

[文章编号] 1000-4718(2005)12-2452-05

应用重组 PCR 技术构建人单核细胞趋化蛋白-1cDNA 的突变体-hμMCP-1(7ND)*

仲琳¹, 张运¹, 张梅¹, 季晓平¹, 陈文强¹, 李大庆¹,
张岩², 张冰², 杨军³, 刘少荣³

(¹ 山东大学齐鲁医院心内科, ²山东大学医学院分子生物学实验室, 山东 济南 250012;

³烟台毓璜顶医院, 山东 烟台 264000)

[摘要] 目的:探讨用重组 PCR 技术对人单核细胞趋化蛋白-1(hμMCP-1)基因 cDNA 进行缺失突变,构建 N 末端缺失 7 个氨基酸的编码序列 hμMCP-1 突变体-hμMCP-1(7ND)cDNA,以期实现 7ND 基因治疗抑制 MCP-1 活性。方法:根据缺失前后的两段基因片段 A 和 B 分别设计两对引物即内引物与外引物,第一轮 PCR 反应通过每段各自的内外引物,分别获得加有互补末端的 A⁺ 和 B⁺ DNA 片段。然后进行第二轮 PCR 反应,以第一轮 PCR 产物为模板,加入两外引物,获得大量重组体 AB 基因片段,将 PCR 产物与 T 载体连接,进行酶切鉴定并测序证实成功进行了 hμMCP-1 的基因改造。为便于表达 hμMCP-1 突变体,通过 *EcoR* I/*Hind* III 酶切,将目的基因克隆入 pcDNA3.1 真核表达载体中。结果:经酶切鉴定并测序,表明已成功地构建了 hμMCP-1cDNA 突变体-7ND 的真核细胞表达载体。结论:已成功进行了 hμMCP-1 基因 cDNA 的缺失突变,获得了 7ND cDNA 的克隆,为进一步研究 hμMCP-1 功能奠定了基础。

[关键词] 单核细胞化学吸引蛋白 1; DNA; 克隆; 序列

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Construction of human monocyte - chemoattractant protein - 1 mutant - 7ND by recombinant PCR

ZHONG Lin¹, ZHANG Yun¹, ZHANG Mei¹, JI Xiao - ping¹, CHEN Wen - qiang¹, LI Da - qing¹, ZHANG Yan², ZHANG Bing², YANG Jun³, LIU Shao - rong³

(¹ Department of Cardiology, Qilu Hospital, ² Department of Biochemistry, Medical College, Shandong University, Jinan 250012, China; ³ Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China)

[ABSTRACT] AIM: To construct 7ND - the deletion mutant of human monocyte chemoattractant protein - 1 cDNA by recombinant PCR. METHODS: Using pBluescript - hμMCP - 1 as template and two synthetic oligonucleotides containing restriction sites suitable for cloning as primers, the deletion mutant was introduced by recombinant PCR. Linking the 2 chains by recombinant PCR and cloning into T vector, the sequence was verified as 7ND cDNA with a length of 342 bp and was inserted into pcDNA3.1 eukaryotic expressing plasmid. RESULTS: A recombinant plasmid pcDNA3.1 - 7ND for cloning human monocyte chemoattractant protein - 1 cDNA mutant was successfully constructed. The results of sequencing proved that 7ND was the mutant of human monocyte chemoattractant protein - 1, which lacked the N - terminal amino acids 2 through 8. CONCLUSION: A clone of human monocyte chemoattractant protein - 1 mutant was obtained by recombinant PCR. This research has paved the way for further study on biological functions of 7ND.

