论著

文章编号:1000-5404(2005)18-1830-03

ERp29基因的克隆及其在IEC-6细胞中的表达

章 波,粟永萍,艾国平 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆小鼠ERp29基因并在IEC-6细胞中表达。**方法** 采用RT-PCR方法从小肠上皮细胞克隆该基因的编码区,经T-载体克隆并测序证实后构建真核表达载体,并转染IEC-6细胞,RT-PCR分析外源基因的表达。**结果** 从小肠上皮细胞总RNA中成功地克隆了ERp29基因,序列测定结果表明克隆的序列与数据库中序列完全一致。构建的真核表达载体与预期一致,表达质粒转染细胞后的RT-PCR分析结果表明:外源的质粒得到了有效的表达。**结论** 成功地克隆了ERp29基因,并获得真核表达。

关键词: ERp29;真核表达载体;IEC-6细胞;RT-PCR

中图法分类号: Q785;Q786 **文献标识码:** A

Molecular cloning of mouse ERp29 and expression in IEC-6 cells

ZHANG Bo, SU Yong-ping, AI Guo-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone mouse ERp29 gene from intestinal epithelia and express it in IEC-6 cells. **Methods** The total RNAs of mouse intestinal epithelia were isolated and the coding region of mouse ERp29 gene was amplified by RT-PCR. Then the coding region was cloned to T-vector and sequenced, and the expression vector was constructed by using pSG5. Cultured IEC-6 cells were transfected with recombinant vector by lipidsome, and the expression was confirmed by RT-PCR. **Results** A DNA fragment about 850 bp was amplified from total RNAs of mouse intestinal epithelial cells using specific primers of ERp29. The sequencing confirmed the coding region was successfully cloned into T-vector, which was completely coincident with the sequence in GenBank. After the fragment of T-vector containing ERp29 was inserted into pSG5, the recombinant plasmid was transferred to IEC-6 cells. RT-PCR assay showed that a DNA fragment of 967 bp could be amplified, indicating the transcription of pSG5-ERp29. **Conclusion** Mouse ERp29 gene was successfully cloned and expressed in IEC-6 cells, which help to further study the biochemical and physiological role in radiation response of this protein.

Key words: ERp29; eukaryotic expression vector; IEC-6 cells; RT-PCR

ERp29基因是在研究大鼠牙釉质细胞的内质网应急反应时发现的[1,2]。该基因所编码的蛋白质为内质网蛋白,可能是一种分子伴侣,在蛋白质折叠中起作用。研究表明:在内质网应急中ERp29的表达升高。我们在以往的研究中发现:细胞或组织受到电离辐射后,该蛋白的表达升高[3]。研究认为电离辐射也是内质网应急的诱导因素。因此,我们推测:电离辐射诱导细胞内质网应急,产生大量未折叠蛋白质,从而使ERp29基因表达增强,促进蛋白质的折叠。

为了深入研究该基因在电离辐射中的作用,以及阐述其作用机制,我们从小鼠小肠上皮细胞中克隆了ERp29基因的编码区,并构建了真核表达载体,使该基因在IEC-6中表达。这为进一步分析该基因在电离辐

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30230360, 30400121)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230360, 30400121)

作者简介: 章 波(1972-),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事基因表达与调控方面的研究,现在基础医学部分子遗传学教研室。电话:(023) 68753670

通讯作者: 粟永萍,电话:(023) 68752009, E-mail: suyping@yahoo.com

收稿日期: 2005-06-15;**修回日期:** 2005-08-28

射中的作用奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　菌株和质粒　　*E. coli* JM108 为本室保存。质粒 pSG5 为第三军医大学生物化学教研室陈健博士赠送。

1.1.2　引物设计　　从基因数据库中搜索出小鼠 ERp29 的 mRNA 序列(gi: 31982657)，采用 Primer5.0 软件设计其引物。上游引物(P1)：5′-CGGAATTCTCTCCCGCT CCCACCATC-3′；下游引物(P2)：5′-CGGATCCTGCCCCTGGCAAACCCT-3′。针对 pSG5 的引物(P3)：5′-AAAGCTGGATCGATCCTGAG-3′。这些引物均由上海申友生物技术有限公司合成。

1.1.3　主要试剂　　细胞总 RNA 提取试剂和脂质体购自 Roche(USA)，RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司，细胞培养基 DMEM 购自 Hyclone 公司(USA)，各种限制性内切酶购自 New England Biolabs，电泳试剂均购自 Sigma，其它试剂为国产分析纯。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　　IEC-6 细胞来源于大鼠空肠上皮细胞，本室引自美国 ATCC 并成功传代培养、保存。培养液组成：DMEM、10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素，于 37 ℃、10% CO_2 条件下培养。

1.2.2　RNA 提取及 RT-PCR　　参照文献[3]提取小肠上皮细胞的总 RNA。提取的 RNA 经过甲醛变性凝胶电泳检测其完整性。RT-PCR 按照说明书进行。逆转录混合液于 50 ℃ 30 min 处理后在 95 ℃灭活逆转录酶，然后按照如下条件进行 PCR 反应：95 ℃ 40 s，60 ℃ 40 s，72 ℃ 2 min。30 个循环完成后，取产物进行琼脂糖电泳电泳。

