

文章编号:1673-1689(2005)05-0064-04

中国人神经珠蛋白(NGB)基因克隆

赵慧¹, 牛建章¹, 廖祥儒^{1, 2}, 田侠¹

(1. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002; 2. 江南大学 生物工程学院工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:应用 RT-PCR 方法从中国人胎脑组织中扩增出神经珠蛋白(NGB)特异性编码基因片段, 构建了 pMD18-T-hNGB 克隆质粒, 并与 Burmester NGB 序列进行了比较. 结果表明, 获得的中国人 NGB 编码基因序列与 Burmester 序列的同源性为 98%.

关键词:神经珠蛋白; 基因; 人胎脑

中图分类号:Q 78

文献标识码: A

Cloning of Chinese Neuroglobin(NGB) Gene

ZHAO Hui¹, NIU Jian-Zhang¹, LIAO Xiang-Ru^{1, 2}, TIAN Xia¹

(1. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Educational Ministry Key Lab of Industrial Biotechnology, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: RT-PCR was utilized to amplify neuroglobin(NGB) gene segment from the brain tissue of human fetus. The NGB gene was cloned to pMD 18-T Vector. The gene segment was sequenced and compared with NGB sequence reported by Burmester et al. The results indicated that the homogeneity between Chinese NGB and Burmester NGB is 98%.

Key words: neuroglobin (NGB); gene; human fetus brain

珠蛋白是具有可逆性结合、储存和运输氧的蛋白^[1], 广泛存在于不同生物中^[2]. 其中, 脊椎动物珠蛋白又可分为血红蛋白(Hb)和肌红蛋白(Mb)^[3]. 神经珠蛋白(NGB)是新近发现的一种截短型氧结合血红素蛋白, 在人类和其他脊椎动物脑组织中表达, 是珠蛋白家族中的一名新成员^[4~6]. NGB 相对分子质量小、容易透过血脑屏障、携氧能力强, 在神经组织氧的运输、贮存^[4~7]过程中具有重要作用. 作为药物可以防治大脑局部短暂缺氧所导致神经细胞死亡和部分神经功能的丧失, 帮助维持神经功

能^[8]. 还可开发成保健品, 用于脑中风和老年性痴呆症等脑血管疾病的治疗和预防. 作者以人胎脑组织为材料, 扩增得到了中国人 NGB 基因, 并进行了序列分析. 为 NGB 基因表达研究提供了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

冻存于 -70 ℃ 的胎儿脑组织.

1.2 主要试剂

异硫氰酸胍, IPTG, X-gal 等主要化学试剂均

收稿日期: 2004-12-23; 修回日期: 2005-2-21.

作者简介: 赵慧(1977-), 女, 河北石家庄人, 基因工程硕士研究生.

万方数据

为美国 Sigma 公司产品. 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒 (TaKaRa , Code DV 805T), BcaBESTTM RNA PCR 试剂盒 Ver. 1. 1 (TaKaRa, Code DRR023), PCR 扩增试剂盒为 TaKaRa 公司产品, pMD 18-T Vector 质粒 (TaKaRa, Code D504A) 和大肠杆菌 (*E. coli*) JM109 菌株 (TaKaRa D9052) 均为日本 TaKaRa 公司产品. 以上试剂均严格按照说明书操作, 在有效期内使用.

1.3 引物设计与合成

引物设计与合成引物设计参考 Burmester 等^[4]报道的序列, 采用 primer 5. 0 软件设计. 正向引物 5' 端设计了 EcoR I 酶切位点, 反向引物 5' 端设计了 Not I 酶切位点. 引物由日本 TaKaRa 公司合成, 其正向引物序列为 5' - GGA ATT CAT GGA GCG CCC GGA GC - 3' (23bp), 反向引物序列为 5' - ATA AGA ATG CGG CCG CTT ACT CGC CAT CCC AG - 3' (32bp) .

1.4 主要仪器

基因扩增仪: Biometra T-GRADIENT Thermoblock 为德国产品; DNA 序列仪: ABI PRISMTM 377XL DNA Sequencer; Doc 2000 凝胶成像分析系统为美国 Bio-Rad 公司产品.

