

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.19.013

人朊蛋白基因真核表达载体的构建及鉴定*

张海英¹,刘亦恒²,费小雯¹,易西南¹,吴多庆²

(1.海南医学院人体解剖学教研室,海口 571101;2.海南省海口市人民医院骨科中心 570208)

摘要:目的 构建人朊蛋白基因(PRNP)真核表达重组质粒。方法 从阿尔茨海默病(AD)患者外周血白细胞中提取总RNA,利用RT-PCR的方法扩增编码人PRNP的基因片段,应用基因重组技术将人PRNP基因片段克隆到真核表达载体pEGFP-N2中,经Xho I及EcoR I双酶切、单酶切及基因序列测定证实所构建的载体。结果 RT-PCR方法获得人PRNP的基因片段,限制性内切酶酶切分析、PCR法及序列测定证实为正确重组质粒,并且该重组载体能够在SH-SY5Y细胞中表达。结论 构建的真核表达重组质粒pEGFP-N2-PRNP通过鉴定,结构正确,为后续研究PRNP的生物学功能奠定了基础。

关键词:阿尔茨海默病;朊蛋白基因;pEGFP-N2 真核表达载体

中图分类号:R592

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)19-2434-03

Building and identification of prion gene eukaryotic expression vector of human*

Zhang Haiying¹, Liu Yiheng², Fei Xiaowen¹, Yi Xinan¹, Wu Duoqing²

(1. Department of Anatomy, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571101, China;

2. Department of Orthopaedic, Haikou Municipal People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To construct a eukaryotic expression recombinant plasmid named pEGFP-N2-PRNP. **Methods** Total RNA was extracted from Alzheimer's (AD) disease peripheral blood, and the PRNP gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). By using gene recombination technique, human PRNP cDNA was inserted into retroviral vector pEGFP-N2. The recombinant plasmid was identified by a pair of specified primers containing the restriction sites of Xho I and EcoR I. **Results** The PRNP gene could be obtained by RT-PCR, the recombinant plasmid was identified by restriction endonuclease analysis, PCR and sequence analysis, and the expression vector pEGFP-N2-PRNP, which could be stably expressed in SH-SY5Y cells. **Conclusion** The recombinant plasmid pEGFP-N2-PRNP is constructed successfully, which offers a basic for the further research on PRNP biological function.

Key words: Alzheimer's disease; PRNP gene; pEGFP-N2 eukaryotic expression vector

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以记忆和认知损害为主要特征的慢性进行性神经系统退行性疾病。主要的病理改变为在大脑皮层和海马,出现大量老年斑和神经纤维缠结。因它的发病机制并不清楚,从而无有效的治疗手段。有研究发现, A β 寡聚体与神经细胞膜上的细胞型的朊蛋白(cellular prion protein, PrP^C)结合^[1-2],增强了 A β 寡聚体的神经毒性。PrP^C是由染色体基因组朊蛋白基因(prion protein gene, PRNP)编码,表达产物由253~254个氨基酸构成,相对分子质量为(33~37)×10³,在Ser231处安装糖基化的磷脂肌醇锚受体(GPI)结合位点,通过短的寡糖与包埋在脂双层外膜中糖基化的磷脂肌醇锚相连,固定于脂筏中,主要分布在神经元表面^[2]。为了更好地阐明 PrP^C基因在 AD 发病机制中的作用,本实验采用 RT-PCR 获得编码人 PRNP 的基因片段,通过酶切、纯化、连接等重组方法,将克隆得到的人 PRNP 基因构建真核表达重组质粒载体,为进一步研究 PRNP 基因生物学功能及作用机制奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料 质粒和菌株:真核表达载体 pEGFP-N2、大肠埃希菌 DH5 α 菌株由海南医学院基础医学实验室提供。酶类和主要生化试剂:Trizol、RT-PCR Kit 购自 Fermentas 公司,限制性内切酶 Xho I 和 EcoR I、Wide Range DNA Ladder Marker 购自 Takara 公司,DNA 凝胶纯化试剂盒(Omega 公司),质粒提

取试剂盒(QIAGEN 公司)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取 AD 患者静脉血,提取白细胞,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,测定其 A₂₆₀/A₂₈₀ 吸光比值,计算总 RNA 水平。

