维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)08-0785-04

未知基因 CGI-100 的克隆及其真核表达载体的构建

黄凤霞,张 彦,王伟佳

(重庆医科大学临床生化教研室 临床检验诊断学重庆市重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:为探讨研究未知基因 CGI-100 的功能,克隆人 CGI-100 基因并构建其真核表达载体。方法:通过 RT-PCR 从人白血病 K562 细胞中克隆 CGI-100 基因全长编码区,将该 cDNA 片段亚克隆至载体 pMD18-T SimpleT 中,经测序鉴定后,用 *BamH* Ⅰ和 Pst Ⅰ双酶切将目的 cDNA 片段定向克隆至相同处理的 pIRES2-EGFP 真核表达质粒中,然后经酶切、PCR 鉴定和 DNA 序列测定三重鉴定方法对重组质粒进行鉴定。结果:经酶切、PCR 及测序鉴定证实,CGI-100 基因全长编码区 cDNA 被准确正向插入至 pIRES2-EGFP 质粒的酶切位点 *BamH* Ⅰ和 Pst Ⅰ之间,未发现碱基突变或移位。结论:成功地构建并鉴定了含 CGI-100 基因全长编码区的真核表达质粒,为以后研究该基因的功能奠定了基础。

【关键词】CGI-100 基因;真核表达载体;克隆

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-28

Cloning of CGI-100 gene and reconstruction of its eukaryotic expressive vector

HUANG Fengxia, et al

(*The Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics in Chongqing, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone human CGI-100 gene and reconstruct its eukaryotic expressive vector for further investigation. *Methods*: The full coding domain sequence of human CGI-100 gene was cloned from human leukemic K562 cells with RT-PCR and was sub-cloned into pMD18-T Simple vector. After confirmed by DNA sequencing, the targeted DNA fragment, digested with BamH Ⅰ and Pst Ⅰ, was directionally cloned into eukaryotic expressive plasmid pIRES2-EGFP, then, the reconstructed plasmid was identified with enzyme digestion, PCR and sequencing. *Results*: It was demonstrated that the full coding domain sequence of human CGI-100 gene was accurately cloned into digestion sites between BamH Ⅰ and Pst Ⅰ in pIRES2-EGFP without mutation and transposition. *Conclusion*: The reconstruction and verifying of eukaryotic expressive plasmid containing CGI-100 gene are successful, which establishes the foundation of further investigation.

【Key words】CGI-100 gene; Eukaryotic expressive vector; Clone

CGI-100 是位于人类跨膜蛋白 emp24 第 5 转运区域的基因,也称作 TMED5 (Homo sapiens transmembrane emp24 protein transport domain containing 5)。emp24 家族为 24ku 内膜蛋白前体,是包被囊泡的关键成分,参与了分泌性蛋白从内质网到高尔基体之间的转运[1],也有研究推测 p24 蛋白家族具有分泌性受体的重要功能,CGI-100 作为跨膜蛋白 emp24 家族的一员,具有广泛的应用前景[2]。还有报道认为 P24 与 Gas1p(糖基磷脂酰肌醇固定蛋白)相互作用,参与了 P53 介导的肿瘤细胞生长抑制或凋亡[3]。同时有实验发现 emp24 的突变能够导致 Gas1p 在内质网与高尔基体之间的转运完全被阻滞[4],这些研究结果都证实了 emp24 蛋白家族在蛋白转运及细胞生长方面的作用。CGI-100 作为 emp24 蛋白家族中的重要成员之一,其功能可能也与 Gas1p 有关[5],影响肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡。

本课题组的前期研究发现,在苦参碱诱导人白血病 K562 细胞的红系分化过程中 CGI-100 基因表达下调[6]。但该基因的功能怎样?与 K562 细胞的诱导分化关系如何?这一系列的问题都亟待解决。将 CGI-100 基因导入真核表达载体中是研究 CGI-100 基因的可能功能的重要物质基础。

