

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

黄涛¹ 袁如祥¹ 袁雷² 袁晓丹¹ 袁晓忠² 袁建强² 袁磊² 袁忠¹ 渊第一军医大学珠江医院神经外科袁广东广州 510282 日第一军医大学临床解剖学研究所袁广东广州 510515 冤

摘要目的 构建大鼠脑源性神经营养因子受体 trkB 基因真核表达载体遥方法 根据 trkB 基因已知序列袁设计合成一对引物袁上游引物分别引入 EcoR 玉及 BamH 玉酶切位点袁用反转录 PCR 渊 RT-PCR 冤方法从大鼠脑组织总 RNA 中扩增编码 trkB 的基因片段袁插入克隆载体 pMD 18-T 袁构建 pMD 18-trkB 载体遥经 EcoR 玉尧BamH 玉双酶切出 trkB 基因片段袁再克隆至载体 pEGFP-C2 中构建 pEGFP-C2-trkB 真核表达载体遥结果 trkB 基因 RT-PCR 扩增产物大小约 1 461 bp 袁真核表达载体经酶切鉴定表明为正确重组子袁基因测序结果与已知序列基本吻合遥结论 成功扩增出完整 trkB 基因袁构建了真核表达载体 pEGFP-C2-trkB 遥

关键词 脑源性神经营养因子 基因表达 重组遗传 分子克隆

中图分类号 394.2 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)12-1283-03

Amplification of brain-derived neurotrophic factor receptor trkB gene and construction of its eukaryotic expression vector

HUANG Tao¹, XU Ru-xiang¹, WU Lei², JIANG Xiao-dan¹, QIU Xiao-zhong², QIN Jian-qiang², YU Lei², XU Zhong¹
¹Department of Neurosurgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China;
²Institute of Clinical Anatomy, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To construct a recombinant eukaryotic expression vector of rat brain-derived neurotrophic factor receptor trkB gene. Methods Using the total RNA extracted from rat brain tissue as the template, the trkB gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with a pair of specific primers containing the restriction sites of EcoR 玉 and BamH 玉. The amplified fragment of trkB gene was digested with EcoR 玉 and BamH 玉, and then subcloned into cloning vector pMD18-T and then expression vector pEGFP-C2. The recombinant plasmid was identified by restriction endonuclease analysis and PCR. Results The amplified DNA fragment was about 1 461 bp in length, and enzyme digestion and PCR analysis showed that trkB gene had been successfully cloned into the vectors pMD18-T and pEGFP-C2. Conclusion The trkB gene of rat has been successfully amplified and cloned into the eukaryotic expression vector pEGFP-C2.

Key words: brain-derived neurotrophic factor; gene expression; recombination, genetic; cloning, molecular

脑源性神经营养因子渊rain-derived neurotrophic factor, BDNF 冤于 20 世纪 80 年代被发现后袁受到人们的广泛关注和研究遥BDNF 是神经营养因子家族的主要成员之一遥在胚胎发育过程中袁它可诱导神经前体细胞的定向分化袁促进神经系统的成熟和完善 在成体袁DNF 则表现出广泛的神经营养和神经保护活性袁它可促进神经元对葡萄糖等能量物质的利用袁提高细胞 Na⁺/K⁺-ATP 酶的活性袁进而增加 Na⁺ 依赖性氨基酸的转运袁增强细胞内功能蛋白的合成和利用袁对神经元的存活及正常生理功能的维持有着重要的影响遥实验证实袁该因子对运动神经元尧胆碱能神经元

及多巴胺能神经元等的作用尤为明显 渊袁因而袁人们认为将 BDNF 用于帕金森病尧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 渊遥BDNF 作用的发挥主要是通过其高亲和力受体 trkB 完成的 渊遥trkB 是细胞膜受体袁神经系统的不同部位袁细胞膜上 trkB 含量不同袁这也决定了它们对 BDNF 的反应敏感性不同 渊遥应用分子克隆的方法将 trkB 基因导入病损局部的神经细胞袁提高 trkB 的表达水平袁增强它们对 BDNF 的敏感性袁对于 BDNF 治疗作用的发挥有着重要意义遥本实验从大鼠脑组织中提取总 RNA 袁用反转录聚合酶链式反应方法 渊 RT-PCR 冤获得 trkB 全长基因片段袁通过酶切尧纯化尧连接等重组方法袁构建了带有目的片段的克隆及真核表达重组质粒袁为 trkB 基因治疗的进一步研究提供了基础遥

