

人苯丙氨酸羟化酶基因克隆及其原核表达质粒的构建

张 志¹, 黄宗青¹, 沈 琪¹, 刘洪涛¹, 邓英太¹, 李爱东¹, 周国强¹, 汪华侨², 何蕴韶³
(1. 广东医学院附属深圳第四人民医院神经内科, 广东 深圳 518033; 2. 中山大学中山医学院人体解剖学教研室脑研究室; 3. 中山大学达安基因诊断中心, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】克隆健康人苯丙氨酸羟化酶基因全长 cDNA 序列, 构建并鉴定其原核表达质粒 pTrcHisB/PAH。【方法】采用 RT-PCR 方法从人肝组织中扩增 PAH 基因全长 cDNA, T/A 克隆到 pMD18-T 载体中, 双酶切后将 cDNA 亚克隆入 pTrcHisB 载体, 构建 pTrcHisB/PAH 质粒, 经限制性内切酶鉴定并测序。【结果】人 PAH 基因 cDNA 正确克隆入 pTrcHisB 表达载体, 与 Genbank 中 PAH 基因序列一致。【结论】成功构建 pTrcHisB/PAH 表达质粒, 为进一步进行研究 PAH 蛋白表达和重组蛋白活性鉴定奠定基础。

关键词: 苯丙酮尿症; 苯丙氨酸羟化酶; 克隆; 原核表达质粒

中图分类号: R479.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)03-0288-04

Cloning of Human Phenylalanine Hydroxylase Gene and Construction of Prokaryotic Expression Plasmid

ZHANG Zhi¹, HUANG Zong-qing¹, SHEN Qi¹, LIU Hong-tao¹, DENG Ying-tai¹, LI Ai-dong¹,
ZHOU Guo-qiang¹, WANG Hua-qiao², HE Yun-shao³

(1. Department of Neurology, Futian People's Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen, 518033, China;
2. Department of Anatomy and Brain Research, Zhongshan College of Medicine, 3.Center of Daan Gene Diagnosis,
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To clone human phenylalanine hydroxylase (PAH) gene and construct a prokaryotic expression plasmid. 【Methods】The cDNA of human PAH Gene amplified with RT-PCR from health human liver tissue was cloned into pMD18-T vector by T/A Ligation. After double digested, PAH cDNA fragment was subcloned into pTrcHisB vector to construct a prokaryotic expression plasmid. Restriction endonucleases analysis and sequencing were used to conform the recombinant plasmid. 【Results】The full length PAH cDNA was correctly inserted into prokaryotic expression vector, and its sequencing was consistent with reported sequence derived from Genbank. 【Conclusion】The successful construction of prokaryotic expression plasmid provides a basis for further studies on the expression, recombined protein biological activities.

Key words: phenylketonuria; phenylalanine hydroxylase; clone; prokaryotic expression plasmid

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):288-291]

苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是神经科常见氨基酸代谢障碍的常染色体隐性遗传病。98%~99%是由于苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)基因突变导致肝脏苯丙氨酸羟化酶活性降低而致病^[1]。当前的基因治疗为本病治疗提供了崭新的思路^[2]。国外学者已经在 PKU 小鼠模型上用腺病毒载体转导 PAH 进行基因治疗获得一定的成功,但是始终未能解决生物安全和

如何长期稳定表达等问题^[3,4],阻碍了这种方法的临床推广和应用。本研究旨在通过体外原核表达活性 PAH 蛋白,开发新型 PKU 基因治疗药物,改进当前 PKU 治疗单纯依靠饮食控制的现状。我们采用基因工程重组技术从健康人肝细胞中定向克隆出人 PAH 基因,构建 pTrcHisBPAH 原核表达质粒并进行鉴定,为以后 PAH 蛋白的体外表达打下基础,结果报道如下。

收稿日期: 2006-11-02

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2006cb500700)

作者简介: 张 志(1971-),男,安徽安庆人,博士,主治医师;何蕴韶,教授,博士生导师,通讯作者, E-mail:zh0755@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料和试剂 新鲜肝脏标本来自中山大学附属第一医院肝胆外科肝血管瘤病人手术; pTrcHisB、TOP10 (Invitrogen), pMD18-T Vector (TaKaRa), Trizol (GIBCO), RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (#1621), EcoRI, Kpn I (MBI Fermentas), QIA quick Gel Extraction Kit, QIA Spin Miniprep Kit (QIAGEN), T4-DNA Ligase (Invitrogen)。大肠杆菌 DH5 为中山大学达安基因中心提供。

