论著

文章编号:1000-5404(2007)02-0144-03

大鼠神经球蛋白基因的克隆及其真核表达载体构建

朱 继,唐文渊 (重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

提 要:目的 克隆Wistar大鼠神经球蛋白(neuroglobulin, NGB)基因并构建其真核表达载体,为进一步研究其功能奠定基础。**方法** 从雄性Wistar大鼠脑组织中提取总RNA,经逆转录PCR得到cDNA,测序并利用BLAST工具对比证明该基因序列正确后,亚克隆入pCDNA3.1(+)载体中,并通过双酶切和测序确定序列和阅读框正确。**结果** 克隆了Wistar大鼠的神经球蛋白基因,有4个碱基发生了突变;成功构建了真核表达载体。**结论** Wistar大鼠脑组织中有NGB表达,成功克隆了该基因并构建了其真核表达载体。

关键词:神经球蛋白基因;脑组织;克隆;表达载体

中图法分类号:Q512.2;Q782;Q785 **文献标识码**:A

Cloning of rat neuroglobulin gene and construction of its eukaryotic expression vector

ZHU Ji, TANG Wen-yuan (Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To clone rat neuroglobulin (NGB) gene and construct its eukaryotic expression vector. **Methods** The total RNA was extracted from Wistar rat brain and the full length cDNA encoding NGB was obtained by RT-PCR. After the sequence was confirmed by sequencing and BLAST, it was inserted in the eukaryotic expression vector pCDNA3.1 (+), then the sequence and reading frame were confirmed by two restriction endonucleases and sequencing. **Results** The NGB gene was cloned with four bases mutated and its eukaryotic expression vector was constructed. **Conclusion** NGB expressed in Wistar rat brain. NGB gene was successfully cloned and inserted in eukaryotic expression vector.

Key words: neuroglobulin gene; brain; cloning; expression vector

氧是机体新陈代谢和维持生存的必要因素。研究表明,脊椎动物中共有4种球蛋白:参与氧储存与转运的血红蛋白(hemoglobin, HGB),协助氧进入线粒体的肌红蛋白(myoglobin, MGB),充当氧缓冲剂、便于氧扩散和参与清除细胞毒性NO的细胞球蛋白(cytoglobin)以及新近发现的神经球蛋白(neuroglobulin, NGB)[1]。神经球蛋白是Burmester等在人和小鼠脑内发现的一类携氧球蛋白,由151个氨基酸组成的单体蛋白。NGB主要在脑组织中表达,其分布区域包括大脑皮质、海马、丘脑、下丘脑、嗅球及小脑等[2]。NGB能够可逆地结合氧,且与氧有很高的亲和力,能够特异性地向脑组织供氧[3]。NGB基因的表达调控至少有两条信号转导途径参与,在中枢神经系统的功能活动中可能起重要作用[4]。NGB的发现,为氧这一基本生命元素与神经系统功能之间的关系提供了重要线索,对卒中等临床脑缺血缺氧疾病的防治提供了新思路。为了进一步研究NGB的结构和功能,本研究通过逆转录PCR技术得到NGB基因,并成功将其亚克隆至表达载体,为以后的研究工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性成年Wistar大鼠1只,体质量210 g,由本校实验动物中心提供。大肠杆菌DH5α及质粒pCDNA3.1(+)为本室保存。LA *Taq*酶、限制性内切酶*Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ、DNA marker DL2000均购自TaKaRa公司,T_4 DNA连接酶为NEB公司产品。RT-PCR试剂盒、Trizol试剂均购自Invitrogen公司。

1.2 大鼠脑组织中总RNA的提取

取Wistar大鼠脑组织,迅速加入液氮和1 ml Trizol,于研钵

基金项目:重庆市卫生局资助项目(06-2-177)
Supported by the Bureau of Public Health of Chongqing (06-2-177)

作者简介:朱 继(1965-),男,重庆市人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事神经脑血管病方面的研究。E-mail: a68690569@cta.cq.cn,电话:13808399425

收稿日期:2006-07-18;**修回日期**:2006-10-20

中充分研磨至浆状，倒入 EP 管中。依照 Trizol 试剂说明书中的步骤进行 RNA 提取，终产物溶于 35 μl ddH_2O(Rnase free)中。

1.3　逆转录 PCR

参照试剂盒程序，反转录合成 cDNA。根据已发表的序列(NCBI 登陆号：NM_033359)设计 2 条引物，在其 5′端分别加上 *Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ限制性酶切位点，由博亚公司合成。引物 1：5′-CGGGATCCGCCACCATGGAGCGCCTAGAGT-3′；引物 2：5′-CCGCTCGAGCTTGTCTCTTACTCCCCGTC-3′。PCR 反应条件：94 ℃预处理 5 min，94 ℃变性 20 s，54 ℃退火 25 s，72 ℃延伸 30 s，30 个循环后 72 ℃再延伸 3 min。1% 琼脂糖凝胶电泳观察后将目的片段连接到 T 载体(TS-NGB)。

