>[8-13]</sup>。参与维甲酸第一步代谢的酶类有乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)与短链脱氢酶/还原酶(short-chain dehydrogenase/reductase, SDR)家族成员<sup>[14]</sup>。

黄东阳等<sup>[15]</sup>于 1997 年在兔肝细胞质溶胶(cytosol)中发现并纯化了一种新的催化视黄醇和视黄

醛可逆的氧化/还原反应的脱氢酶(NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase, NRDR)。NRDR 对视黄醇有很高的底物特异性与亲和性,酶活性也远大于报道的 ADH 与目前已知的 SDR 类,其活性在其他哺乳动物肝中也普遍存在,但以兔肝脏为最高。兔、小鼠与人的 NRDR cDNA 全长相近,约为 1300bp,编码 260 个氨基酸,已相继被 GenBank 接受 [BAB18777 | BAB18776 | BAB18775]。

我们在扩增人肝细胞 NRDR 编码区部分序列时,发现了它的短的剪接体,利用 RACE 法成功地进行了全长 cDNA 序列测定。本文介绍了序列测定的全过程,并对其 cDNA、氨基酸序列进行生物信息学分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 组织来源** 人肝组织由中国医科大学附属第一医院普外科提供,新鲜肝组织于冰上取回,立即贮存于 -70℃ 冰箱中。

**1.1.2 菌种和质粒** JM109 感受态细胞, pGEM-T 质粒购自 Promega 公司。

**1.1.3 试剂** RNA 提取采用 RNeasy Mini Kit, 逆转录酶采用 Ominiscript Reverse Transcriptase, 质粒提取采用 QIAprep Miniprep Kit, 以上均购自 QIAGEN 公司;

胶回收试剂盒购自 Watson 公司(上海华舜);Oligo dT (15) 购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶,合成引物,3'RACE,5'RACE 试剂盒均购自 TaKaRa 公司(大连),T4 连接酶购自 Promega 公司。

**1.1.4 培养基:**LB:1% 胰蛋白胨,0.5% 酵母粉,0.5% 氯化钠;LBA:1% 胰蛋白胨,0.5% 酵母粉,0.5% 氯化钠,1.5%~1.8% 琼脂粉。

## 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 提取及纯度鉴定:**总 RNA 提取按 QIAGEN 公司 RNeasy Mini Kit 操作完成,在紫外分光光度计(岛津 UV 610)上对所提总 RNA 进行纯度鉴定和定量。

**1.2.2 cDNA 合成:**按 Ominiscript Reverse Transcription Kit 进行。取 2.3 $\mu$ g 总 RNA 在 Ominiscript Reverse Transcriptase 作用下被逆转录为 cDNA。

**1.2.3 PCR 扩增特异的全长 cDNA 片段:**根据人、小鼠依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶的一致性序列,设计一对引物,Primer 1:5'-tccaccgacgggatcggtt-3', Primer 2:5'-atgcagcacaatcctctggct-3',PCR 条件 94 $^{\circ}$ C,1min;94 $^{\circ}$ C,30s,55 $^{\circ}$ C,30s,72 $^{\circ}$ C,30s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C,5min。PCR 扩增得到两条分别为 635bp 及 377bp 的片段,通过联网到 NCBI 调用 Blast 服务器进行分析显示 377 bp 的 DNA 序列与 NRDR 编码区 cDNA 的前后序列完全一致,中间缺失 258bp 碱基序列。根据此序列设计特异引物,采用 TaKaRa 公司(大连)3'RACE,5'RACE 试剂盒通过 RACE 法获得全长 cDNA 片段。

**3'RACE:**采用 TaKaRa 公司(大连)3'RACE 试剂盒。以试剂盒提供的 Oligo dT-3sites Adaptor primer 5'-ctgatctagaggtaccggatcctttt.....ttttt-3'引物进行逆转录,条件为:30 $^{\circ}$ C,10min,50 $^{\circ}$ C,20min,95 $^{\circ}$ C,5min,5 $^{\circ}$ C,5min,一个循环,然后以两条序列共同的 291bp 部分为模板,设计引物,Primer 3:5'-cctagctccaatgctgctg-3',与试剂盒提供的 3sites Adaptor primer,序列为 5'-ctgatctagaggtaccggatc-3',进行 PCR。条件为 94 $^{\circ}$ C,1min;94 $^{\circ}$ C,30s,55 $^{\circ}$ C,30s,72 $^{\circ}$ C,30s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C,5min 以此获得 3'末端。

