

王武明, 索伦, 周雨潇, 等. 小鼠原钙黏蛋白的多样性分析及其亚型的克隆与表达[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 34–36.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.009

# 小鼠原钙黏蛋白的多样性分析及其亚型的克隆与表达

王武明<sup>1</sup>, 索伦<sup>1</sup>, 周雨潇<sup>1,2</sup>, 鲁琳<sup>1</sup>, 吴强<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学系统生物医学研究院比较生物医学中心, 上海 200240; 2. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

**摘要:**原钙黏蛋白(protoadherin)是广泛分布于中枢神经系统的一类跨膜蛋白,是钙黏蛋白家族中最大的亚族。成簇 *Pcdh* 基因包含 3 个串联的基因簇——*Pcdh*  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ , 其中 *Pcdh*  $\alpha$  和  $\gamma$  分别由 14 个和 22 个可变区及各自共同的恒定区组成。这种特殊蛋白结构决定了原钙黏蛋白各亚型在功能上既相似又不完全相同,为了系统研究原钙黏蛋白各个亚型的功能,本研究对原钙黏蛋白家族氨基酸序列保守性进行了系统性分析,并据此设计特异性的引物来完成原钙黏蛋白各个亚型的克隆;并以原钙黏蛋白  $\alpha 1$  基因为例,通过 PCR 方法成功将其从小鼠大脑中克隆并构建到带有 Myc 标签的真核表达载体 pcDNA3.1 上;利用脂质体转染方法将该基因成功表达于 293T 细胞。本研究结果将为后续其他亚型的克隆建立技术平台。

**关键词:**原钙黏蛋白;基因;克隆;小鼠;亚型;氨基酸序列

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0034-03

根据原钙黏蛋白在基因组上的排布可以分为非成簇原钙黏蛋白和成簇原钙黏蛋白,成簇原钙黏蛋白在神经系统中大量表达,是钙黏蛋白超家族中最大的一个亚家族<sup>[1]</sup>。成簇原钙黏蛋白包含 3 个串联基因簇—— $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ <sup>[2]</sup>。其中原钙黏蛋白  $\alpha$  和  $\gamma$  分别由 14 个和 22 个可变区及各自共同的恒定区组成,并通过基因的可变剪接编码成 36 种原钙黏蛋白分子,而原钙黏蛋白  $\beta$  的 22 个成员仅分别由 1 个外显子编码而成<sup>[2]</sup>。研究表明,原钙黏蛋白在神经突触发育过程中起直接作用,作为黏附分子加强神经突触的连接,在突触特异性形成过程中也发挥重要作用<sup>[3]</sup>。原钙黏蛋白根据其胞内段的差异可以分为 A 类型和 B 类型, A 类型在调节学习记忆和海马 5-羟色胺总量上起重要的作用<sup>[4]</sup>,原钙黏蛋白  $\alpha$  和  $\gamma$  负调控 PYK2 活性,依赖胞内区与 PYK2 结合<sup>[5]</sup>,并通过 PYK2-RhoGTPase 通路调节细胞骨架从而影响神经元树突发育<sup>[6]</sup>,结果表明,原钙黏蛋白经由调节细胞黏附来建立神经元连接。迄今为止,已经发现大约 60 多种原钙黏蛋白在中枢神经系统中表达<sup>[7]</sup>。原钙黏蛋白与典型的钙黏蛋白一样,由 6 个胞外 EC 结构域、跨膜区和胞内区 3 部分组成,各亚型在结构上高度相似,在氨基酸序列上却不完全相同<sup>[2,8]</sup>。众多研究结果表明,原钙黏蛋白各个亚型在神经元发育过程中分别发挥着独特的作用。为了系统探索各个亚型的作用,本研究通过软件分析原钙黏蛋白  $\alpha$  家族氨基酸序列保守性,以原钙黏蛋白  $\alpha 1$  基因为例将其构建到 pcDNA3.1 载体并顺利表达,结果将为原钙黏蛋白其他亚型克隆及其后续功能研究建立技术平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞和表达载体 真核表达载体 pcDNA3.1(一)myc His A 购自 Invitrogen;293T 细胞系由上海交通大学肿瘤所实验室赠送。