1.5 实验方法

1.5.1 RNA 提取 人胎脑总 RNA 提取采用异硫氰酸胍-酚/氯仿一步法^[9].

1.5.2 PCR 扩增及鉴定 反转录反应及 PCR 扩增按 TaKaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒说明进行. 反应终体积 20 μ L, 其中含有: MgSO₄ 5 mmol/L, dNTP 0.5 mmol/L, Rnasin 20 U, BcaBEST 多聚酶 22 U, 正向和反向引物各 20 pmol, RNA 模板 1 μ L, 无 Rnase 重蒸水 1.5 μ L, 2 $\times$ Bca 1st Buffer 10 μ L. 反应过程为 65 $^{\circ}$ C 1 min; 30 $^{\circ}$ C 5 min; 逐步升温到 65 $^{\circ}$ C (15~30 min, 平均 1 min 升 1 $^{\circ}$ C); 65 $^{\circ}$ C 保温 30 min, 98 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min. 在第一轮 20 μ L 的 PCR 产物中加入 80 μ L 反应液, 反应终体积为 100 μ L, 其是含有: MgSO₄ 1.5 mmol/L, 正向和反向引物各 20 pmol, 5 $\times$ Bca 2nd Buffer 16 μ L, Bca-Optimized Taq 2.5U, 重蒸水 55.5 μ L. 扩增条件为: 第一轮反应 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 45 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 进行 5 个循环. 第二轮反应为 94 $^{\circ}$ C 30 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 进行 25 个循环. 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. 加入产物及标准相对分子质量样品各 5 μ L, 进行琼脂糖凝胶电泳 (1.2% 琼脂糖), 溴乙锭染色, 用 Doc2000 凝胶成像分析系统观察结果并拍照. 万方数据

1.5.3 克隆质粒的构建 选用日本 TaKaRa 公司生产的 DNA 连接试剂盒, 严格按说明书操作.

1.5.4 蓝白斑筛选 将连接好的质粒转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞中^[10,11]. 转化细胞涂在含有 X-gal 和 IPTG (0.5 mmol/L IPTG, 40 μ g/mL X-gal) 的 LB 琼脂固体培养基 (Amp⁺) 上. 培养 12 h 后, 得到蓝白斑菌落. 其中含有 NGB 基因片段质粒的细胞长出的菌落为白色, 而未转化的菌落为蓝色.

1.5.5 PCR 鉴定方法 挑选白斑和蓝斑菌落在 LB 液体培养基中培养 12 h^[13], 提纯质粒后进行 PCR 扩增. 反应终体积为 50 μ L, 其中含有以下成份: 4 d NTPs 200 μ mol/L, Taq 酶 1.25 U, 10 $\times$ Buffer 5 μ L, 正向和反向引物各 20 pmol, 质粒模板 1 μ L. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 90 s; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 53 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 30 个循环. 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 7 min. 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行结果鉴定.

1.5.6 原核表达 用碱裂解法提取 pBV221 质粒. 将获得的 pBV221 质粒和 pMD 18-T-hNGB 质粒分别进行 EcoR I 和 Not I 双酶切, DNA 凝胶回收试剂盒纯化后用 DNA 连接试剂盒进行定向连接. 用构建的重组质粒转化 JM109 大肠杆菌, 将抗 Amp 阳性重组子接种于含 100 mg/mL Amp 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养. 以 1 : 100 接种于新鲜 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A 值为 0.6, 取出 1 mL 未诱导的发酵液作为对照, 其余的迅速放入 42 $^{\circ}$ C 振荡热诱导 4 h. 各取 1 mL 发酵液收集菌体. SDS-PAGE (分离胶 15%, 浓缩胶 4%) 电泳分析.

2 结 果

2.1 人胎脑组织总 RNA 的提取

通过紫外分光光度法和变性琼脂糖凝胶电泳法鉴定, 确认纯化的人胎脑组织总 RNA 含有 28S 与 18S 的 2 个 RNA 条带 (见图 1), 经扫描分析两者条带面积比约为 2 : 1, 说明总 RNA 完整性好; A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.9, 说明纯度较高. 因此, 所提总 RNA 可用于进一步实验.

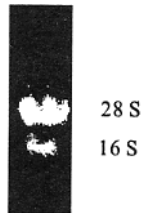
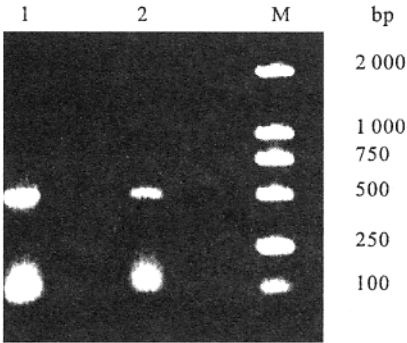


图 1 人胎脑组织总 RNA 电泳图
Fig. 1 Electrophoresis diagram of total RNA purified from human fetus brain tissue

2.2 NGB 基因 RT-PCR 扩增

经 RT-PCR 可以从提取的总 RNA 中扩增得到大小约 500 bp 的 DNA 片段(见图 2),与预期的 NGB 基因大小相符合,表明人胎脑组织中可能有 NGB 基因的表达.



