

真核重组质粒 pCDNA3.1-Flag-PTEN 和原核重组质粒 pGEX-6P-1-GST-PTEN 构建

柴云, 于明, 朱颖

[摘要] **目的:**构建人第 10 号染色体缺失的磷酸酶(PTEN)真核重组质粒 pCDNA3.1-Flag-PTEN 和原核重组质粒 pGEX-6P-1-GST-PTEN, 研究 PTEN 融合质粒生物学效应。**方法:**根据基因库中 PTEN 序列, 设计并合成相关引物。用基因重组技术将目的片段插入 pCDNA3.1-Flag 和 pGEX-6P-1-GST 空载质粒中, 通过 PCR 和 DNA 测序, 鉴定插入基因序列。将 pCDNA3.1-Flag-PTEN 转染到 HEK 293 细胞, 将 pGEX-6P-1-GST-PTEN 转到 *E. coli* BL-21 中, 通过 Western blotting 和考马斯亮蓝染色法分别检测 PTEN 蛋白的表达。**结果:**PCR 显示目的基因插入成功; DNA 测序显示插入序列与目的基因序列完全一致, 无位点突变; Western blotting 和考马斯亮蓝染色法证实融合质粒可以在生物体内正确表达。**结论:**成功构建 PTEN 相关真核和原核融合质粒并正确表达, 为 PTEN 在帕金森疾病中的机制研究奠定了基础。

[关键词] 抑癌蛋白; 人第 10 号染色体缺失的磷酸酶; 真核; 原核; 克隆构建; 重组表达

[中图分类号] R 392.13 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.11.001

Construction of eukaryotic recombinant plasmid pCDNA3.1-Flag-PTEN and prokaryotic recombinant plasmid pGEX-6P-1-GST-PTEN

CHAI Yun, YU Ming, ZHU Ying

(Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212001, China)

[Abstract] **Objective:**To construct the eukaryotic recombinant plasmid pCDNA3.1-Flag-PTEN and prokaryotic recombinant plasmid pGEX-6P-1-GST-PTEN of phosphatase and tension homologue deleted on chromosome ten (PTEN), and study the biological effects of PTEN fusion plasmid. **Methods:**The primers of PTEN gene were designed according to the sequence in Gene Bank. The target fragment was inserted into pCDNA3.1-Flag and pGEX-6P-1-GST empty vector by genetic recombination technique, and the inserted gene sequence was identified by PCR and DNA sequencing. The pCDNA3.1-Flag-PTEN was transfected into HEK293 cells and pGEX-6P-1-GST-PTEN was transfected into *Escherichia coli* BL-21. The expression of PTEN protein was detected by Western blot and Coomassie brilliant blue staining. **Results:**The PCR results showed that the target gene was successfully inserted. The results of DNA sequencing showed that the inserted sequence was completely consistent with the target gene sequence, and no site-mutation was found. The results of Western blot and Coomassie brilliant blue staining confirmed that the fusion plasmid could be correctly expressed *in vivo*.

Conclusions:The successful construction and correct expression of PTEN in eukaryotic and prokaryotic expression vectors can provide a basis for further study of the mechanism of PTEN in Parkinson's disease.

[Key words] tumor suppressor protein; phosphatase and tension homologue deleted on chromosome ten; eukaryon; prokaryon; clone construction; recombinant expression

人第 10 号染色体缺失的磷酸酶 (phosphatase and tension homologue deleted on chromosome ten, PTEN) 基因位于人类染色体 10q23.3, 属于蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatases, PTP) 基因家族。迄今为止, PTEN 蛋白是发现的首个具有脂

质磷酸酶和蛋白质磷酸酶双重活性的抑癌蛋白^[1]。研究^[2]表明, 不同种属的 PTEN 基因具有高度同源性, 作为生物体内重要的调控基因, PTEN 基因参与多种细胞的生长、增殖、分化、迁移和凋亡等环节。同时, PTEN 基因参与了包括帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 在内的多种神经退行性疾病的发病机制。本研究通过基因工程技术构建 PTEN 的真核和原核表达载体, 并将重组质粒 Flag-PTEN 和 GST-PTEN 分别转入 HEK 293 细胞和大肠埃希菌 BL-21 中, 诱导其正确表达, 为后续进一步研究 PTEN 参与 PD 发病机制中的具体信号通路提供理论基础。现作报道。

[收稿日期] 2019-03-12 [修回日期] 2019-04-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81601043); 镇江市重点研发计划项目 (SH2018037)