收稿日期 003-09-23

基金项目 广东省科技计划项目 渊003A3020304 冤 广东省团队项目 渊粤科基办 2000 渊5 冤 军队十五重点项目 渊1ZD54 冤

Supported by Sci-Tech Development Plans of Guangdong Province 渊003A3020304 冤 Team Research Project of Guangdong Province and Key Project Foundation of the Tenth Five-year Plan of PLA 渊1ZD54 冤
作者简介 黄涛 渊975- 冤男 袁安徽颍上人 袁998 年毕业于第一军医大学 在读博士研究生 电话 20-61643270 袁 e-mail: arteries@263.net

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袁M109 菌株及 DH5琢为第一军医大学临床解剖学研究所保存遥

1.1.2 试剂 Trizol 试剂为 Gibco 公司产品袁T-PCR 试剂盒 One Step RNA PCR Kit渊MV冤限制性内切酶 EcoR玉及 BamH玉尧DNA Marker DL 2000尧DNA Marker DL 15000尧质粒提取试剂盒尧agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒均为宝生物工程公司产品袁4 DNA 连接酶为 New England BioLabs 公司产品袁-gal 及 IPTG 为 Sigma 公司产品遥

1.1.3 仪器 PCR 仪渊NO域 Biometra 德国冤低温离心机渊eraeus 德国冤Bio-Rad 电泳仪及电泳槽渊美国冤01-1 电热培养箱 渊上海冤W-CJ-1F 净化工作台 渊江苏 苏州冤HZ-C 恒温振荡器 渊江苏 太仓冤ZF-90 型紫外透射仪渊上海冤

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遥

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 从 GenBank 检索大鼠 trkB 基因袁针对基因全长袁用 promoter 软件设计两端引物袁上游引物 5'CGGAATTCATGTCGCCCTGGCCGAGGTG3'袁下游引物 5'CGGGATCCCAGCCTTGTCTTTCC TTTATCT3'遥上游引物 5'端分别包含 EcoR玉和 BamH玉限制性内切酶酶切位点袁扩增产物为 1461bp遥引物由上海博亚生物技术有限公司合成遥

1.2.2 脑组织总 RNA 提取 取 14 d 龄 Wistar 大鼠袁引颈处死袁入 75%酒精 5 s遥无菌条件下取出完整的脑组织袁放入组织匀浆器袁参照 Trizol 试剂说明提取 RNA遥紫外分光光度仪测定 RNA 浓度袁琼脂糖凝胶电泳证实 RNA 无降解遥

1.2.3 RT-PCR 取所提取的总 RNA 进行 RT-PCR 袁反应体系参照 One Step RNA PCR Kit渊MV冤试剂盒说明遥2 益 50 min 反转录袁7 益 5 min 灭活反转录酶 AMV曰然后 94 益 1 min尧5 益 1 min尧2 益 2 min袁0 个循环曰最后 72 益 10 min遥另设一阴性对照袁以 dH₂O 代替样品 RNA 袁相同遥反应结束后袁取反应液 5 滋于 1% 琼脂糖凝胶电泳袁紫外透射仪观察结果遥

1.2.4 克隆载体 pMD 18-trkB 的构建及鉴定 取 RT-PCR 反应液 45 滋袁% 琼脂糖凝胶电泳后袁用 Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒袁割胶纯化目的基因片断遥按 pMD 18-T 载体试剂盒说明袁将目的基因连接至 pMD 18-T 克隆载体遥取 10 滋连接液加入 100 滋感受态 JM109 菌中袁常规方法转化后袁取 200 滋转化菌涂布于表面涂有 X-gal 和 IPTG 的琼脂糖平板渊含 50 滋/ml 氨苄青霉素冤上袁7 益过夜培养遥

挑取白色菌落并扩增后袁参照质粒提取试剂盒说明提取质粒袁用 EcoR玉和 BamH玉酶切鉴定袁并以质粒为模板袁用 trkB 特异性引物进行 PCR袁筛选出含有 pMD 18-trkB 重组质粒的菌落遥

1.2.5 真核表达载体 pEGFP-C2-trkB 的构建及鉴定

分别用 EcoR玉和 BamH玉双酶切载体 pMD 18-trkB 和真核表达载体 pEGFP-C2袁用 Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒提取纯化 trkB 基因和线性化的 pEGFP-C2遥根据 T₄ DNA 连接酶说明书配制连接反应体系袁6 益温育过夜遥连接产物按常规方法转化 DH5琢菌感受态袁取 200 滋转化菌涂布于含 30 滋/ml 卡那霉素的琼脂糖平板袁7 益培养过夜遥挑取存活的菌落袁扩增并提取质粒袁用 EcoR玉和 BamH玉双酶切鉴定后袁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遥