**5'RACE:**采用 TaKaRa 公司(大连)5'RACE 试剂盒。首先,以 377bp 和 635bp 片段缺失部交界区设计 5'磷酸化 RT 引物进行逆转录,序列为 5'-P tccagagctt-gtc-3' 条件为:30 $^{\circ}$ C,10min,50 $^{\circ}$ C,45min,80 $^{\circ}$ C,2min,一个循环,然后降解杂交 RNA,接着进行连接反应,使 cDNA 环化或形成串联体,最后进行 PCR 反应,采用巢式 PCR,设计两对引物,Primer 4:5'-gctgctgcaac-

cctttt-3', Primer 5:5'-tccatgaagcttcacagccgt-3', Primer 6:5'-aggttaggcgagccagaggat-3',Primer 7:5'-cttcggctgct-gacgaccac-3',两轮 PCR 反应条件相同,均为 94 $^{\circ}$ C,1min;94 $^{\circ}$ C,30s,55 $^{\circ}$ C,30s,72 $^{\circ}$ C,30s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C,5min,以此获得 5'末端。

**1.2.4 pGEM-T 重组体的构建及 DNA 片段克隆:**将 RACE 法扩增得到的产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用 Watson 公司(上海华舜)胶回收试剂盒回收胶中 DNA 片段,采用 T/A 克隆法将其克隆至 pGEM-T 质粒载体,转化入 JM109 感受态大肠杆菌,在含氨苄青霉素的 LB 平皿上随机挑选白色菌落进行菌落 PCR 鉴定结果,LB 培养基中扩大培养,用 QIAprep Mini-prep Kit 提取质粒,EcoR I 酶切进一步鉴定是否插入了相应 DNA 片段并测序。

**1.2.5 序列测定及分析:**质粒 DNA 测序由 TaKaRa 公司(大连)完成,序列分析工具采用 NCBI Blast, Jellyfish, Prosite 等软件。

## 2 结果

### 2.1 人肝组织总 RNA 纯度

$$A_{260}/A_{280} = 1.927$$

### 2.2 全长 cDNA 片段扩增

根据人、小鼠依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶的一致性序列,设计一对引物,PCR 扩增得到两个 PCR 产物,大小分别为 377bp 和 635bp 左右。测序结果表明 635bp 左右序列与人的依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶的部分 cDNA 序列完全一致,而 377bp 片段与 NRDR 编码区部分 cDNA 的前后序列完全一致,中间缺失 258bp 碱基序列,以缺失部交界区片段为模板设计特异引物,经 3'RACE,5'RACE 法扩增分别得到 650bp 和 300bp 左右的片段。

### 2.3 全长 cDNA 序列获得

经测序表明用 3'RACE 方法得到 663bp 的产物,采用 5'RACE 方法获得了长为 315bp 5'末端。

综合上述人肝脏 RT-PCR、3'RACE 与 5'RACE 法扩增所得序列,得到了一个全长为 1003 bp 的 cDNA 序列。

### 2.4 基因序列分析结果

#### 2.4.1 cDNA 序列分析:

**ORF 分析:**经 Blast 比较得知该序列为一新的 cDNA 序列,联网到 NCBI 的 ORF finder 服务器对此序列进行可读框架分析,结果发现其可读框架位于第 6-584bp 或 60-584bp 位之间,但进一步分析发现第 60bp 位的起始密码附近碱基符合 Kozak 序列

而第 6 位起始密码序列不符合,因此,确认该 cDNA 序列起始密码位于 60bp 处,终止密码位于 584bp 处,由 525bp 的读码框,419bp 的 3' 端非翻译区和 59bp 的 5' 端非翻译区组成,编码 174 个氨基酸。其聚腺苷酸化信号 AATAAA 位于终止密码子下游 372bp 处,poly A 位于 986bp 处,其上游未发现启动子序列 TATA 盒等。