[作者单位] 江苏大学附属医院 神经内科, 江苏 镇江 212001

[作者简介] 柴云 (1993-), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 于明, 主任医师, 硕士研究生导师。E-mail: yuming7251@163.com; 朱颖, 主任医师, 硕士研究生导师。E-mail: zhuyingdoctor@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 真核表达载体 pCDNA3.1、原核表达载体 6P-1-pGEX、HEK 293 细胞均为江苏大学附属医院中心实验室惠赠。*E. coli* DMT 和 BL-21 细菌株 (TRAN 公司);限制性内切酶 *BamH* I 和 *EcoR* I 酶 (Thermo 公司);T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司);BCA 蛋白定量试剂盒、质粒小提试剂盒、PCR 回收试剂盒、RIPA 细胞裂解液、DAB 试剂盒 (Beyotime 公司);PTEN 的兔多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (Solarbio 公司);根据基因库中人 PTEN 基因编码多肽氨基酸序列 (AF067844.1) 设计多条引物用于基因拼接,由上海生物工程公司合成;其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 引物设计及基因扩增 检索 NCBI 网站上 PTEN 编码区基因序列,设计 PTEN 特异性引物 (primer 5 软件) (见表 1)。真核融合质粒选择的 PTEN 基因片段长 1 209 bp,原核融合质粒选择的 PTEN 基因片段长 162 bp。通过 PCR 大量扩增目的片段。PCR 反应条件为 94 °C 3 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 25 s,共 38 个循环,72 °C 延伸 5 min,扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

表 1 PTEN 基因特异性引物

质粒类别	引物名称	引物序列(5'→3')
真核	HOMO-PTEN-Q-F	atgacagccatcatcaaga
真核	HOMO-PTEN-Q-R	cggaaattccagacttttgaatttg
原核	PTEN-CF	cgggatccacagtagaggagccgtca
原核	PTEN-CR	cggaaattccagacttttgaatttg

1.3 融合质粒 pCDNA3.1-Flag-PTEN 和 pGEX-6P-1-GST-PTEN 的构建和鉴定 用 *BamH* I 和 *EcoR* I 分别双酶切载体 pCDNA3.1-Flag 和 PTEN 基因片段、载体 6P-1-pGEX 和 PTEN 基因片段,于 37 °C 孵箱中反应 12 h;使用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收后,用 T4 DNA 连接酶于 37 °C 反应 16 h;连接产物转化至 *E. coli* DMT 感受态中,冰浴 30 min,42 °C 热激 90 s,再次冰浴 3~5 min,加入 0.5 mL LB 培养基 (不含抗生素),放入 37 °C 200 r/min 摇床中震动 1 h后,将菌液涂布到 LB 固体培养基 (Amp +) 上,于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中孵育过夜;挑选 3~5 个单克隆菌落分别接种到 7 mL LB 液体培养基 (Amp +) 中,37 °C 200 r/min 摇床中振荡过夜。第 2 天提取质粒,双酶切后产物,琼脂糖凝胶电泳阳性者送上

海生物工程公司测序。

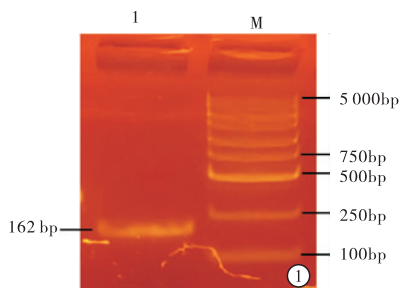
1.4 真核重组质粒 pCDNA3.1-Flag-PTEN 转染 HEK 293 细胞中的表达与蛋白纯化 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HEK 293 细胞,并置于 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱中,待其生长融合度至 80%,将适量 HEK 293 细胞接种到 6 孔板,待其生长融合度至 50%~80%时,采用 LipoHigh 脂质体高效转染试剂体系将 pCDNA3.1-Flag 和 pCDNA3.1-Flag-PTEN 分别转染 HEK 293 细胞,并于 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h。