2 结果

2.1 RT-PCR

将 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳袁可见一约 1 500 bp 的特异扩增带袁与理论预期值渊461 bp冤一致袁阴性对照组无片断扩出渊图 1冤

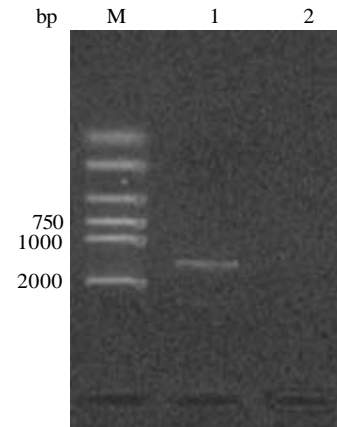


图 1 RT-PCR 结果
Fig.1 Result of RT-PCR
M: DNAMarkerDL2000;
Lane1:RT-PCRproduct;
Lane2:Negative control

2.2 克隆载体 pMD 18-trkB 的鉴定

挑取白色菌落扩增尧提取质粒后袁用 EcoR玉和 BamH玉双酶切袁琼脂糖凝胶电泳后观察遥阳性菌落所提取的质粒渊pMD18-T 载体冤酶切后袁可见一约 2 600 bp 的条带袁与 pMD18-T 载体渊692 bp冤大小相符合曰重组质粒渊MD18-trkB冤酶切后袁可见约 2600 尧1 500 bp 两条带袁分别与 pMD18-T 载体及 trkB 基因大小一致渊图 2冤

分别以假阳性菌落质粒和重组质粒为模板袁用 trkB 特异引物进行 PCR 后袁电泳观察结果袁可见以重组质粒为模板能扩增出约 1 500 bp 的片断袁与目的基因大小一致渊图 3冤

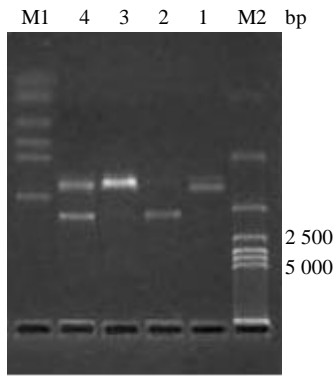


图 2 pMD 18-trkB 载体构建的凝胶电泳分析
Fig.2 Gel electrophoresis of the constructed pMD 18-trkB vector

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

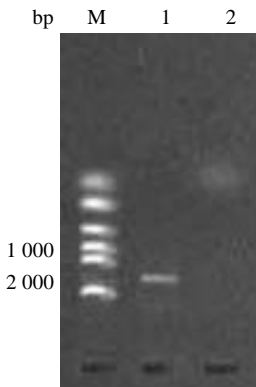


图 3 克隆载体 pMD 18-trkB 的 PCR 鉴定

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

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，酶切电泳观察可见假阳性菌落所含质粒。pEGFP-C2 空载体在琼脂糖中迁移较重组质粒稍快，酶切后仅在约 5 000 bp 处见一条带。pEGFP-C2 载体上 EcoRⅡ和 BamHⅠ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。

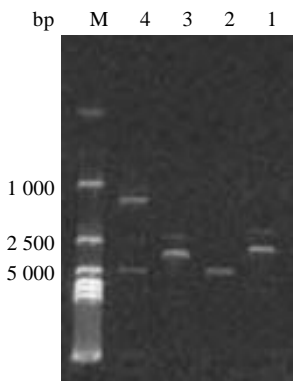


图 4 pEGFP-C2-trkB 载体构建的凝胶电泳分析

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/EcoRⅡ+BamHⅠ; Lane 3: pEGFP-C2-trkB; Lane 4: pEGFP-C2-trkB/EcoRⅡ+BamHⅠ

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。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。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，末端可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 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 浓度，判断浓度。当其 D₂₆₀ 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。

参考文献

咱暂 Katz DM. Neuronal growth factors and development of respiratory control.咱暂 Respir Physiol Neurobiol, 2003, 135(2-3): 155-65.
咱暂 Burkhalter J, Fiumelli H, Allaman I, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons.咱暂 J Neurosci, 2003, 23(23): 8212-20.
咱暂 Shen L, Figurov A, Lu B. Recent progress in studies of neurotrophic factors and their clinical implications.咱暂 J Mol Med, 1997, 75(9): 637-44.
咱暂 Pezet S, Malcangio M, McMahon SB. BDNF: a neuromodulator in