1.1.2 主要设备 玻璃匀浆机、高速冷冻离心机、恒温摇床、恒温培养箱、-80 °C 冰箱(日本 SANYO 公司)、PE9600 PCR 扩增仪、ABI3100 Avant DNA 测序仪(美国 PE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 GeneBank 上登录 PAH 基因 mRNA 序列(GI: 18765884), 在 Primer Premier5.0 和 Olig6.0 软件设计引物扩增 PAH 的编码序列(CDS), 5 端设计 Kpn 和 EcoR 酶切位点加上 3 个保护碱基。引物由上海生工合成。

1.2.2 目的基因的获得 从新鲜肝脏标本 Trizol 法提取总 RNA, 检测 A_{260} 和 A_{280} 值, 计算浓度, -80 °C 保存。取 RNA 2 μ g 采用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA (complement DNA)。以 PAHcDNA 为模板做 RT-PCR。反应条件: 93 °C 10 min, 93 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环后, 72 °C 10 min。PCR 产物浓缩后在 0.8% 琼脂糖上电泳 (1 377 bp), 用 QIA quick Gel Extraction Kit 割胶纯化, 1% 琼脂糖电泳鉴定、拍照、-20 °C 保存。

1.2.3 PCR 产物克隆和鉴定 克隆反应体系: 纯化的 PCR 产物 4 μ L、pMD18-T Vector 1 μ L、Ligation Solution I 5 μ L, 16 °C 过夜, 得到 pMD18-T/PAH 质粒, 转化感受态大肠杆菌 DH5a, 涂含氨苄青霉素 LB 平板, IPTG 进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落, 体外扩增并 PCR 初筛后菌液抽提 pMD18-T/PAH 质粒, 用 Kpn 和 EcoR 双酶切并测序鉴定。测序正向引物为 M-47, 反向为 M-48, 中间引物为 5'-TGGAATACATGGAGGAAGA-3'。测序在中山大学达安基因中心完成。

1.2.4 原核表达载体 pTrcHisB/PAH 构建和鉴定 质粒 pTrcHisB 空载体和质粒 pMD18-T/PAH 分别经 Kpn 和 EcoR 双酶切, 割胶回收目的基因片段和空载体。目的基因与空载体 pTrcHisB 按 5:1 的比例混合进行连接反应, 加入 T4 连接酶 2U, 反应体积为 10 μ L, 18 °C 连接过夜。反应液全部转化入感受态 TOP10 细菌中培养过夜, 在含氨苄青霉素 LB 平板上随机挑取 10 个单菌落, 摇菌培养, PCR 初筛后抽提 pTrcHisB/PAH 质粒, 用 Kpn1 和 EcoR1 双酶切并全长测序鉴定, 测序引物为 RT-PCR 引物和上述中间引物。

2 结果

2.1 肝组织总 RNA 结果

提取总 RNA 电泳后可见三条带, 说明提取的 RNA 较完整。所测 1、2 两个标本的 A_{260} / A_{280} 分别为 2 和 1.99, 其浓度分别为 4.84 和 2.85 μ g/ μ L, RNA 纯度符合要求。

2.2 PAH 基因 CDS 序列的 RT-PCR 结果

本研究设计 RT-PCR 片段大小为 1 377 bp, 包含 PAH 基因的 CDS 序列 1 359 bp。图 1 中 P 为 RT-PCR 产物, 片段大小与预期设计基本相符。

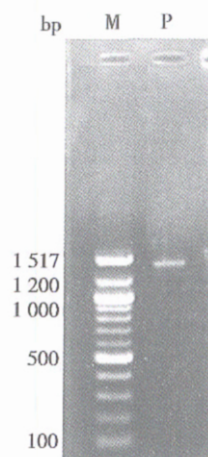


图 1 目的基因 RT-PCR 结果

Fig.1 Result of target gene segment RT-PCR
M: DNA Marker; P: RT-PCR of PAH gene segment

2.3 pMD18-T/PAH 酶切结果

RT-PCR 的片段大小为 1 377 bp, pMD18-T 的大小为 2 692 bp, pMD18-T/PAH 大小理论上应为 1 377+2 692=4 069 bp。酶切鉴定结果(图 2)与设计结果相符。