1.5 原核重组质粒 pGEX-6P-1-GST-PTEN 转化 *E. coli* BL-21 中表达与蛋白纯化 将 pGEX-6P-1-GST-PTEN 重组质粒转化至 *E. coli* BL-21 感受态中,挑选 3~5 个挑取单菌接种到 LB 液体培养基 (Amp +) 中,37 °C 200 r/min 摇床中振荡培养过夜,第 2 天取 1 mL 细菌悬液转接到新鲜的 20 mL LB 液体培养基 (Amp +),37 °C 200 r/min 摇床中振荡培养 2 h,使得菌液吸光度值 (600 nm) ≈ 0.6,然后加入 21 μL IPTG (诱导 *E. coli* BL-21 表达目的蛋白) 至终浓度为 0.1 mmol/L,16 °C 200 r/min 继续振荡培养 8 h 后收集菌体,用 6 mL PBS 重悬菌液,冰上超声裂解细菌,超声功率 200~300 W,每次超声处理 1 s,间隔 1 s,共处理约 15 min 至菌液清亮。将破碎的菌液 4 °C 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液于离心管中并置于冰水浴。取 40 μL GST 磁珠悬液,用 1 mL PBS 于 4 °C,2 000 r/min,离心 10 s,液体,重复漂洗 2 次。将 4 mL 细菌裂解上清液与漂洗过后 GST 磁珠混合,4 °C 侧摆摇床过夜。第 2 天将混合液 4 °C 1 500 r/min 离心 5 min 收集沉淀,用 PBS 漂洗 3 遍。加入事先配制好的 200 μL GST 磁珠洗脱液,4 °C 侧摆摇床振荡 10 min,离心取上清后再洗脱 1 遍。

1.6 Western blotting 检测真核融合质粒表达的重组蛋白 Flag-PTEN 水平 在 HEK 293 细胞转染 24 h 后,弃去旧培养基,用 PBS 漂洗,加入 100 μL RIPA (含 1% 蛋白酶抑制剂),冰上裂解 20~30 min,用细胞刮板在冰上轻轻刮起细胞,吸至 1.5 mL 离心管内,冰上静置 30 min,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清。用 BCA 试剂盒测蛋白浓度,每孔取含有 400 μg 蛋白的细胞裂解上清液,用 RIPA 将两者的体积补成一致,继续加入总体积 1/4 量的 4 × SDS 上样缓冲液,金属浴 100 °C 煮 10 min 后,4 °C,3 000 r/min 离心 5 s。取相同体积量的上清液进行 SDS-PAGE,再电转移至硝酸纤维素膜上;用 5% 脱脂奶粉于 4 °C 封闭 1 h;用 1 × TBST 按 1:1 000 比例

稀释 Rabbit PTEN Polyclonal Antibody, 4 ℃ 孵育过夜; 1 × TBST 洗膜 3 次, 10 min/次; 再用 1 × TBST 按 1:10 000 比例稀释 Goat anti-Rabbit, 室温摇床孵育 1 h, 1 × TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 化学发光法显色 2 min, 压片显影。

1.7 考马斯亮蓝染色脱色法检测原核融合质粒表达的重组蛋白 GST-PTEN 水平 重组蛋白 GST-PTEN 按比例加 4 × 蛋白质上样缓冲液 (含 DTT), 100 ℃ 金属浴 10 min; 经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 取凝胶放入适量考马斯亮蓝染色液中, 确保充分覆盖凝胶, 置于水平摇床缓慢摇动, 室温染色 4 h; 倒出染色液, 加入适量考马斯亮蓝染色脱色液, 确保充分覆

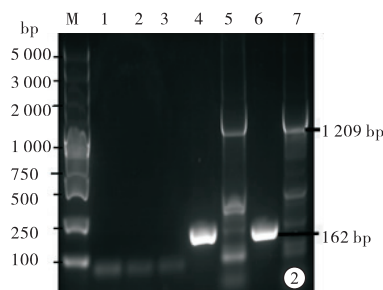


1: 平板上单菌落 PTEN-C(162 bp) 原核表达载体; M: DNA 标准参照物 DL 5000
图 1 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PTEN 基因

盖凝胶; 置于水平摇床缓慢摇动, 室温脱色 4 ~ 24 h, 期间更换脱色液 2 ~ 4 次, 直至蓝色背景基本上全部被脱去, 并且蛋白条带染色效果达到预期。

2 结果

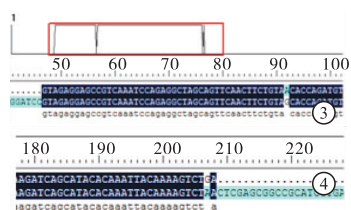
2.1 PTEN 基因克隆的鉴定 构建 PTEN-C 原核表达载体 (162 bp) 和 PTEN (1 209 bp) 真核表达载体。重组质粒经过菌落 PCR 验证, 均扩增出特异 DNA 片段 (见图 1、2)。与测序结果的 BLAST 进行比对, 结果进一步确定插入片段碱基无缺失、无突变、无移位, 正确率达 100%, 说明目的载体构建成功 (见图 3、4)。