1.1.2 试剂和酶类 Tris 碱、甘氨酸、过硫酸铵和十二烷基磺酸钠购自 Sigma-Aldrich 公司。无水乙醇、甲醇、氯化钠、乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸钠等试剂购自国药集团化学试剂有限公司;TRIzol Reagent 购自 Gibco(life technologies)公司;胰化蛋白胨与酵母提取物购自 Oxoid 公司;RT-PCR 试剂盒、电泳级琼脂糖和核糖核酸酶购自 Promega 公司;质粒小抽和胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;质粒中抽试剂盒购自 Qia-gen 公司。30% Acr/Bis 储备胶溶液和封闭用脱脂奶粉,购自 Bio-Rad 公司;胰蛋白酶和胎牛血清购自 Gibco 公司;100 bp DNA Ladder marker、1 kb DNA Ladder marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;Opti-MEM 液体培养基、Lipofectamine 2000、蛋白 marker Seeblue Plus2 Prestained Standard 购自 Invitrogen 公司; $T_4$  连接酶、限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司;RIPA 细胞裂解液购自碧云天公司。

1.1.3 引物 本试验所用引物由上海生工生物工程技术公司合成 上游引物 PF: 5'-AGCTCGAGCTCGATACG-GAAAGTGCAGTAC-3'包含 1 个 *Xho*I 酶切位点。下游引物 PR: 5'-AGCAAGCTTACACTGGTCACTGTTGTCCGT-3'包含 1 个 *Hind*III 酶切位点。

1.1.4 抗体 mouse anti-Myc(Millipore), mouse anti- $\beta$ -actin(Abcam), mouse anti-protocadherin  $\alpha$  由艾比玛特公司定制生产。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取小鼠大脑组织 50~100 mg,加 1 mL TRIzol 试剂,在冰上将组织捣碎,12 000 r/min,4℃离心 10 min,将上清液转移至另外无核酸酶的离心管里,室温孵育

收稿日期:2013-12-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31200825);国家重大科学研究计划(编号:2009CB918701)。

作者简介:王武明(1988—),男,江西抚州人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:wwmncusjtu@163.com。

通信作者:吴强,博士,教授,主要从事神经发育研究。E-mail:qiangwu@sjtu.edu.cn。

5 min, 然后加 0.2 mL 氯仿, 急剧摇晃 15 s, 室温孵育 3 min, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 15 min, 转移分界面上层无色液体到另外离心管中, 加 0.5 mL 异丙醇沉淀 RNA, 室温放置 10 min, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min, 去除上清液, 加 1 mL 75% 乙醇洗 RNA 沉淀, 然后 7 500 r/min, 4 ℃ 离心 5 min, 去除上清, 加无核酸酶的水溶解 RNA 沉淀。

1.2.2 RT-PCR 运用 2 步法, 第 1 步首先合成 cDNA: 取 1 μg 总 RNA, 70 ℃, 10 min, 简单离心后放置在冰上。准备 20 μL 反应体系, 包括 4 μL 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 逆转录 10 × 缓冲液 2 μL, 10 mmol/L dNTP 混合液 2 μL, 重组 RNasin 核糖核酸酶抑制剂 0.5 μL, AMV 逆转录酶 15 U, Oligo(dT)<sub>15</sub> 引物或随机引物 0.5 μg, 总 RNA 1 μg, 加无核酸酶的水到 20 μL 体积。如果用 Oligo(dT)<sub>15</sub> 引物扩增, 将反应体系放于 42 ℃, 15 min; 如果用随机引物扩增, 将反应体系室温放置 10 min, 然后放置在 42 ℃, 15 min。最后 95 ℃ 热激样品 5 min, 放于 0~5 ℃, 5 min。

