

应用 RACE 法分离和克隆猪 GPX2 基因研究

赵华^{1,2}, 周继昌², 李俊刚¹, 赵莹², 王康宁²

(1. 四川农业大学未来农业与人类健康研究中心, 四川成都625014; 2. 四川农业大学动物营养研究所, 四川成都625014)

摘要 [目的] 运用分子生物学技术克隆猪 GPX2 基因。[方法] 以猪十二指肠总 RNA 为模板, 根据人、大鼠、小鼠、牛、狗 GPX2 基因同源序列分析, 设计兼并引物对, 采用 RT-PCR 技术扩增获得了1段330bp 的猪 GPX2 基因序列。根据获得的已知序列分别设计引物, 采用 3-RACE 和 5-RACE 技术手段分离、克隆猪 GPX2 基因。并对所得基因进行基因序列分析。[结果] 该试验成功克隆分离了1段长924 bp 的 mRNA 序列, 该序列包含完整3-末端, 与人、鼠、牛、狗 GPX2 基因具有较高的序列同源性, 并在基因第114~116 位置具有编码硒代半胱氨酸残基(Sec) 的密码子 TGA。[结论] 序列分析比对的结果表明克隆的基因就是猪 GPX2 基因(NCBI GeneBank 数据库序列号为 DQ98982)。

关键词 基因克隆; 猪; GPX2; RACE; RT-PCR

中图分类号 S821.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-07586-03

Study on the Cloning and Isolation of *sus scrofa* GPX2 Gene by RACE Method

ZHAO Hua et al (The Center of Future Agriculture for Human Health, Sichuan Agriculture University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract [Objective] Using molecular biotechnology to clone the *sus scrofa* GPX2 gene. [Method] Using total RNA of *sus scrofa* duodenum as template, degenerated primer pairs were designed according to the homology alignment analysis of GPX2 gene of human, rat, mouse, dog and cattle. A *sus scrofa* GPX2 gene sequence of 330 bp was obtained by RT-PCR application method. Primers were designed respectively according to the known sequence, *sus scrofa* GPX2 gene was isolated and cloned by 3-RACE and 5-RACE method and analyzed the gene sequence. [Result] A mRNA sequence of 924 bp was successfully cloned and isolated in this research. This sequence contained complete 3' end and had higher sequence homology with human, mouse, cattle and dog GPX2 gene, and there was codon called TGA which encoding Sec on the position of No. 114-116 gene. [Conclusion] Sequence alignment analysis showed that the cloned gene was *sus scrofa* GPX2 gene (NCBI GenBank database, the sequence number was DQ98982).

Key words Gene clone; *sus scrofa* GPX2; RACE; RT-PCR

谷胱甘肽过氧化物酶(GPX) 是一类含硒的蛋白, 是体内重要的抗氧化酶, 起清除体内过氧化氢、脂及磷脂自由基, 保护膜结构、脂蛋白、DNA 生物大分子的作用^[1]。GPX 在其活性中心含1个硒代半胱氨酸残基(Selenocysteine, Sec), Sec 是由密码子 UGA 编码, 而 UGA 在生物系统中是一个终止信号, 其识别需要特殊的机制^[2]。GPX2 是谷胱甘肽过氧化物酶家族重要的一员, 具有组织特异性, 主要分布在动物胃肠道, 被认为在胃肠道抗氧化防御系统中起重要作用, 并可能在防御结肠癌中起一定作用^[3-4]。目前, 在人、鼠等部分物种中已经分离获得了 GPX2 的基因序列, 但在猪中, 由于国内外研究相对较少, 其基因序列还未知。因此, 该研究根据 GenBank 已经报道的人、大鼠、小鼠、牛、狗 GPX2 mRNA 序列同源性比对分析, 设计兼并引物对, 以猪十二指肠总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术, 获得了1段猪 GPX2 基因序列, 在此基础上采用 3-RACE 和 5-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 技术分离、克隆了猪 GPX2 基因, 为进一步研究该基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物材料、菌株与质粒。HC 猪十二指肠样品采自四川农业大学动物营养研究所试验场, 采样后迅速液氮冷冻保存备用。大肠杆菌 JM109 菌株由该实验室保存。克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物公司。