[KEY WORDS] Monocyte chemoattractant protein - 1; DNA; Clone; Sequence

近年来研究表明炎症反应在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的发生发展中起了重要的作用^[1,2], AS 病变中的主要组成细胞包括单核/巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等,而上述细胞都能表达

[收稿日期] 2004-04-19 [修回日期] 2004-11-23

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 60271015); 卫生部临床学科重点项目(No. 20012943)

Tel: 0531-8380164; E-mail: lzhong@188@sina.com

单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), 作用于血液中的单核细胞, 使其黏附于血管内皮并进入内皮下形成巨噬泡沫细胞。因此针对该因子的治疗为新的治疗靶点。其受体CCR2可调节体内反应, MCP-1/CCR2 旁路已确定, Murphy等^[3]研究表明 MCP-1 与 CCR2 高亲和力结合能诱导受体构型的改变形成功能性的 G 蛋白偶联受体启动诱导单核细胞趋化的信号途径, 活化 MAPK 通路, 进而启动 AP-1 及 NF- κ B 等转录因子, 促进 TNF 及其它细胞因子生成。而研究表明 MCP-1 的缺失突变体(huMCP-1 第2到第8位氨基酸的缺失) huMCP-1(7ND), 能抑制单核细胞的趋化功能^[4], 从而提示我们进行 MCP-1 的缺失突变可以为以后研究 7ND 在 AS 易损斑块中的作用奠定基础。缺失突变传统上有不同方法, 但“重组 PCR”是利用 PCR 技术进行定点突变, 可使传统的体外突变技术变得更简单、快速、经济, 故我们选择重组 PCR 对 huMCP

-1 进行缺失突变。

材 料 和 方 法

1 菌种与质粒

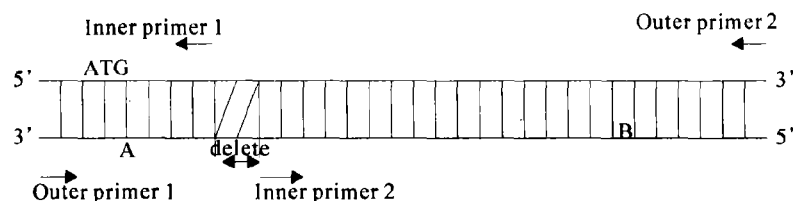
E. Coli. DH5 α 、pcDNA3.1 由山东大学医学院分子生物学实验室提供, 克隆有 huMCP-1cDNA 的 pBluescript 质粒由美国 NCI Dr. Yoshimura 惠赠。

2 试剂

引物由上海博亚生物技术有限公司合成, pfuDNA 聚合酶购自 Strategene 公司, DNA 回收试剂盒购自 Qia-gene 公司, minibest plasmid purification、*EcoR* I/*Hind* III 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、DNA marker(DL2000, DL15000)、PMD18-T 等购自 TaKaRa 公司。

3 引物

根据 GenBank 中 Yoshimura 提供 huMCP-1cDNA (gi:240867) 序列^[5]及重组 PCR 引物设计原则设计以下引物:



内引物 1: 5' - GCTGAAGTTATAACAGCAGGTGAC-CTGAGCGAGCCCTTGGGGAA - 3'。

huMCP-1(7ND)A 片段 3' 端 20 个碱基和 B 基因 5' 端 24 个碱基。

内引物 2: 5' - TTCCCCAAGGGCTCGCTCAGGTCACCTGCTGTTATAACTTCACC - 3'。

huMCP-1(7ND)B 片段 5' 端 24 个碱基和 A 基因 3' 端 20 个碱基。

外引物 1: 5' - GGAATTC~~CCCC~~CAGAAACATCCAAT - 3'; 外引物 2: 5' - GAAGCITCTCAAGTCTTCGGAGTT - 3'。

外引物根据 huMCP-1 基因 cDNA 序列设计并分别在引物 5' 端加有 *EcoR* I 及 *Hind* III 限制性内切酶的酶切位点(划线部分), 便于以下克隆。

4 重组 PCR 反应

4.1 第一轮 PCR 反应 以 pBluescript - huMCP-1 为模板, 用 pfuDNA 聚合酶分别扩增加有互补末端的 A⁺ 和 B⁺ DNA 片段。PCR 反应体系分别为 A⁺: 模板质粒 2 μ L, pfuDNA 聚合酶 0.25 μ L, dNTP 3 μ L, MgCl₂ 4

