维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0784-04

人载脂蛋白 Eε3 等位基因的克隆及表达

邹 莉[1],江 涌[2],孙晓川[2],郑履平[2]

(1. 泸州医学院附属第一医院眼科,泸州 646000;2. 重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:克隆人载脂蛋白 E(Apolipoprotein E,APOE)ε3 等位基因,测定序列,并构建带有人源性 APOE ε3 等位基因的真核表达载体。方法:通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从人胎儿脑组织中克隆得到 APOE ε3 等位基因,与 PMD19-T 载体连接,再酶切 PMD19-T-APOE ε3,获得 APOE ε3 基因,然后将其与表达载体 pEGFP-N1 连接,构建 pEGFP-N1-APOE ε3 真核表达载体。重组质粒转染 293T 细胞后,在荧光显微镜下观察 EGFP 的表达,并用 Western-Blot 的方法检测目的蛋白在 293T 细胞中的表达。结果:经酶切和 DNA 测序证明 APOE ε3 基因序列正确,真核表达载体构建成功。将重组质粒转染 293T 细胞,在转染后的细胞中检测到目的蛋白的表达。结论:成功构建了 pEGFP-N1-APOE ε3 真核表达载体,该表达载体能在真核细胞中正确表达。

【关键词】载脂蛋白 E;等位基因;基因克隆;真核表达

【中国图书分类法分类号】R74;Q75 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-12

Cloning of human APOE ε3 gene and construction of its eukaryotic expression vector

GUI Li,et al

(*Department of Ophthalmology,the First Affiliated Hospital,Luzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*:To clone human APOE ε3 gene for construction of mammalian expression vector pEGFP-N1-APOE ε3. *Methods*:The cDNA encoding APOE ε3 was cloned by the methods RT-PCR from total human embryonic brain RNA. The gene was ligated with PMD19-T vector and then was excised from PMD19-T-APOE ε3 plasmid and inserted into pEGFP-N1 to construct eukaryotic expression vector. The expression of APOE ε3 gene was identified by western-blot. *Results*:APOE ε3 gene sequence and vector were identified correctly by enzyme digestion and sequence analysis. The APOE ε3 gene was transfected into HEK293 cells and expressed successfully. *Conclusion*:The APOE ε3 gene is successfully cloned and its eukaryotic expression vector is obtained,which provides basis for the further experimental researches on APOE functions.

【Key words】 Apolipoprotein E;Alleles;Gene clone;Mammalian expression

载脂蛋白 E(apoE),因其神经生物学功能的特殊性及其与神经退行性疾病的密切联系,与脑损伤的相关性开始受到重视。apoE 是脑组织中主要的载脂蛋白,为 34ku 糖基化蛋白,主要由星形胶质细胞产生,少量由神经元产生,负责胆固醇、磷脂的转运,在神经组织细胞再生,细胞膜、轴突及突触修复或重建等方面起着重要作用。APOE 位于 19 号染色体长臂上,含有 4 个外显子。APOE 存在多态性,主要有 3 个等位基因:epsilon 2、epsilon 3、epsilon 4(简称 ε2,ε3,ε4),分别编码 apoE2、E3、E4。APOE ε3 等位基因最常见,具有正常的生理功能[1]。本实验从人胎儿脑组织中克隆得到 APOE ε3 等位基因,构建带有 APOE ε3 等位基因的真核表达载体,并将其转染 293T 细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

克隆载体 PMD19-T 购自 TaKaRa 公司,表达载体 pEGFP-N1,大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。SV40 转染的人胚胎肾细胞 293T 由本实验室保存。

作者介绍:邹 莉(1977-),女,硕士,住院医师,研究方向:青光眼。

基金项目:重庆市卫生局重点科研课题资助项目(05-1-017),重庆市科委自然科学基金项目(2007BB5299)重庆医科大学 2006 年优秀博士学位论文科研资助项目(0200100978)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