基因名称确定 经与 GenBank 数据库比较,其与依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶/还原酶(NADPH-dependent retinol dehydrogenase/reductase, NRDR, 长度为 1325bp) 基因高度同源,是从人肝组织中发现的一个新的 cDNA 序列,命名为 NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase short isoform(NRDRiso),并已登录 GenBank(A Y071856)。

#### 2.4.2 推测的蛋白质序列分析:

基本性质分析:ProtParam tool 推测该基因编码的蛋白(下文简称 NRDRiso)由 174 个氨基酸组成,等电点为 5.24,分子量为 18.6kD。Blast 分析表明,人 NRDRiso 与人过氧化物酶体短链乙醇脱氢酶(peroxisomal short-chain alcohol dehydrogenase, SCAD-SRL)的序列一致性为 59%,相似性为 63%,与牛 NRDR 的序列一致性为 52%,相似性为 62%,与兔 NRDR 的序列一致性为 41%,相似性为 46%,与小鼠 NRDR 的序列一致性为 48%,相似性为 55%,与猪 carbonyl reductase/NADP-retinol dehydrogenase 的序列一致性为 54%,相似性为 67%,与大鼠 carbonyl reductase/NADP-retinol dehydrogenase 的序列一致性为 53%,相似性为 67%。另外,与人 HEP27 蛋白的序列相似性为 61%,与小鼠 SCAD 的相似性为 31%,与大鼠 2-*A*-dienoyl-CoA reductase(NADPH)的相似性为 30%,与拟南芥菜 3-oxoacyl[acyl-carrier-protein] reductase 的相似性为 30%,与线虫 hypothetical protein F36H9.3 的相似性为 51%,与果蝇 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (Type II HADH)(Scully protein)的相似性为 27%,与大肠杆菌 probable 3-oxoacyl[acyl-carrier-protein] reductase 的相似性为 32%,与酵母 SPORULATION PROTEIN SPS19 的相似性为 28%。

功能位点分析:采用 PROSITE 数据库分析 NRDRiso 的结构位点,结果发现其含有多个蛋白激酶 α(PKC),酪氨酸激酶 II(CK2)的磷酸化位点,同时含有多个脂肪酸酰基化(MYRISTYL)位点,另外在该蛋白 C-末端含有过氧化物酶体 C-末端靶信号序列 SRL(图 1)。

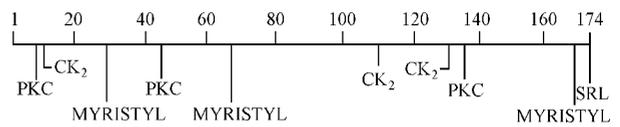


图 1 功能位点分析

Fig.1 Motif analysis

NRDRiso contains protein kinase C (PKC) phosphorylation sites at positions 7~9, 44~46 and 132~134, and casein kinase II (CK<sub>2</sub>) phosphorylation sites at positions 7~10, 107~110 and 128~131, and fatty acylation sites at positions 25~30, 62~67 and 168~173. In addition, NRDRiso contains peroxisome targeting signal sequence (SRL) at its C-terminus.

结构功能域的确定:用 SMART 服务器分析 NRDRiso 蛋白质序列的结构功能域,我们发现在第 13~120 位之间含有一个典型的 adh-short (pfam00106) 结构域(图 2)。

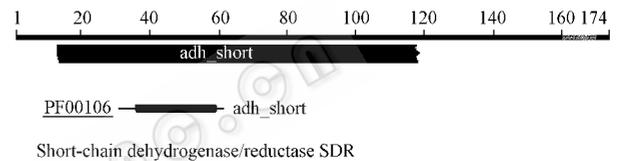


图 2 结构功能域分析

Fig.2 Domain analysis

NRDRiso contains a classical adh-short (pfam0016) domain between nucleotide 13 and 120. This domain belongs to SDR superfamily.

