维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0018-04

人蛋白激酶 CβⅡ基因开放读码框的克隆及序列分析

段 炼,周 波,李启富

(重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:克隆人蛋白激酶 CβⅡ基因(PRKCB1)的开放读码框(Open reading frame,ORF),为其进一步的功能研究提供基础。方法:采用逆转录-巢式 PCR 法,从人脐静脉内皮细胞株中扩增出含 PRKCB1 基因 ORF 全长的片段,所得片段经加"A"处理并插入 T 载体。经蓝白筛选,用特异引物扩增阳性重组子,得到编码人蛋白激酶 CβⅡ(Protein kinase CβⅡ,PKCβⅡ)基因的 ORF,并与 T 载体相连,测序鉴定。结果:通过巢式 RT-PCR 及 T/A 克隆获取了 PRKCB1 基因的 ORF,测序结果与 GenBank 报道序列一致。结论:成功克隆了 PRKCB1 基因的 ORF,在技术路线上可以为某些难克隆的基因提供参考。

【关键词】蛋白激酶 Cβ 基因;聚合酶链反应;T/A 克隆;序列分析

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-20

Cloning and sequencing analysis of human PKCβⅡ gene ORF

DUAN Lian, et al

(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone human PRKCB1 gene open reading frame(ORF) in order to further research on it's function. *Methods*: RT-nested PCR method was adopted to the amplify the total length of human PRKCB1 ORF from human umbilical vein endothelial cell (HUVEC).T vector was inserted into the harvested fragment after a tail was added. With blue white screening, the gene ORF encoding human PKCβⅡ was obtained by special primers amplifying recombinant plasmids, and linked into T vector.Then the plasmid was identified by sequencing. *Results*: The human PRKCB1 ORF was amplified successfully with RT-nested PCR and T/A cloning, and the gene sequence was completely consistent with that reported in GenBank. *Conclusion*: Human PRKCB1 gene ORF was successfully cloned. The strategy of cloning may provide technical references for some genes hard to be cloned.

【Key words】 PKCβ gene; PCR; T/A cloning; Sequence analysis

微血管并发症是糖尿病终点事件的重要病理生理基础,其致病机制涉及:多元醇途径异常、糖基化终产物形成、蛋白激酶 C(Protein kinase C,PKC)系统激活、己糖胺旁路紊乱和氧化应激亢进等[1]。业已证明 PKC 信号转导途径系上述高葡萄糖介导的多元代谢异常的汇聚焦点[2]。其中 PKCβⅡ亚型由于其分布广泛及其细胞特异性表达与微血管并发症关系更为密切[3,4],因此,探索选择性 PKCβⅡ抑制剂正受到国内外学者的广泛关注。本文旨在通过克隆人 PKCβⅡ基因的开放读码框 (Open reading frame,ORF),为进一步构建表达人 PKCβⅡ重组腺病毒载体及研究其亚细胞水平蛋白复合体功能,筛选相关蛋白质药靶提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人脐静脉内皮细胞株(Human umbilical vein endothelial cell,HUVEC) 由重庆医科大学基础医学研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂 DEPC 为惠利试剂中心产品,总 RNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒购于上海华舜公司,cDNA 第一链合成试剂盒为北京鼎国生物公司产品,高保真酶 PrimeSTAR、T4 连接酶、DNA A-Tailing Kit、pMD18-T Vector 为 TaKaRa 公司产品,IPTG、X-Gal 为重庆辛创生物公司产品,质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品,PCR 产物纯化试剂盒为上海生工产品,PCR 引物由赛百盛公司代为合成,测序由上海生工完

作者介绍:段 炼(1979-),男,硕士,主要研究方向:糖尿病微血管病变的发病机制及防治。

通讯作者:周 波,男,副教授,E-mail:zhoubo915@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570877)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

成。胰蛋白胨、酵母提取物、抗生素及相关耗材由重庆医科大学基础医学研究所提供。

1.1.3 主要仪器 Eppendorf MasterCycler PCR 仪,Eppendorf ThermoStat 恒温金属浴,低温台式高速离心机(Heraeus,德国),DNA 电泳凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞株培养 人脐静脉内皮细胞株用含 10%小牛血清、青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养液培养,培养条件为 37℃,5%CO_2。

1.2.2 总 RNA 提取 所用移液器头、移液器盒、EP 管均经过 1%DEPC 处理,132℃消毒 30min,60℃干燥备用。按照试剂盒说明提取总 RNA。所提总 RNA 用分光光度仪分析其浓度与纯度,琼脂糖电泳观察完整性。