1.4　目的片段的酶切鉴定及测序

将连接产物转化至 DH5α 中，挑取克隆进行酶切鉴定。通过蓝/白斑和抗生素筛选，得到阳性菌落，提取重组质粒。对重组质粒进行 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定后，选取阳性克隆进行测序。

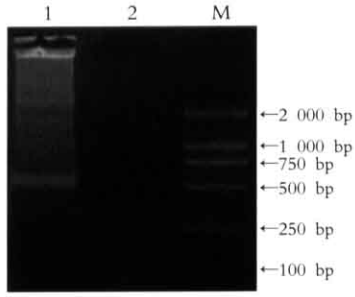
1.5　真核表达载体的构建及鉴定

用 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ将 TS-NGB 及目的载体 pCDNA3.1(+)两步法双酶切，然后进行连接。连接产物转化至 DH5α 中，挑取克隆进行鉴定。

2　结果

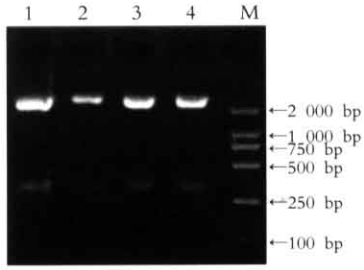
2.1　目的基因的获取

逆转录 PCR 扩增大鼠脑组织 RNA，得到 1 条 500 bp 左右的目的片段，见图 1。随机挑取 4 个阳性菌落，用 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切鉴定，见图 2。序列测定结果表明，扩增、克隆得到的大鼠神经球蛋白基因全长 465 bp，共编码 151 个氨基酸。用 BLAST 工具与 NCBI 数据库中序列比对，结果显示有 4 个碱基发生了突变，其编码的氨基酸序列中也有 4 个不一致(图 3、4)。



1：NGB 扩增结果；2：对照；3：DL2000 标准

图 1　大鼠神经球蛋白基因扩增电泳图



1－4：*Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切；M：DL2000 标准

图 2　T 载体克隆鉴定结果

```
Query  107  TTGGCTCCAGGCGGTCCTTGTAGCCGGCGTAA G GTCGGGACCCAGGCACTTCTCCAGCAT  166
Sbjct  614  TTGGCTCCAGGCGGTCCTTGTAGCCGGCGTAA A GTCGGGACCCAGGCACTTCTCCAGCAT  555

Query  167  GTAGA A CAGGGACTCACCTACTGTCGAGAAGG G GCTGAGCCTCACTCCCACTGCCCGATG  226
Sbjct  554  GTAGA G CAGGGACTCACCTACTGTCGAGAAGG A GCTGAGCCTCACTCCCACTGCCCGATG  495

Query  347  ACAGTCCTCAGGACTGGAGAACTGGCGGCCATTGTACTGGA G GAGAGGCAGCAGGCTGGG  406
Sbjct  374  ACAGTCCTCAGGACTGGAGAACTGGCGGCCATTGTACTGGA A GAGAGGCAGCAGGCTGGG  315
```

图 3　DNA 序列比对结果(仅列出含突变碱基的序列)

NCBI 数据库中序列(Norway 大鼠)

MERLESELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFSRLFALEPSLLPLF * QYNGQF SSPEDCLSSPEFLDHIRKVMLVIDAAVTNVEDLSSLEEYLATLGRKHRA VGVRLSS * FSTVGESLL * YMLEKCLGPDF * TPATRTAWSQLYGAVV QAMSRGWDGE－

实验所得序列(Wistar 大鼠)

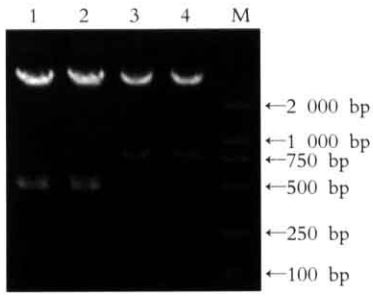
MERLESELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFSRLFALEPSLLPLL * QYNGRQ FSSPEDCLSSPEFLDHIRKVMLVIDAAVTNVEDLSSLEEYLATLGRKHRA VGVRLSP * FSTVGESLF * YMLEKCLGPDL * TPATRTAWSQLYGAVV QAMSRGWDGE－

*：改变的氨基酸

图 4　Norway 大鼠与 Wistar 大鼠的氨基酸序列比对结果

2.2　NGB-pCDNA3.1(+)重组表达载体的构建与鉴定

TS-NGB 及目的载体 pCDNA3.1(+)经 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后进行连接，构建成重组 NGB 真核表达载体(NGB-pCDNA3.1)。进行酶切电泳鉴定，其中两个克隆在 500 bp 处有明亮条带，与理论设计基本相符(图 5)。选取阳性克隆培养，提取重组质粒测序鉴定表明所插入片段的核苷酸序列与本实验所克隆的 NGB 基因的序列完全一致，阅读框也正确无误。神经球蛋白基因已成功插入到真核表达载体 pCDNA3.1(+)中。