作者介绍:黄凤霞(1980-),女,硕士,
主要研究方向:肿瘤的发生、发展与逆转机制。

基金项目:国家自然科学基金(No.30171150)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 质粒和菌株 E.coli. JM109;DH5α 为本室保存，pMD18-T Simple 质粒(含氨卞青抗性基因)购自大连宝生物(TaKaRa)公司;pIRES2-EGFP 真核表达质粒(含新霉素抗性基因和绿色荧光蛋白筛选标记) 购自 BD Biosciences Clontech 公司。

1.1.2 主要试剂和工具酶 限制性内切酶 (*BamH* Ⅰ、Pst Ⅰ),T4 DNA 连接酶(Lingase)及缓冲液购自 TaKaRa 公司。RPMI 1640 培养液、小牛血清、青、链霉素、氨卞青霉素(AMP),丁胺卡那霉素购自北方同正公司。总 RNA 提取试剂 TRIZOL;Promega 公司产品。

RNase 抑制剂(RNasin)、AMV、MMLV 逆转录酶、10mmol/L dNTP 混合物、Oligo(dT)18 及随机引物、高保真 DNA LA 聚合酶 Pyrobest、DNA 分子量标准(Marker)、电泳上样缓冲液等购自 TaKaRa。

焦碳酸二乙酯(DEPC)、琼脂糖(Agarose,电泳级)购自北方同正公司。

1.1.3 PCR 引物设计 利用 Primer Premier 5.0 辅助设计，由 TaKaRa(大连)公司合成。

Sense:5'—AAC TGC AGA TGG GCG ACA AGA TCT GGC TGC CC— 3'

Antisense:5'—CGG GAT CCT TAA GTT CTA CTT TTC CTC TTA TC—3'

上、下游引物的 5'端分别引入了 *BamH* Ⅰ 和 Pst Ⅰ 的酶切位点，预期扩增目的基因 cDNA 全长,PCR 产物长度为 689bp。

1.2 方 法

1.2.1 CGI-100 基因全长编码区的克隆 以人白血病 K562 细胞 mRNA 为模板，用 RT-PCR 方法克隆基因的 CDS 区全长。

逆转录反应体系如下:10×RT 缓冲液 1.0μl;25mmol/L $MgCl_2$ 2.0μl;10mmol/L dNTP mixture 1.0μl;RNase inhibitor 0.25μl;AMV 逆转录酶 0.5μl;OligodT (18)0.5μl; 总 RNA 1.0μg;RNase Free ddH_2O 3.75μl。混匀后分别经 42℃,30min;99℃,5min 灭活逆转录酶,5℃,5min;合成的 cDNA -20℃冻存备用。

PCR 反应体系如下:cDNA 10μl;5×PCR 缓冲液 10.0μl;

TaKaRa LA Taq 酶 0.25μl;CGI-100 上、下游引物各 1.0μl;以无菌 dd H_2O 补足体积为 50μl。PCR 反应条件为:94℃ 2min,94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 50s,30 个循环，最后 72℃延伸 5min。取 5.0μl PCR 产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳(170V,20min)鉴定。

1.2.2 pMD18-T Simple/CGI-100 的亚克隆 将 CGI-100 片段胶回收后通过 TA 末端连接到质粒 pMD18-T Simple 的，转化感受态大肠杆菌 DH5α,利用前者带有 AMP 耐受基因和 LacZ 基因的诱导表达的特点，经蓝白法筛选阳性菌株:LB 琼脂平板上蓝色菌落为 pMD18-T Simple 质粒自环化的转化子,为阴性克隆,而白色菌落是重组质粒转化子,即阳性克隆。扩增后提取纯化质粒，得到重组 pMD18-T Simple/CGI-100 质粒。