1.1.2 酶与试剂。Taq 聚合酶、TaKaRa EX Taq HS、dNTP、T4DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒、5-full RACE core set、3-full RACE core set、PCR 产物纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA

Marker DL2000、Agarose Regular 购自大连宝生物公司; 总 RNA 提取试剂盒 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; 氨苄青霉素、焦碳酸二乙酯 (DEPC) 购自北京天根公司; Tryptone、Yeast Extract 购自 Oxoid 公司。其他常规生化试剂为国产分析纯。引物由上海生工公司合成, 测序由上海英俊公司完成。

1.1.3 培养基。LB 培养基组成见文献[5]。

1.2 方法

1.2.1 猪十二指肠总 RNA 提取。所用塑料耗材经 0.1 ml/L 的 DEPC 溶液 37℃ 浸泡处理。过夜后, 经 121℃ 高压灭菌 30 min 以去除残余的 DEPC。猪十二指肠样品用液氮研磨成粉末, 称取粉末约 100 mg, 采用 Invitrogen 公司 TRIZOL 试剂盒提取总 RNA。用紫外分光光度计测定 RNA 含量 A_{260} : A_{280} , 并立即使用或于 -80℃ 冰箱保存。提取的总 RNA 采用 1% 甲醛变性琼脂糖电泳检测。

1.2.2 引物设计。根据 GenBank 已经报道的人、大鼠、小鼠、牛、狗 GPX2 mRNA 序列同源性比对分析结果, 设计兼并引物对 [P1: GGACATCAGGAGAACTGTCAGAA 和 P2: TTGATGTCAGGCTC (AG) ATGTTGATG], 在 RT-PCR 扩增获得 1 段序列并测序后, 根据测序结果分别设计引物: X-RT, (P) AAGGTGGGCTGGA; X2F1, GAACAGCCTCAAGTACGTCCGC; X2F2, AGCCTCAAGTACGTCCGCCCTGG; X2R1, CAGGATCTCCTCAT-TCTGACAGTTC; X2R2, ATCTCCTCATTTCTGACAGTTCTCCT 进行 5-RACE 和 3-RACE 扩增 GPX2 基因。

1.2.3 RT-PCR 扩增。10 μ l RT 反应体系组成为: MgCl₂ 2.0 μ l, 10 \times RT Buffer 1 μ l, RNase Free dH₂O 3.75 μ l, dNTP Mixture 1 μ l, RNase Inhibitor 0.25 μ l, AMV Reverse transcriptase 0.5 μ l, Cligo dT-Adaptor primer 0.5 μ l, total RNA 1 μ g。反转录的条件为: 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 95℃ 5 min, 5℃ 5 min。

50 μ l PCR 反应体系组成为: 5 \times PCR Buffer 10 μ l, dH₂O 33.75 μ l, TaKaRa EX Taq HS 0.25 μ l, 引物 1 (10 μ mol/l) 0.5

作者简介 赵华(1974-), 男, 四川石棉人, 博士, 讲师, 从事分子生物学与营养学研究。

收稿日期 2008-03-28

引物2(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μl 。加入上述 RT 反应液5 μl 进行 PCR 扩增, 条件为: 94 预变性5 min, 94 变性30 s, 58 退火30 s, 72 延伸1 min, 35 个循环后, 72 延伸10 min。反应结束后, 取5 μl PCR 反应产物采用1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收与目的片段大小相近的条带, 具体操作步骤按试剂盒说明进行。

5-RACE 和3-RACE 分别采用 TaKaRa 5-full RACE core set 和3-full RACE core set, 按照试剂盒说明书进行操作^[6]。5-RACE 采用的引物为 X-RT、X2F1、X2F2、X2R1 和 X2R2; 3-RACE 采用的引物为 X2F1 和试剂盒里的3-adaptor 引物。

1.2.4 TA 克隆。 采用 pMD18-T 载体进行 TA 克隆, 将用胶回收试剂盒回收的 PCR 产物, 与 pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶混合。10 μl 反应体系的组成为: pMD18-T Vector DNA 1 μl , Insert DNA 4 μl , Solution I 5 μl 。16 连接过夜, 并转化大肠杆菌 JM109 的感受态细胞, 在含 X-Gal IPTG、Amp 的 LB 培养基上, 37 培养过夜直至长出白色菌落。