1－4：*Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切；M：DL2000 标准

图 5　NGB-pCDNA3.1 重组质粒的酶切鉴定

3 讨论

NGB 为单链蛋白,具有独特的外显子和内含子结构,NGB 基因缺乏 TATA 阅读框。Zhang 等[5]在国际上率先克隆了 Norway 大鼠 NGB 基因(GenBank AF 333245)。由于生物的多样性,同一个基因在不同品系或个体间出现基因编码不一致是普遍存在的现象。我们选用的是 Wistar 大鼠,其 NGB 基因与报道的用 Norway 大鼠的不完全相同,有 4 个碱基发生了突变,同源性为 99%,所对应的氨基酸序列也有 4 个发生了改变。我们在扩增的时候选用的是 TaKaRa 公司的高保真的聚合酶,测序是由上海生工完成的,因此理论上来讲,这些突变不是由于实验操作引起的。这些氨基酸的改变是否影响到蛋白质的结构和功能,还需作进一步的研究。我们成功构建其真核表达载体,也为今后的研究打下了基础。

NGB 具有转运和储存氧的功能,能够可逆地结合氧。结合氧的能力和 MGB 相似,但高于 HGB 的携氧能力。在大鼠脑缺氧模型中显示,在脑缺血缺氧状态下,NGB mRNA 快速增加,其表达也明显增加,因此 NGB 可能在脑缺氧的适应性保护过程中起重要作用[6,7]。在胚胎肾和正常成人肝组织中也发现了高表达的 NGB,提示其可能还具有其他功能,如还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶的功能、一氧化氮的解毒作用等[8]。

参考文献:

[1] Mammen P P, Shelton J M, Goetsch S C, *et al*. neuroglobulin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain [J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50(12): 1591 - 1598.

[2] Fuchs C, Heib V, Kiger L, *et al*. Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobulin gene structure, expression pattern, and ligand binding [J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24116 - 24122.

[3] Brunori M, Giuffre A, Nienhaus K, *et al*. neuroglobulin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(24): 8483 - 8488.

[4] Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobulin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor [J]. J Biol Chem, 2003, 278(38): 36505 - 36512.

[5] Zhang C, Wang C, Deng M, *et al*. Full-length cDNA cloning of human neuroglobulin and tissue expression of rat neuroglobulin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(5): 1411 - 1419.

[6] Hundahl C, Stoltenberg M, Fago A, *et al*. Effects of short-term hypoxia on neuroglobulin levels and localization in mouse brain tissues[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2005, 31(6): 610 - 617.

[7] Li R C, Lee S K, Pouranfar F, *et al*. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobulin and cytoglobin in rat brain[J]. Brain Res, 2006, 1096(1): 173 - 179.

[8] Ostojic J, Sakaguchi D S, De-Lathouder Y, *et al*. neuroglobulin and cytoglobin: oxygen-binding proteins in retinal neurons[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(3): 1016 - 1023.

(编辑 张大春)

欢迎订阅《医学教育探索》杂志

《医学教育探索》是经国家科技部和国家新闻出版署批准,由重庆医科大学主办,在国内外公开发行的月刊。中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊;《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊;《中国核心期刊(遴选)数据库》全文收录。

本刊特色:以医学教育研究为主要内容,探讨教育领域的理论与实践,反映国内外医学教育动态,推动教育改革的深化。引入人文、社会等相关学科的新观念、新内容、新方法,关注医学领域内的社会、心理、经济和法律等问题,促进大卫生观和大健康观的树立,以适应医学模式的转变及医学教育国际化的需求。阐述各类高校办学的新理念、新思路,探讨高等教育的共同规律。介绍现代教育技术发展的动向,引导医学教育观念和手段的革新。

栏目设置:教育理论研究、教学改革、素质教育、教育评价、课程建设、比较教育、生命科学与教育、现代教育技术、临床教学、外语教学、医学与社会、医学与哲学、卫生经济、医学与法律、卫生事业管理、生命与健康伦理等。

《医学教育探索》于月末出刊,全年 12 期,大 16 开本,每期定价 8 元,全年定价 96 元。统一刊号:ISSN 1671-8569,CN 50-1149/R。邮发代号:78-127。请及时向当地邮局订阅,漏订的读者直接汇款至《医学教育探索》编辑部。

联系人:蔡骏翔 电 话:(023)68485014

传 真:(023)68485013 电子信箱:yxjyts@126.com

地 址:重庆市渝中区袁家岗医学院路 1 号 重庆医科大学 385# 信箱《医学教育探索》编辑部 邮编:400016