维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0790-04

小鼠 Hsp84 真核表达质粒的构建及鉴定

季业伟[1,2],赵 艳[1],王 华[1],徐晓玉[2],周元国[1]

(1 第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心,重庆 400042;2 重庆医科大学药学院,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建小鼠 Hsp84 基因真核表达质粒。方法:采用逆转录、热降落 PCR 方法,扩增 BALb/c 小鼠 Hsp84 基因片段,将其连入 pMD18-T 载体,筛选阳性克隆、测序验证。然后以重组 T 载体为模板,PCR 扩增目的序列,插入真核表达质粒 pcDNA3.1 中,转化大肠杆菌 DH5α,通过琼脂糖电泳、双酶切挑选和验证阳性重组克隆。结果:RT-PCR 自小鼠脑组织中扩增出目的基因片段,克隆入 pMD18-T 载体后,测序结果证明为 BALb/c 小鼠 Hsp84 基因.插入目的基因的真核表达载体的酶切谱与设计一致。结论:成功构建了小鼠 Hsp84 编码框全长的真核细胞表达质粒。

【关键词】热休克蛋白 90;真核表达;应激耐受

【中国图书分类法分类号】Q7 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-17

Construction and verification of eukaryotic expression vector for mouse Hsp84

JI Yewei, et al

(*Molecular Biology Center, Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the eukaryotic expression vector of mouse Hsp84. *Methods*: Amplify the Hsp84 gene by reverese transcription and touchdown PCR ,and then the PCR products was ligated into pMD18-T vector. The positive was selected and verified by agorose electrophoresis and sequencing.The positive clone was used as template and further amplified with the primers containing endodigestion sites and protective hases in both terminals.The PCR products were then inserted into eukariotic expression vector pcDNA3.1.DH-5α was transformed with ligated plasmids .Check for the presence of positive clones by means of agorose electrophoresis and endodigestion. *Results*: The sequence inserted into the recombined positive T vectors was corresponding to the BALb/c mouse Hsp84 gene provided in Gene bank. The presence of positive eukaryotic expression vector was verified by double endodigestion. *Conclusions*: The eukaryotic expression plasmid for mouse Hsp84 was successfully constructed.

【Key words】Hsp90; Eukaryotic expression; Stress endurance

热休克蛋白 90(Heat shock protein90,Hsp90)是真核生物中普遍存在并且高度保守的蛋白质,在哺乳动物各种细胞中高度表达。Hsp90 在细胞应激中具有重要的保护作用,能够纠正细胞内蛋白质在热应激条件下发生的错误折叠,恢复并维持蛋白质的正确构象[1,2]。

不仅在体外试验中观察到细胞内 Hsp90 蛋白表达水平会在热刺激、缺氧、重金属存在等条件下明显升高,在大鼠、犬等创伤、烧伤、感染等模型中,也观察到肝、脑等器官 Hsp90 水平明显升高,提示 Hsp90 可能在严重感染、创伤等病理过程中具有一定保护作用[3]。我们拟构建小鼠 Hsp90 亚型元的Hsp84 的真核表达载体并用于上调小鼠体内 Hsp90 水平,作为进一步观察其是否可以减轻感染、创伤模型小鼠的病理损害程度的工具。

作者介绍:季业伟(1980-),男,博士研究生,
主要研究方向:糖皮质激素抗炎效应的分子机制。

基金项目:高等学校全国优秀博士论文作者专项基金(编号 200156),国家自然科学基金项目(编号 30470988)。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

E.coli DH5α 为本室保存,pcDNA3.1 真核表达质粒由本室申海鹰博士提供。pMD18-T 载体,逆转录试剂盒(AMV) ver3.0, 限制性内切酶 NHe I、Xho I 及 T4 连接酶等购自 Takara 公司。PCR 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒为美国 Omega 公司产品。RNA 提取试剂为美国罗氏公司 Tripure。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 Genbank 上 BALb/c 小鼠 Hsp84

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因 mRNA 全长序列（序列号 MM186），利用引物设计软件 clone manager 设计并合成了两对 PCR 引物，两对引物都互补结合 mRNA 5'端和 3'端非翻译区，使 PCR 产物含基因编码全长序列，并且含有起始密码子和终止密码子。