TaKaRa RNAiso Reagent, High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit、限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ/*BamH* Ⅰ、T4DNA 连接酶、DNA Marker DL2 000、λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker、DEPC 购自 TaKaRa 公司，质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜公司。转染试剂 LipofectAMINE2000 购自 Invitrogen 公司。兔抗人 apoE 多抗为 DAKO 公司产品，二抗羊抗兔 IgG 购于武汉博士德公司。

1.2 引物设计与合成

设计引物分段调取 APOE 基因 CDS 区域，引物由大连宝生物公司合成。

F0:5'-CAGCCCCAGCGGAGGTGAAG-3';

F:5'-GGAATTCAGATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTG-3';

F1:5'-CTGGGCGCGGACATGGAGGA-3';

R0:5'-GCGTGAAACTTGGTGAATCT-3';

R:5'-CGGGATCCCGGTGATTGTCGCTGGGCACAGGGGC-3';

R1:5'-AGGTCATCGGCATCGCGGAG-3'。

1.3 总 RNA 提取

所用器材均经 DEPC 过夜处理。胎脑组织取自于正常流产胎儿，取材后立即投于液氮中保存待用。

用 TaKaRa RNAiso Reagent 试剂盒提取人源胎脑组织总 RNA，所得 RNA 通过紫外分光测定含量及纯度，凝胶电泳分析检测其完整性。

1.4 RT-PCR 分段调取 APOE 基因 CDS 区域

以 Total RNA 2μg 为模板，使用 High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit，以 Oligo dT Primer 为反转录引物合成总 cDNA 第 1 链，逆转录反应条件：30℃ 10min，42℃ 30min，95℃ 5min。取逆转录产物 10μl 使用 High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit 中的 PrimeSTARTM HS DNA Polymerase，依次分别以 F0/R1、F1/R0、F/R 为引物进行 PCR 扩增，分段调取 APOE 基因 CDS 区域，反应体系 50μl，反应条件：94℃预变性 5min，94℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 1min，循环 30 次，72℃延伸 10min。取 PCR 终产物 5μl 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.5 人 APOEε3 等位基因真核表达载体的构建

取 PCR 终产物 40μl 进行凝胶电泳，胶回收扩增得到的特异性 DNA 片段，用 T4DNA 连接酶将其与 PMD19-T 载体连接，获得重组子 PMD19-T-APOE ε3。再将 PMD19-T-APOE ε3 经 *EcoR* Ⅰ/*BamH* Ⅰ进行双酶切后胶回收，用 *EcoR* Ⅰ/*BamH* Ⅰ分别对质粒 PMD19-T-APOE ε3、pEGFP-N1 进行双酶切后，切胶回收。胶回收片段与胶回收的线性化 pEGFP-N1 载体经 T4DNA 连接酶连接形成真核表达载体 pEGFP-N1-APOE ε3。用 *EcoR* Ⅰ/*BamH* Ⅰ进行双酶切检测，并送大连宝生物公司测序。

1.6 细胞转染

将质粒用 LipofectAMINE2000 瞬时转染 293T 细胞。转染前 1d 于 60mm 细胞培养皿中接种 2×10^6 个 293T 细胞，细胞贴壁生长过夜后，细胞密度达 80%左右，将 8μg 质粒 DNA 加入 0.5ml 不含血清的 DMEM 培养基中，将 20μl LipofectAMINE2000 稀释于 0.5ml 不含血清的 DMEM 培养基中，室温孵育 5min 后，将质粒稀释液和 LipofectAMINE2000 稀释液混合，室温孵育 20min，滴加至细胞培养皿中。48h 后收获细胞用于检测。