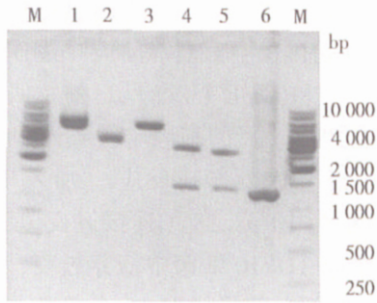


图 2 pMD18- T/PAH 质粒酶切鉴定

Fig.2 Identification by endonucleases analysis of pMD18- T/PAH plasmid

1:pMD18- T/PAH plasmid; 2:pMD18- T blank control plasmid;
 3:Restriction analysis with EcoR ; 4:Restriction analysis with Kpn
 ; 5:Restriction analysis with Kpn and EcoR ; 6:RT- PCR

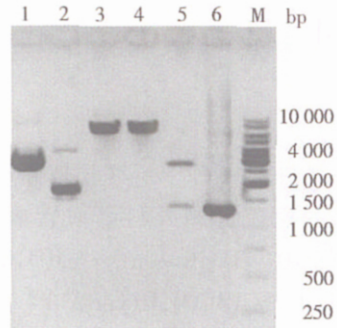


图 3 pTrcHis- PAH 质粒酶切鉴定

Fig.3 Identification by endonuclease analysis of pTrcHis- PAH plasmid

1:pTrcHisB/PAH Plasmid; 2:pTrc blank control Plasmid; 3:
 Restriction analysis with EcoR ; 4:Restriction analysis with Kpn ;
 5:Restriction analysis with Kpn and EcoR ; 6:RT- PCR

2.4 pTrcHis/PAH 酶切结果

pTrcHisB 空质粒大小为 4 400 bp,PAH 基因 CDS 的大小为 1 359 bp, 理论上 pTrcHis- PAH 的大小为 4 400+1 359=5 759 bp,酶切鉴定结果(图 3)与设计结果相符。

2.5 pMD18- T/PAH 测序结果

测序结果表明 pMD18- T/PAH 序列与 GeneBank 上 PAH 基因 mRNA 序列(GI:18765884) 一致, pMD18- T/PAH5 端起始密码子(ATG)和 3' 端终止子(TAA)及两侧 Kpn 和 EcoR 限制性内

切酶的识别序列均完整。

2.6 重组表达质粒测序结果

测序结果表明 pTrcHis- PAH 质粒序列与 GeneBank 上 PAH 基因 mRNA 序列(GI:18765884) 一致, pTrcHis- PAH 质粒 (图 1)5 端起始密码子(ATG)和 3 端终止子(TAA)及两侧 KpnI 和 EcoRI 限制性内切酶的识别序列均完整, 序列完全正确, 未见框移和突变(图 4)。

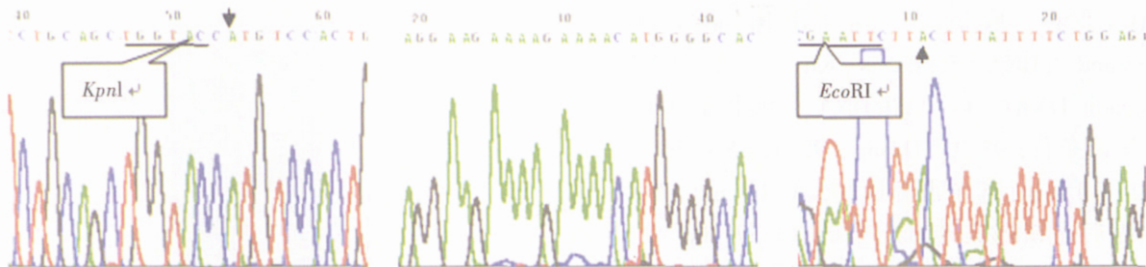


图 4 重组 pTrcHisB/PAH 表达质粒全长测序图谱

Fig.4 Map of the sequence of recombined pTrcHisB/PAH expression plasmid

A: Positive primer; B: Middle primer; C: Reverse primer

3 讨 论

PKU 是 1934 年法国医生 Folling 首次报道。PKU 是常染色体隐性遗传病, 其致病基因 PAH 基因已经成功分离、克隆^[5]。PAH 基因定位于 12 号染色体 (12q22- 12q24.1), 大约由 1.5 Mb 碱基组成。PAH 基因是断裂基因, mRNA 为 2.4 kb, 编码区包

