维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0789-03

人 PPARδ 受体 cDNA 全长序列的克隆及测序

章 涛[1],袁 野[1],李芃清[1],杨俊卿[1],周元国[2],周岐新[1]

(1.重庆医科大学基础医学院药理学教研室,重庆 400016;
2.第三军医大学野战外科研究所分子生物学中心,重庆 400042)

【摘 要】目的:对人过氧化物酶体增殖物激活受体 δ(hPPARδ)全长 cDNA 序列进行克隆并测序,为构建含 hPPARδ 基因真核表达载体及其受体功能研究奠定基础。方法:采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)从 HepG2 细胞总 RNA 克隆 hPPARδ 全长 cDNA 序列,胶回收目的条带后与 pMD19-T 载体连接并转化 DH5α 感受态菌,用 *Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ 双酶切及基因测序筛选、鉴定阳性克隆 pMD19- hPPARδ-T 载体中 hPPARa 基因的完整性和忠实性。结果:经酶切和测序证实 pMD19-hPPARδ-T 载体中插入的 hPPARδ 基因序列与 GeneBank 中提交的序列 (AY919140) 一致。结论:成功克隆了 hPPARδ 基因,构建了 pMD19-hPPARδ-T 中间载体,为含 hPPARδ 基因真核表达载体的构建和受体功能研究打下了良好的基础。

【关键词】过氧化物酶体增殖物激活受体 δ;RT-PCR;cDNA 克隆;T 载体;测序
【中国图书分类法分类号】R34;R966 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-27

Cloning and sequencing of the full-length of human PPARδ cDNA

ZHANG Tao, et al

(*Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone and sequence the full-length of human PPARδ cDNA in order to further construct the eukaryotic expression vector carrying hPPARδ gene. *Methods*: hPPARδ cDNA was cloned from HepG2 cells total RNA by RT-PCR. The PCR product recovered from gel were ligated with pMD19-T vector and transformed into DH5α competent cell. The integrity and fidelity of hPPARδ cDNA sequence inserted in T vector were verified by *Bam*H I and *Sal* I double excising and DNA sequencing assays. *Results*: The positive clone T vector plasmid containing correct sequence of hPPARδ cDNA were verified by enzyme digestion as well as sequence analysis and was named as pMD19-hPPARδ-T vector. The sequence of inserted hPPARδ cDNA was in accordance with the corresponding sequence in GeneBank database(AY919140). *Conclusion*: hPPARδ gene is successfully cloned and the pMD19-hPPARδ-T intermediate vector is constructed, which provide a good basis for further constructing the eukaryotic expression vector carrying hPPARδ gene and studying the receptor's function.

【Key words】 Peroxisome proliferator-activated receptor δ; RT-PCR; cDNA clone; T vector; Sequencing

过氧化物酶体增殖物激活受体 δ(Peroxisome proliferator-activated receptor δ,PPARδ)广泛表达于各组织中,目前为止,对其功能了解还非常有限[1],现有研究表明,PPARδ 参与了多种组织的能量代谢调节[2,3]。人 PPARδ 基因克隆及其表达载体构建对于人 PPARδ 受体功能研究具有重要意义。本文采用基因工程技术克隆了人 PPARδ 受体全长 cDNA 序列,为含人 PPARδ 基因真核表达载体的构建及人 PPARδ 受体功能研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

大肠杆菌 DH5α 和 HepG2 细胞分别由重庆医科大学超声医学研究所和肝病研究所惠赠。*Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ限制性内切酶、T4 连接酶、高保真 PrimeStar HS DNA 聚合酶、pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司;Thermoscript RTase 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、RNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒和质粒小抽试剂盒为 Promega 公司产品;RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司;其它试剂均为分析纯。

1.2 引物设计与合成

作者介绍:章 涛(1969-),男,博士,
主要研究方向:肿瘤分子药理学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572353),
重庆医科大学博士启动基金(2004)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

