



脑源性神经营养因子受体trkB基因扩增和真核表达载体的构建

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)于20世纪80年代被发现后,受到人们的广泛关注和研究。BDNF是神经营养因子家族的主要成员之一。在胚胎发育过程中,它可诱导神经前体细胞的定向分化,促进神经系统的成熟和完善;在成体,BDNF则表现出广泛的神经营养和神经保护活性,它可促进神经元对葡萄糖等能量物质的利用,提高细胞 Na^+/K^+ -ATP酶的活性,进而增加 Na^+ 依赖性氨基酸的转运,增强细胞内功能蛋白的合成和利用,对神经元的存活及正常生理功能的维持有着重要的影响。实验证实,该因子对运动神经元、胆碱能神经元及多巴胺能神经元等的作用尤为明显[1][2]。因而,人们认为将BDNF用于帕金森病、阿尔茨海默病及脑、脊髓损伤等疾病的治疗有着广阔的前景[3]。BDNF作用的发挥主要是通过其高亲和力受体trkB完成的[4]。trkB是细胞膜受体,神经系统的不同部位,细胞膜上trkB含量不同,这也决定了它们对BDNF的反应敏感性不同[5]。应用分子克隆的方法将trkB基因导入病损局部的神经细胞,提高trkB的表达水平,增强它们对BDNF的敏感性,对于BDNF治疗作用的发挥有着重要意义。本实验从大鼠脑组织中提取总RNA,应用反转录聚合酶链式反应方法(RT-PCR)获得trkB全长基因片断,通过酶切、纯化、连接等重组方法,构建了带有目的片断的克隆及真核表达重组质粒,为trkB基因治疗的进一步研究提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体与菌株 pMD 18-T载体试剂盒为宝生物工程公司产品,真核表达载体pEGFP-C2由第一军医大学解剖教研室王万山博士惠赠, JM109菌株及DH5 α 为第一军医大学临床解剖学研究所保存。

1.1.2 试剂 Trizol试剂为Gibco公司产品, RT-PCR试剂盒One Step RNA PCR Kit(AMV)、限制性内切酶EcoR I及BamH I、DNA Marker DL 2000、DNA Marker DL 15000、质粒提取试剂盒、Agarose Gel DNA Purification Kit试剂盒均为宝生物工程公司产品, T4 DNA连接酶为New England BioLabs公司产品, X-gal及IPTG为Sigma公司产品。

1.1.3 仪器 PCR仪(UNO II Biometra, 德国), 低温离心机(Heraeus, 德国), Bio-Rad电泳仪及电泳槽(美国), 301-1电热培养箱(上海), SW-CJ-1F净化工作台(江苏 苏州), THZ-C恒温振荡器(江苏 太仓), ZF-90型紫外透射仪(上海)。

1.1.4 实验动物 14 d龄Wistar大鼠由第一军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 从GenBank检索大鼠trkB基因, 针对基因全长, 用primer软件设计两端引物, 上游引物: 5' CGGAATTCATGTCGCCCTGGCCGAGGT G3', 下游引物5' CGGGATCCCAGCCTTGTCTTTCC TTTATCT3'。上、下游引物5'端分别包含EcoR I和BamH I限制性内切酶酶切位点, 扩增产物为1 461 bp。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2.2 脑组织总RNA提取 取14 d龄Wistar大鼠, 引颈处死, 浸入75%酒精5 s。无菌条件下取出完整

的脑组织，放入组织匀浆器，参照Trizol试剂说明提取RNA。紫外分光光度仪测定RNA浓度，琼脂糖凝胶电泳证实RNA无降解。

1.2.3 RT-PCR 取所提取的总RNA进行RT-PCR，反应体系参照One Step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒说明。42 °C 50 min反转录，97 °C 5 min灭活反转录酶AMV；然后94 °C 1 min、55 °C 1 min、72 °C 2 min，30个循环；最后72 °C 10 min。另设一阴性对照，以dH2O代替样品RNA，余相同。反应结束后，取反应液5 μl于1%琼脂糖凝胶电泳，紫外透射仪观察结果。