含 13 个外显子和 12 个内含子。mRNA 大小为 1 353 bp, 翻译成含 451 个氨基酸的酶单体^[6,7]。

PKU 是由于 PAH 基因突变导致 PAH 酶的催化活性减弱或消失引起^[1]。迄今全世界已经发现 PKU 有 524 多种不同类型的突变 (<http://www.mcgill.ca/pahdb>)。1997 年后 PKU 分子遗传学的研究热点逐渐转为 PAH 基因突变的功能研究, 即进入 PAH 后基因组学研究, 我国学者也在这个领域

做了大量的工作, 发现了很多新的突变^[8]。迄今全世界共发现 70 余种致病突变, 导致 PAH 酶的催化功能减弱或消失, 引起体内苯丙氨酸的蓄积致病^[9,10]。

我们于 2003 年采用荧光 PCR 技术成功建立经典型 PKU 的基因诊断方法^[11]。鉴于目前国内外研究 PKU 基因治疗的报道尚少, 为了探讨 PKU 的新型基因治疗方法, 弥补 PKU 治疗的缺陷, 本研究采用基因工程技术, 根据 Genebank 中 PAHcDNA 序列, 自行设计一对引物, 分别在引物 5 端和 3 端设计 KpnI 和 EcoRI 酶切识别位点, 并添加保护碱基, 扩增包括目的基因在内的全部序列, PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体构建 pMD18-T/PAH 质粒, KpnI 和 EcoRI 双酶切鉴定后全长测序证实 pMD18-T/PAH 质粒序列完整、正确, 即包含起始密码、终止密码及两端的 KpnI 和 EcoRI 识别序列。pMD18-T/PAH 质粒双酶解消化, 目的基因片段定向克隆入 pTrcHisB 表达载体, 蓝白斑筛选挑白色菌落, PCR 初筛后转化入 TOP10 菌体中扩增, 抽提重组质粒, KpnI 和 EcoRI 双酶解鉴定, 最后全长测序。测序结果表明我们获得的 pTrcHisB/PAH 质粒序列与 GeneBank 上 PAH 基因 cDNA 序列(GI:18765884)一致, 且 pTrcHis/PAH 质粒中 5 端起始密码子(ATG)和 3 端终止子(TAA)及两侧 KpnI 和 EcoRI 限制性内切酶的识别序列均完整, 序列和方向完全正确, 未见框移和突变, 表达质粒的成功构建为下一步重组蛋白的表达和纯化研究奠定了坚实的基础。目前, 该重组质粒的表达及其重组蛋白的活性鉴定研究正在进行之中。

参考文献:

- [1] 张 志, 何蕴韶. 苯丙酮尿症分子遗传学研究进展 [J]. 遗传, 2004, 26(5): 729-734.
- [2] DING Z, HARDING C O, THONY B. State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy [J]. Mol Genet Metab, 2004,

81(1): 1-2.

- [3] HARDING C O, GILLINGHAM M B, HAMMAN K, et al. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria [J]. Gene Ther, 2006, 13(5): 457-462.
- [4] OH H J, LEE H, PARK J W, et al. Reversal of gene expression profile in the phenylketonuria mouse model after adeno associated virus vector mediated gene therapy [J]. Mol Genet Metab, 2005, 86 Suppl 1: S124-32.
- [5] WOO S L C, LIDSKY A S, GUTTLER F D, et al. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene and allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria [J]. Nature, 1983, 306(1): 151-155.
- [6] SCRIVER C R, WATERS P J, SARKISSIAN C, et al. PAHdb: a locus-specific knowledge base [J]. Hum Mutat, 2000, 15(1): 99-104.
- [7] SCRIVER C R, HURTUBISE M, KONECKI D, et al. PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do [J]. Hum Mutat, 2003, 21(5): 333-344.
- [8] 孟 峻, 张军力. 内蒙古经典型苯丙酮尿症 PAH 基因外显子 11 突变的检测 [J]. 内蒙古医学院学报, 2006, 28(3): 178-180.
- [9] WATERS P J. How PAH gene mutations cause hyperphenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression [J]. Hum Mutat, 2003, 21(6): 357-369.
- [10] LULEYAP H U, ALPTEKIN D, PAZARBASI A, et al. The importance of arginine mutation for the evolutionary structure and function of phenylalanine hydroxylase gene [J]. Mutat Res, 2006, 601(1-2): 39-45.
- [11] 张 志, 何蕴韶, 闫宗合, 等. 荧光 MGB 探针实时 PCR 检测经典型苯丙酮尿症的基因突变 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003, 24(6): 593-596.

(编辑 张恩健)