根据 hPPAR δ cDNA 序列设计引物，上游引物包含起始密码子前的 Kozak 序列，5'端引入酶切位点，交 TaKaRa 公司合成。引物 1（含 *Sal* I 酶切位点）：5'-GCGTCGACGAG GGGAGATCAGCCATG-3'；引物 2（含 *Bam*H I 酶切位点）：P2 5'-CGGGATCCTGGGTGCCGCCGTTAGTAC-3'。

1.3 细胞培养

采用 T_{25} 培养瓶，接种细胞密度为 1×10^5 个/ml，用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 HepG2 细胞，并常规添加青霉素 100U/ml 和链霉素 100μg/ml，于 37℃、5%CO_2 全湿环境培养。

1.4 pMD19-hPPARδ-T 载体的构建（图 1）

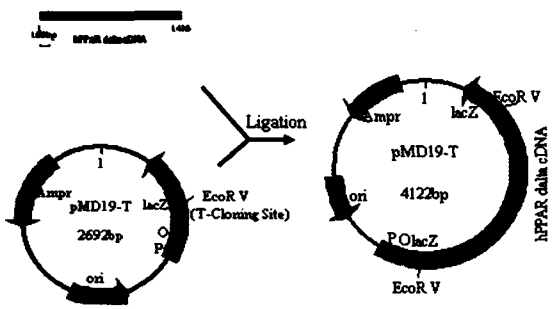


图 1 pMD19-hPPARδ -T 载体构建流程

1.4.1 HepG2 细胞总 RNA 的提取 至 HepG2 细胞生长汇集 90%时，按照 RNA 抽提试剂盒说明提取细胞总 RNA，核酸定量分析仪检测其纯度和浓度，1%琼脂糖凝胶电泳判断其完整性。

1.4.2 hPPARδ 全长 cDNA 克隆 用 Thermoscript RTase 从 HepG2 细胞总 RNA 逆转录合成 hPPRAδ cDNA 第一链，逆转录反应条件：65℃ 10min，50℃ 60min，85℃ 5min。hPPARδ 全长 cDNA 克隆 PCR 反应体系 50μl，其中含模板 cDNA 1μl(50ng)，dNTPs 4μl(200μmol/L)，5×PrimerStar buffer（含 Mg^{2+}）10μl，引物 1、2 各 1μl(0.4μmol/L)，PrimerStar HS Taq 0.5μl，灭菌超纯水 32.5μl；反应条件为：98℃ 预变性 5min，98℃ 15s，68℃ 90s 循环 35 次，72℃ 延伸 10min。取 4μl PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，随后经电泳、胶回收预期 hPPAR δ 全长 cDNA 条带。

1.4.3 目的基因与 pMD19-T 载体的连接、转化 按 pMD19-T 载体试剂盒说明进行 hPPARδ 全长 cDNA 序列与 pMD19-T 载体的连接，氯化钙法制备 DH5α 感受态细胞，将连接产物转化 DH5α 感受态菌，于含卡那霉素的 LB 平板 37℃下培养 12h，挑取 3 个菌落进行阳性克隆筛选，分别命名为 PD1、PD2 和 PD3，于 37℃、LB 液体培养基中振荡（200 r/min）培养过夜，按照质粒小抽试剂盒说明提取 PD1、PD2 和 PD3 质粒。

1.4.4 质粒酶切及测序鉴定 对 PD1、PD2 和 PD3 质粒进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切初步鉴定，对可能的阳性克隆进行测序鉴定。

2 结 果

2.1 HepG2 细胞总 RNA 的完整性

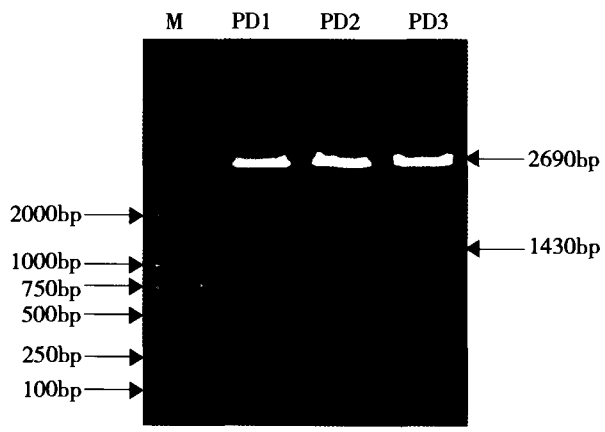
RNA 电泳结果表明，28S 和 18S 条带明亮、清晰、边缘锐利，并且 28S 的亮度是 18S 的两倍以上，5S 隐约可见，RNA 的质量较好；紫外检测 A_{260}/A_{280} 为 1.95，浓度为 1.85μg/μl。