1.2.4 克隆载体pMD 18-trkB的构建及鉴定 取RT-PCR反应液45 μl，1%琼脂糖凝胶电泳后，用Agarose Gel DNA Purification Kit试剂盒，割胶纯化目的基因片断。按pMD 18-T载体试剂盒说明，将目的基因连接至pMD 18-T克隆载体。取10 μl连接液加入100 μl感受态JM109菌中，常规方法转化后，取200 μl转化菌涂布于表面涂有X-gal和IPTG的琼脂糖平板(含50 μg/ml氨苄青霉素)上，37 °C过夜培养。挑取白色菌落并扩增后，参照质粒提取试剂盒说明提取质粒，用EcoR I和BamH I酶切鉴定，并以质粒为模板，用trkB特异性引物进行PCR，筛选出含有pMD 18-trkB重组质粒的菌落。

1.2.5 真核表达载体pEGFP-C2-trkB的构建及鉴定 分别用EcoR I和BamH I双酶切载体pMD 18-trkB和真核表达载体pEGFP-C2，用Agarose Gel DNA Purification Kit试剂盒提取纯化trkB基因和线性化的pEGFP-C2。根据T4 DNA连接酶说明书配制连接反应体系，16 °C温育过夜。连接产物按常规方法转化DH5α菌感受态，取200 μl转化菌涂布于含30 μg/ml卡那霉素的琼脂糖平板，37 °C培养过夜。挑取存活的菌落，扩增并提取质粒，EcoR I和BamH I双酶切鉴定后，交上海博亚生物技术有限公司测定重组质粒中目的基因的序列。

2 结果

2.1 RT-PCR

将RT-PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，可见一约1 500 bp的特异扩增带，与理论预期值(1 461 bp)一致，阴性对照组无片断扩出(图1)。

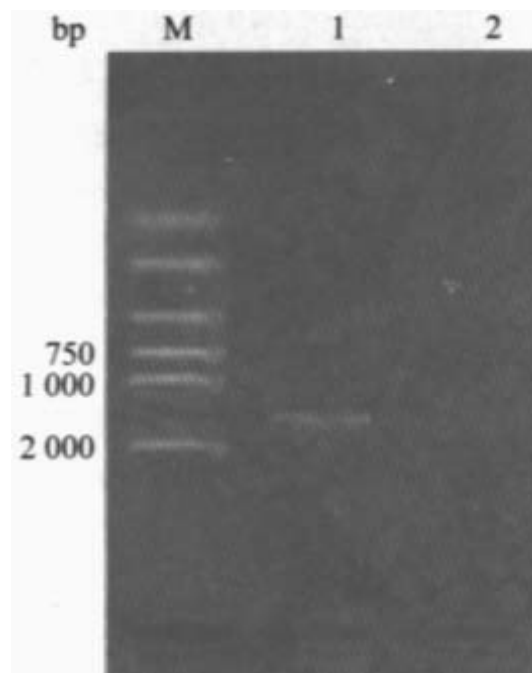


图1 RT-PCR结果

Fig.1 Result of RT-PCR

M: DNA Marker DL 2000; Lane 1: RT-PCR product;

Lane 2: Negative control

2.2 克隆载体pMD 18-trkB的鉴定

挑取白色菌落扩增、提取质粒后，用EcoR I 和BamH I 双酶切，琼脂糖凝胶电泳后观察。假阳性菌落所提取的质粒(空pMD18-T载体)酶切后，仅见一约2 600 bp的条带，这与pMD18-T载体(2 692 bp)大小相符合；重组质粒(pMD 18-trkB)酶切后，可见约2 600、1 500 bp两条带，分别与pMD18-T载体及trkB基因大小一致(图2)。

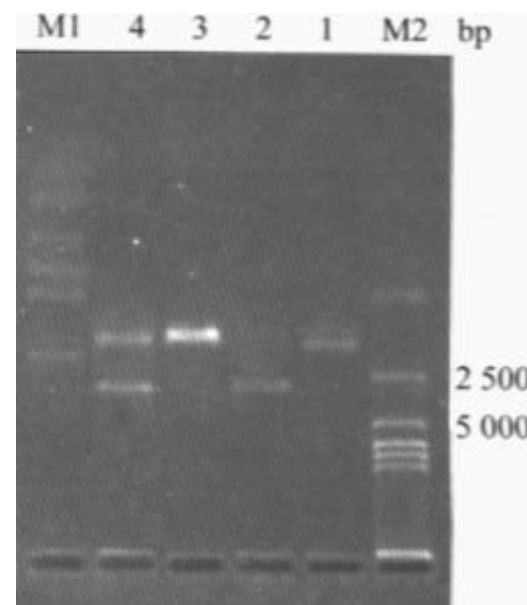


图2 pMD 18-trkB载体构建的凝胶电泳分析

Fig. 2 Gel electrophoresis of the constructed pMD 18-trkB vector

M1: DNA Marker DL 2000; M2: DNA Marker DL 15000; Lane 1: pMD 18-T; Lane 2: pMD 18-T /EcoR I +BamH I ; Lane 3: pMD 18-trkB; Lane 4: pMD 18- trkB/EcoR I +BamH I