第 2 步 PCR: 以反转录得到的 cDNA 为模板, 以 PF、PR 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应参数: 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 15 s, 57 ℃ 退火 30 s, 68 ℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 最后 68 ℃ 7 min。PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 用胶回收试剂盒回收纯化。

1.2.3 重组质粒 pcDNA3.1-Myc-Pcdh α1 的构建 PCR 扩增原钙黏蛋白 α1 经电泳、胶回收纯化后用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 消化, 连接到用同样酶切割了多克隆位点的 pcDNA3.1 载体上。

1.2.4 JM109 感受态进行转化, 用氨苄抗性平板筛选克隆。

1.2.5 菌落 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序 菌落 PCR 挑取单克隆菌落, 稀释于 10 L 灭菌水中, 以 1 L 菌液为模板, 配成 10 L 反应体系。PCR 反应参数: 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 20 s, 57 ℃ 退火 30 s, 68 ℃ 延伸 3 min, 26 个循环; 最后 68 ℃ 7 min。菌落 PCR 鉴定正确后, 将剩余的 9 L 菌液小摇扩繁, 第 2 天小抽提取质粒。

酶切鉴定 测定小抽质粒浓度, 酶切体系: 质粒 200 ng, 10 × BSA 0.5 μL, 10 × 酶切缓冲液 0.5 μL, 限制性内切酶 *Xho* I 0.3 μL, *Hind* III 0.3 μL, 加无菌水至 5 μL, 放于 37 ℃, 1 h。琼脂糖凝胶电泳检测片段大小。酶切鉴定正确后测序。

1.2.6 重组质粒在真核细胞中表达 将鉴定正确的重组菌用含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基进行扩大培养。14~16 h 后, 收获菌液, 中抽质粒。用 6 孔板培养 293T 细胞, 待细胞长至 80%~90% 时, 用 Lipofectamine 2000 转染细胞, 48 h 后收获细胞。用 RIPA 裂解液裂解细胞, 蛋白悬浮液 4 ℃, 12 000 r/min 离心 20 min。取上清加 2 × Loading buffer 99 ℃ 煮 5 min, 用于蛋白质免疫印迹试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 原钙黏蛋白 α 家族多样性分析

利用 DNAMAN 软件分析原钙黏蛋白 α 家族氨基酸序列保守性发现, 由可变外显子编码的氨基酸序列保守性较差, 尤其在接近跨膜区的一段胞内域, 有一段特异性很强的序列, 但胞内段 C 端有一段较长的氨基酸序列 (150 个氨基酸) 完全一样, 这种特殊的蛋白结构决定了原钙黏蛋白各亚型之间在功能上既有其相似性又不完全相同 (图 1)。