μ L, 外引物 1(5 μ L), 内引物 1(5 μ L), 10 \times buffer 5 μ L, 加水补齐至 50 μ L。B⁺: 模板质粒 2 μ L, pfuDNA 聚合酶 0.25 μ L, dNTP 3 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 外引物 2(5 μ L), 内引物 2(5 μ L), 10 \times buffer 5 μ L, 加水补齐至 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 执行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物。并回收纯化两片段产物。

4.2 第二轮 PCR 反应 首先将第一轮回回收的 PCR 产物 A⁺ 和 B⁺ DNA 片段等摩尔数混合后, 经过变性和复性, 使加有互补末端的两个片段进行碱基互补和 3' 端重叠延伸, 获得重组体 AB cDNA 片段。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min。执行 5 个循环然后加入引物(外引物 1, 外引物 2), 以 ABC cDNA 片段为模板, 进行扩增。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 执行 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 反应体系为: 10 \times buffer 10 μ L, MgCl₂ 4 μ L, dNTP 10 μ L, A⁺ 模板 1 μ L, B⁺ 模板 1 μ L, 外引物 1 母液 1 μ L, 外引物 2 母液 1 μ L

(两者后加), pfuDNA 聚合酶 2.5 μ L, 加水补齐至 100 μ L。其中需加大模板与引物量, 100 μ L 的体系中每种模板量应达到 1 μ g, 引物的终浓度也应达到 1 nmol/L。

5 与 T 载体构建

将重组 PCR 产物回收后与 PMD18-T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接, 转化 *E. Coli*. DH5 α 感受态细胞, 铺氨苄青霉素的 LB 板筛选阳性克隆, 用 *EcoR* I / *Hind* III 限制性内切酶进行酶切鉴定并测序。

6 pcDNA3.1-7ND 表达载体的构建

将 h μ MCP-1(7ND) 基因片段自 TA 载体中经 *EcoR* I / *Hind* III 酶切后回收, 插入经同样酶切的真核细胞表达载体 pcDNA3.1 中, 构建成表达 7ND 的真核表达载体 pcDNA3.1-7ND, 经酶切鉴定并测序证实。

结 果

1 重组 PCR 第一轮反应产物

PCR 产物 A⁺ 和 B⁺ DNA 片段碱基大小分别为 145 bp 和 226 bp(图 1)。

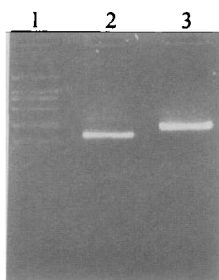


Fig 1 Primary PCR product. 1: DL 2 000 marker (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 from top to bottom); 2: A⁺ DNA fragment; 3: B⁺ DNA fragment.

图 1 第一轮 PCR 产物

2 重组 PCR 反应第二轮反应产物

扩增后重组 AB 片段经 2% 琼脂糖凝胶电泳回收, 其碱基大小为 342 bp, 命名为 7ND(图 2)。



Fig 2 Secondary PCR product. 1: DL 2 000 marker; 2: recombinant AB gene fragment.

图 2 第二轮 PCR 产物

3 TA 载体构建成功电泳鉴定

将重组 PCR 产物 7ND 回收后与 PMD18-T 载体构建成功, 命名为 PMD18-T-7ND, 经 *EcoR* I / *Hind* III 限制性内切酶进行酶切鉴定并测序。酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 3)。

4 pcDNA3.1-7ND 的克隆及鉴定

构建成表达 7ND 的真核表达载体, 命名为 pcDNA3.1-7ND, 经 *EcoR* I / *Hind* III 限制性内切酶酶切分析, 结果显示成功获得表达载体 pcDNA3.1-7ND(图 4)。DNA 测序分析结果显示, 第 178 至 179 位碱基之间敲除 21 个碱基(图 5)



Fig 3 The results of the PMD18-T-7ND recombinant digested with endonuclease. 1: DL 2 000 marker; 2: PMD18-T-7ND recombinant digested with *EcoR* I / *Hind* III.