1.2.2 PRNP 基因的获得 根据 GenBank 上人的 PRNPcDNA 功能全长序列,设计一对引物并导入 Xho I 和 EcoR I 限制性内切酶酶切位点,序列如下:上游引物 5'-CCG CCG CTC GAG CAT GGC GAA CCT TG-3',下游引物 5'-CCG CCG GAA TTC TCC CAC TAT CAG-3',扩增产物长度 759 bp。以总 RNA 中的 mRNA 为模板、Oligo(dT)₂₀ 为引物进行逆转录,合成 cDNA 第一链,并以其为模板,加入 PRNP 基因特异引物进行 PCR 扩增,获得目的基因 PRNP。取 5 μ L 反应产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳分析。

1.2.3 pEGFP-N2-PRNP 重组质粒的构建与鉴定 切胶回收阳性条带,用 DNA 纯化试剂盒纯化,用 Xho I 及 EcoR I 分别双酶切 PRNP 和真核表达载体 pEGFP-N2,电泳线性片段并予以切胶回收、纯化。用 T4 DNA 连接酶连接 pEGFP-N2 载体片段与 PRNP 基因片段,将连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,铺卡那霉素+LB 平板,随机挑取克隆菌落并提取重组质粒,进行紫外分光光度计检测。分别经 Xho I/EcoR I 单酶切和 Xho I+EcoR I 双酶切鉴定,同时取 0.1 μ g 重组质粒作为模板,进

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81100246);海南省自然基金资助项目(811204);海口市重点科技计划项目(2013-52)。作者简介:张海英(1972-),副教授,博士,主要从事神经退行性变及神经损伤研究。

行 PCR 鉴定。酶切产物及 5 μL PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。将含初步鉴定正确的重组质粒送测序得到 pEGFP-N2-PRNP 重组质粒。

1.2.4 转染及转染后鉴定 转染前 1 d 将 SH-SY5Y 细胞接种至 24 孔板中, 1×10^5 个/孔, 使细胞达到 90%~95% 汇合。使用 X-tremeGENE HP DNA Transfection 转染。96 孔板于内, 每孔按照 0.5 μg 质粒和 3 μL 转染试剂分别用 50 μL 无血清 DMEM/F12 培养液稀释后, 室温静置 5 min 后, 将二者轻轻混匀后再置室温静置 30 min, 24 孔板内加入 100 μL 混合复合物。轻轻振荡细胞培养板, 放入 5% CO₂ 培养箱继续培养 4 h 后, 更换含有血清培养基培养, 继续培养 48 h 后加入含 G418 (浓度为 800 μg/mL) 的培养基进行筛选, 建立稳定转染 pEGFP-N2-PRNP 的 SH-SY5Y 细胞细胞株, 应用 Western blot 检测转染后 PRNP 基因表达情况。

2 结 果

2.1 总 RNA 鉴定 提取的 AD 患者外周血白细胞总 RNA, 经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。可见 28、18、5 s 3 条高亮度清晰条带, 未见 DNA 等大分子污染条带, 紫外分光光度计分析, $A_{260/280} = 1.745$ 。见图 1。

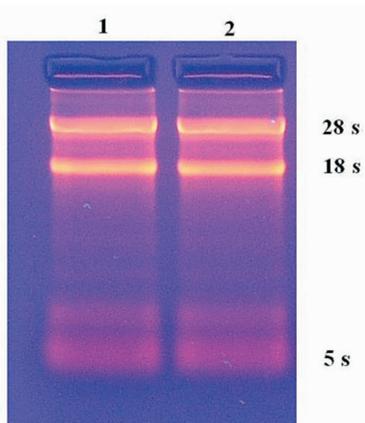
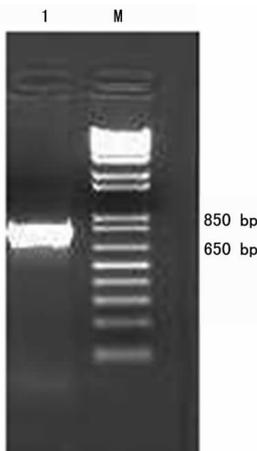


图 1 AD 患者外周血白细胞总 RNA

2.2 RT-PCR 扩增产物人 PRNP 分子质量的鉴定 AD 患者外周血白细胞总 RNA 经 PRNP 上、下游引物 RT-PCR 扩增后, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 650、850 bp 条带处出现特异性扩增条带, 与预期的 759 bp 目的片段大小相符。见图 2。