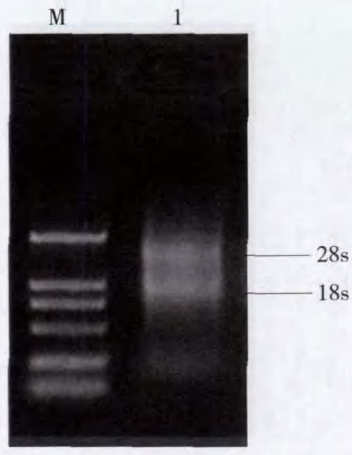
1.7 Western-Blot 检测

转染后 48h 按常规方法提取细胞总蛋白，取 30μg 蛋白进行胶浓度为 12%的 SDS-PAGE 电泳，电泳完毕后利用半干电转仪将蛋白转移到 PVDF 膜上，封闭 1h 后，加一抗于 4℃过夜，二抗室温孵育 2h，ECL 显色系统显色。

2 结 果

2.1 Total RNA 提取

用提取的 RNA 1μl 进行琼脂糖凝胶电泳，可见 28S，18S 2 条带(见图 1)，分光光度法测定 OD_{260}/OD_{280}=1.850，表明 RNA 无明显降解且有较高纯度。

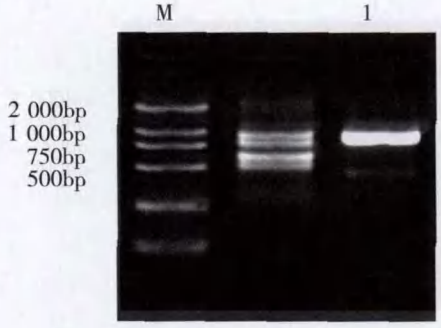


M. DNA Marker DL 2 000; 1. Total RNA

图 1 Total RNA 琼脂糖电泳图

2.2 APOE ε3 基因的克隆

RT-PCR 扩增 APOE ε3 基因得到约 950bp 的特异性产物(见图 2)。



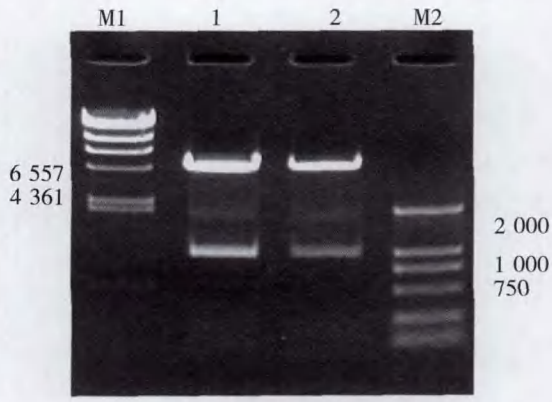
M. DNA Marker DL 2 000; 1. PCR 回收产物

图 2 PCR 回收产物电泳图

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 真核表达载体 pEGFP-N1-APOEε3 的构建及鉴定

PMD19-T 和 pEGFP-N1 载体本身大小分别为 2.7kb 和 4.7kb，将 APOE 基因克隆到 pEGFP-N1 载体上得到的质粒大小约为 5.7kb，将pEGFP-N1-APOE ε 3 以 *EcoR* Ⅰ/*BamH* Ⅰ双酶切后得到约 4.7kp 和 950bp2 个片段(见图 3)。将 pEGFP-N1-APOE ε 3 送大连宝生物公司对插入部分进行测序，证实真核