2.2 hPPARδ cDNA 克隆产物

采用 hPPAR δ 基因克隆引物从 HepG2 细胞总 RNA 经 RT-PCR 获得了 1430bp 预期目的基因片段。

2.3 克隆筛选的酶切鉴定结果

PD1、PD2 和 PD3 质粒 *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切结果如图 2 所示，PD1 和 PD3 质粒产生约 1430 bp 和 2690 bp 大小的 2 条条带，而 PD2 质粒仅有与 pMD19-T 空载体大小一致的 2690 bp 左右的 1 条条带。



M 为 DL2000 Marker；
PD1、PD2、PD3 为 3 个候选质粒双酶切条带

图 2 阳性克隆酶切筛选分析

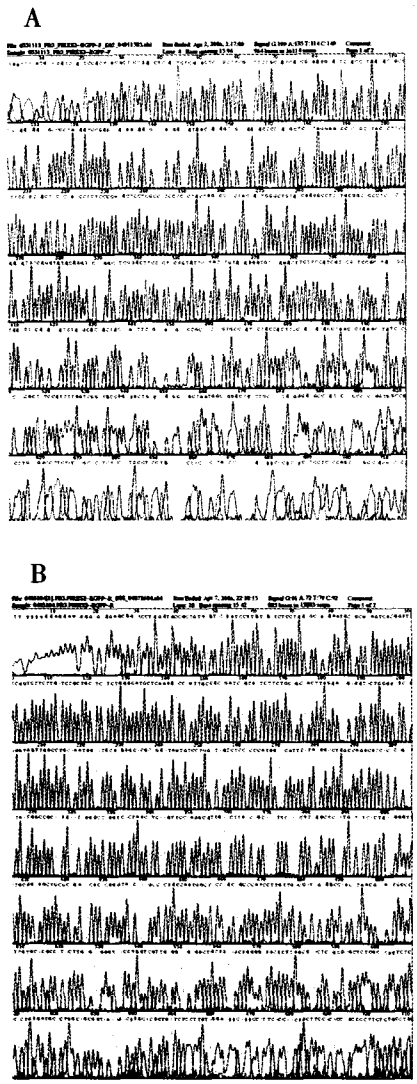
2.4 测序结果

PD1 和 PD3 质粒送经上海鼎安生物科技有限公司测序鉴定，正、反双向测序的序列拼接结果表明，PD3 质粒中所含的 hPPARδ 基因序列与 GeneBank 数据库提交的相应序列（AY919140）完全吻合（图 3），将其命名为 pMD19-hPPARδ-T。

3 讨 论

PPAR 属核受体超家族成员，包括 PPARα、

维普资讯 http://www.cqvip.com



A 为正向测序结果;B 为反向测序结果

图 3 pMD19-hPPAR -T 质粒(PD3)测序报告

PPARδ 和 PPARγ 3 种受体亚型。人 PPARδ 基因定位于 6p21,编码 441 个氨基酸残基[4],配体结合后被激活,与靶基因启动子区域过氧化物酶体增殖物反应元件 (Peroxisome proliferators response element, PPRE)结合,调控靶基因的转录[5]。自发现 PPARδ 以来,由于其组织表达广泛和缺乏特异性配体等原因,其功能研究一直未获突破。新近研究显示,PPARδ 激动剂可提高胆固醇逆向转运体表达,减少遗传性肥胖小鼠体内棕色脂肪和肝细胞中的甘油三酯(TG)积聚[6],增加骨骼肌脂肪酸氧化、线粒体呼吸、慢缩肌纤维涉及的相关基因表达[7],并可提高培养的骨骼肌细胞氧化代谢相关基因表达[8]。构建含 PPARδ 基因的真核表达载体对于 PPARδ 受体相关研究极为必要,而含完整开放阅读框(Open reading frame, ORF)的 PPARδ 受体 cDNA 全长序列的克隆又是此类载体构建的前提和基础。