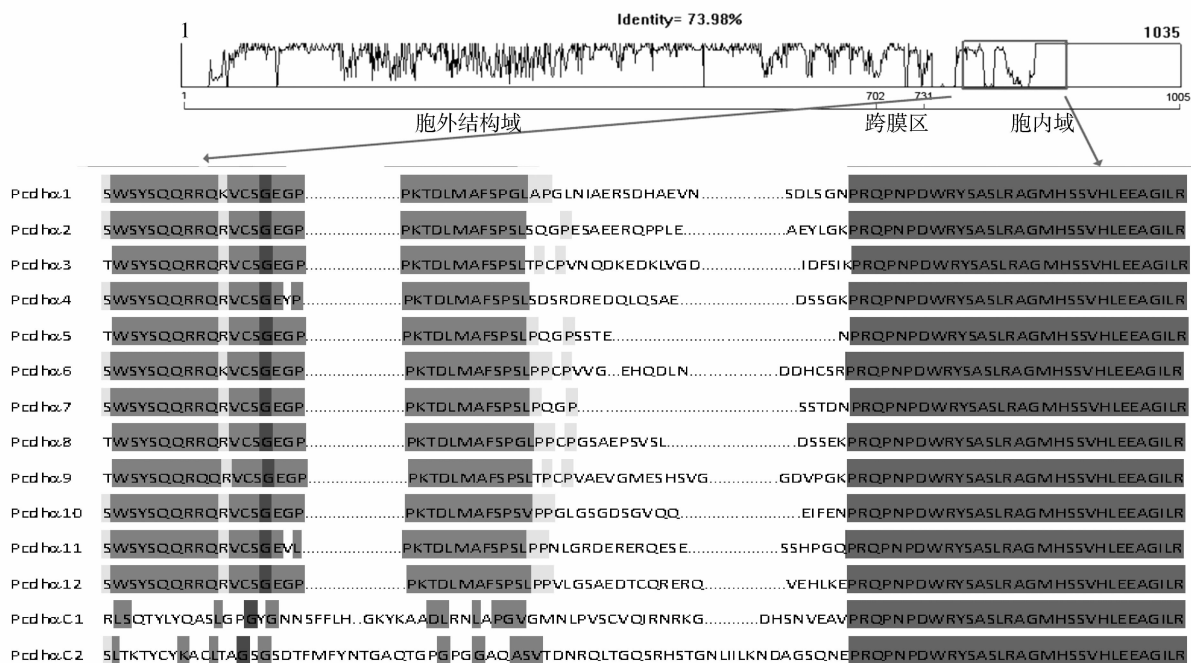


图1 原钙黏蛋白 α 家族氨基酸序列保守性分析

### 2.2 原钙黏蛋白 α1 基因的克隆和表达载体构建

2.2.1 RT-PCR 扩增原钙黏蛋白 α1 基因 以反转录的 cDNA 第 1 条链为模板, 以 PF、PR 为引物 PCR, 用 0.8% 的琼脂糖进行电泳, 在 2 800 bp 左右获得与目的片段大小相同的

扩增条带, 结果如图 2 所示。

2.2.2 菌落 PCR 鉴定 以单克隆菌落为模板, 以 PF、PR 为引物 PCR, 扩增得到 2 874 bp 的目的条带, 结果如图 3 所示。

2.2.3 重组质粒在 293T 细胞中的表达 重组质粒转染到

293T 细胞中,过表达原钙黏蛋白  $\alpha 1$  基因,通过 Western blot 方法,分别用 mouse anti - Myc 和 mouse anti - protocadherin  $\alpha$  抗体检测,结果如图 4、图 5 所示,在 110 ku 处有 1 条明显的蛋白条带,对照没有条带,而  $\beta$  - *actin* 的表达量几乎一致,说明  $\alpha 1$  基因成功表达。