1.2.3 pMD18-T Simple/CGI-100 的筛选和鉴定 将插入了 CGI-100 cDNA 目的片段的阳性克隆送交大连 TaKaRa 公司，使用 BcaBest PrimerM13-47 和 Bca Best PrimerRV-M 引物对其进行测序。

1.2.4 pIRES2-EGFP/CGI-100 的构建和鉴定 pMD18-T Simple/CGI-100 质粒用 *BamH* Ⅰ 和 Pst Ⅰ 双酶切获得 CGI-100 基因片段，定向克隆至同样处理的 pIRES2-EGFP 质粒上,构建 pIRES2-EGFP/CGI-100 重组表达质粒。然后分别用 PCR、双酶切和测序三重方法对 pIRES2-EGFP/CGI-100 进行鉴定。

2 结 果

2.1 CGI-100 基因全长编码区的扩增

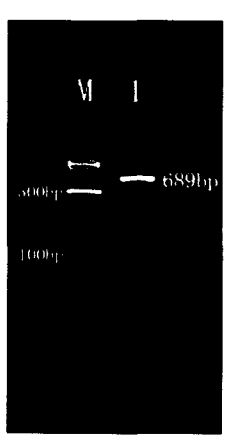
将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,在 689bp 左右的位置可见 1 条清晰明亮的目的条带,片段大小与 Genebank 中公布的片段大小相符。而阴性对照无目的条带出现(见图 1)。

2.2 阳性重组质粒 pMD18-T Simple/CGI-100 的电泳鉴定

质粒大小为 3.6kb,结构完整,大小相符(见图 2)。

2.3 pMD18-T Simple/ CGI-100 阳性克隆的测序鉴定

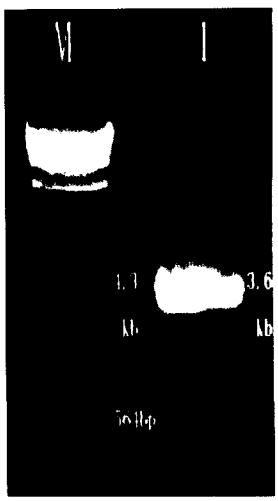
经测序鉴定,CGI-100 片段插入正确，无碱基变异 (测序公司为 TAKARA 公司，测序编号为 CTS627-2)。



M:DL1000Maker 1:CGI-100

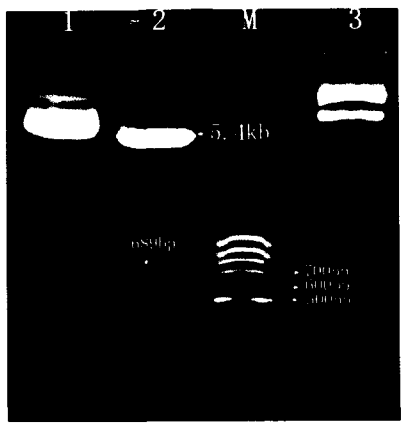
图 1 CGI-100 基因 PCR 电泳图

维普资讯 http://www.cqvip.com



M: λ *Hind*III DNA Maker
1:pMD18-T Simple/CGI-100 质粒

图 2 阳性重组质粒 pMD18-T Simple/CGI-100 的电泳鉴定图



M: GeneRuler 100bpDNA Maker
1: pIRES2-EGFP 质粒
2: pIRES2-EGFP/CGI-100 质粒
3: pIRES2-EGFP/CGI-100 空质粒