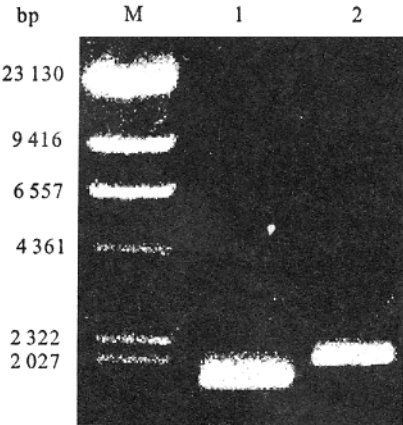
1. 样品 1; 2. 样品 2; M. 标准相对分子质量

图 2 NGB 基因 RT-PCR 扩增结果电泳图(1.2%琼脂糖)

Fig. 2 Diagram from agarose gel electrophoresis of RT-PCR result of NGB

2.3 pMD 18-T-hNGB 质粒构建

pMD 18-T 载体是由 pUC18 载体改建而成的. 在 pUC18 载体的多克隆位点处的 *xba* I 和 *Sal* I 识别位点之间插入了 *Eco*RV 识别位点,用 *Eco*RV 酶切后,再在两个 3'端添加“T”而成. 因大部分耐热 DNA 聚合酶反应时均有在 PCR 产物的 3'末端添加一个“A”的特性,所以利用 pMD 18-T 载体能大大提高 PCR 产物的连接和克隆效率. 将 NGB 特异性片段克隆到 pMD 18-T Vector 质粒构建 pMD 18-T-hNGB 质粒,转化 JM109 大肠杆菌,通过蓝白斑筛选得到阳性菌株,经电泳鉴定白斑菌落中提取的质粒迁移率慢于蓝斑菌落,表明有 NGB 基因片段插入(见图 3).

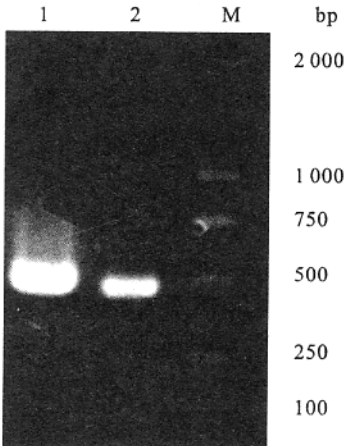


1. 蓝斑克隆; 2. 白斑克隆; M. λDNA Hind III 酶切片断标准相对分子质量

图 3 pMD 18-T-hNGB 克隆质粒电泳图

Fig. 3 The agarose gel electrophoresis diagram of pMD 18-T-hNGB plasmids

利用设计的 RT-PCR 引物,用 PCR 方法对 pMD 18-T-hNGB 质粒进行特异性扩增,也能得到大小约 500 bp 的 DNA 片段(见图 4),所得片段与预期大小一致.



1. PCR 产物 1; 2. PCR 产物 2; M. 标准相对分子质量

图 4 pMD 18-T-hNGB PCR 产物电泳图

Fig. 4 The agarose gel electrophoresis diagram of PCR products of pMD 18-T-hNGB

2.4 NGB 基因序列分析

NGB 基因片段测序结果如图 5 所示,此 NGB 的 DNA 片段的长度为 472 bp. 是为毕赤酵母 C9K 质粒设计,该质粒已有 ATG 起始密码子,所以引物设计时缺失了 NGB 结构基因中的 ATG 密码子. 人胎脑 NGB 与 Burmester T.^[4] 报导的序列同源性为 98%. 尽管 396 位的为 T 但编码的氨基酸未变. 3'端虽然有差异,但此区域为非编码区.

2.5 NGB 基因的原核表达

在热激诱导后,大肠杆菌蛋白质 SDS-PAGE 图谱如图 6 所示. 说明 4,6 两个细胞系有 17 000 的蛋白质表达,相对分子质量约 17 000,可能是 NGB 蛋白.