M: DNA 标准参照物 DL 5000; 1、3、5、7: 平板上不同单菌落 PTEN(1 209 bp) 真核表达载体; 2、4、6: 平板上不同单菌落 PTEN-C(162 bp) 原核表达载体
图 2 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PTEN 基因

2.2 Western blotting 检测真核融合质粒在 HEK 293 细胞中的表达 将构建的真核重组质粒 pCDNA3.1-Flag-PTEN 和空载质粒 pCDNA3.1 分别转染至 HEK 293 细胞中, 24 h 后提蛋白进行

Western blot 检测 PTEN 蛋白的表达, 结果显示 pCDNA3.1-Flag-PTEN 高表达 PTEN 目的基因; 用 GAPDH 做内参基因, 且灰度基本一致, 说明蛋白样本的蛋白总量一致, 结果真实可靠 (见图 5)。



1: 空载质粒 pCDNA3.1-Flag; 2: 真核重组质粒 pCDNA3.1-Flag-PTEN
图 3 PCR 阳性菌株反向测序结果部分图
图 5 蛋白印迹分析重组蛋白 Flag-PTEN

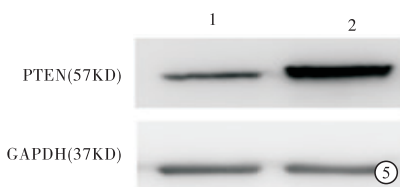


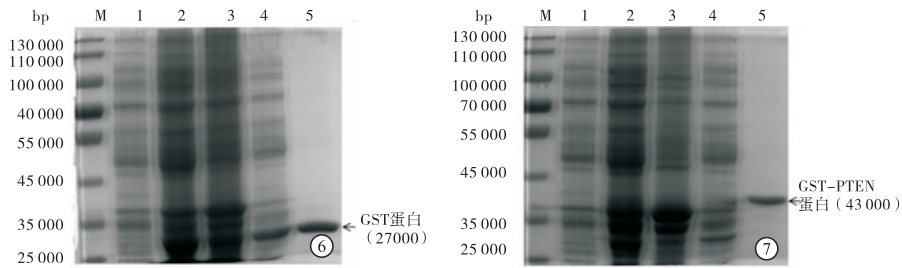
图 4 PCR 阳性菌株反向测序结果部分图

2.3 重组蛋白 GST-PTEN-C (AA350-403) 的纯化和鉴定 重组质粒 pGEX-6P-1-GST-PTEN-C (AA350-403) 转化 *E. coli* BL-21, 经 IPTG 诱导 6 h 后, 离心收集细菌, PBST 重悬, 超声粉碎仪处理, 得到的上清液含有 GST 标记的目的蛋白。使用 GST 磁珠进行选择性吸附, 并用 GST 蛋白洗脱液进行洗脱。经过考马斯亮蓝染色, 验证蛋白表达成功 (见图 6、7)。

3 讨论

PD 是一种以中脑黑质纹状体通路的退变、黑质致密区多巴胺能神经元进行性变性、丢失和胞内内

涵体路易氏小体生成为主要特征的神经系统退行性疾病。目前 PD 的发病机制尚不明确, 线粒体自噬是近年来研究的热点, 而 PI3K/AKT/mTOR 是线粒体自噬机制中至关重要的信号通路。研究^[3]表明, 抑癌基因 PTEN 正常表达可以通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路而干扰正常线粒体自噬功能, 直接影响多巴胺神经元的活性。有研究^[4-5]发现 Parkin、PINK 1、 α -synuclein、LRRK 2 等基因与 PD 的致病存在一定的相关性, 其中 Parkin、PINK 1 功能活性均受 PTEN 调节^[6-7]。因此, 我们可以得出 PTEN 参与 PD 发病过程中多条信号通路的结论, 但其具体发病



M: 蛋白标准参照物; 1: 诱导蛋白表达前的细菌悬液; 2: 诱导蛋白表达后超声前的细菌悬液; 3: 诱导蛋白表达后超声后的菌体沉; 4: 诱导蛋白表达后超声后的上清; 5: 超声后的上清经GST标签小量纯化后的洗脱液