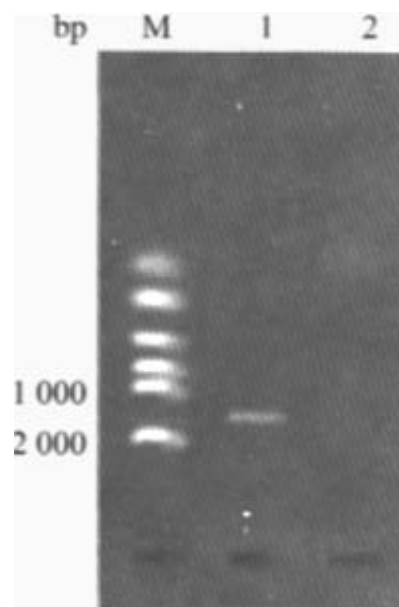


图3 克隆载体pMD 18-trkB的PCR鉴定

Fig. 3 Identification of pMD 18-trkB vector by PCR

M: DNA Marker DL 2000; Lane 1: PCR product of pMD 18-trkB; Lane 2: PCR product of pMD 18-T empty vector

分别以假阳性菌落质粒和重组质粒为模板，用trkB特异引物进行PCR后，电泳观察结果，可见以重组质粒为模板能扩增出约1 500 bp的片断，与目的基因大小一致(图3)。

2.3 真核表达载体pEGFP-C2-trkB的鉴定

经卡那霉素筛选后，扩增存活菌落提取质粒，双酶切，电泳观察，可见假阳性菌落所含质粒(即pEGFP-C2空载体)在琼脂糖中迁移较重组质粒稍快，双酶切后仅在约5 000 bp处见一条带，与pEGFP-C2(4 700 bp)大小基本一致(pEGFP-C2载体上EcoR I 和BamH I 酶切位点间约有20 bp)；pEGFP-C2-trkB酶切后可见两条带，大小约5 000和1 500 bp，分别与pEGFP-C2及trkB大小相一致(图4)。

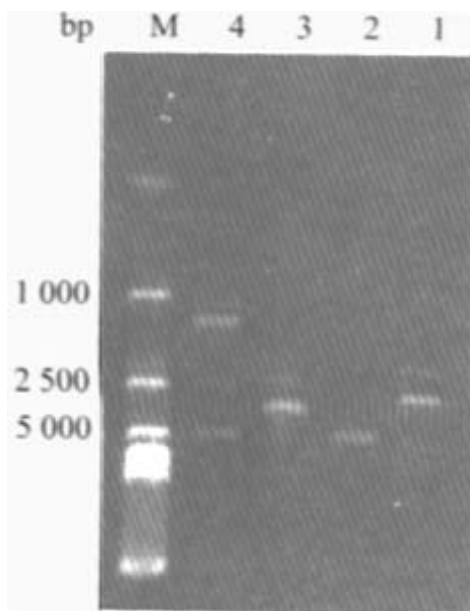


图4 pEGFP-C2-trkB载体构建的凝胶电泳分析

Fig.4 Gel electrophoresis of the constructed pEGFP-C2-trkB vector

M: DNA Marker DL 15000;

Lane 1: pEGFP-C2 vector; Lane 2: pEGFP-C2/EcoR I +BamH I ;

Lane 3: pEGFP-C2-trkB; Lane 4: pEGFP-C2-trkB/ EcoR I +BamH I

测序结果表明，插入的大鼠trkB基因序列与Genbank登录的cDNA序列相同，与绿色荧光蛋白(GFP)报告基因同框表达。

3 讨论

将神经营养因子及其受体的基因转染至病损处神经细胞，或转染雪旺细胞、神经干细胞后再用于移植，是组织工程及基因治疗神经系统疾病的主要思路。构建带有目的基因的真核表达载体往往是整个过程的难点。理想的载体是在转染细胞后，目的基因能长期表达，并使细胞易于筛选和标记追踪。目前，文献中所提及的trkB真核表达载体转染细胞后多用G418进行筛选，但往往缺乏有效的标记来追踪阳性细胞[6]。本研究中我们选用pEGFP-C2载体，该载体带有Neor基因和GFP报告基因[7]，构建pEGFP-C2-trkB转染细胞后可用G418筛选纯化阳性细胞。同时，因trkB基因被同框克隆于GFP报告基因下游(C端)，故直接通过荧光显微镜即可观察到被转染细胞的形态，明确质粒的转染效率及目的基因的表达情况。