1.2.5 感受态细胞的制备、重组质粒转化大肠杆菌。 参照

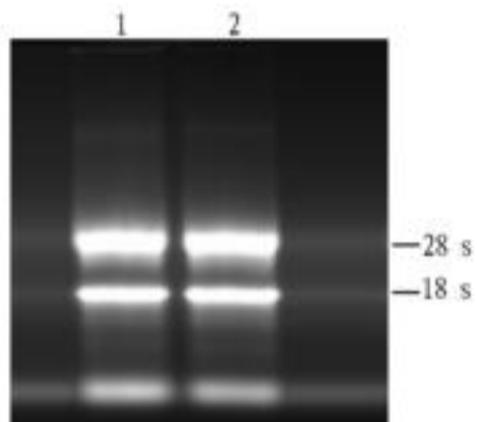
文献[7]进行。

1.2.6 阳性克隆的筛选。 挑选若干白色菌落, 用10 μl dH₂O 混合后, 取1 μl 菌液采用相应的引物进行 PCR 检测。检测条件为25 μl 反应体系, 其组成为: 菌液1 μl , 上游引物1 μl , 下游引物1 μl , dNTP(2.5 mmol/L) 2 μl , MgCl₂(25 mmol/L) 1.5 μl , 10 \times Buffer 2.5 μl , Taq 0.25 μl , 加 dH₂O 至25 μl 。反应条件为94 预变性5 min, 94 变性30 s, 56 退火30 s, 72 延伸0.5~1 min, 35 个循环, 72 延伸10 min。取5 μl 反应产物电泳检测。

1.2.7 DNA 测序和序列分析。 得到的阳性克隆经 PCR 验证后, 将阳性菌穿刺培养后送上海英俊公司测序。DNA 测序采用 ABI 公司的3730 型全自动 DNA 测序仪。对测序结果采用 Mitalin 软件进行 cDNA 序列比对分析^[8]。

2 结果与分析

2.1 猪十二指肠总 RNA 提取 采用美国 Invitrogen 公司的试剂盒提取猪十二指肠总 RNA, 提取的总 RNA 经甲醛变性电泳检测, 结果如图1 所示。



注: 1, 2 分别猪十二指肠总 RNA 的提取样品。

Note: 1 and 2 stand for extraction samples of total RNA in *Sus scrofa* duodenum.

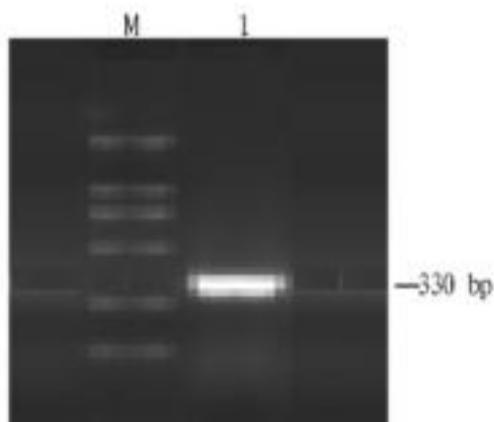
图1 猪十二指肠总 RNA 的提取结果
Fig.1 Extraction result of total RNA of *Sus scrofa* duodenum

由图1 可知, 所提取的 RNA 28S 和18S 的带型较好, 亮度比接近2:1, 此外, $A_{260}/A_{280} = 2.01$, 说明 RNA 完整性很好, 在提取过程中没有降解, 纯度较高, 可以用于 RT-PCR 扩增。

2.2 猪 GPX2 基因片段兼并引物扩增 在反转录合成第1链 cDNA 后, 以反转录产物为模板, 采用兼并引物对 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 扩增出1 条约330 bp 的条带(图2), 经 TA 克隆测序分析后发现, 该片段正是目的基因片段。

2.3 GPX2 基因的5-RACE 和3-RACE 克隆分析 在获得1 段已知 GPX2 基因片段的基础上, 设计反转录引物 X-RT 和巢氏引物对(Nest primers): X2F1/X2R1 和 X2F2/X2R2, 采用 TaKaRa 5-full RACE core set 扩增 GPX2 基因片段5-端序列, 同时用引物对 X2F1/3-adaptor 以第一链 cDNA 为模板扩增 GPX2 基因3-端序列。经巢氏扩增后, 用引物对 X2F2/X2R2 扩增出1 条约300 bp 的目的基因片段(图3 第2 泳道), 用 X2F1/3-adaptor 引物对扩增出了1 条约700 bp 的目标基因条带(图3 第1 泳道)。经 TA 克隆并测序验证后, 上述片段正是猪 GPX2 目标基因片段。