1.2.3 逆转录反应 (RT) 按照试剂盒说明利用 Oligo dt 介导合成 cDNA 第一链。

1.2.4 巢式引物扩增人 PKCβ Ⅱ基因 由于常规 RT-PCR 扩增基因,引物设计有困难,故据 GenBank 公布的人 PKCβ Ⅱ基因 mRNA 序列(NM_002738.5)用 Primer Premier 5.0 设计比该基因 ORF 稍长的巢式引物。上游引物 P1: 5'-CACC TCTCGGGCTCCGGCTC-3';下游引物 P2:5'-CGCCTTAGCTC TTGACTTCGGGTT-3'。PCR 反应体系(50μl):ddH_2O 32.5μl;5×Buffer 10μl; dNTP 4μl;P1 1μl;P2 1μl; 逆转录反应产物 1μl; 高保真酶 PrimeSTAR 0.5μl。反应条件:95℃,5min;98℃,15s;62℃,20s;72℃,4min;30 个循环,72℃,10min;Hold 4℃。巢式引物扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析后,用 PCR 产物胶回收试剂盒纯化备用。

1.2.5 巢式扩增产物的 T/A 克隆 按照 DNA A-Tailing Kit 说明对纯化后的巢式扩增产物做平滑末端加"A"处理,反应体系 (50μl): ddH_2O 20.5μl; 10×A-Tailing Buffer 5μl; dNTP Mixture 4μl; 巢式扩增产物 20μl; A-Tailing Enzyme 0.5μl。反应条件:72℃,20min; 冰浴 2min。按照 pMD18-T Vector 说明将加"A"处理后的巢式扩增产物与 T 载体连接、重组。

1.2.6 重组质粒的转化和筛选 按《分子克隆》方法制作 JM109 感受态,连接产物转入感受态细胞中,冰浴,热激后加入 LB 培养基,37℃振荡培养。离心弃上清后重悬菌体,将菌液涂布于含 IPTG、X-Gal、Amp 的琼脂平板培养基上 37℃过夜培养。次日挑取白色单菌落于含 Amp 的 LB 培养基中过夜培养。用 Cracking 法快速初步鉴定重组子: 制备 Cracking Gel 缓冲液,取过夜培养的菌液离心,弃上清后加入 Cracking Gel 缓冲液,混匀,37℃孵育,离心,取上清电泳,观察质粒 DNA 迁移距离,据此初步判定阳性重组子。

1.2.7 人 PKCβ Ⅱ基因 ORF 克隆及重组质粒 pMD18-T-PRKCB1 构建 以上步初步鉴定含人 PKCβ Ⅱ基因 ORF 的阳性重组子质粒为模板,据 GenBank 上的人 PKCβ Ⅱ基因的序列特征,用 Primer Premier 5.0 设计克隆 ORF 的 PCR 引物。上游引物 P1:5'-ATGGCTGACCCGGCT-GCGGGG-3';下游引物 P2:5'-TTAGCTCTTGACTTCGGGT TTTAAAAAT-3'。反应体系 (50μl):ddH_2O 32.5μl;5×Buffer 10μl;dNTP 4μl;P1 1μl;P2 1μl; 阳性重组子质粒 1μl; 高保真酶 PrimeSTAR 0.5μl。反应条件:95℃,5min;98℃,15s;57℃,20s;72℃,4min;30 个循环,72℃,10min;Hold 4℃。特异引物扩增产物经 1.0%低熔点琼脂糖凝胶电泳分析后,用胶回收试剂盒纯化备用。所得片段按上述试剂盒说明经加"A"后与 pMD18-T 连接、转化、筛选后,质粒抽提并送上海生工测序。

2 结果

2.1 HUVEC 总 RNA 提取

所提总 RNA 用分光光度仪分析其纯度:A_{260}/A_{280}=1.938,1.0%琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

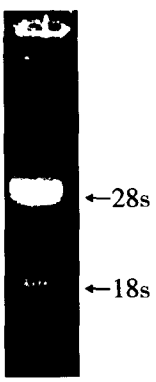
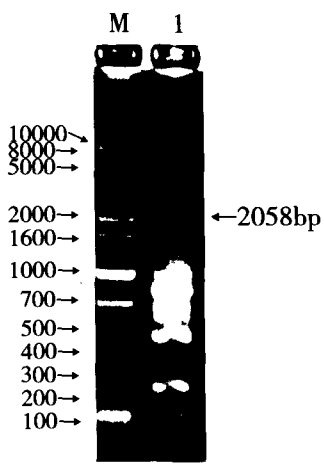