图 3 PMD18-T-7ND 与 TA 载体酶切产物

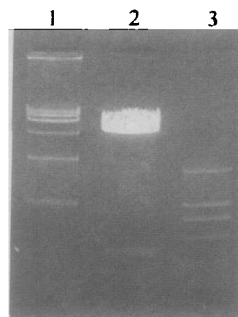


Fig 4 The results of the pcDNA3.1-7ND recombinant digested with endonuclease. 1: DL 15 000 marker (15 000, 100 000, 7 500, 5 000, 2 500, 1 000, 250, from top to bottom); 2: pcDNA3.1-7ND recombinant digested with *EcoR* I / *Hind* III; 3: DL 2 000 marker.

图 4 pcDNA3.1-7ND 酶切产物

讨 论

目前研究表明单核细胞迁移至损伤的内皮细胞处并活化是动脉粥样硬化的中心事件。例如高胆固醇血症的小鼠基因编码巨噬细胞 MCP-1 基因敲除后能防止 AS 的发展。MCP-1 特异地作用于血液的

尤其如果我们必须突变特定序列的基因时,由于受到上述限制,就考虑进行重组 PCR 反应,而通过重组 PCR 对基因进行拼接,使之形成重组体的过程完全不依赖于限制性内切酶和连接酶,因此有传统的 DNA 重组技术无法比拟的优势。

本研究成功地进行了该基因的突变分析与以下因素有关:①进行重组的基因片段在 1 kb 之内,大于 1-2 kb 的片段用此方法拼接有一定的困难。②选用了高保真的 DNA 聚合酶,避免普通的 Taq 酶有一定的错配率。③重叠延伸反应所需的模板量,引物浓度, DNA 聚合酶的浓度, Mg 离子浓度, dNTP 含量都很关键^[11]。我们选择进行第二轮 PCR 反应(重叠延伸反应)的模板量、引物浓度、dNTP 浓度较高,大模板量可有效地减少循环数,能降低 DNA 聚合酶引发的错配率。引物浓度增大提高了扩增效率。低镁离子浓度减少了扩增背景,减少了错配率。循环数减少亦减低了碱基错配机率。外引物后加入,有利于提高扩增产物的特异性。

血管生物学及分子病理生理的研究发展使设计及验证基因表达水平来治疗动脉粥样硬化易损斑块成为可能,因此无疑应用重组 PCR 技术进行的 hμMCP-1 的缺失突变体-7ND cDNA 的表达载体的构建为以后进一步研究易损斑块的基因治疗提供了保障。

[参 考 文 献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115 - 126.
- [2] Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 2001, 104(3): 365 - 372.
- [3] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors[J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52(1): 145 - 176.
- [4] Zhang Y, Rollins BJ. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimmer[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(9): 4851 - 4855.
- [5] Yoshimura T, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1991, 305: 47 - 56.
- [6] Werle M, Schmal U, Hanna K, et al. MCP-1 induces activation of MAP-kinases ERK, JNK and p38 MAPK in human endothelial cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 56(2): 284 - 292.
- [7] Zhang Y, Ernst CA, Rollins BJ. MCP-1: Structure/Activity analysis[J]. *Methods enzymol*, 1996, 10(1): 93 - 103.
- [8] Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease[J]. *Hypertension*, 2003, 41(part2): 834 - 841.
- [9] Inoue S, Egashimura K, Ni WH, et al. Anti - monocyte chemoattractant protein - 1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E - knockout mice[J]. *Circulation*, 2002, 106(21): 2700 - 2706.
- [10] Russell Higuchi. PCR protocols: A guide to methods and applications [A]. *Recombinant PCR [M]*. Academic Press, 1990. 177 - 183.
- [11] Davis GT, Bedzyk WD, Voss EW, et al. Single chain antibody(SCA) encoding genes: one - step construction and expression in eukaryotic cells[J]. *Biotechnology*, 1991, 9(2): 165 - 169.