在RT-PCR扩增trkB基因过程中，我们采用的是的一步法RT-PCR，即反转录与PCR反应在同一体系中连续完成。因trkB基因相对较长(接近1 500 bp)，我们经多次实验，将反转录温度设定为42 ℃。这一温度较常用温度(50 ℃)低，更有利于cDNA链的延伸。反转录结束后，反转录酶灭活是否充分对下一步PCR反应效率的影响很大。反转录酶与cDNA结合可直接阻碍PCR反应的进行，在长链cDNA扩增中尤为明显。因而，我们设定97 ℃、5 min对该酶进行了充分的灭活。另外，在RT-PCR反应体系的配制中，RNA模板量的多少也很关键。常用紫外分光光度仪检测RNA D(λ)值判断浓度，当其D(λ)值为1.9左右时，一般加1 μl较为合适。我们体会RNA模板量应“宁少勿多”，RNA量过多会增加非特异性扩增的几率。

通过本研究，我们构建了pEGFP-C2-trkB真核表达载体，至于该载体转染细胞效率及其目的基因表达的

情况, 还需进一步研究明确。

(责任编辑: 黄开颜)

参考文献:

- [1] Katz DM. Neuronal growth factors and development of respiratory control[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003, 135(2-3): 155-65.
- [2] Burkhalter J, Fiumelli H, Allaman I, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(23): 8212-20.
- [3] Shen L, Figurov A, Lu B. Recent progress in studies of neurotrophic factors and their clinical implications[J]. *J Mol Med*, 1997, 75(9): 637-44.
- [4] Pezet S, Malcangio M, McMahon SB. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 40(1-3): 240-9.
- [5] Du Y, Fischer TZ, Lee LN, et al. Regionally specific effects of BDNF on oligodendrocytes[J]. *Dev Neurosci*, 2003, 25(2-4): 116-26.
- [6] 马仲才, 吴晓兰, 潘 卫, 等. 脑源性神经营养因子受体trkB在NIH 3T3细胞上的表达[J]. *生命科学研究*, 2001, 5(3): 265-9.
- Ma ZC, Wu XL, Pan W, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor receptor trkB on NIH 3T3 cells[J]. *Life Sci Res*, 2001, 5(3): 265-9.
- [7] 杨明夏, 胡 莺, 沈 波, 等. 抗药性相关糜蛋白酶基因真核表达载体的构建和鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然版)*, 2003, 23(2): 95-7.
- Yang MX, Hu Y, Shen B, et al. Construction and identification of eukaryotic expression plasmid of resistance-related chymotrypsin gene[J]. *Acta Nanjing Med Univ (Nat Sci)*, 2003, 23(2): 95-7.

参考文献:

- [1] Katz DM. Neuronal growth factors and development of respiratory control[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003, 135(2-3): 155-65.
- [2] Burkhalter J, Fiumelli H, Allaman I, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(23): 8212-20.
- [3] Shen L, Figurov A, Lu B. Recent progress in studies of neurotrophic factors and their clinical implications[J]. *J Mol Med*, 1997, 75(9): 637-44.
- [4] Pezet S, Malcangio M, McMahon SB. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 40(1-3): 240-9.
- [5] Du Y, Fischer TZ, Lee LN, et al. Regionally specific effects of BDNF on oligodendrocytes[J]. *Dev Neurosci*, 2003, 25(2-4): 116-26.
- [6] 马仲才, 吴晓兰, 潘 卫, 等. 脑源性神经营养因子受体trkB在NIH 3T3细胞上的表达[J]. *生命科学研究*, 2001, 5(3): 265-9.
- Ma ZC, Wu XL, Pan W, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor receptor trkB on NIH 3T3 cells[J]. *Life Sci Res*, 2001, 5(3): 265-9.
- [7] 杨明夏, 胡 莺, 沈 波, 等. 抗药性相关糜蛋白酶基因真核表达载体的构建和鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然版)*, 2003, 23(2): 95-7.
- Yang MX, Hu Y, Shen B, et al. Construction and identification of eukaryotic expression plasmid of resistance-related chymotrypsin gene[J]. *Acta Nanjing Med Univ (Nat Sci)*, 2003,

回结果列表