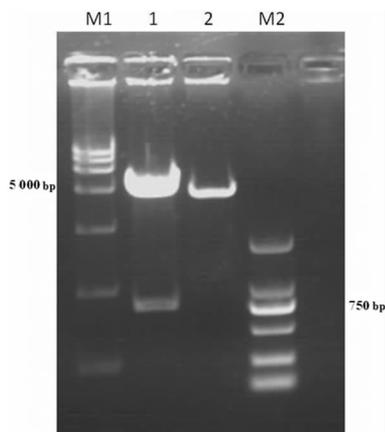


1: RT-PCR 扩增产物; M: DNA 分子标记物。

图 2 人 PRNP 相对分子质量的鉴定

2.3 重组表达载体的酶切鉴定 重组质粒经 Xho I 及 EcoR I 双酶切得到 2 条带, 大小分别为 759、4 700 bp, Xho I 单酶切

得到 1 条带, 可见约 5 000 bp 的 1 条带, 与 pEGFP-N2-PRNP 重组质粒的理论值 (5 459 bp) 大小相符, 将重组质粒命名为 pEGFP-N2-PRNP, 见图 3。经正、反向 DNA 测序, 证实与 Gene Bank 数据库序列完全一致。



M1: 宝生物 15 000 bp 标记物; 1: Xho I 及 EcoR I 双酶切; 2: Xho I 单酶切; M2: 宝生物 DL2000 标记物。

图 3 pEGFP-N2-PRNP 重组质粒酶切鉴定

2.4 转染及转染后鉴定的结果 真核表达载体 pEGFP-N2-PRNP 转染 SH-SY5Y 细胞, 培养 24 h 后在真核细胞内均可见绿色荧光信号, 见图 4。应用 Western blot 检测经 G418 筛选后, SH-SY5Y 细胞中 Prion 蛋白表达较空质粒组明显增强, 见图 5。

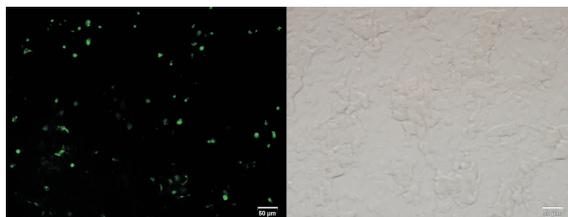
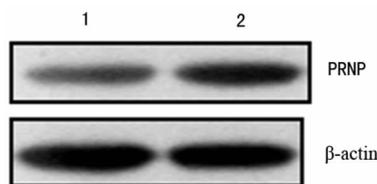


图 4 转染 24 h 重组表达质粒在 SH-SY5Y 细胞中的表达



1: 空质粒组; 2: pEGFP-N2-PRNP 质粒组。

图 5 Western blot 检测 SH-SY5Y 细胞 Prion 蛋白的表达

3 讨 论

目前, 全世界有超过 2 千万的 AD 患者, 然而它的发病机制不清楚, 无有效的治疗手段。从而, 探讨 AD 的发病机制显得尤为重要。AD 的发病机制很复杂, 其中 Aβ 级联学说认为, 淀粉前体样蛋白 (Amyloid precursor protein, APP) 的酶切代谢产物 Aβ, 在 AD 发病早期起主要的作用, 具有神经毒性的 Aβ 在特定脑区聚集是 AD 起始因素。水溶性的 Aβ 逐渐聚集和沉积触发缓慢但致死性的级联反应, 最终导致突触改变、小胶质细胞和星形胶质细胞的激活、可溶的 tau 蛋白变成寡聚体, 而后变成不可溶性的双螺旋细丝和进行性的神经元丢失。Aβ 在大脑皮层内的蓄积是 AD 病理发生过程中一个早期必然过程事件, 超前于其他脑区损伤和临床症状数年^[3-4]。近年来研究认为, AD 患者记忆受损、认知损害与脑内存在小的、Aβ 寡聚体对神经突触的损伤有密切关系, 而与神经元丢失关系不

