维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0474-04

人 C 型利钠肽基因的克隆及其真核表达载体的构建

肖 乐, 赵 渝, 时 德

(重庆医科大学附属第一医院血管外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:为开展 C 型利钠肽基因治疗,克隆人 C 型利钠肽基因并构建其真核表达载体。方法:通过 RT-PCR 从人胎盘组织中克隆人 C 型利钠肽基因全长编码区,将该 DNA 片段亚克隆至克隆载体 pBS-T 中,用 *Sma* Ⅰ单酶切筛选出负向插入片段,用 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ双酶切将目的 DNA 片段定向克隆至真核表达质粒 pcDNA3.1(+)中,然后用双酶切、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:酶切、PCR 及测序鉴定证实,人 C 型利钠肽基因全长编码区被准确插入至 pcDNA3.1(+)酶切位点 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ之间,并且未发现有碱基突变或移位。结论:含人 C 型利钠肽基因真核表达质粒的成功构建并鉴定,为开展 C 型利钠肽基因治疗奠定了物质基础。

【关键词】C型利钠肽;真核表达质粒;基因治疗

【中国图书分类法分类号】R392.114 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-12-28

Cloning of human C-type natriuretic peptide gene and reconstruction of its eukaryotic expressive vector.

XIAO Le, et al.

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To clone human C-type natriuretic peptide gene and reconstruct its eukaryotic expressive vector for future investigation of gene therapy. *Methods*: The full coding domain sequence of human C-type natriuretic peptide gene was cloned from human placenta with RT-PCR and was sub-cloned into pBS-T. After screening of negative pBS-T/CNP with restriction enzyme *Sma* Ⅰ degestion, the targeted DNA fragment, digested with *Hind* Ⅲ and *Bam*H Ⅰ, was directional cloned into eukaryotic expressive plasmid pcDNA3.1(+). Then, the reconstructed plasmid was identified with enzyme digestion, PCR and sequencing. *Results*: It was demonstrated that the full coding domain sequence of human C-type natriuretic peptide gene was accurately cloned into digestion sites between *Hind* Ⅲ and *Bam*H Ⅰ in pcDNA3.1(+) without mutation and transposition. *Conclusion*: The successive reconstruction and verifying of eukaryotic expressive plasmid containing human C-type natriuretic peptide gene established the foundation of gene therapy of C-type natriuretic peptide.

【Key words】C-type natriuretic peptide; Eukaryotic expressive vector; Gene therapy

C型利钠肽 (C-type natriuretic peptide, CNP)是 Sudoh[1]在 1990 年首先从猪脑组织中分离出的一种小分子蛋白。作为利钠肽家族中的一员,CNP 在短短 15 年的研究中显示出诱人的应用前景。其生理调节作用涉及促进血管内皮细胞修复[2],抑制血管平滑肌细胞增殖[3],促进血管再生[4],调节血管紧张性,作为多极化因子发挥血管舒张作用[5],直接/间接调节血压[6],抑制缺血/再灌注损伤[7]和抑制血管炎症反应[8]等。CNP 的多方位作用靶点使其成为近年血管疾病基因治疗的一个新的热点,受到越来越多的关注。将 CNP 基因导入真核表达载体中是研究基因治疗的重要物质基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 真核表达质粒 pcDNA3.1(+)和大肠杆菌 DH5α 为本室保存,克隆载体 pBS-T 购自北京天为时代生物技术公司。

1.1.2 主要试剂和工具酶 限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Bam*H Ⅰ、*Sma* Ⅰ、T_4DNA 连接酶购自日本 TAKARA(大连)公司;逆转

作者介绍:肖 乐(1975-),男,博士,
主要研究方向:血管外科和肿瘤的综合治疗。

基金项目:国家自然科学基金(30270514)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

录酶 M-MLV，dNTP 购自美国 Promega 公司；DNA 纯化回收试剂盒购自美国 Omega 公司；质粒提取纯化试剂盒购自北京天为时代生物技术公司；Taq Plus DNA 聚合酶购自上海生工生物技术公司。