图 3 重组 pIRES2-EGFP/CGI-100 真核表达质粒的双酶切鉴定

CQS1940(pIRES2-EGFP/ CGI-100)
TTAAGTTCTACTTTTCCTCTTATCTTCAAACAGACTCTTCAGCATATAAACTTGAATGGCT
GACACCACCACCATGACCACTAAATTAACCATAGACCAGAAATTGACTCTATCAAAGTTG
CTTTCTTGTATGTTCCGATCACGAGCTTCAAATGCTCTAAGCAGAATTTGTATGTG
CCCACTTTTGCTTAGTCTGGACTTGATGCTGTTGATGGATTCCAGGATGTCTTCCAGTTTC
ATATCCAATATATCTGTGCCAGTAATATATTTCTTCCAATCTTCTTGTTCTTGTGCCTGTTCT
CCCATATTATCCAGGATTAATTCAAAGAAAATCACCTTCTCAGAAATGGTGCTGAATGTAT
TGTCAAAGCAGAACATGTAATCACCAACTTCAGTCTCTACAGTGTGAACTCCATCTGATT
TTCTTTGTTCAAAAACTAAGGTTTTGCCTTCTGGAGAGGCAAGATGGAAATCAATATCTA
ATCCTGCTCCATCTAAAACTTGGTACTCGATCTCCAGCGAGGCCTTCAGGGGCATGGGCT
GGTAGAAGCACTCCTTCTGGCCGGCGGGAAGGGTAAAGGTGAAGTCGCTATCGAGGGA
AGGTGTGAAGCCGGCCGCCCCAGGCAGCAGCACCGGAGGCAGAGCGGCCAGAAGGAG
CACGGGGAAGGGCAGCCAGA

图 4 重组 pIRES2-EGFP/ CGI-100 质粒的测序鉴定

2.4 重组 pIRES2-EGFP/CGI-100 真核表达质粒的双酶切鉴定

重组 pIRES2-EGFP/TIM2 质粒经 *BamH* Ⅰ和 Pst Ⅰ 双酶切后，出现 5.4kb 和 0.7kb 左右的两条带，而 pIRES2-EGFP 质粒只切出一条 5.4kb 左右的区带(见图 3)。

2.5 重组 pIRES2-EGFP/CGI-100 质粒的测序鉴定

重组 pIRES2-EGFP/CGI-100 测序结果如下，经 Blast 比对，测序结果与 Genebank 中公布的序列完全相符，且目的片段被准确插入到 pIRES2-EGFP 中 *BamH* Ⅰ和 Pst Ⅰ中(经 TAKARA 公司，CQS1940)(见图 4)。

3 讨 论

emp24 蛋白家族是 COP Ⅰ和 COP Ⅱ囊泡的主要成分[7]，介导分泌性蛋白从内质网到高尔基体之间的转运具有重要作用，可能存在功能有 1)：运载蛋白的选择和包装[8]；2)：囊泡的生物合成与功能[9]；3)：分泌系统的蛋白运输和量的调节[10]。研究发现至少有 8 个人类 P24 蛋白存在，已经证实 4 种蛋白为

维普资讯 http://www.cqvip.com

P24A、gp25L2、TMP21 和 CGI-100，而 CGI-100 是 emp24 蛋白家族功能中具有重要影响的蛋白，具有广泛的应用前景[11]。

CGI-100 基因定位于染色体的 1p22.1，mRNA 序列长为 3635bp，从 113bp 起到 802bp 为蛋白编码区，编码 CGI-100 蛋白，主要具有分泌性蛋白受体功能[12]，质膜蛋白 Gas1p 与 P24 蛋白交联，即 Gas1p 生物行为发生依赖于 emp24 蛋白[13]，而 Gas1-依赖的信号转导途径通过 p53 的一个脯氨酸区，可以在不同类型的肿瘤细胞中诱导生长抑制效应或者凋亡[14]，本研究 CGI-100 基因从白血病细胞中获得表达，可能是一个与 K562 细胞增殖有关的功能蛋白质，也可以推测 CGI-100 可能是一个具有生物学功能的白血病未知基因。