基因的体外克隆重组技术自 20 世纪 70 年代诞生以来[9],已在生命科学等领域中得到广泛使用,由此极大地推动了基因组功能研究以及基因工程产业的发展。基因克隆(Gene cloning)的核心是体外重组,也即人工将一段目的 DNA 插入一个载体,再导入受体细胞扩增形成大量子代分子的过程[10]。其中,目的基因的获得有多种方法可供选择,包括:直接分离、基因组文库(Gene library)、构建 cDNA 文库 (Complementary DNA library)、PCR、人工合成和差异显示法(Differential display, DD)等[11]。直接分离适用于克隆原核生物基因;构建基因组文库包含某生物的所有基因的遗传信息,此法对于单拷贝基因、长片段基因的构建难度大,也不宜筛选;构建 cDNA 文库则仅包含表达的基因, 不同物种、不同组织的 cDNA 文库不相同, 其特点是基因总量少, 易筛选;PCR 扩增目的基因片段法适用于克隆序列已知的基因, 多采用以 mRNA 为模板的 RT-PCR 法。本实验由于克隆的 hPPARδ 基因其 cDNA 序列已知,加之我们前期实验经特异引物 PCR 反应证实,人肝癌细胞株 HepG2 表达 hPPARδ,故本实验选择了以 HepG2 细胞 mRNA 为模板的 RT-PCR 法克隆 hPPARδ 基因,实验获得了满意的结果,这比构建文库获得目的基因的方法简便、经济。

基因克隆要求插入的目的基因序列忠实、完整。重组子的筛选方法包括平板法的抗生素和蓝白斑筛选以及原位杂交法;鉴定方法有酶切长度鉴定和测序鉴定。本实验构建的 T 载体经转化 DH5α 感受态细菌后挑选了 PD1、PD2 和 PD3 共 3 个克隆,经双酶切初步鉴定,PD2 仅有约 2690 bp 大小的条带,这与 pMD19-T 线性空载体大小相同,说明没有 hPPARδ cDNA 目的条带插入,而 PD1 和 PD3 质粒含大小约 1430bp 和 2690bp 2 条条带, 其中 1430 bp 条带正好与克隆的 hPPARδ cDNA 序列大小一致。进一步对 PD1、PD3 质粒测序的结果证实,PD3 质粒含有目的 hPPARδ 基因 cDNA 完整序列, 无突变,与 GeneBank 数据库提交的相应序列完全吻合,这表明, 本实验构建的 pMD19-hPPARδ-T 载体 (PD3 质粒) 含有序列正确且完整的 hPPARδ 基因,这为进一步构建含 hPPARδ 受体基因真核表达载体和 hPPARδ 功能研究打下了良好的基础。

(下转第 795 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

和皮质醇分泌无显著差异。提示短期 24h 内血浆 FFAs 水平升高对健康青年男性 HPA 轴起抑制作用，随着时间的延长，抑制作用解除。

Fabio 等[5]给健康青年女性短时间(3.5h)输注 10%脂肪乳(Intralipid)后血浆 FFAs 显著升高，观察到 ACTH 和皮质醇分泌减少，同时他们发现高水平 FFA 对 HPA 轴的抑制作用并不会影响 HPA 轴对促肾上腺皮质激素释放激素的反应，因此 FFA 对 HPA 轴的抑制部位是在垂体上游。我们对正常青年男性的研究结果与其一致，并且还进一步观察到在血浆 FFAs 水平升高 8h 时，仍存在高 FFAs 对 HPA 轴的抑制作用。但本研究发现短时间(<24h)和较长时间 FFAs 增高对 HPA 轴或糖皮质激素分泌的影响是不同的。我们的结果提示 FFAs 对 ACTH 和皮质醇分泌的抑制作用在第 2 天 0 点时和第 2 天 8 点已经不存在，说明这种抑制作用持续不到 24h。鉴于 2 型糖尿病或存在 IR 的肥胖患者体内高水平 FFA 与皮质醇显著正相关，结合动物试验结果，我们推测随着 LHE 持续灌注时间延长，FFA 很可能转而激活 HPA 轴，从而构成 FFA 诱导 IR 产生与发展的一个重要分子基础。但是，此方面的研究有待进一步证实。