第一对引物为 PF1 5'actcggcTTTcccgtcaagatg 3' PR1 5'atacagaGGGcagggcttcttc 3' 第二对引物正义链、反义链分别带有 NHe I、Xho I 酶切位点及保护性碱基，引物均在 Takara 公司合成。

PF2 5' CTCGCTAGCTGTACTACTACTCGGCTTTC 3'

PR2 5' CTTCTCGAGTCTTCCAGCAGGCTTTAATC 3'。

1.2.2 小鼠脑组织总 RNA 提取　取新鲜 BALb/c 小鼠脑组织 50mg，加入 Tripure 1ml，在冰浴中匀浆，用氯仿抽提，离心后小心取上清，加入异丙醇沉淀 RNA，用 75%乙醇清洗，干燥后加入 40μl DEPC 处理水。用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度，并用 1%琼脂糖电泳验证总 RNA 有无降解。

1.2.3 RT-PCR 及 T-A 克隆　逆转录反应体系：RNA 600ng，10 X RT buffer 1μl，10mol/L d NTP 2μl，$MgCl_2$ 2μl，RNA 酶抑制剂 0.25μl，随机 9 聚引物 0.5μl，加水补至 10μl。温度及反应时间：30 ℃ 5 min，42℃ 30 min ，90℃ 5 min，5℃ 5 min。PCR 反应体系：5 X PCR 缓冲液 10μl，PF1、PR1 各 0.5μl，EX Taq 热启动酶 0.25μl，c DNA 10μl，双蒸水补足至 50μl。温度及反应时间：94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，62 ℃ 35 s，72 ℃ 90s，然后第 2 到第 4 个循环，退火温度每一循环降低 1℃，以 58 ℃的退火温度再重复 30 个循环。产物用 1%琼脂糖电泳鉴定，并用 PCR 产物清洁试剂盒清洁，紫外分光光度计测定浓度。

将 PCR 产物与 pMD18-T 载体按摩尔浓度 10∶1 的比例进行连接，将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α，在含有 X-gal 和 IPTG 的氨苄抗性平板上通过蓝白斑筛选阳性克隆，扩增白色菌落，抽提质粒，根据 1%琼脂糖电泳条带位置再一次判断是否插入目的片断，并对阳性重组克隆进行测序鉴定。

1.2.4 真核表达载体 pcDNA3.1 的构建及鉴定　以 T-A 阳性重组克隆为模板进行 PCR：反应体系：模板质粒 0.5μl，5 X PCR 缓冲液 10μl，d NTP 5μl，$MgCl_2$ 5μl，PF2、PR2 各 0.5μl，EX Taq 热启动酶 0.25μl，双蒸水补足至 50μl。温度及反应时间：94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，61.5 ℃ 35 s，72 ℃ 90s，然后第 2 到第 5 个循环，退火温度每一循环降低 1.5℃，以 55.5 ℃的退火温度再重复 30 个循环，产物用 PCR 产物清洁试剂盒清洁。

分别对 pcDNA3.1 质粒和 PCR 产物进行双酶切：先用 NHe I，M Buffer；后加入 Xho I，H Buffer.酶切产物用 1%琼脂糖电泳分离，切胶回收。将回收的酶切 PCR 产物、pcDNA3.1 线性质粒各用 0.3pmol、0.03pmol 进行连接。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α，在氨苄抗性平板上筛选阳性克隆，扩增菌落，抽提质粒，根据 1%琼脂糖电泳条带位置判断是否插入目的片断，并对阳性重组克隆进行酶切鉴定。

2 结　果

2.1 BALb/c 小鼠 Hsp84 基因的扩增

RT-PCR 扩增出带有全长读码框的 BALb/c 小鼠 Hsp84 基因，琼脂糖电泳证实条带大小为 2.2k 左右，与预期扩出 2225bp 符合，见图 1。

2.2 重组 T-A 阳性克隆的获得

在有 X-gal 和 IPTG 的氨苄抗性平板上有大量

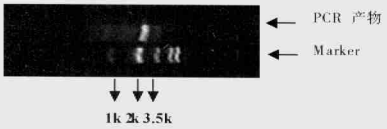


图 1　RT-PCR 产物琼脂糖电泳图

注：根据 Tiangen Marker Ⅳ判断，RT-PCR 产物大小为 2.2k。MarkerⅣ最亮的带为 2k，后面 3 条带大小分别是 3.5,5.5,7.5k。