图 1 总 RNA 提取

2.2 巢式引物扩增人 PKCβ Ⅱ基因

用巢式引物扩增人 PKCβ Ⅱ基因,图示非特异扩增及目的条带 2 058bp,同预期大小相符,结果如图 2。



M. maker 1kb plus; 1.巢式 PCR 扩增出的目的条带(2 058bp)及非特异扩增

图 2 巢式 PCR 电泳图

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 重组质粒的筛选和鉴定

阳性重组子在含 IPTG、X-Gal、Amp 的琼脂平板培养基上培养成白色单菌落，而少量自连的阴性对照在该琼脂糖平板培养基上培养成蓝色菌落，结果见图 3(箭头示阴性对照蓝斑)。Cracking 法快速初步鉴定阳性重组子较 PCR 法更省时、方便，结果见图4。

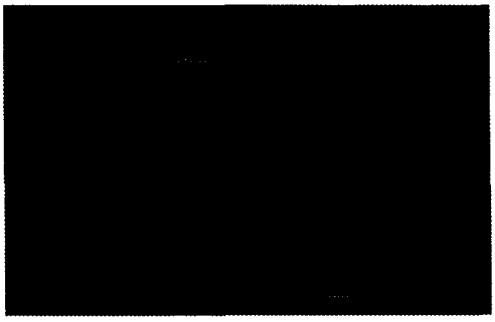


图 3 重组质粒蓝白筛选

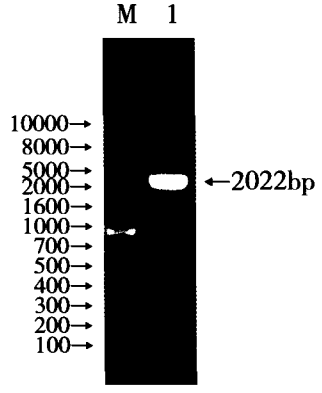


M. maker λ-*Hind* Ⅲ; 1. 阳性重组质粒(4 714bp)

图 4 阳性重组子 Cracking 法快速初步鉴定

2.4 人 PKCβⅡ基因 ORF 克隆

用特异上、下游引物扩增人 PKCβⅡ基因 ORF，所得片段大小约 2022bp，与 GenBank 上公布信息一致，结果见图 5。



M. maker 1kb plus; 1. 人 PKCβⅡ基因 ORF 片段(2 022bp)

图 5 人 PKCβⅡ基因 ORF 克隆图谱

2.5 重组质粒测序鉴定

pMD18-T-PRKCB1 质粒送上海生工测序，与 GenBank 公布的序列(NM_002738.5)比较，同源性 100%，无碱基突变，部分序列测序图见图 6。

3 讨 论

人类 PRKCB1 基因定位于 16q12~q13[5]，其mR-

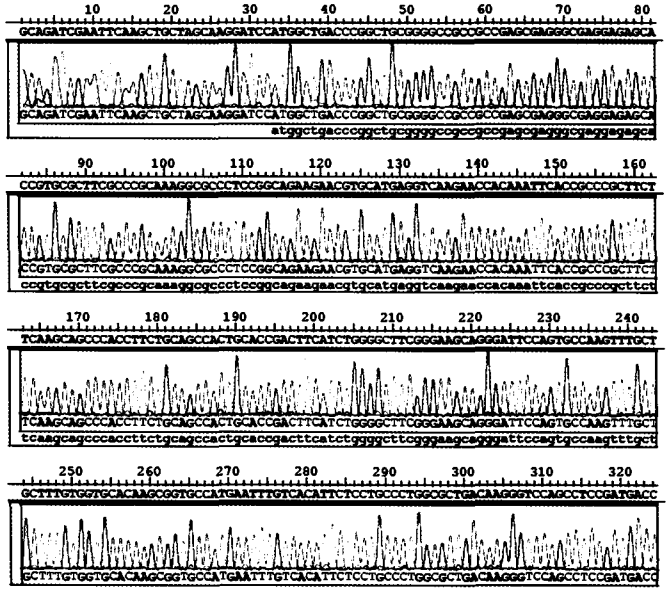


图 6 pMD18-T-PRKCB1 质粒部分测序图

维普资讯 http://www.cqvip.com

NA 经不同剪接后编码 PKCβI(671 个氨基酸组成)和 PKCβ Ⅱ(673 个氨基酸组成)2 种蛋白,区别在于 V 5 区羧基端残基数目不等:PKCβⅠ50 个,PKCβ Ⅱ52 个[6]。该基因长约 375kb,包含 18 个外显子,大小 32~174bp。其中位于第 2、3 号外显子间的 1 个内含子较长,跨度达 150kb[7]。人 PKCβ Ⅱ由 673 个氨基酸组成,未加工的前体分子量 76 869 Ua。其结构中比较重要的区域包括:富含半胱氨酸推测为结合佛波酯或二酯酰甘油的 C1 区(aa37~86)、被认为与钙依赖磷脂结合区域密切相关的 C2 区(aa159~278)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化区 S_TKc(aa341~600)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性延伸区,S_TK_X(aa601~663)。已有研究表明,生理状态下,PRKCB1 基因 mRNA 剪接在内皮细胞中因多腺苷酸化信号差异而以 PKCβⅡ表达占优,故实验以 HUVEC 为研究对象,可为人 PKCβ Ⅱ基因ORF 克隆奠定基础。