序列多重对齐分析:为了进一步研究 NRDRiso 蛋白在序列上的同源性,我们用人 NRDRiso 蛋白质序列联网查询了其相似序列,并进行了序列多重对比分析,以确定其可能的功能保守区。这些参与分析的序列包括人 NRDR (GenBank 接受号 BAB18775),大鼠 NRDR (GenBank 接受号 BAB78529),小鼠 NRDR (GenBank 接受号 BAB18776),兔 NRDR (GenBank 接受号 BAB18777),牛 NRDR (GenBank 接受号 AAL93248),猪 NRDR (GenBank 接受号 BAB78528)。用 Jellyfish 软件进行蛋白质序列的多重对齐结果见图 3。

结果发现,所有参与对比的序列 C-末端几乎均含有过氧化物酶体 C-末端靶信号序列 SRL(peroxisomal targeting signal, PTS1)<sup>[16]</sup>,且在 20-27 位氨基酸处均含有 SDR 超家族的模序结构(TAXXXGXG),另外除 NRDRiso 外,其它各 NRDR 在 164-168 位氨基酸处均含有 SDR 超家族的另一模序结构(YXX-SK)。

#### 2.4.3 基因组结构分析:

染色体定位分析:基于电子基因定位技术对人 NRDRiso 进行染色体定位。首先将该序列进行基因

	1	11	21	31	41	51	61
hum NRDRiso	MAS	SGH	EREDFL	ANKVA	LV	TA	SD
hum NRDR Pc	MAS	SGH	EREDFL	ANKVA	LV	TA	SD
Rat NRDR Pc	MAS	SGH	EREDFL	ANKVA	LV	TA	SD
mouse NRDR	MAS	SGH	EREDFL	ANKVA	LV	TA	SD
rabbit NRDR	MAS	SGH	EREDFL	ANKVA	LV	TA	SD
Bos NRDR	MAS	SGH	EREDFL	ANKVA	LV	TA	SD
Sus NRDR	MAS	SGH	EREDFL	ANKVA	LV	TA	SD
Consensus	mas	sg	er	ed	fl	an	kv
71	81	91	101	111	121	131	
hum NRDRiso	HYG	KA	ED	RE	RL	VAT	AV
hum NRDR Pc	HYG	KA	ED	RE	RL	VAT	AV
Rat NRDR Pc	HYG	KA	ED	RE	RL	VAT	AV
mouse NRDR	HYG	KA	ED	RE	RL	VAT	AV
rabbit NRDR	HYG	KA	ED	RE	RL	VAT	AV
Bos NRDR	HYG	KA	ED	RE	RL	VAT	AV
Sus NRDR	HYG	KA	ED	RE	RL	VAT	AV
Consensus	hyg	ka	ed	re	rl	vat	av
141	151	161	171	181	191	201	
hum NRDRiso	ROG	GS	VY	VS	SI	AA	RS
hum NRDR Pc	ROG	GS	VY	VS	SI	AA	RS
Rat NRDR Pc	ROG	GS	VY	VS	SI	AA	RS
mouse NRDR	ROG	GS	VY	VS	SI	AA	RS
rabbit NRDR	ROG	GS	VY	VS	SI	AA	RS
Bos NRDR	ROG	GS	VY	VS	SI	AA	RS
Sus NRDR	ROG	GS	VY	VS	SI	AA	RS
Consensus	rog	gs	vy	vs	si	aa	rs
211	221	231	241	251	261	271	
hum NRDRiso	RE	S	SK	ET	L	R	K
hum NRDR Pc	RE	S	SK	ET	L	R	K
Rat NRDR Pc	RE	S	SK	ET	L	R	K
mouse NRDR	RE	S	SK	ET	L	R	K
rabbit NRDR	RE	S	SK	ET	L	R	K
Bos NRDR	RE	S	SK	ET	L	R	K
Sus NRDR	RE	S	SK	ET	L	R	K
Consensus	re	s	sk	et	l	r	k

图 3 推测的 NRDRiso 及其同源蛋白一级结构比较

Fig.3 Primary structure comparisons of putative NRDRiso and its homologous protein

The proteins compared include human NRDRiso, human NRDR, rat NRDR, mouse NRDR, rabbit NRDR, bovine NRDR (Bos NRDR) and pig NRDR (Sus NRDR). All the proteins contain SDR motif (TAXXXGXC) at position 20 ~ 27, and YXXSK motif except NRDRiso