迄今为止，我们尚未找到 FFAs 对 HPA 轴昼夜节律影响的直接证据。但有 HPA 轴节律紊乱的疾病，常存在血浆高 FFAs 水平，间接提示 FFAs 对 HPA 轴昼夜节律可能有影响[6,7]。本研究观察到，无论 SH 组还是 LHE 组，血浆 ACTH 和皮质醇下午 4 点的水平较 8 点明显降低，到晚上 0 点时达最低，血浆 ACTH 和皮质醇昼夜节律正常。这说明短期血浆 FFAs 水平升高对正常人 HPA 轴节律无明显影响。

参 考 文 献

[1] Roy M,Collier B,Roy A. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients[J]. Psychiatry Research,1990;31(1):31-37.

[2] Chan O, Chan S,Inouye K,et al. Diabetes impairs hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) responses to hypoglycemia,and insulin treatment normalizes HPA but not epinephrine reponses[J]. Diabetes,2002;51(6):1681-1689.

[3] Liu H,Bravata DM,Cabaccan J,et al. Elevated late-night salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetes veterans[J]. Clinical Endocrinology,2005;63(6):642-649.

[4] Widmaier EP,Rosen K,Abbott B. Free Fatty Acids Activate the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis in Rats[J]. Endocrinology,1992;131(5):2313-2318.

[5] Fabio L,Roberta G,Micaela P,et al. Free fatty acids exert and inhibitory effect on adrenocorticotropin and cortisol secretion in humans[J]. J Clin Endo Meta,2004;89(3):1385-1390.

[6] Reimondo G,Allasino B,Bovio S,et al. Evaluation of the effectiveness of midnight serum cortisol in the diagnostic procedures for Cushing`s syndrome[J]. European Journal of Endocrinology,2005;153(6):803-809.

[7] Catargei B,Rigalleau V,Poussin A,et al. Occult Cushing`s syndrome in type 2 diabetes[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,2003;88(12):5808-5813.

(上接第 791 页)

(通讯作者：周岐新，重庆医科大学药理学教研室，cqzhouqx@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Fredenrich A,Grimaldi PA. PPAR delta:an uncompletely known nuclear receptor[J]. Diabetes Metab,2005;31(1):23-27.

[2] Berger JP,Akiyama TE,Meinke PT. PPARs:Therapeutic targets for metabolic disease[J]. Trends Pharmacol Sci,2005;26(5):244-251.

[3] Lee CH,Olson P,Hevener A,et al. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2006;103(9):3444-3449.

[4] Schmidt A,Endo N,Rutledge SJ,et al.Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferators and fatty acids[J]. Mol Endocrinol,1992;6(10):1634-1641.

[5] Glass CK,Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors[J]. Genes Dev,2000;14(2):121-141.

[6] van der Veen JN,Kruit JK,Havinga R,et al. Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1[J]. J Lipid Res,2005;46(3):526-534.

[7] Wang YX,Zhang CL,Yu RT,et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta[J]. PLos Biol,2005;3(1):e61.

[8] Abbot EL,McCormack JG,Reynet C,et al. Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells[J]. Febsj,2005;272(12):3004-3014.

[9] Cohen SN,Chang AC. Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in Escherichia coli transformants[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1973;70(5):1293-1297.

[10] 李芳菲，刘永刚，彭 彦，等. 人 L IF 基因的克隆及其真核表达载体的构建[J]. 重庆医科大学学报，2005;30(1):102-103,107.

[11] 黄培堂译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版，北京：科学出版社，2002.8.