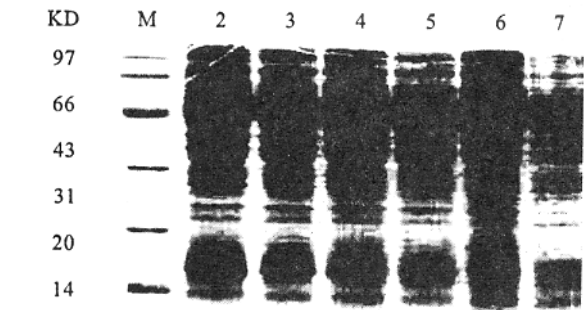
3 讨 论

2000 年,德国学者 Burmrster 等参考人和小鼠的基因序列数据库,对鼠和人的 NGB 编码区进行了克隆与序列分析. 用分光光度法分析了 NGB 重组蛋白的氧结合活性. 此后,国内外学者对人^[12]、鼠^[7]和鱼类^[13]的 NGB 进行了研究. Dewilde 等^[14]和 Jan 等^[15]对 NGB 的配基结合特性和重组蛋白的动力学进行了深入的研究. 这些结果证实,人类和鼠类神经珠蛋白 mRNA 全序列长为 7727bp,其中含 11 个重复序列,4 个外显子和 3 个内含子^[8],均编码 151 个氨基酸(大约 17 000);人类和鼠类神经珠蛋白有 94%的同源性,高于本物种其它种类珠蛋

白如血红蛋白和肌红蛋白的保守性(77%~85%同源性). 本文测得的 NGB 序列与 Burmrster 等^[4]的序列相比较, 同源性达 98%, 属于高度同源, 但仍有一定差别.

人胎脑 NGB	1	ATGGAGCGCC	CGGAGCCCGA	GCTGATCCGG	CAGAGCTGGC	GGGCAGTGAC
BurmesterNGB	1	ATGGAGCGCC	CGGAGCCCGA	GCTGATCCGG	CAGAGCTGGC	GGGCAGTGAC
人胎脑 NGB	51	CCGCAGCCCG	CTGGAGCACG	GCACCGTCCT	GTTTGCCAGG	CTGTTTGCCC
BumesterNGB	51	CCGCAGCCCG	CTGGAGCACG	GCACCGTCCT	GTTTGCCAGG	CTGTTTGCCC
人胎脑 NGB	101	TGGAGCCTGA	CCTGCTGCCC	CTCTTCCAGT	ACAACTGCCG	CCAGTTCTCC
BumesterNGB	101	TGGAGCCTGA	CCTGCTGCCC	CTCTTCCAGT	ACAACTGCCG	CCAGTTCTCC
人胎脑 NGB	201	GGTGATGCTC	GTGATTGATG	CTGCAGTGAC	CAATGTGGAA	GACCTGTCCT
BumesterNGB	101	GGTGATGCTC	GTGATTGATG	CTGCAGTGAC	CAATGTGGAA	GACCTGTCCT
人胎脑 NGB	301	GTGAAGCTCA	GCTCCTTCTC	GACAGTGGGT	GAGTCTCTGC	TCTACATGCT
BumesterNGB	301	GTGAAGCTCA	GCTCCTTCTC	GACAGTGGGT	GAGTCTCTGC	TCTACATGCT
人胎脑 NGB	351	GGAGAAGTGT	CTGGGCCCTG	CCTTCACACC	AGCCACACGG	GCTGCTTGGA
BumesterNGB	351	GGAGAAGTGT	CTGGGCCCTG	CCTTCACACC	AGCCACACGG	GCTGCTTGGA
人胎脑 NGB	401	GCCAACTCTA	CGGGGCCGTA	GTGAGGCCA	TGAGTCGAGG	CTGGGATGGC
BumesterNGB	401	GCCAACTCTA	CGGGGCCGTA	GTGAGGCCA	TGAGTCGAGG	CTGGGATGGC
人胎脑 NGB	451	GAGTAAG CGG	CCGC ATTCTT	AT		
BumesterNGB	451	GAGTAAG AGG	CGAC CCCGCC	CG		

图 5 中国人胎脑 NGB 基因 DNA 序列
Fig. 5 The sequence of NGB gene from Chinese human fetus brain tissue(Burmester NGA, see Ref [4])



1. 标准相对分子质量; 2~6. 阳性克隆; 7. 对照
图 6 大肠杆菌蛋白质 SDS 电泳图谱
Fig. 6 SDS PAGE diagram of E. coli

Sun 等^[8]对 NGB 可能的药用效果和机制进行了研究,发现缺血半球神经细胞内的 NGB 蛋白的表达量升高,推测 NGB 可能参与缺氧的识别和引发,保护细胞反应,能在缺氧的环境下保护神经元.