1.2.3　ERp29 的克隆　　RT-PCR 产物经凝胶回收后与 T-载体连接，室温反应 2 h。然后按照常规 $CaCl_2$ 转化大肠杆菌，筛选重组子进行序列测定(上海生工)。

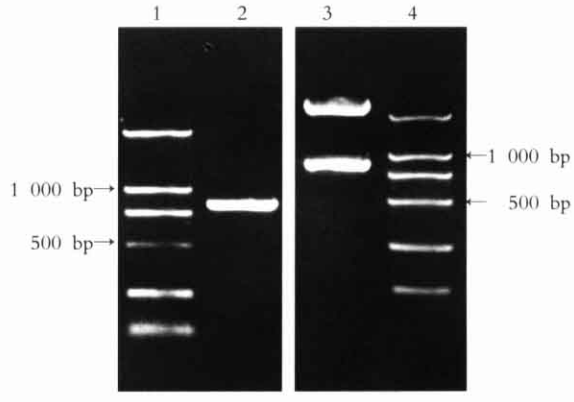
1.2.4　表达质粒的构建　　经序列测定后，提取重组到 T-载体的质粒 DNA，经 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切后进行凝胶回收备用。同时提取载体 pSG5，用同样的酶切后与外源 DNA 连接，并转化 *E. coli* DH5α。采用菌落 PCR 方法筛选重组子，并采用 *Bgl* Ⅱ 酶切鉴定外源片断的插入方向。

1.2.5　IEC-6 细胞的转染及表达检测　　采用质脂体转染法：参照说明书进行。按照 2.0 μg DNA、30 μl DOTAP 与 HBS 液体混合，该混合物后与 5～6 ml 无血清培养液混匀后处理 10^7 细胞 6 h，然后换液，继续培养。转染后 16 h，重复转染 1 次。于第 2 次转染后 24 h 收集细胞提取总 RNA，采用 RT-PCR 方法检测基因表达情况。

2　结果

2.1　RT-PCR

我们采用 Tripure 试剂从小鼠小肠上皮细胞中能提取出质量较好的总 RNA，3 条主要的核糖体 RNA 带清晰可见，mRNA 呈弥散状。RT-PCR 产物经过电泳后显示为 1 条带，约为 850 bp，与预期的产物大小一致(图 1)。



1，4：DL2000 marker；2：RT-PCR product；3：Prx-T digested by *Eco*R Ⅰ and *Bam*H Ⅰ

图 1　PCR 扩增 ERp29 基因编码区及克隆

Fig 1　Amplification of the coding region of ERp29 from mouse intestinal epithelial cells by RT-PCR and cloning into T-vector

2.2　表达质粒的构建

将 RT-PCR 产物回收，与 T-载体连接并转化大肠杆菌。从含 X-Gal 的培养皿挑选白色菌落的转化子进行菌落 PCR 和酶切鉴定。结果显示：我们所挑选的菌落均有外源 DNA 片段的插入(图 2)。随即送菌落至上海生工技术公司进行 DNA 测序，结果表明我们所克隆的 ERp29 编码区与数据库中序列完全相同。

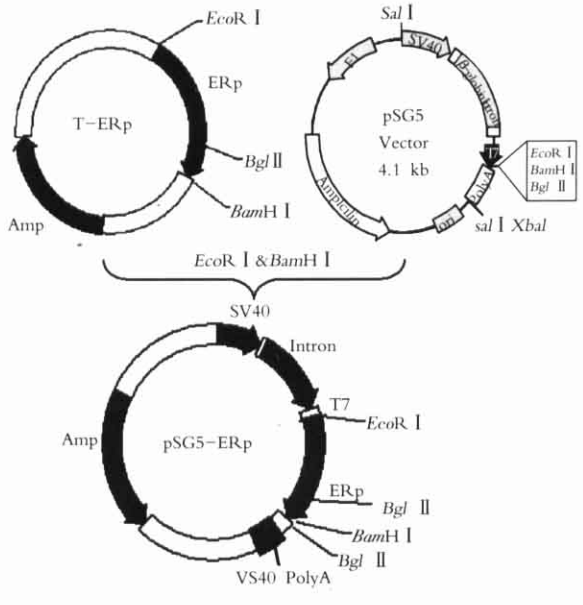
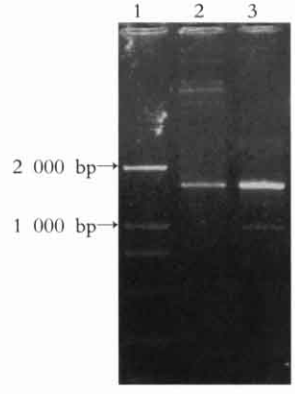


