

· 论 著 ·

家兔 C 型利钠肽基因真核表达载体的构建及鉴定*

张 剑, 龚昆梅, 肖 乐, 王昆华[△], 欧阳一鸣, 李临海, 黄映光, 朱 宇, 龙亚新
(云南省第一人民医院普外一科, 昆明 650032)

摘要:目的 为开展 C 型利钠肽(CNP)基因治疗构建家兔 CNP 基因真核表达载体。方法 通过 RT-PCR 从家兔腹主动脉组织中克隆 CNP 基因全长编码区,将该 DNA 片段亚克隆至克隆载体 pMD 18-T 中,用 Pst I 单酶切筛选出负向插入片段,用 Hind III 和 Kpn I 双酶切将目的 DNA 片段定向克隆至真核表达质粒 pEGFP-N1 中,然后用双酶切、DNA 序列测定鉴定方法对重组质粒进行鉴定。结果 酶切及测序鉴定证实,家兔 CNP 基因全长编码区被准确插入到 pEGFP-N1 酶切位点 Hind III 和 Kpn I 中。结论 含家兔 CNP 基因真核表达载体的成功构建和鉴定为 CNP 基因治疗的研究奠定了基础。

关键词:利钠肽,C 型;质粒;克隆;分子;基因疗法;兔

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.27.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)27-2796-03

Reconstruction and identification of rabbit C-type natriuretic peptide gene eukaryotic expression vector*

Zhang Jian, Gong Kunmei, Xiao Le, Wang Kunhua[△], Ouyang Yimin, Li Linghai, Huang Yingguang, Zhu Yu, Long Yaxin
(Department of General Surgery, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To reconstruct rabbit C-type natriuretic peptide(CNP) gene eukaryotic expressive vector for future investigation of gene therapy. **Methods** The full coding domain sequence of rabbit CNP gene was cloned from rabbit abdominal aorta with RT-PCR and was sub-cloned into pMD 18-T vector. After screening of negative pMD 18-T /CNP with restriction enzyme Pst I digestion, the targeted DNA fragment, digested with restriction enzyme Hind III and Kpn I, was directionally cloned into eukaryotic expressive plasmid pEGFP-N1. Then, the reconstructed plasmid was identified with enzyme digestion and sequencing. **Results** The restriction enzyme digestion and sequencing demonstrated that the full coding domain sequence of rabbit CNP gene was accurately cloned into digestion sites between Hind III and Kpn I in pEGFP-N1 without mutation and transposition. **Conclusion** The successive reconstruction and verifying of eukaryotic expressive plasmid containing rabbit CNP gene lays the foundation of gene therapy of CNP.

Key words: natriuretic peptide, C-type; plasmids; cloning, molecular; gene therapy; rabbits

C 型利钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)是 Sudoh 等^[1]在 1990 年从猪脑中分离而得的由 22 个氨基酸组成的多肽,是利钠肽家族的重要成员^[2],主要表达于中枢神经系统和血管内皮细胞。目前认为 CNP 是新型有效的血管调节因子^[3],但由于 CNP 在合成后并非大量释放入血,且半衰期极短(仅为 2.6 min),生理状态下血浆 CNP 浓度难以检出^[4],大大限制了对其功能的研究和应用。本研究利用基因工程技术将 CNP 基因导入真核表达载体中,是进一步基因治疗研究的重要基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒和菌株 真核表达质粒 pEGFP-N1 由本室保存;感受态大肠杆菌 DH5 α 购自北京百泰克生物技术有限公司;克隆载体 pMD 18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 主要试剂和工具酶 限制性内切酶 Pst I、Hind III、Kpn I、T₄DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司;逆转录酶 M-MuLV 购自加拿大 Fermentas 公司;TaqPlus DNA 聚合酶、dNTP Mix、总 RNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;质粒提取纯化试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司。

1.1.3 PCR 引物设计 利用软件 Primer Premier 5.0 辅助设

计,由上海超世生物科技有限公司合成。序列如下:上游引物 5'-ATG CAC CTC TCC CAG CTG C-3',5 端从起始密码 ATG 开始;下游引物 5'-ACA TCC CAT GCC GCT CAT G-3',5' 端含有终止密码子 TAG 的互补序列。PCR 产物长度为 381 bp。

1.2 方 法

1.2.1 兔腹主动脉总 RNA 的提取和 cDNA 的逆转录 按照总 RNA 提取试剂盒、Fermentas 逆转录试剂盒说明书进行。

1.2.2 兔 CNP 基因全长编码区的克隆 以兔腹主动脉 cDNA 为模板,用 RT-PCR 方法克隆。cDNA 模板 4 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2 μ L, Taq plus buffer (10 \times) 5 μ L, Taq plus (5 μ / μ L) 2 μ L, DMSO 2.5 μ L, 甘油 2.5 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 2 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 2 μ L, ddH₂O 28 μ L。循环条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 75 s, 59 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s (共 40 个循环), 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.3 pMD 18-T/rCNP 的亚克隆 将 CNP 片段胶回收后通过 TA 克隆连接到克隆质粒 pMD 18-T 的 TA 克隆位点,经 T/A 连接,16 $^{\circ}$ C 延伸 30 min。将重组克隆转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,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 pMD 18-T /rCNP。