用 Primer Premier5.0 软件设计引物时,发现该引物不能满足引物设计的一般原则:上游引物的 GC 含量过高;上、下游引物间 Tm 值相差过大;形成能值很高的二级结构等。此种情况下,采用巢式 PCR 方法增加扩增范围,以期能找到满足评分要求的引物对。考虑到下游实验需要,进行 PCR 扩增时均采用保真性很高的 PrimeSTAR 高保真酶。此酶有外切酶活性,所得 PCR 产物几乎都为平末端,故连入 pMD18-T Vector 需先做加"A"处理。pMD18-T 载体是一种高效克隆 PCR 产物的专用载体,由 pUC18 载体经 *EcoR* V 酶切后,并在两侧的 3'端添加"T"改建而成。经 T/A 克隆,可大大提高 PCR 产物的连接、克隆效率。蓝白筛选后,以鉴定正确的重组子为模板,在特异扩增 ORF 引物介导下,获得人 PKCβ Ⅱ基因 ORF。经测序分析,与 GenBank 公布的序列(NM_002738.5)比较,同源性 100%,无碱基突变。实验中针对 PRKCB1 基因较长,常规引物扩增困难的特点,在技术路线上做了改进,并获得较佳效果,为较难扩增的基因提供了借鉴。

糖尿病微血管病变(DMA)是糖尿病患者致残、致死的主要原因。研究发现,DMA 的演进可分为 4 个环节[8,9]:源于葡萄糖不同代谢途径的代谢异常;进而诱导的核内基因谱重新表达的分子异常;血液动力学稳态失调的功能异常;以细胞外基质聚积,新生血管形成等为突出表现的解剖异常。大量研究表明[10,11]PKCβ Ⅱ信号转导途径介导了上述 DMA 事件链的发生与发展,选择性 PKC 抑制剂可能为DMA 防治带来新希望,正受到国内外学者的广泛关注。实验成功地克隆了人 PKCβ Ⅱ基因的 ORF,且片段保真性佳,为进一步构建表达人 PKCβ Ⅱ重组腺病毒载体及研究其亚细胞水平蛋白复合体功能,筛选并寻找 PKCβ Ⅱ相关蛋白质药靶提供了前期实验基础。

参 考 文 献

[1] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications:a unifying mechanism[J]. Diabetes,2005;54(6):1615-1625.

[2] Sheetz MJ,King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications[J]. JAMA,2002;288(20):2579-2588.

[3] Wakasaki H,Koya D,Schoen FJ,et al. Targeted overexpression of protein kinase Cβ Ⅱ isoform in myocardium causes cardiomyopathy[J]. Med Sciences,1997;94(17):9320-9325.

[4] Bosch RR,Bazuine M,Span PN,et al.Regulation of GLUT1-mediated glucose uptake by PKCλ - PKCβ II interactions in 3T3-L1 adipocytes[J]. Biochem J,2004;384(Pt 2):349-355.

[5] Francke U,Harper JF, Darras BT,et al.Assignment of human genes for phosphorylase kinase subunits alpha(PHKA) to Xq12-q13 and beta(PHKB) to 16q12-q13[J]. Am J Hum Genet,1989;45(2):276-282.

[6] Kawakami T,Kawakami Y,Kitaura J. Protein kinase C beta (PKC beta):normal functions and diseases[J]. Biochem J,2002;132(5):677-682.

[7] Greenham J,Adams M,Doggett N,et al. Elucidation of the exon-intron structure and size of the human protein kinase C beta gene (PRKCB)[J]. Hum Genet,1998;103(4):483-487.

[8] Idris I,Gray S,Donnelly R. Protein kinase C activation:isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes[J]. Diabetologia,2001;44(6):659-673.

[9] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature,2001;414(6 865):813-820.

[10] Kunisaki M, Bursell SE, Clermont AC,et al. Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway[J]. Am J Physiol,1995;269(2 Pt 1):E239-246.

[11] Campbell M,Trimble ER.Modification of PI3K-and MAPK-dependent chemotaxis in aortic vascular smooth muscle cells by protein kinase C beta II[J]. Circ Res,2005;96(2):197-206.

(责任编辑:冉明会)