国内外专家对这些研究结果十分欣慰,认为 NGB 可能为阿尔茨海默氏症和脑中风等脑血管疾病病人带来福音. 本实验的结果初步证明得到了人胎脑 NGB 基因,但还需经 WESTERN BLOT-TING 的最后证实. 要在医药研究和临床中使用 NGB 也还待其大量的表达,还应在发酵条件优化、基因表达调控等方面进行深入研究.

谨以此文献给牛建章教授,并致深切哀悼!

参考文献:

[1] Dickerson R E, Geis I. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology[M]. California: Benjamin/cummings, 1983.

[2] Hardison R C. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1996, 93: 5675—5679.

[3] G Decke A, Ulrich F, Klaus Z, Ding Z P, *et al.* Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1999, 96: 10495—10500.

[4] Burmester T, Weich B Z, Reinhardt S, *et al.* A vertebrate globin expressed in the brain[J]. **Nature**, 2000, 407: 520—523.

从表 1 可以看出薰衣草的超临界萃取和水蒸气蒸馏精油成分的主要区别有二点:一是乙酸薰衣草酯和乙酸芳樟酯的相对质量分数,前者在超临界中的相对质量分数低于水蒸气蒸馏法中的相对质量分数,而后者在超临界中的相对质量分数则远远高于水蒸气蒸馏法中的相对质量分数,文献[2]报道乙酸芳樟酯通过水蒸气蒸馏法易分解,实验结果与其一致;二是第五个主成分不同,前者为异丁酸叶醇酯,后者为 α -松油醇。

参考文献:

[1] Reverchon E, Della Porta G. Supercritical CO₂ extraction and fraction of lavender essential oil and waxes[J]. **J Agric Food Chem**,1995, 43: 1645—1658.

[2] Stahl E, Quirin K W, Verdichtete D. Gase zur Extraction und Raffination[M]. Springer verlag : Berlin,1987.

[3] Adasoglu N, Dincer S. Optimization of SCEF of essential oil from turish lavender flowers by response surface methodology[A]. Proceeding of the 3rd International Symposium on Supercritical Fluids[C]. Strasbourg : Perrut and Brunner, 1994. 329—334.

[4] 张春玲,赵继飏,张朝英,等. 用 GC-MS 分析云南薰衣草挥发油的化学成分[J]. 河南科学. 1999,17(4): 388—391.

[5] 解成喜,王强,崔晓明. 薰衣草挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 新疆大学学报(自然科学版),2002,19(3):294—296.

[6] 陈行烈,瞿建军,赵凡智,等. 新疆薰衣草化学成分的研究[J]. 新疆大学学报(自然科学版). 1991,8(4): 81—84.

[7] 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用[M]. 北京:科学出版社,1987.

(责任编辑:朱 明)

(上接第 67 页)

[5] Trent III J T, Watts R A, Hargrove M S. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen[J]. **J Bio Chem**, 2001, 276: 30106—30110.

[6] Moens L, Dewilde S. Globin in the brain[J]. **Nature**, 2000, 407: 461—462.

[7] Couture M, Burmester T, Hankeln T, *et al.* The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the present of two conformations of the heme pocket[J]. **J Biol Chem**, 2001,276: 36377—36382.

[8] Sun Y J, Jin K L, Mao X O, *et al.* Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2001, 98: 15306—15311.

[9] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate- phenol-chloroform extraction[J]. **Anal Biochem**, 1987, 162: 156—161.

[10] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆试验指南第三版(上册)[M]. 黄培堂主译. 北京:科学出版社, 2002.

[11] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999: 278—279, 283.

[12] Zhang C G, Wang C L, Deng M Y, Li L, *et al.* Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 2002, 290: 1411—1419.

[13] Awenius C, Hankeln T, Buemester T. Neuroglobins from the zebrafish danio verio and the puffer fish tefraodon nigroviridis[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2001, 287: 418—421.

[14] Dewilde S, Laurent K, Burmester T, *et al.* Biochemical characterization and ligand-binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family[J]. **J Biol Chem**, 2001,276: 38949—38955.

[15] Jan M K, Aninda J B, Karin N, *et al.* Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2002, 99: 7992—7997.

(责任编辑:杨 萌)