无论是人类基因组计划还是后基因组计划，基因信息与基因结构的获得都不是最终目的，基因功能的研究只有通过基因表达为蛋白质才最终得以实施。同样，以迅猛发展的生物信息学的各种数学算法对基因结构与功能做出的任何最佳预测，都只能称之为预测。要获得真正意义上的执行生命活动的蛋白质的结构与功能信息，还应从基因表达做起[15]。基因表达的中心法则是：DNA-RNA-蛋白质，即要表达的基因 DNA 序列转录形成 mRNA，mRNA 再经翻译、加工合成此基因编码的蛋白质，从而行使其生物功能。因此，在尚未获得 CGI-100 全长基因时，要初步探测 CGI-100 基因的功能，前提是将其 ORF 片段亚克隆至表达载体上，通过表达蛋白质的生物学行为，来了解其生物学功能。一些真核蛋白质在原核宿主中的表达尽管行之有效且成本低廉，但往往因折叠的方式不正确，或因折叠的效率低下，结果比活性都很低。此外，要通过克隆化基因生产名副其实的真核生物活性蛋白，往往要进行翻译后加工，而这些加工原核生物很难进行[16]。因此，为稳定表达有活性的蛋白质以研究其生物学功能，必然要构建真核表达体系。

本研究构建含 CGI-100 基因的真核表达质粒，是为下一步探索新基因与肿瘤发生、发展关系打下一个重要基础。

参 考 文 献

[1] Schimmoller F.,Singer-Kruger B.,Schroder S.,et al. The absence of Emp24p,a component of ER-derivedCOPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins tothe Golgi[J]. EMBO J,1995;14:1329 - 1339.

[2] Lai CH,Chou CY,Chang LY,et al. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics[J]. Genome Res,2000;10:703-713.

[3] Muniz M,Nuoffer C,Hauri H,et al. The EMP24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles[J]. J. Cell Biol,2000;148:925-930.

[4] Renwang P,Anna DA,Dieter G. Evidence for overlapping and Distinct Functions in Protein Transport of Coat Protein Sec24p Family Members[J]. J Biol Chen,2000;275:11521-11528.

[5] Ginger E,Nathan J. P24 proteins,intracellular trafficking,and behavior:Drosophila melanogaster provides insights and opportunities [J]. Biology of the Cell,2004;96:271-278.

[6] 张 彦.苦参碱诱导 K562 细胞分化早期的基因表达分析[J]. 中华血液学杂志,2004;25(6):342-345.

[7] Couchy I.,Bolte S.,Crosnier M.T.,et al. Identification and localization of a beta-COP-like protein involve in the morphodynamics of the plant Golgi apparatus[J]. J. Exp. Bot,2003;54:2053-2063.

[8] Anantharaman V.,Aravind L.. The GOLD domain,a novel protein module involved in Golgi function and secretion[J]. Genome Biol,2002;3(5):research 0023.1-0023.7.

[9] Lavoie C.,Paiement J.,Dominguez M.,et al. Roles for a2p24 and COPI in endoplasmic reticulum cargo exit site formation[J]. Cell Biol,1999; 146:285-299.

[10] Bremser M.,Nickel W.,Schweikert M.,et al. Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors[J]. Cell,1999;96:495-506.

[11] Fullekrug J.,Suganuma T.,Tang B. L,et al. Localization and Recycling of gp27 (hp24 3):Complex Formation with Other p24 Family Members[J]. Cell Science,1999;10:1939-1955.

[12] Joseph Locker,Jianmin Tian,Robert Carver.A Common Set of immediate-Early Response Genes in Liver Regeneration and Hyperplasia[J]. Hepatology,2003;38(2):314-325.

[13] Raffaella Spagnuolo,Monica Corada,Fabrizio Orsenigo,et al. Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis[J]. Blood,2004;103: 3005-3012.

[14] Elisabetta M. Ruaro,Licio Collavin,Giannino Del Sal,et al. A proline-rich motif in p53 is required for transactivation- independent growth arrest as induced by Gas1[J]. April Medical Sciences,1997;94: 4675-4680.

[15] 贺 林. 解码生命—人类基因组计划和后基因组计划[M]. 北京:科学出版社,2000.339-344.

[16] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京:科学出版社,2001.12-15.