1.2.4 pMD 18-T/rCNP 的筛选和鉴定 用 Pst I 内切酶对

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30860276);云南省科技厅科研基金资助项目(2007C248M);云南省科技厅-昆明医学院应用基础联合专项基金资助项目(2008CD042)。 Δ 通讯作者,E-mail:wangkunhua1@medmail.com.cn。

重组 pMD 18-T/rCNP 进行单酶切,筛选出负向插入片段,分别用 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切鉴定。双酶切体系:10×M Buffer 5 μL,*Hind* III 2.5 μL,*Kpn* I 2.5 μL,模板 20 μL,双蒸 20 μL,共 50 μL,37 °C 酶切 1 h,结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 pEGFP-N1/rCNP 的构建和鉴定 用 *Hind* III 和 *Kpn* I 分别对 pEGFP-N1 和负向 pMD 18-T/rCNP 进行双酶切,切胶回收后将 CNP 通过 T4DNA 连接酶定向克隆至 pEGFP-N1 的酶切位点 *Hind* III 和 *Kpn* I 中,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,选取阳性克隆,扩增后提取纯化质粒,得到重组 pEGFP-N1/rCNP。然后分别用 PCR、双酶切和测序三重方法对重组 pEGFP-N1/rCNP 进行鉴定。

2 结 果

2.1 家兔 CNP 基因全长编码区的克隆 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,在 381 bp 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。



1:DNA 标记物;2:目的条带家兔 CNP;3:阴性对照。

图 1 家兔 CNP 基因琼脂糖凝胶电泳

2.2 pMD 18-T/rCNP 亚克隆的筛选和鉴定 用 *Pst* I 对 pMD 18-T/rCNP 进行单酶切,含反向插入片段的酶切结果是 2 条分别为 153 bp 和 2 920 bp 的条带,含正向插入片段的酶切结果是 2 条分别为 256 bp 和 2 817 bp 的条带。



1:DNA 标记物;2:重组 pEGFP-N1/rCNP;3:空 pEGFP-N1。

图 2 重组 pEGFP-N1/rCNP 的双酶切鉴定

2.3 pEGFP-N1/rCNP 的鉴定 采用 pEGFP-N1/rCNP 为模板,进行 PCR 鉴定,在 381 bp 左右的位置可见到目的条带。用 *Hind* III 和 *Kpn* I 对重组 pEGFP-N1/rCNP 进行双酶切,结果得到大小分别为 4 300 bp 和 400 bp 的 2 条片段,而空 pEGFP-N1 仅为 1 条 4 700 bp 的片段(图 2)。经 Blast 对比,测序结果与 Genebank 中公布的序列完全相符(Gene ID:

100344147),且目的片段被准确插入到 pEGFP-N1 中 *Hind* III 和 *Kpn* I 中(上海生工生物工程技术有限公司,07051844(ZJ1)PEGFPN5_A11)。重组 pEGFP-N1/rCNP 的部分测序结果,见封 2 图 3。

3 讨 论

利钠肽家族成员包括心房利钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP),脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、CNP、树眼镜蛇属利钠肽(dendroaspis natriuretic peptide, DNP)、尿扩张素、鸟苷蛋白和尿鸟苷蛋白等^[5]。利钠肽在调节血容量、血管平滑肌张力和维持心血管动态平衡方面起着重要作用^[6]。其中,ANP 和 BNP 主要来源于心脏,合成后分泌到血液循环中与血管组织、肾脏和肾上腺上的特异性受体(natriuretic peptide receptor, NPR)-A 结合,发挥促使血管扩张、促进利钠、利尿等作用^[7];CNP 主要来源于中枢神经系统、血管内皮和肾脏,通过旁分泌、自分泌的方式与 NPR-B 结合,对血管紧张度和重构起调节作用^[8-9]。

CNP 主要在血管组织中表达,与广泛分布于血管系统、脑、骨等组织的受体胞外区域特异性结合后,通过跨膜转运激活与质膜相连的鸟苷酸环化酶,促进第二信使 cGMP 积累,导致 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化,降低细胞内钙离子浓度,使血管平滑肌松弛^[10]。其生理效应:(1)调节血管平滑肌细胞紧张度与血管内皮细胞保持一致,实现对局部血管舒缩的调控^[11];(2)调节血管稳态^[12],直接或间接调节血压^[3,13];(3)增强心肌收缩^[14];(4)抑制血管炎症反应和血管平滑肌细胞增殖^[15];(5)促进血管损伤后新生内膜形成^[3,16];(6)抑制缺血或再灌注损伤^[4]以及作为血管内皮细胞超极化因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)发挥作用^[17]。