大^[5-6]。鉴于 A β 寡聚体对神经突触的毒性,推测在神经细胞膜上存在特异性 A β 寡聚体的高亲和受体。

有学者认为,PrP^C是 A β 寡聚体的主要受体,介导了 A β 寡聚体的神经毒性。通过抗-PRNP 抗体可以阻止 A β 寡聚体与 PrP^C的结合,恢复突触可塑性。并且推测以 PrP^C为靶点的药物在 AD 治疗中具有一定的潜在应用价值^[7-9]。相关研究还发现,尽管不能排除细胞膜上存在有其他 A β 寡聚体的受体,例如糖基化终产物受体(RAGE)和 α 7-烟碱乙酰胆碱受体,但 PrP^C可以与 50% 以上的 A β 寡聚体结合^[10-11]。Toyohara 等^[12]研究发现 APP 与 PrP^C同样参与蛋白激酶 C 调节的蛋白质水解过程,并且有毒性的 A β 1-40、A β 1-42 和 PrP^C第 106~126 位多肽片段同样可以触发 Caspase 的级联反应。因此,认为干预它们共同的作用途径可以减轻 APP 和 PrP^C的毒性作用。Taylor 等^[13]认为 PrP^C构型转变为致病性的 PrP^{Sc}和 A β 的沉积及细胞膜上的脂筏有关,推测干预脂筏的形成可能对朊病毒病和 AD 具有一定的治疗作用。Ferreiro 等^[14]研究发现 在朊蛋白病及 AD 中 PrP^C 106~126 和 A β 肽的毒性均导致了神经元的丢失,并且神经元内的 Ca²⁺紊乱和内质网应激有关。提出干预内质网 Ca²⁺水平是治疗 AD 和朊蛋白病的一种潜在手段。

综上所述,有必要深入研究 PrP^C介导 A β 寡聚体神经毒性的作用机制。本研究将人 PRNP 在体外进行扩增并成功构建的重组质粒 pEGFP-N2-PRNP,进而转染 AD 模式细胞,为进一步研究 PRNP 基因在 AD 发病机制中的作用及生物学功能奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, et al. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers [J]. *Nature*, 2009, 457 (7233): 1128-1132.
- [2] Yun SW, Kouznetsova E, Nitschke C, et al. β -Amyloid deposition and prion infection in adult primary brain cell long-term culture model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(3): 520-524.
- [3] Brügger B, Graham C, Leibrecht I, et al. The membrane domains occupied by glycosyl-phosphatidyl inositol anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 7530-7536.
- [4] Mucke L. Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2009, 461 (7266): 895-897.
- [5] Shankar GM, Bloodgood GL, Townsend M, et al. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(11): 2866-2875.
- [6] Wilcox KC, Lacor PN, Pitt J, et al. Amyloid- β oligomer-induced synapse degeneration in Alzheimer's disease [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(6): 939-948.
- [7] Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, et al. Tau protein is required for amyloid {beta}-induced impairment of hippocampal long-term potentiation [J]. *J Neurosci*, 2011, 31 (5): 1688-1692.
- [8] Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, et al. The prion protein as a receptor for amyloid- β [J]. *Nature*, 2010, 466 (7380): E3-5.
- [9] Infante J, Llorca J, Rodero L, et al. Polymorphism at codon 174 of the prion-like protein gene is not associated with sporadic Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 332(3): 213-215.
- [10] Prusiner SB. Prions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(23): 13363-13383.
- [11] Yan SD, Chen X, Fu J, et al. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 1996, 382(6593): 685-691.
- [12] Toyohara J, Hashimoto K. α 7 nicotinic receptor agonists: potential therapeutic drugs for treatment of cognitive impairments in schizophrenia and Alzheimer's disease [J]. *Open Med Chem J*, 2010, 27(4): 37-56.
- [13] Taylor DR, Hooper NM. Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid- β proteins [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18(5): 638-648.
- [14] Ferreiro E, Resende R, Costa R, et al. An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid-beta peptides neurotoxicity [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 23(3): 669-678.

(收稿日期:2014-02-18 修回日期:2014-03-25)

(上接第 2433 页)

- [6] Ito H, Maruyama A, Iwakura K, et al. Clinical implications of the no-reflow phenomenon. A predictor of complications and left ventricular remodeling in reperfused anterior wall myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1996, 93(2): 223-228.
- [7] DeWood MA, Spores J, Notske R, et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 1980, 303 (16): 897-902.
- [8] Vlaar PJ, Svilaas T, van der Horst IC, et al. Cardiac death and reinfarction after 1 year in the Thrombus Aspiration

during Percutaneous coronary intervention in Acute myocardial infarction Study (TAPAS): a 1-year follow-up study [J]. *Lancet*, 2008, 371(9628): 1915-1920.

- [9] Sardella G, Mancone M, Bucciarelli-Ducci C, et al. Thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention improves myocardial reperfusion and reduces infarct size the EXPIRA (Thrombectomy With Export Catheter in Infarct-Related Artery During Primary Percutaneous Coronary Intervention) [J]. *J Am Coll Card*, 2009, 53(4): 309-315.

(收稿日期:2014-02-16 修回日期:2014-03-12)