后衰 CD4⁺ 及 CD8⁺ 初始 T 细胞产量增加趋势较为明显且而 BMT 与 PBSCT 相比较而言前者的 CD4⁺ 及 CD8⁺ 初始 T 细胞增长明显不如后者迅速衰即接受 PBSCT 患者的免疫重建恢复较 BMT 的患者要显著且总体而言接受移植之后的患者衰 CD4⁺CD45RA⁺ 的细胞恢复缓慢衰而 CD8⁺CD45RA⁺ 细胞在 1 个月之内便可达到移植前水平遥

NK 细胞是淋巴细胞中最先被移植衰也是最快恢复的遥 T 细胞虽也是很快被移植衰且 CD3⁺T 细胞在恢复到正常水平前至少需要 6~9 个月时间衰而这些 CD3⁺T 细胞主要包含的是 CD8⁺T 细胞衰 CD4⁺T 细胞水平在 BMT 1 年后都偏低衰这与我们的研究结果相一致遥而初始 T 细胞衰 CD4⁺CD45RA⁺ 也偏低衰说明新生移植 T 细胞最初阶段主要是来源于干细胞输注的成熟 T 细胞的增生衰而不是从造血祖细胞中分化的新生 T 细胞衰这一结论与 Mette 等^[10] 进行的研究不谋而合衰同时也与先前所证实的在移植后早期存在一种非常有限的 TCR 重排过程是相一致的^[11]遥而 CD8⁺CD45RA⁺ 细胞在一个月之内恢复到正常水平衰 CD4⁺CD45RA⁺ 细胞在 6~12 个月后开始提高衰表明从未分化的造血祖细胞中产生的新生 T 细胞衰有助于移植后 T 细胞免疫功能的恢复衰同时也显示了经过大剂量治疗后的胸腺衰依然维持着促进成人 T 细胞免疫重建的能力遥

Allo-HSCT 的患者不可避免受到移植植物抗宿主病的影响衰其胸腺恢复能力自然不如 auto-HSCT 的患者衰而 PBSCT 后患者的免疫重建恢复比 BMT 迅速衰机理尚不清楚衰但先前相关研究证明衰 CD4⁺ 与 CD8⁺ 初始 T 细胞在移植之后的产量与 PBSCT 中输

入的移植物的数量有一定的相关性衰而 BMT 后初始 T 细胞数量与 BMT 中输入的量并无相关性^[12]遥

对于 CD4⁺ 或 CD8⁺ 初始 T 细胞的检测衰只能间接地说明其胸腺再生输出功能恢复的进程衰且无法直接定量胸腺再生输出产量衰所以寻找一种直接的胸腺再生功能的标志衰即初始 T 细胞的标志衰利用 T 细胞受体重排时产生的 DNA 产物与新生 T 细胞密切相关性进行检测是今后研究的重要任务遥这对于评价集中化疗后的免疫重建的研究衰免疫缺陷相关治疗和证明胸腺功能的动态性研究方面非常重要遥

参考文献

- 咱暂 Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection 咱暂 Nature, 1998, 396(6712): 690-5.
- 咱暂 沈柏均. 人类脐血咱暂天津科学技术出版社, 1995. 69.
- 咱暂 Ephraim P, Hochberg, Antoinette C, et al. Quantitation of T-cell neogenesis in vivo after allogeneic bone marrow transplantation in adults咱暂 Blood, 2001, 98(4): 1116-21.
- 咱暂 Mette D, Hazenberg, Sigrid A, et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events咱暂 Blood, 2002, 99(9): 3449-53.
- 咱暂 Hatzakis A, Touloumi G, Karanicolas R, et al. Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease 咱暂 Lancet, 2000, 355 (9204): 599-5.
- 咱暂 AL-Hrathi L, Marchetti G, Steffens GM. Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) 咱暂 J Immunol Med, 2000, 237: 187.
- 咱暂 Ichihara Y, Hirai M, Kurosawa Y, et al. Two Subsets of Naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood咱暂 J Exp Med, 2002, 195(6): 789-4.

渊上接 1285 页冤

- nociceptive pathways咱暂 Brain Res Brain Res Rev, 2002, 40(1-3): 240-9.
- 咱暂 Du Y, Fischer TZ, Lee LN, et al. Regionally specific effects of BDNF on oligodendrocytes咱暂 Dev Neurosci, 2003, 25(2-4): 116-26.
- 咱暂 马仲才, 吴晓兰, 潘卫, 等. 脑源性神经营养因子受体 trkB 在 NIH 3T3 细胞上的表达咱暂 生命科学, 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咱暂 Life Sci Res, 2001, 5

(3): 265-9.

- 咱暂 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咱暂 南京医科大学学报咱自然版冤 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咱暂 Acta Nanjing Med Univ (Nat Sci), 2003, 23(2): 95-7.

责任编辑 隋开颜 冤