本研究直接通过 RT-PCR 方法从家兔血管组织中克隆 CNP 全长编码区,然而 CNP 编码区 GC 含量高达 64%,容易形成稳定的二级结构,使 PCR 反应及测序常常不能顺利进行。本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基砷等 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黏端连接、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^[18]。本研究先将 CNP 全长编码区亚克隆至克隆载体 pMD 18-T 中,再通过双酶切使 CNP 片段具备与 pEGFP-N1 互补的黏端,然后再定向克隆至 pEGFP-N1 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。

本研究成功构建了含家兔 CNP 基因的真核表达质粒,对于进一步开展研究 CNP 的作用机制以及与疾病的关系及其临床应用价值等打下了重要基础。

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 brain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 168(2): 863-870.
- [2] Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, et al. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases [J]. *Am J Hypertens*, 2008, 21(7): 733-741.
- [3] Scotland RS, Ahluwalia A, Hobbs AJ. C-type natriuretic

- peptide in vascular physiology and disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 105(2):85-93.
- [4] Hobbs AJ, Foster P, Prescott C, et al. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial is chemia/reperfusion injury: a novel cardio-protective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide[J]. *Circulation*, 2004, 110(11):1231-1235.
- [5] Potter LR, Yoder AR, Flora DR, et al. Natriuretic peptides: their structures receptors, physiologic, functions and therapeutic applications[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009 (191):341-366.
- [6] Vlachopoulos C, Ioakeimidis N, Terentes-Printzios D, et al. Amino-terminal pro-C-type natriuretic peptide is associated with arterial stiffness, endothelial function and early atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(2):649-655.
- [7] Nakao K, Ogawa Y, Suga S, et al. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides[J]. *J Hypertens*, 1992, 10(9):907-912.
- [8] Miyoshi M, Kitaqawa Y, Imoto T, et al. Effect of natriuretic peptide receptor antagonist on lipopolysaccharide-induced fever in rats: is natriuretic peptide an endogenous antipyretic[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(3):1163-1170.
- [9] Pagel-Langenickel I, Buttgerit J, Bader M, et al. Natriuretic peptide receptor B signaling in the cardiovascular system; protection from cardiac hypertrophy[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2007, 85(8):797-810.
- [10] Garbers DL, Chrisman TD, Wiegand P, et al. Membrane guanylyl cyclase receptors: an update[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(6):251-258.
- [11] Kelsall CJ, Chester AH, Sarathchandra P, et al. Expression and localization of C-type natriuretic peptide in human vascular smooth muscle cells[J]. *Vascular Pharmacol*, 2006, 45(6):368-373.
- [12] Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions [J]. *Endocr Rev*, 2006, 27(1):47-72.
- [13] 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.
- [14] Palmer SC, Prickett TC, Espiner EA, et al. Regional release and clearance of C-type natriuretic peptides in the human circulation and relation to cardiac function[J]. *Hypertension*, 2009, 54(3):612-618.
- [15] Walther T, Stepan H. C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy and fetal development[J]. *J Endocrinol*, 2004, 180(1):17-22.
- [16] Hutchinson H, Trinlade P, Cunanan D, et al. Mechanisms of natriuretic-peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovascular Res*, 1997, 35(1):158-167.
- [17] Sandow SL, Tare M. C-type natriuretic peptide: a new endothelium-derived hyperpolarizing factor[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(2):61-67.
- [18] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, 2002:78-90.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)

(上接第 2795 页)

- [10] Mesulam MM. Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a noncarcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents[J]. *J Histochem Cytochem*, 1978, 26(2):106-117.
- [11] He C, Chen JY, Ao SZ, et al. Preparation and a structure-function analysis of human ciliary neurotrophic factor[J]. *Neurosci Res*, 1995, 23(2):327-333.
- [12] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(12):5447-5454.
- [13] Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5-6):993-998.
- [14] Iyer NV, Kothe LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(1):149-162.
- [15] Copray S, Balasubramanian V, Levenga J, et al. Olig2 overexpression induces the in vitro differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4):1001-1010.
- [16] Cayre M, Bancila M, Virard I, et al. Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 31(4):748-758.
- [17] Walczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, et al. Applicability and limitations of MR tracking of neural stem cells with asymmetric cell division and rapid turnover: the case of the shiverer dysmyelinated mouse brain[J]. *Magn Reson Med*, 2007, 58(2):261-269.
- [18] 孔令胜, 于如同, 聂冬丽, 等. 大鼠脊髓损伤后对红核神经元逆行性损伤的实验研究[J]. *济宁医学院学报*, 2009, 32(1):12-14.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-05-22)