1.1.3 PCR 引物设计 利用软件 Primer Premier 5.0 辅助设计，由日本 TAKARA（大连）公司合成。序列如下：上游引物 5′-CAC CAT GCA TCT CTC CCA-3′，其中 5′ 端从起始密码子上游 CACC 开始是因为该序列（CAC CAT G）为 Kozak 序列。下游引物 5′-CTA ACA TCC CAG GCC GCT-3′，其中 5′ 端含有终止密码子 TAG 的互补序列。PCR 产物长度为 385bp。

1.2 方 法

1.2.1 人 C 型利钠肽基因全长编码区的克隆 以正常产妇胎盘 cDNA 为模板，用 RT-PCR 方法克隆 CDS 区全长。反应体系（50 μl）为：cDNA 模板 6 μl，dNTP（10mmol/L）2 μl，Taq plus buffer（10 ×）5 μl，DMSO 2.5 μl，甘油 2.5 μl，上游引物（10 μmmol/L）1 μl，上游引物（10 μlmmol/L）1 μl，ddH_2O 30 μl。循环条件为：95℃ 5min，94℃ 75s，59℃ 45s，72℃45s（共 40 个循环），72℃ 10min。

1.2.2 pBS-T/hCNP 的亚克隆 将 CNP 片段胶回收后通过 TA 克隆连接到克隆质粒 pBS-T 的 TA 克隆位点，转化感受态大肠杆菌 DH5α，通过蓝白斑筛选挑取阳性克隆，扩增后提取纯化质粒，得到重组 pBS-T/hCNP。

1.2.3 pBS-T/hCNP 的筛选和鉴定 用 *Sma* Ⅰ对 pBS-T/hCNP 进行单酶切，筛选出负向插入片段，然后分别用 PCR、双酶切和测序三重方法对负向 pBS-T /hCNP 进行鉴定。

1.2.4 pcDNA3.1（+）/hCNP 的构建和鉴定 用 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ分别对负向 pBS-T/hCNP 和 pcDNA3.1(+)进行双酶切，胶回收后将 h CNP 通过 T4DNA 连接酶定向克隆至 pcDNA3.1(+)的酶切位点 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ中，转化感受态大肠杆菌 DH5α，挑取阳性克隆，扩增后提取纯化质粒，得到重组 pcDNA3.1(+)/hCNP。然后分别用 PCR、双酶切和测序三重方法对 pcDNA3.1(+)/hCNP 进行鉴定。

2 结 果

2.1 人 C 型利钠肽基因全长编码区的克隆

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，在 385bp 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 pBS-T/hCNP 的亚克隆、筛选和鉴定

用 *Sma* Ⅰ对 pBS-T/hCNP 进行单酶切，含反向插入片段的酶切结果为 3 条分子量分别为 96bp、230bp和 3058bp 的条带，含正向插入片段的酶切结果为 3 条分子量分别为 96bp、101bp 和 3187bp 的条带，见图 2。



图 1 泳道 2 为 CNP 条带，泳道 3~5 为阴性对照，泳道 6 为阳性对照 β-actin，片段大小 350bp



图 2 泳道 2 为反向 pBS-T/hCNP，泳道 3 正向 pBS-T/hCNP，泳道 4 为空 pBS-T



图 3 泳道 2 为反向 pBS-T/hCNP，泳道 3 为空 pBS-T

对反向 pBS-T/hCNP 进行 PCR 鉴定，结果扩增出大小约 385bp 的目的条带，而空 pBS-T 未扩增出目的条带，见图 3。

反向 pBS-T/hCNP 的测序结果如下，经 Blast 对比发现，测序结果与 Genebank 中 Tawaragi [9]公布的序列完全相符（Gene ID:4880），而且目的片段被准确插入到 pBS-T 的 TA 克隆位点中，插入方向为反向（测序公司为日本 TAKARA（大连）公司，测序编号为 CQS1429 T7）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

GAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATCTAACATCCCAGGCCGCTCATGGAGCCGATTCGGTCCAGCTTGAGGCCGAAGCAGCCCT
TGGACAAGCCCTTCTTGTTGGCTCCTTTGTATTTCCGCGGCGTTGGGGTGCTCTTGCAGAAGGCGAGCCCACGCTGCCCCCGACTTGGTGT
CCACCGCGAGGTCCCGGAGCAGTCGCGACCGGTCGCCCTTGAGATTGGCGCCCCGCCCCCGGGAGCCTTGTCGCCCTTCTTCTGACCGCCGCCGCAGC
CTGCGGCTCGGCCAGCTCCTCTGCCGCGGGGTTCGCGGGACCTTCGGCGGCGCCCGCGGCTTGGCTTCGGAGGGCCGGAGGGAGACGAGCGTGAGCAGC
AGGGCGCAGGCCAGCAGCTGGGAGAGATGCATGGTGATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCC

2.3 pcDNA3.1/h CNP 的鉴定

用 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ对重组 pcDNA3.1/h CNP 进行双酶切，结果得到大小分别为 5400bp 左右和 400bp 左右的两条片段，而空 pcDNA3.1 仅为 1 条 5400bp 左右的片段，见图 4。

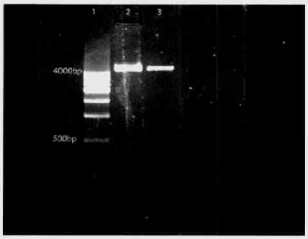


图 4 泳道 2 为 pcDNA3.1/h CNP，泳道 3 为空 pcDNA3.1

对 pcDNA3.1/h CNP 进行 PCR 鉴定，结果扩增出大小约 385bp 的目的条带，而空 pcDNA3.1 未扩增出目的条带，见图 5。



图 5 泳道 2 为 pcDNA3.1/h CNP，泳道 3 为空 pcDNA3.1

重组 pcDNA3.1/hCNP 测序结果如下，经 Blast 对比，测序结果与 Genebank 中公布的序列完全相符（Gene ID:4880），且目的片段被准确插入到 pcDNA3.1 中 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ中（上海生工生物工程技术有限公司，0412162(cq713)t7）。

TTAAGCTTGATTCACATGCATCTCTCCCAGCTGCTGGCCTCGCCCTGCTGCTCACGCTGCTCTCCCTCCGGCCCTCCGAAGCCAAGC
CCGGGGCGCCGCCGCGAAGGTCCCCCGAACCCCGCCGCCAGAGGAGCTGGCCGAGCCGCAGGCTGCGGGCGGCGGTCAGAAGAAGG
GCGACAAGGCTCCCGGGGGCGGGGGCCGCCAATCTCAAGGGCGACCGGTCGCCGACTGCTCCGGGACCTGCGCGTGGACACCAAGTC
GCGGGCAGCGTGGGCTCGCCTTCTGCAAGAGCACCCCAACGCCGCGAAATACAAAGGAGCCAACAAGAAGGGCTTGTCCAAGGGC
TGCTTCGGCCTCAAGCTGGACCGAATCGGCTCCATGAGCGGCCTGGGATGTTAGATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAG
TCCAGTGTGGTGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTC
GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTT
CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG
GANGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTA
GGGGGTATNCCCNCGGCCCCCCTGNAGCGGCNCATTAAANCCCCGNCGGGGNGTGGGTGGNTTACCCNCNGCGGNGGACCCCCTAC
ACTTTGGCCAGGNGCCCCTTANCNC

3 讨 论

利钠肽家族（natriuretic peptides family，NP）在调节血管自身平衡中具有重要作用，包括 A 型利钠肽（atrial natriuretic peptide，ANP）、B 型利钠肽（brain natriuretic peptide，BNP）、C 型利钠肽、尿道舒张素（也称 ANP95-126，来源于 ANP 前体的变异剪接）和树眼镜蛇利钠肽（Dendroaspis natriuretic peptide，DNP，来源于蛇毒液，亦存在于一些哺乳动物体内）[10]。其中，ANP 和 BNP 主要以内分泌的方式调节机体血容量和血压，而 CNP 和尿道舒张素则以旁分泌方式分别作用于血管和肾脏。

CNP 最初在猪脑组织中被发现，它与早前发现的 ANP 和 BNP 具有相似的结构。除脑组织外，CNP 主要表达于血管内皮细胞[11]，而 ANP 和 BNP 则分别表达于心房和心室。利钠肽与第二信使 -- 鸟苷酸环化酶（guanylate cyclase，GC）偶联的细胞膜受体结合后，通过催化 GTP 转换为 *c*GMP 而发挥其生物学效应。其中，CNP 选择性激动利钠肽受体 B（natriuretic peptide receptor B，NPR-B，也称 GC-B），而 ANP 和 BNP 选择性激动利钠肽受体 A（natriuretic