图 2　真核表达质粒 pSG5-ERP 的构建

Fig 2　Construction of eukaryotic expression vector pSG5-ERP

2.3 ERp29 的表达及检测

质粒转染 IEC-6 细胞后 24 h，提取细胞的总 RNA，以 P1、P3 为引物进行 RT-PCR 检测目的基因的表达情况。结果显示：以总 RNA 为模板，PCR 产物有两条带，大小分别为1 550 bp和960 bp；而以质粒 DNA 为模板，产物则只有 1 条带（图 3）。这说明转染的质粒在细胞中得到了转录，并被加工为成熟 mRNA。因为该质粒转录后 RNA 含有 β-globin 的内含子，在成熟 RNA 中被剪接除去。因而，以成熟 RNA 为模板扩增产物大小为 960 bp。



1：DL2000 marker；2：pSG5-ERP as template；3：RT-PCR of transfected IEC-6 cells

图 3 RT-PCR 方法分析转染细胞的外源基因表达

Fig 3 RT-PCR analysis of transfected IEC-6 cells

3 讨论

Demmer 等[1]在研究大鼠牙釉质细胞的内质网应急反应时发现并克隆了 ERp29 基因。研究表明：ERp29 含有定位于内质网的信号序列 KEEL，提示可能为一种内质网蛋白。ERp29 广泛表达于各种组织，并与其它哺乳动物有高度同源性。ERp29 蛋白具有 2 个结构域：N-端结构域与蛋白二硫键异构酶（PDI）的硫氧还蛋白结构域类似，但是该蛋白没有异构酶所必需的半胱氨酸位点，故缺乏 PDI 类似的氧化还原作用；其 C-端结构域为全螺旋结构，功能不明。ERp29 蛋白依靠 N-端结构域形成二聚体，在分泌蛋白的产生中具有重要作用[4~7]。目前，ERp29 基因在病理生理中的作用还不明确，且对 ERp29 的表达调控的也未深入研究。

我们在以往的研究中发现：IEC-6 细胞在照射后 ERp29 蛋白显著增加。进一步采用 RT-PCR 研究发现：IEC-6 细胞的 ERp29 mRNA 在照射后随时间增加[8]。我们进行文献检索，少见有关 ERp29 基因在电离辐射中作用的研究报道。因而，有必要研究电离辐射中该分子在 mRNA 及蛋白水平升高的原因，以及它在电离辐射作用机制。为了进一步研究该基因的功能，首先必须克隆并表达它。因此，我们从小肠上皮细胞中采用 RT-PCR 方法克隆该基因的编码区。实验结果表明我们克隆的编码区正确。在表达该基因时，我们选择了真核表达载体 pSG5。该载体没有选择标志，为瞬时表达载体，它被广泛使用于基因表达的研究中[9]。且在其 SV40 启动子下游含一个 β-globin 的内含子，在成熟的 mRNA 中被剪接除去，因而可以采用 RT-PCR 方法来证实外源基因的转录，这如同我们实验结果所显示。本研究成功地克隆并表达了 ERp29 基因，为深入研究该基因在电离辐射中的作用奠定了基础。

参考文献：

[1] Demmer J, Zhou C, Hubbard M J. Molecular cloning of ERp29, a novel and widely expressed resident of the endoplasmic reticulum[J]. FEBS Lett, 1997, 402(2-3): 145-150.

[2] Hubbard M J, McHugh N J, Carne D L. Isolation of ERp29, a novel endoplasmic reticulum protein, from rat enamel cells evidence for a unique role in secretory-protein synthesis[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(7): 1945-1957.

[3] Zhang B, Su Y P, Ai G P, *et al*. Differentially expressed proteins of gamma-ray irradiated mouse intestinal epithelial cells by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(12): 2726-2731.

[4] Sargsyan E, Baryshev M, Backlund M, *et al*. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding a putative endoplasmic reticulum chaperone, ERp29[J]. Gene, 2002, 285(1-2): 127-139.

[5] Liepinsh E, Baryshev M, Sharipo A, *et al*. Thioredoxin fold as homodimerization module in the putative chaperone ERp29: NMR structures of the domains and experimental model of the 51 kDa dimer[J]. Structure (Camb), 2001, 9(6): 457-471.

[6] Sargsyan E, Baryshev M, Szekely L, *et al*. Identification of ERp29, an endoplasmic reticulum lumenal protein, as a new member of the thyroglobulin folding complex[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 17009-17015.

[7] Shnyder S D, Hubbard M J. ERp29 is a ubiquitous resident of the endoplasmic reticulum with a distinct role in secretory protein production [J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50(4): 557-566.

[8] 章 波，粟永萍，艾国平，等. γ射线照射前后 IEC-6 细胞蛋白质组的差异分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25(24)：2157-2160.

[9] Rose K, Steinbuchel A. Construction and intergeneric conjugative transfer of a pSG5-based cosmid vector from *Escherichia coli* to the polyisoprene rubber degrading strain Micromonospora aurantiaca W2b[J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 211(2): 129-132.

（编辑 薛国文）