组数据库的同源性检索,提示该基因定位于人 14 号染色体,并显示编号为 NT 025892.9 的 Contig 序列对应其基因组序列,随后观察其基因结构,连接 14 号染色体的匹配位点,获得了该基因的准确定位,该基因定位于 14q11.2。

采用基于 UniGene 方式进行电子定位的结果与其完全一致。RH 定位结果同样支持上述结果(定位向量为:0210202110 2210111010 0100100000 0111110101 1001110101 1010010210 0111110102 0011110R02 1001010011 001)

基因组结构确定:基于 Blast 软件对人 NRDRiso 的基因序列和相应的基因组序列进行分析,发现 NRDRiso 全长 cDNA 序列位于基因组 14 号染色体 humNRDR 基因组(LOCUS NT-025892)序列上,humNRDR 基因组序列为 52638 bp,含有 8 个外显子和 7 个内含子,所有的内含子/外显子边界均符合典型的 GT/AG 剪切模式。进一步研究发现人 humNRDR 基因第一外显子的上游启动子区域为 79bp,GC 比例为 62.03%,但是其中未发现 CAAT 或 TATA 调节元件。

### 3 讨论

根据人、小鼠依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶基因的高度保守区设计出一对引物,用 RT-PCR 方法从人肝组织 cDNA 中扩增出 cDNA 的中间段,然后再根

据中间段序列设计特异性引物分别进行 3' 和 5' RACE 得到 cDNA 片段,全长为 1003bp,推测其编码的蛋白由 174 个氨基酸组成。

对推测的蛋白质序列进行生物信息学分析表明,该序列与人、小鼠、大鼠、牛、猪等依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶具有高度的同源性,序列多重对齐分析表明上述参与比对的序列均含有过氧化物酶体 C-末端靶向信号序列 SRL(peroxisomal targeting signal, PTS1),提示推测的依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶剪接体应该定位于过氧化物酶体。其次,参与对比序列均含有 SDR 超家族的模序结构。典型的 SDR 超家族多含有两个高度保守的模序,一是二核苷酸结合模序 TGXXXGXC,此序列位于 SDR 酶的氨基末端,参与结合辅酶 NAD(H)或 NADP(H),上述对比序列均含此模序结构,只不过其中 TG 由 TA 取代,但此种氨基酸的替代是保守的,并不影响 Rossmann 折叠<sup>[17]</sup>;第二个保守模序是 YXXSK,该模序可能是 SDR 族酶的活性部位,可能与酶的催化活性有关,多数参比序列均含此模序,但人的新克隆 NRDRiso 全长 cDNA 序列推测的氨基酸序列无此模序,而底物结合袋(Pocket)的氨基酸的变化或缺失可能会导致底物特异性发生变化,从而决定底物是视黄醇类或其它<sup>[18]</sup>。因此,上述对比分析提示 NRDRiso 蛋白可能是 SDR 超家族成员,但是否具有依赖 NADPH 的

视黄醇脱氢酶活性还不确定。另外,功能位点分析表明人 NRDR<sub>iso</sub> 蛋白含有多个蛋白激酶 C (PKC) 酪氨酸激酶 II (CK2) 的磷酸化位点,同时含有多个脂肪酸酰基化位点,结构功能域分析表明 NRDR<sub>iso</sub> 在第 13 ~ 120 位之间含有一典型的 adh-short 结构域。

进一步对此全长 cDNA 序列进行人类基因组 Blast,发现该 cDNA 序列位于 14 号染色体 humNRDR 基因组结构上。NRDR<sub>iso</sub> 全长 cDNA 经与人类基因组 Blast 比对表明编码区含有 5 个外显子,与含 8 个外显子的 humNRDR 全长 cDNA 编码区序列相比,humNRDR 编码区在 355 - 612bp 处比 NRDR<sub>iso</sub> 多 258 个 bp,且在 355 - 612bp 处比 NRDR<sub>iso</sub> 多编码 86 个氨基酸,分析以上 2 个序列发现,符合真核生物内含子/外显子的剪切位点特征,NRDR<sub>iso</sub> 序列可由 humNRDR 进一步切去连续的 3 个外显子(第 4、5、6 外显子)及相应内含子而来,这说明在 humNRDR 基因转录选择性剪接时,除了内含子被切除外,外显子也发生了选择性剪接。