2.4 GPX2 基因序列分析 克隆测序的5-端片段和3-端片段经序列拼接后, 获得了1 条924 bp 的 GPX2 基因 mRNA 序

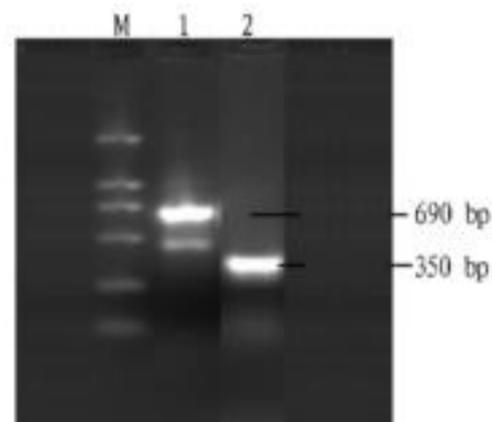


注: M 为 marker; 1 为 gpX2 RT-PCR 片段。

Note: M. Marker; 1. gpX2 RT-PCR fragment.

图2 GPX2 目的基因片段 RT-PCR 扩增结果

Fig.2 RT-PCR amplification of GPX2 fragment



注: M 为 marker; 1 为 GPX2 3-RACE 产物, 2 为 GPX2 5-RACE 产物。

Note: M. Marker; 1. GPX2 3-RACE product; 2. 5-RACE product of GPX2.

图3 GPX2 基因 RACE 扩增结果
Fig.3 Result of RACE amplification of GPX2 gene

列, 该序列3-末端完整, 距5-端起始密码子 ATG 约100 bp, 将该基因提交 NCBI GenBank 数据库, 序列编号为 DQ98982。该基因在第114~116 位置序列为 TGA, 编码一个硒代半胱氨酸残基(Sec)。Mitalin 比对分析显示, 该基因与人、鼠、牛、狗等物种 GPX2 基因有很高的序列同源性(图4), 进一步证明克隆的基因就是猪 GPX2 基因。

3 结论

(1) 通过基因序列同源性比对, 设计相应的兼并引物, 应用 RT-PCR 手段成功克隆了1 段约330 bp 猪 GPX2 基因片段。

(2) 在获得1 段已知序列的 GPX2 基因片段的基础上, 设计相应引物, 采用 RACE 的技术手段, 获得了 GPX2 基因5-端部分序列和3-端全长序列。

(3) 序列拼接后获得了1 条长924 bp 的 GPX2 基因 mRNA 序列, 该序列与人、鼠、牛、狗 GPX2 基因具有很高的序列同源性, 并在该基因第114~116 位置发现具有编码硒代半胱氨酸残基(Sec) 的密码子 TGA, 证明分离克隆的基因就是猪 GPX2 基因, 其在 GenBank 数据库中的编号为 DQ98982。