M1. λ.Hind Ⅲ DNA Marker; 1、2. pEGFP-APOE3 酶切后；M2. DNA Marker DL 2 000

图 3 pEGFP-N1-APOEε3 双酶切后片段电泳图

表达载体的方向及序列正确，阅读框也正确无误。

2.4 pEGFP-N1-APOEε3 在 293T 细胞中的表达

于转染 48h 后在荧光显微镜下观察。结果，EGFP 蛋白在 293T 细胞中大量表达(见图 4、5)。

3 讨 论

近年来，一些基因及相关表达产物在脑伤后病理反应中的作用受到研究者的关注。APOE 基因多

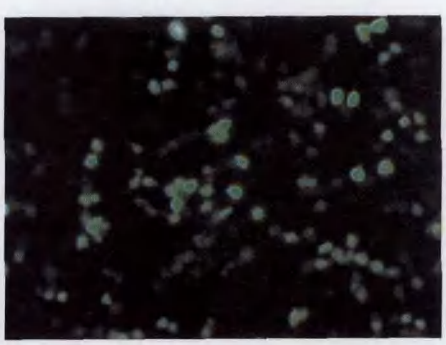


图 4 pEGFP-N1-APOEε3 在 293T 细胞中表达

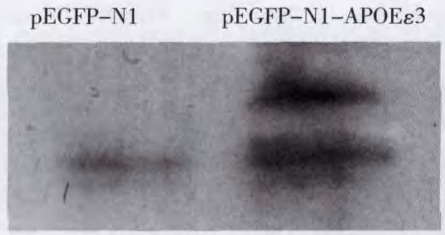


图 5 Westem-Blot 检测 转染 pEGFP-N1 的细胞只在 34ku 处有 1 条带(本底表达)，而转染 pEGFP-N1-APOEε3 的细胞在 34ku 和 62ku(APOEε3 与 EGFP 融合蛋白)处各有 1 条带

态性与脑损伤的相关性是目前研究热点。早期动物实验发现[2,3]，敲除 APOE 的转基因小鼠与野生型基因鼠相比，脑组织易损性增加；国外临床研究发现携带 ε 4 的患者对脑损伤的耐受性降低，更易出现不良预后[4-6]。本课题组前期临床研究也发现[7-10]，在中国黄种人群中，APOE ε 4 基因是颅脑损伤急性期病情加重的危险因素之一。但 APOE 影响脑损伤的作用机制不明，需要进行深入的实验研究。

APOE 基因存在多态性，主要有 3 个等位基因：ε 2，ε 3，ε 4，分别编码 apoE2、E3、E4，可构成 6 种基因型(Genotype)，即 3 种纯合子(ε 2/2，ε 3/3，ε 4/4)和 3 种杂合子(ε 2/3，ε 2/4，ε 3/4)。目前的研究表明，虽然不同的基因型所编码的蛋白只有个别氨基酸的差异，但是不同的亚型却具有不同的神经生物学作用[1,11]：APOE ε 3 是“野生型”，具有正常的生理功能；而 APOE ε 2、APOE ε 4 是 2 种“变异体”，各基因型在生理及脑损伤等病理条件下的作用机制尚未完全阐明。而通过基因克隆技术首先克隆出常见的 APOE ε 3 真核表达载体，对于进一步深入研究不同 APOE 亚型病理生理机制具有重要意义。pEGFP-N1 是一种增强型绿色荧光蛋白的质粒载体，在 GFP 序列前带有 CMV 启动子，可使 GFP 表达效率大大提高，并且含有高效增强子 SV40，这是一类可促进基因转录活性的顺式调控元件。此外，还具有抗 G418 的 Neo 基因，可在原核和真核系统中进行筛选，建立稳定表达目的基因的哺乳动物细胞系。

本实验通过 RT-PCR 的方法克隆 APOE 基因，包含起始密码子及终止密码子，含有信号肽编码区，构建含 APOE 基因的真核表达载体，将有利于研究其多方面的神经生物学作用。为进一步探讨人 APOE 基因在哺乳动物细胞中的高效表达，获得重组人 APOE 蛋白奠定基础。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] 江 涌,孙晓川.载脂蛋白 E 多态性与颅脑损伤[J]. 中华创伤杂,2005;21(2):154-157.

[2] Lomnitski L,Oron L,Sklan D,et al. Distinct alterations in phospholipid metabolism in brains of apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Neurosci Res,1999;58(4):586-592.

[3] Horsburgh K,McCulloch J,Nilsen M,et al. Intraventricular infusion of apolipoprotein E ameliorates acute neuronal damage after global cerebral ischemia in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000;20(3):458-462.

[4] Teasdale GM,Murray GD,Nicoll JA,et al. The association between APOE ε4,age and outcome after head injury: a prospective cohort study[J]. Brain,2005;128(11):2556-2561.