目前人类基因组草图已基本完成,人类约有 32 000 个编码蛋白质的基因,只是线虫或果蝇的 2 倍<sup>[19]</sup>。人类是怎样完成其复杂的生物功能?越来越多的证据表明选择性剪接在扩大蛋白的多样性中发挥重要作用,并且有助于解释基因数目与生物复杂程度两者的不一致性。选择性剪接能够从一个基因产生多个转录本,从而产生远多于基因数目的蛋白,完成机体的复杂功能及精细调节。根据 ESTs 分析,在人类 32 000 个基因中大约有 40% 的基因有选择性剪接的形式,选择性剪接有重要的生物学意义。现在人们已知道许多基因的前体 mRNA 可能有几百种,几千种或上万种选择性剪接形式,这些剪接形式产生的蛋白是功能相关的。相互协调的多个 mRNA 前体的选择性剪接,是基因表达如神经系统的分化和细胞凋亡的重要组成部分,机体必须对选择性的剪接位点在时空上进行精细调节。选择性剪接在增加蛋白多态性和基因在不同时空表达发挥不同的功能中发挥重要功能。

对于选择性剪接的研究长期以来一直作为分子生物学方面具有较高价值的领域看待,但与主要领域如新基因的发现或转录调节的研究相比受到了相对少的关注,自 1977 年发现腺病毒 hexon 基因的外显子和内含子<sup>[20]</sup>,Walter Gilbert 提出外显子的不同组成能剪接在一起(“选择性剪接”)从而产生一个基因的不同 mRNA 同工型<sup>[21]</sup>,到目前为止分子生物学家仅鉴定了几百种具有选择性剪接的基因,而且

多数通过生物信息学方法,通过得到的 EST 序列进行电子 PCR 拼接得到,生物实验证实选择性剪接形式存在及揭示其功能的更是寥寥无几,因此,通过大量实验证实选择性剪接的形式,功能鉴定以及选择性剪接的调节是今后研究的主要方向。由此可见,对我们克隆的 NRDR<sub>iso</sub> 的全长 cDNA 与依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶/还原酶基因选择性剪接形式及调节的研究,必将对多组织完整基因组序列选择性剪接提供重要的生物实验信息,并且有助于阐明细胞、组织和发育的不同阶段基因等表达的调节和生命本质。

此外,我们在以人、小鼠依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶基因(NRDR)的高度保守区设计引物扩增新的 DNA 片段的同时,用该引物在人、小鼠及兔肝的依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶基因中也找到了约 300bp 的高度保守区,以此片段设计引物在大鼠及牛肝中同样获得了 300bp 左右的片段,此依赖 NADPH 的视黄醇脱氢酶(NRDR)在多种哺乳动物组织基因中有高度保守序列,表明其可能在多种动物体内维甲酸的合成方面具有基本的、重要的生理功能。另外,NRDR<sub>iso</sub> 蛋白与果蝇 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (Type II HADH) (Scully protein),低等生物拟南芥菜 3-oxoacyl[acyl-carrier-protein] reductase,线虫 hypothetical protein F36H9.3,大肠杆菌 probable 3-oxoacyl[acyl-carrier-protein] reductase,酵母 SPORULATION PROTEIN SPS19 比对同源性也很高,表明此酶在基因演变过程中具有相对保守性。因此对 NRDR 和 NRDR<sub>iso</sub> 酶现有已知序列结构和功能的关系进行深入研究,进一步挖掘新的功能,另外继续寻找新的有价值的成分,必将会为体内维甲酸的合成过程提供新的视点。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Moore T. Vitamin A. *Elsevier*, New York, 1957
- [2] Wolf G. Multiple functions of vitamin A. *Physiol Rev*, 1984, **64**: 873 - 937
- [3] Sucov HM, Evans RM. Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Mol Neurobiol*, 1995, **10**: 169 - 184
- [4] Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*, 1996, **10**: 940 - 954
- [5] Maden M. Vitamin A in embryonic development. *Nutr Rev*, 1994, **52**: S3 - S12
- [6] Morriss-Kay GM, Sokolova N. Embryonic development and pattern formation. *FASEB J*, 1996, **10**: 961 - 968
- [7] Semba RD. The role of vitamin A and related retinoids in immune