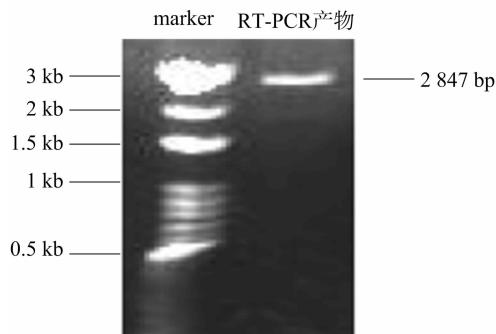


图2 RT-PCR 结果

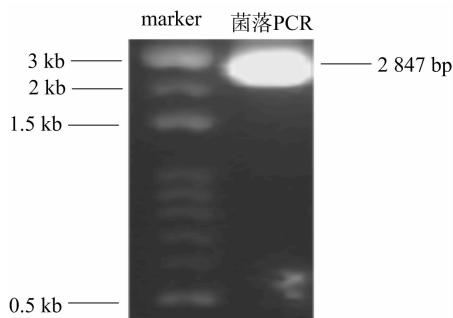


图3 菌落PCR结果

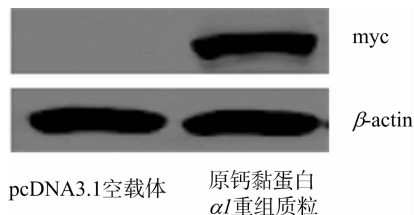


图4 Western blot 用Myc抗体检测结果

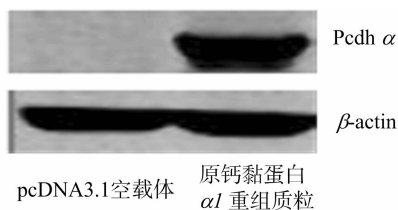


图5 Western blot 用protocadherin 抗体检测结果

### 3 结论与讨论

原钙黏蛋白在脊椎动物中广泛存在<sup>[9]</sup>,在神经系统中广泛表达<sup>[7]</sup>,而且包含数十种亚型<sup>[2]</sup>,各亚型在神经元特异性识别中分别起重要作用<sup>[10-11]</sup>。相关文献报道,原钙黏蛋白  $\alpha$  和  $\gamma$  家族基因可以调节神经元发育和突触形成<sup>[6,12]</sup>,这对解

释某些重大神经疾病有重要的启示作用。本研究利用 DNA-MAN 软件分析了原钙黏蛋白  $\alpha$  家族氨基酸序列保守性,对其蛋白质多样性进行分析,发现整个家族各亚型在胞内区有一段氨基酸序列完全一样,但胞外区和小部分胞内区保守性较差,这决定了各亚型在功能上既有相似性又不完全相同。本研究成功克隆原钙黏蛋白  $\alpha 1$  基因并构建到 pcDNA3.1 载体上。克隆原钙黏蛋白  $\alpha 1$  基因全长,为后期系统研究原钙黏蛋白各个亚型的作用打下了基础,是进一步深入研究原钙黏蛋白家族基因的有力工具。

### 参考文献:

- [1] Sano K, Tanihara H, Heimark R L, et al. Protocadherins; a large family of cadherin - related molecules in central nervous system[J]. EMBO Journal, 1993, 12(6): 2249 - 2256.
- [2] Wu Q, Maniatis T. A striking organization of a large family of human neural cadherin - like cell adhesion genes[J]. Cell, 1999, 97(6): 779 - 790.
- [3] Weiner J A, Wang X Z, Tapia J C, et al. Gamma protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(1): 8 - 14.
- [4] Fukuda E, Hamada S, Hasegawa S, et al. Down - regulation of protocadherin - alpha A isoforms in mice changes contextual fear conditioning and spatial working memory[J]. European Journal of Neuroscience, 2008, 28(7): 1362 - 1376.
- [5] Chen J, Lu Y Y, Meng S X, et al. Alpha - and gamma - protocadherins negatively regulate PYK2[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(5): 2880 - 2890.
- [6] Suo L, Lu H N, Ying G X, et al. Protocadherin clusters and cell adhesion kinase regulate dendrite complexity through Rho GTPase[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2012, 4(6): 362 - 376.
- [7] Zou C, Huang W, Ying G, et al. Sequence analysis and expression mapping of the rat clustered protocadherin gene repertoires[J]. Neuroscience, 2007, 144(2): 579 - 603.
- [8] Wu Q, Zhang T, Cheng J F, et al. Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters[J]. Genome Research, 2001, 11(3): 389 - 404.
- [9] Wu Q. Comparative genomics and diversifying selection of the clustered vertebrate protocadherin genes[J]. Genetics, 2005, 169(4): 2179 - 2188.
- [10] Lefebvre J L, Kostadinov D, Chen W V, et al. Protocadherins mediate dendritic self - avoidance in the mammalian nervous system[J]. Nature, 2012, 488(7412): 517 - 521.
- [11] Chen W V, Alvarez F J, Lefebvre J L, et al. Functional significance of isoform diversification in the protocadherin gamma gene cluster[J]. Neuron, 2012, 75(3): 402 - 409.
- [12] Garrett A M, Schreiner D, Lobas M A, et al. gamma - Protocadherins control cortical dendrite arborization by regulating the activity of a FAK/PKC/MARCKS signaling pathway[J]. Neuron, 2012, 74(2): 269 - 276.