白色菌落，挑菌扩增抽提质粒，根据琼脂糖电泳条带大小初步得到阳性重组克隆，并进行测序鉴定，证实插入 2225bp BALb/c 小鼠 Hsp84 基因.T-A 阳性克隆测序见图 2。

2.3 重组真核表达载体的获得

用前面获得的重组 T-A 克隆为模板，用带保护性碱基和酶切位点的引物再 PCR，经酶切、连接，将 BALb/c 小鼠 Hsp84 基因再克隆到真核表达载体，根据电泳条带大小和双酶切结果，证实获得了阳性重组克隆。

3 讨　论

通过 RT-PCR 将目的基因片段克隆到载体进行测序、突变或表达是重要的分子生物学手段，我们的目的是要将 BALb/c 小鼠 Hsp84 基因编码框全部序列克隆到真核表达载体。真核表达载体 pcDNA3.1 具有 CMV 强启动子，下游具有多个酶切位点，利用酶切和连接的方法把基因片段连入载体 CMV 的下游，可以高强度的表达。由于我们要表达小鼠 Hsp84 基因全长编码序列，该基因具有内含子，不能直接把基因组 DNA 片段插入表达载体，我们使用 RT-PCR 的方法，以该基因的 mRNA 为模板，将编码框部分逆转录为 DNA，通过 PCR 方法扩增目的基因，连入表达载体。

维普资讯 http://www.cqvip.com

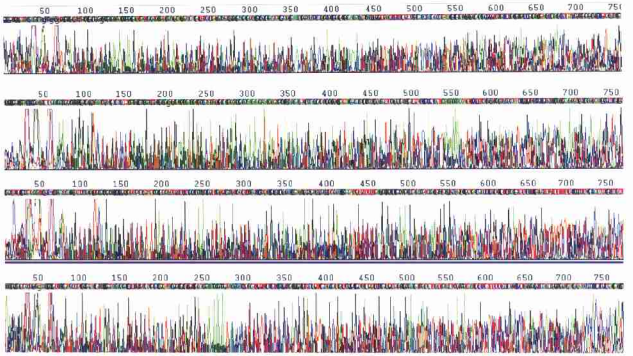


图 2 重组阳性 T 载体测序证明插入 2.2K BALB/c 小鼠 Hsp90 基因

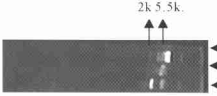


图 3 NHe I、Xho I 双酶切产物电泳图

注：peDNA3.1 空质粒双酶切后为 5.4k 的一条带，而重组阳性质粒双酶切后为 5.4k、2.2k 两条带。

我室在研究中用 RT-PCR 方法扩增 GR 和 RGS4 的目的基因片段，用 clone manager 软件设计不同的带保护性碱基和酶切位点的引物，共顺利扩增 7 个目的基因片段，大小从 0.3~1.3k 不等，可以利用这些酶切位点将基因片段连入表达载体。在扩增 2.2k 的全长 Hsp84 编码框时，开始也利用该软件设计带保护性碱基和酶切位点的引物，包括 PF2、PR2 和另一对引物（未给出序列），RT-PCR 产物始

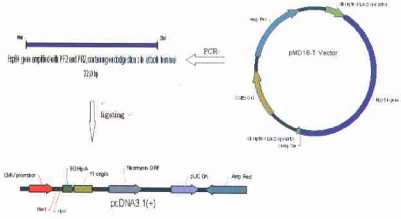


图 4 Hsp84 基因克隆入真核细胞表达载体路线图

维普资讯 http://www.cqvip.com

终是 1k 左右的非特异性条带，尽管对 PCR 各个条件进行了优化和使用了降落 PCR 的方法。考虑失败有以下的原因：首先，通过逆转录得到 2kb 以上的目的片段本身有较大难度，因为逆转录酶具有的 RNA 酶活性，能在 cDNA 延伸的过程中将 RNA 切割；其次，目的基因 Hsp84 可能具有复杂的二级结构使 RT-PCR 得到扩增产物比较困难；最后，PF2、PR2 两端添加的酶切位点和保护性碱基序列(9nt)增加了非特异性结合的倾向性。我们改用不带酶切位点的第一对引物并使用热降落 PCR 方法成功扩增了目的序列。热降落 PCR 起始的 5 个循环中，退火温度逐步降低，在较高的退火温度，能使引物结合特异性提高，目的序列被扩增。在后续的低退火温度的循环开始时，能与引物特异结合的目的片段占有数量上的优势，从而减少非特异性扩增，并增加扩增效率[4]。