图6 SDS-PAGE分析原核空载质粒pGEX-6P-1-GST表达GST蛋白

图7 SDS-PAGE分析原核融合质粒pGEX-6P-1-GST-PTEN蛋白表达重组蛋白GST-PTEN

机制尚不清晰,需进一步探索。

PTEN 蛋白的相对分子质量约 56 000,属于蛋白酪氨酸磷酸酶家族,在胞内表现出蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶的双重活性。目前为止,学术界公认 PTEN 的主要功能是特异性地在 PIP3 第 3 位磷酸基团去磷酸化为 PIP2 而拮抗磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K) 的功能,进而抑制 PI3K 下游特别是 PI3K-AKT 通路的信号转导,发挥抑制细胞生长、侵袭、增殖和迁移等多种生物学效应^[1,8]。近年来研究^[9]发现,PTEN 在成人中枢神经系统的神经元中高度表达,但仅限于神经元的胞核和胶质细胞的胞质中。PTEN 在中枢神经系统神经元的发育、增殖、分化、轴突的生长和突触可塑性等方面发挥着重要的调控作用,尤其与 PD 的多巴胺能神经元通路^[10-11]、 α -突触核蛋白毒性^[12]、线粒体损伤^[13]等机制均有关联,这对 PD 发病机制的研究具有重大意义,所以 PTEN 可能成为 PD 潜在治疗靶点。

鉴于 PTEN 蛋白有如此重要的功能,并且与 PD 多种发病机制之间有紧密联系,所以我们有必要构建其多种重组质粒,进而得到相关融合蛋白,为进一步研究 PTEN 蛋白生物学功能以及与 PD 相关信号通路之间的相互作用提供了便利工具。本研究根据基因库中 PTEN 序列,设计 PTEN 基因相关引物,用基因重组技术成功构建出真核表达载体 pCDNA 3.1-Flag-PTEN 与原核表达载体 pGEX-6P-1-GST-PTEN,并分别转染到 HEK 293 细胞和 *E. coli* BL-21 中正确表达出相应的 PTEN 重组蛋白,为后续研究 PTEN 的磷酸化位点以及降解方式等多种生物学功能奠定了基础,为 PD 发病机制中研究和进一步开展临床检测研究创造有利条件。

[参 考 文 献]

[1] SONG MS, SALMENA L, PANDOLFI PP. The function and regulation of the PTEN tumor suppressor[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2012,13(5):283.

- [2] BOOSANI CS, AGRAWAL DK. PTEN modulators: a patent review [J]. Expert Opin Ther Pat,2013,23(5):569.
- [3] STAVARACHE MA, MUSATOV S, MCGILL M, *et al.* The tumor suppressor PTEN regulates motor responses to striatal dopamine in normal and Parkinsonian animals [J]. Neurobiol Dis,2015,82:487.
- [4] TRINH J, FARRER M. Advances in the genetics of Parkinson disease [J]. Nat Rev Neurol,2013,9(8):445.
- [5] PICKRELL AM, YOULE RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease [J]. Neuron,2015,85(2):257.
- [6] DAI H, DENG Y, ZHANG J, *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy alleviates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. Toxicology,2015,334:72.
- [7] SCARFFE LA, STEVENS DA, DAWSON VL, *et al.* Parkin and PINK1: much more than mitophagy [J]. Trends Neurosci,2014,37(6):315.
- [8] WANG Z, ZHOU L, ZHENG X, *et al.* Autophagy protects against PI3K/Akt/mTOR-mediated apoptosis of spinal cord neurons after mechanical injury [J]. Neurosci Lett,2017,656:158.
- [9] OHTAKE Y, HAYAT U, LI S. PTEN inhibition and axon regeneration and neural repair [J]. Neural Regen Res,2015,10(9):1363.
- [10] KLEENE R, CHAUDHARY H, KARL N, *et al.* Interaction between CHL1 and serotonin receptor 2c regulates signal transduction and behavior in mice [J]. Reactions Weekly,2015,1557(1):70.
- [11] WANG X, PANG L, ZHANG Y, *et al.* Lycium barbarum polysaccharide promotes nigrostriatal dopamine function by modulating PTEN/AKT/mTOR pathway in a methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) murine model of Parkinson's disease [J]. Neurochem Res,2018,43(4):938.
- [12] MIKLYA I, PENCZ N, HAFENSCHER F, *et al.* The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease [J]. Neuropsychopharmacol Hung,2014,16(2):77.
- [13] LARSEN S B, HANSS Z, KRÜGER R. The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. Cell Tissue Res,2018,373(1):21.