[5] Ariza M,Pueyo R,Matarin MM,et al. Influence of APOE polymorphism on cognitive and behavioural outcome in moderate and severe traumatic brain injury[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006;77(10):1191-1193.

[6] Isoniemi H,Tenovuo O,Portin R,et al. Outcome of traumatic brain injury after three decades--relationship to ApoE genotype[J]. J Neurotrauma,2006;23(11):1600-1608.

[7] Jiang Y,Sun X,Xia Y,et al. Effect of APOE polymorphisms on early responses to traumatic brain injury[J]. Neuroscience letters,2006; 408(2):155-158.

[8] Jiang Y,Sun X,Xia Y,et al. Correlation be tween APOE -491AA promoter in ε4 carriers and severity in early stage of traumatic brain injury(abstract)[J]. J Neurotrauma,2007;24(7):1249.

[9] 江 涌,孙晓川,夏玉先,等. 载脂蛋白 E 基因多态性与颅脑损伤的相关性[J]. 中华创伤杂志,2005;21(7):520-523.

[10] 江 涌,孙晓川,夏玉先,等. 载脂蛋白 E 基因型及启动子区多态性与颅脑损伤病情发展的相关性研究[J]. 中国神经精神疾病杂志,2006;32(5):431-435.

[11] Hatters DM,Peters-Libeu CA,Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure:insights into function[J]. Trends Biochem Sci,2006;31 (8):445-454.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 772 页)

质数据库的比对来获得鉴定结果的,如果在蛋白质数据库比对时的参数设置不合理,将对搜索结果产生很大的影响。因此,PSI 的第 1 项工作就是建立质谱数据的交换规则和搜索引擎的规范化。

本文正是根据这种思想对采用 MS-Fit 引擎对肽质量指纹谱鉴定蛋白质时搜索条件的优化进行了探索。通过用牛 Carbonic anhydrase 2 蛋白进行搜索方法优化,得出:①在蛋白酶解充分,漏切位点设为 1,选择 Swissprot 数据库做蛋白质 PMF 分析时,质量容错值模式采用百分数(%)时比较 u、ppm、mmu 更加方便、科学,其原因在于 MALDI-TOF-MS 鉴定质量数越大的蛋白或者肽段时,其校正误差的能力更加薄弱,肽段准确性随质量大小呈现类线性远离标准值趋势。因此采用质量百分数较为理想。②容错值大小的选择应该根据质谱仪准确度校正的最大误差和标准蛋白筛选的最佳数值为准,不应随机选择,如本文筛选出了 0.1 个百分数值时为最佳。③在选择半胱氨酸的修饰时,Carbamidomethylation 比 carboxymethylation 和 acrylamide 相对要容易筛选出候选蛋白,这个跟蛋白在尿素存在情况下极易脲基甲酰化相符合的,同时也说明了丙烯酰胺化和羧甲基化对半胱氨酸的修饰作用不如脲基甲酰化显著。蛋白质搜索引擎主要参数的优化,为后续鉴定蛋白质的筛选提供了可靠、快捷、高效的保证。

参 考 文 献

[1] Orchard S,Zhu W,Julian RKJ,et al. Further advances in the development of a data interchange standard for proteomics data[J]. Proteomics,2003;3(10):2065-2066.

[2] RaiA J,Gelfand CA,Haywood BC,et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling:Towards the standardization of parameters for plasma proteome samples[J]. Proteomics, 2005;5(13):3262-3277.

[3] 母昭德,彭咏波,易发平,等.血清蛋白质组双向凝胶电泳技术的建立[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(6):821-823.

[4] Rosenfeld J,Capdevielle J,Guillemot JC,et al. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis[J]. Anal. Biochem,1992;203(1):173-179.

[5] Hellman U,Wernstedt C,Gonez J,et al. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing[J]. Anal. Biochem,1995; 224(1):451-455.

[6] 夏其昌,曾 嵘.蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京:科学出版社,2004.318-320.

(责任编辑:谭乐勤)