pMD18-T 载体是由 pUC18 载体改建而成的两端带有游离 T 碱基的线性质粒，因为普通 taq 酶扩增得到的 PCR 产物 3'端带有游离碱基 A，刚好与线性载体 5'端的 T 配对，可以高效的克隆 PCR 产物。如前述，我们的实验通过 RT-PCR 的方法扩增了 2kb 的目的基因片段，但扩增所使用引物不带有酶切位点。另外，即使使用了两端带有酶切位点的引物，如果将 PCR 产物直接酶切连到表达载体上，因为酶切前的 PCR 产物清洁和酶切后的胶回收纯化目的片段的步骤，会使 DNA 片段大部分丢失。而将目的片段插入表达载体的过程中，目的片段与线性化载体的摩尔浓度的比值一般要求达到 5~10，所以将 PCR 产物片段直接连入真核表达载体的策略往往因为连接效率很低而不易成功。PCR 产物目的片段连入 T 载体的效率比连入表达载体的效率要高很多，所以我们先把 PCR 产物克隆到 T 载体，通过蓝白斑筛选较方便的获得阳性克隆，经过测序鉴定证明所插入序列为 BALb/c 小鼠的 Hsp84 基因。插入的目的基因片段可以随 T 载体在细菌里复制而反复扩增，并且长期保存。我们接下来以阳性载体上的目的片段为模板，用第二对引物进行 RT-PCR，酶切、连接，顺利的将目的基因片段克隆到真核表达载体，经酶切鉴定获得了阳性克隆。真核表达载体构建整个技术路线见图 4。我们将进一步验证该真核表达质粒在哺乳动物细胞中的表达水平。

(通讯作者，周元国。感谢陈星云助理研究员提供的生物信息学方面的重要帮助，感谢熊仁平高级实验师在 RT-PCR 方面的帮助。)

参 考 文 献

[1] Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins [J]. J Cell Sci, 2002; 115: 2809-2816.

[2] Yonehara M., Minami Y., Kawata Y., et al. Heat-induced chaperone activity of HSP90[J]. J Biol Chem, 1996; 271: 2641-2645.

[3] 王军平、粟永萍、刘贤华、等. 严重烫伤大鼠肝脏热休克蛋白 90α 的表达变化及意义[J]. 第三军医大学学报, 2003; 25: 747-749.

[4] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版, 北京：科学出版社, 2002.8.

欢迎订阅《医学与哲学》杂志(半月刊)

《医学与哲学》杂志创刊于 1980 年，迄今已有 26 年的历史，是中国科学技术协会主管、中国自然辩证法研究会主办的国家级学术期刊。《医学与哲学》杂志自出版以来，已成为我国医学人文学方面的一份主要刊物，在国际同类期刊中占有重要地位，并且是"中国科技核心期刊"与"国家中文核心期刊"的"双核心"期刊。《医学与哲学》杂志于 2005 年第 9 期改为半月刊，上半月刊为"人文社会医学版"，下半月刊为"临床决策论坛版"。

《医学与哲学》杂志人文社会医学版(上半月刊)

主要栏目有：医学伦理理论研究、高新技术伦理、医学史研究、医学心理学、医学人文关怀、卫生保健改革、保健政策研究、医学社会学等。

《医学与哲学》杂志临床决策论坛版(下半月刊)

主要栏目有：决策理论研究、临床决策病例(病种)分析、医学评论、比较治疗学、圆桌会议——专题决策座谈、技术评估、临床伦理、临床人文关怀、临床医学论坛、国外医学新进展、会议博览、名医春秋等。读者对象为临床医生。

《医学与哲学》统一刊号：ISSN1002-0772, CN21-1093, 大 16 开, 80 页。"人文社会医学版"邮发代号：8-122, 定价 7.00 元 / 期；"临床决策论坛版"邮发代号：8-128, 定价 7.00 元 / 期，请及时向当地邮局订阅，漏订的读者请直接汇款至《医学与哲学》编辑部。

联系电话：0411-84722033-15 84721530 传真：0411-84721531

电子信箱：yizhe@yizhe.org 网址：www.yizhe.org

地址：大连市沙河口区中山路 465 号 大连医科大学《医学与哲学》信箱 邮编：116027