(4) 该研究成功克隆了猪 GPX2 基因序列, 为进一步研究

其功能等奠定了基础。

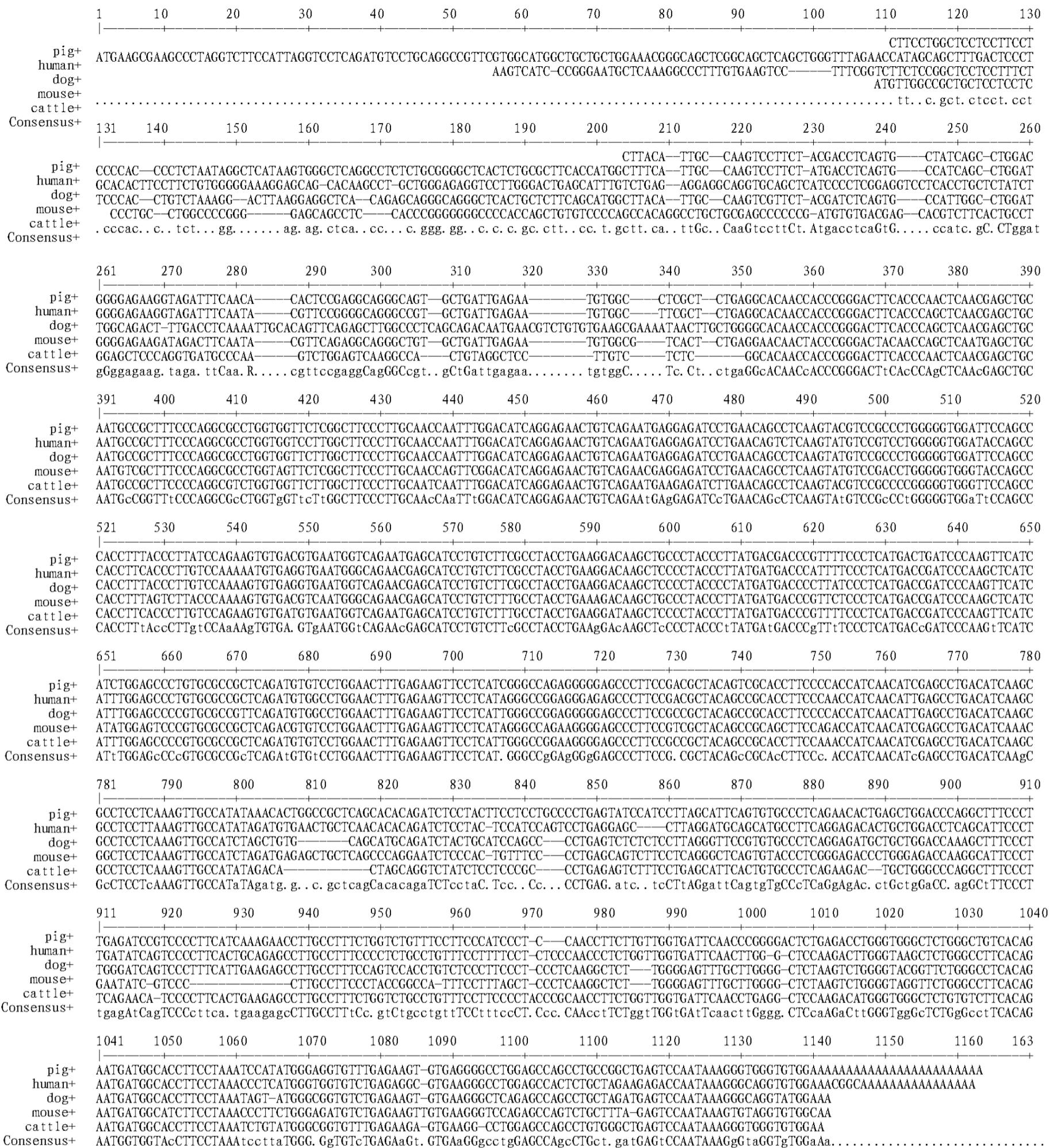


图4 猪 GPX2 基因序列同源性比对分析

Fig.4 Hbnology analysis of Sus scr ofa GPX2 gene sequence

参考文献

[1] BRIGLIUS FLOHE R. Tissue specific functions of individual glutathione peroxidases[J]. Free Radic Bd Med, 1999, 27: 951 - 965.

[2] LOWS C, BERRY MJ. Knowing when to stop: Selenocysteine incorporation in eukaryotes[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 203 - 208.

[3] ESWORTHY R S, SWDEREK K M, HO Y S, et al. Selenum dependent glutathione peroxidase G is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1381: 213 - 236.

[4] CHU F F, ESWORTHY R S, HO Y S, et al. Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX G[J]. Bonad Environ Si, 1997, 10: 156 - 162.

[5] AUSUBEL F M, KINGSTON R E, SEDMAN J G. 精确分子生物学实验指南[M]. 马学军, 舒跃龙, 译 4 版. 北京: 科学出版社, 2005: 2 - 3.

[6] FROHMAN MA, DUSH M K, MARIN G R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene specific oligonucleotide primer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 8998 - 9002.

[7] SAMBROOKI, RUSSELL D W. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001.

[8] CORPET F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 16(22): 10881 - 10890.