维普资讯 http://www.cqvip.com

peptide receptor A，NPR-A，也称 GC-A）。GC-B 主要分布于血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和炎症细胞[11,12]。

人 CNP 基因位于第 2 号染色体，包含 2 个外显子和 1 个内含子，全长编码区为 381bp。去除信号肽序列后，含有 126 个氨基酸的前 CNP 原（pre-pro-CNP）转变为 CNP 前体（pro-CNP），在蛋白转换酶 furin 作用下 CNP 前体转变为 CNP-53（也称 53-aa CNP），CNP-53 进一步转变为具有生物学活性的 CNP-22（12.9KD）[11]。

本研究直接通过 RT-PCR 方法从人胎盘组织中克隆 CNP 全长编码区，比以往通过 c DNA 文库筛选获得 CNP 编码区简单[13]。然而 CNP 编码区 GC 含量高达 69%，尤其在 5' 端 GC 含量更高，这使得稳定的二级结构容易形成而使 PCR 反应及测序常不能顺利进行。我们在实验中采用提高预变性温度和延长变性时间的办法，同时加入甘油和二甲亚砜等 PCR 增强剂，保证了 PCR 扩增反应的顺利进行。

外源 DNA 片段与载体连接的方式包括同源粘端连接、平端连接和定向克隆，其中定向克隆具有连接效率高、定向插入和有效限制自身环化的优点[14]。本研究先将 CNP 全长编码区亚克隆至克隆载体 pBS-T 中，再通过双酶切使 CNP 片段具备与 pc DNA3.1 互补的粘端，然后再定向克隆至 pc DNA3.1 的转录起始位点下游。此方法与直接在引物末端添加酶切位点相比，大大提高了酶切和连接效率。

本研究在国内首次成功构建含人 C 型利钠肽基因的真核表达质粒，为下一步开展 CNP 基因治疗打下了重要的物质基础。

参 考 文 献

[1] Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine hrain [J]. Biochem Biophys Res Commun,1990;168(2): 863-870.

[2] Ohno N, Itoh H, Ikeda T, et al. Accelerated reendothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide [J]. Circulation, 2002;105(14):1623-1626.

[3] Doi K, Ikeda T, Itoh H. C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization[J]. Arterio Thromb Vasc Biol,2001;21(6):930-936.

[4] Yamahara K, Itoh H, Chun TH, et al. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003; 100(6):3404-3409.

[5] Honing ML, Smits P, Morrison PJ, et al. C-type natriuretic peptide-induced vasodilation is dependent on hyperpolarization in human forearm resistance vessels[J]. Hypertension,2001;37(4): 1179-1183.

[6] Ono K, Mannami T, Baba S, et al. A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension[J]. Hypertens Res, 2002;25(5): 727-730.

[7] Hobbs AJ, Foster P, Prescott C, et al. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: a novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide[J]. Circulation, 2004;110(11):1231-1235.

[8] Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al. Perivascular application of C-type natriuretic peptide attenuates neointimal hyperplasia in experimental vein grafts[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2004;25(4): 585-590.

[9] Tawaragi Y, Fuchimura K, Tanaka S, et al. Gene and precursor structures of human C-type natriuretic peptide[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991;175(2):645-651.

[10] Schweitz H, Vigne P, Moinier D, et al. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (Dendroaspis angusticeps) [J]. J Biol Chem,1992;267(20): 13928-13932.

[11] Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, et al. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma[J]. Am J Physiol, 1992;263(4 pt 2):H1318-H1321.

[12] Komatsu Y, Nakao K, Itoh H, et al. Vascular natriuretic peptide[J]. Lancet, 1992;340(8819): 229-239.

[13] Ueno H, Haruno A, Morisaki N, et al. Local expression of C-type natriuretic peptide markedly suppresses neointimal formation in rat injured arteries through an autocrine/paracrine loop[J]. Circulation, 1997;96 (7):2272-2279.

[14] Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M].3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2002.