- [ 8 ] Posch KC , Boerman MHEM , Burns RD *et al.* Holo-cellular retinol binding protein as a substrate for microsomal retinal synthesis. *Biochemistry* ,1991 ,**30** :6224 – 6230
- [ 9 ] Napoli JL , Posch KC , Burns BD. Microsomal retinal synthesis : retinol vs. holo-CRBP as substrate and evaluation of NADP , NAD and NADPH as cofactors. *Biochim Biophys Acta* ,1992 ,**1120** :183 – 186
- [ 10 ] Chai XY , Boerman MHEM , Zhai Y *et al.* Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. *J Biol Chem* , 1995 , **270** :3900 – 3904
- [ 11 ] Boerman MHEM , Napoli JL. Characterization of a microsomal retinol dehydrogenase : A short-chain alcohol dehydrogenase with integral and peripheral membrane forms that interacts with holo-CRBP ( Type I). *Biochemistry* , 1995 , **34** :7027 – 7037
- [ 12 ] Chai XY , Zhai Y , Popescu G *et al.* Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase type II. *J Biol Chem* ,1995 **270** :28408 – 28412
- [ 13 ] Chai XY , Zhai Y , Napoli JL. Cloning of a rat cDNA encoding retinol dehydrogenase isozyme type III . *Gene* ,1996 , **169** :219 – 222
- [ 14 ] Gregg D. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* ,2000 **267** :4315 – 4324
- [ 15 ] Huang DY , Ichikawa Y. Purification and characterization of a novel cytosolic NAD(PH)-dependent retinol oxidoreductase from rabbit liver. *Biochem Biophys Acta* , 1997 , **1338** ( 1 ) :47 – 59
- [ 16 ] Subramani S. Components involved in peroxisome import , biogenesis , proliferation , turnover , and movement. *Physiol Rev* ,1998 ,**78** :171 – 188
- [ 17 ] Taylor WR. The classification of amino acid conservation. *J Theor Biol* ,1986 **119** :205 – 218
- [ 18 ] Duax WL , Griffin JF , Ghosh D. The fascinating complexities of steroid-binding enzymes. *Curr Opin Struct Biol* , 1996 , **6** ( 6 ) :813 – 823
- [ 19 ] Venter JC *et al.* The sequence of the human genome. *Science* , 2001 **291** :1304 – 1352
- [ 20 ] Sambrook J. Adenovirus amazes at Cold Spring Harbor. *Nature* , 1977 , **268** :101 – 104
- [ 21 ] Gilbert W. Why genes in pieces ? *Nature* ,1978 , **271** :501

## Sequencing and Bioinformatic Analysis of NRDRiso cDNA

DU Jing<sup>1 2\*</sup> LIU Ge-Fei<sup>2</sup> WANG Gui-Ling<sup>2</sup> XU Xiao-Lin<sup>2</sup> WANG Bo<sup>2</sup> ZHU Li<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( Department of Biochemistry , Shenyang Medical College , Shenyang , 110034 , China )

<sup>2</sup>( Department of Cell Biology , China Medical University , Shenyang , 110001 , China )

**Abstract** This study describes the cDNA sequencing and the bioinformatic analysis of a novel NAD(PH)-dependent retinol dehydrogenase/reductases isoform( NRDRiso ). Based upon the concensus sequences of human and mouse NRDR coding region , we have identified a short 377 bp RT-PCR product from human liver tissue. The cDNA sequence of a NRDR isoform was then isolated using RACE approach and its sequence was analysed. The full-length cDNA is 1 003bp in length and was submitted to GenBank as NADP-dependent retinol dehydrogenase /reductase short isoform( NRDRiso ). The open reading frames of NRDRiso cDNA is 525 bp.

**Key words** NRDRiso , cDNA sequence , Alternative splicing , Bioinformatics

Received : 09-19-2003

\* Corresponding author. Tel : 86-21-62934830 ; E-mail : Dujing1106@sohu.com