

技术与方法

高GC含量基因*NADK2*的扩增及其真核表达载体的构建

陈静怡 张沪娇 刘丹慧*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 检验医学教育部重点实验室, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 在构建线粒体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸激酶(mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide kinase, *NADK2*)真核表达载体时, 该文发现, 使用Ex *Taq* DNA聚合酶扩增无法得到其编码区域全长, 5'端缺失一段DNA片段。对其cDNA序列进行分析发现, *NADK2*编码区GC含量不均衡。起始密码子附近GC含量最高可达92.5%, 而3'端终止密码子附近GC含量最低只有27.5%。之后, 使用LA *Taq*及GC缓冲液进行扩增, 得到了*NADK2*基因ORF(open reading frame)全长, 并克隆入真核表达载体。该文结果对类似高GC含量DNA片段的PCR扩增有一定的提示作用。

关键词 *NADK2*; PCR; 高GC含量; LA *Taq*

Amplification of GC-Rich *NADK2* Gene and Construction of Its Eukaryotic Expression Vector

Chen Jingyi, Zhang Lujiao, Liu Danhui*

(School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education of China, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract The coding region of mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide kinase (*NADK2*) gene can't be amplified with Ex *Taq* DNA polymerase. The PCR products lacks a fragment in the 5' terminal. We find that the GC distribution is highly uneven in the open reading frame (ORF) of *NADK2* gene. The GC content is as high as 92.5% at its 5' terminal, whereas it is as low as 27.5% at its 3' terminal. We then use LA *Taq* with GC buffer to amplify the target region and get the full length of *NADK2* gene ORF. Our results can be informative for researchers cloning similar DNA fragments with high GC content.

Keywords *NADK2*; PCR; high GC content; LA *Taq*

在体外培养的细胞中升高或抑制特定基因的表达并检测细胞功能的变化是研究基因功能及相

关机制的常规方法。为了构建真核表达载体, 首先需要使用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术, 以cDNA为模板扩增目的基因的蛋白质读码框(open reading frame, ORF)。富含GC的目的基因(GC含量大于60%)容易形成发夹等二级结构, 溶解温度高, PCR扩增难度较大。扩增这些目的片段时, 需要对PCR条件进行优化, 如提高变性温度、调整镁离子浓度、在反应体系中加入DMSO、甘油

收稿日期: 2016-12-12 接受日期: 2017-02-16

国家自然科学基金青年基金(批准号: 81301744)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699651, E-mail: danhui@outlook.com

Received: December 12, 2016 Accepted: February 16, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China for the Distinguished Young Scholar (Grant No.81301744)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699651, E-mail: danhui@outlook.com

网络出版时间: 2017-03-20 10:22:45

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170320.1022.002.html>

等有机试剂等, 还可以使用 Slowdown PCR 和热启动 PCR 等方法^[1]。

我们在扩增 NAD 激酶线粒体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸激酶基因 (mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide kinase, *NADK2*) ORF 时发现, 使用常规方法进行 PCR 扩增得到的产物在 5' 端缺失了长短不一的 DNA 片段, 无法用于后续实验。为此, 我们对 *NADK2* 的扩增条件进行摸索, 尝试使用提高退火温度、延长变性时间、Touchdown PCR 法或在反应体系中加入 DMSO 有机溶剂等扩增高 GC 含量基因的多种方法, 但均未得到目的片段全长。最后, 我们发现, 使用 TaKaRa 公司的 LA *Taq* 及 GC 缓冲液可以扩增得到 *NADK2* 基因全序列, 并最终成功构建了其真核表达载体。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

cDNA 反转录试剂盒 (RR037A)、热启动 Ex *Taq* DNA 聚合酶 (RR030A) 和 LA *Taq* DNA 聚合酶 (RR02AG) 均购自 TaKaRa 公司。肝细胞系 HL7702 和肝癌细胞系 HepG2 购自和元生物科技股份有限公司。培养条件为完全培养基 (含 1% 青霉素-链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基), 将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。DMSO (D8370) 购自 Solarbio 公司。

1.2 引物设计与载体信息

我们设计了两对引物来进行克隆, 扩增引物与目的片段完全互补, 用于以 cDNA 为模板首先扩增目的基因, 克隆引物其两端带有 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点, 所得产物酶切后可以连接入目的载体。所用引物序列如下, 扩增引物 Forward: 5'-ATG ACT TGC TAC CGA GGC TT-3'; Reverse: 5'-TTA GGA GGA AAG GGA AGG-3'。克隆引物 Forward: 5'-ATA GAA TTC GCC ACC ATG ACT TGC TAC CGA GGC TTC-3'; Reverse: 5'-AGC GGA TCC TCA CTG TTC AAG AAG CAC AGT T-3'。真核表达载体 pSinEGFPiresPURO 由温州医科大学谷峰教授赠送。

1.3 反转录

提取正常肝细胞株 HL7702 的总 RNA, 按说明书操作合成 cDNA。

1.4 PCR 条件

扩增引物反应条件为: 95.0 °C 预变性 5 min;

95.0 °C 变性 30 s, 48.4 °C 退火 1 min, 72.0 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72.0 °C 反应 10 min。克隆引物反应条件退火温度为 59.9 °C, 其余与扩增引物反应条件相同。

1.5 细胞转染及 Western blot 检测 *NADK2* 表达

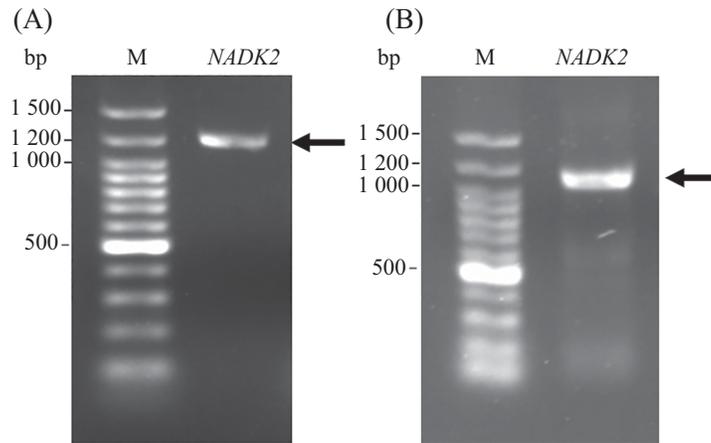
1.5.1 细胞转染 将 HepG2 接种于 6 孔板中, 在处于指数生长期、汇合度大约在 80% 的时候将培养基换成不含双抗的 10% FBS 培养基。在 200 μL DMEM 中加入 2 000 ng 质粒, 振荡 10 s 混匀后, 加入 4.4 μL PEI 再次振荡混匀后室温静置 20 min, 将混合液加到靶细胞培养基中, 待 48 h 后收获转染细胞。

1.5.2 Western blot 检测 将处于指数生长期的细胞裂解, 提取总蛋白。用 BCA 法测定蛋白质浓度, 保证所有样品蛋白质上样量一致。在 10% SDS-PAGE 胶上进行电泳, 分离蛋白质后, 将蛋白质转印至 PVDF 膜上。有蛋白质印迹的 PVDF 膜经 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 在 4 °C 环境下孵育一抗过夜。第二日, 将膜上残余一抗用 TBST 洗干净, 与带有显色标记的二抗在室温下孵育 1 h, 用 TBST 将 PVDF 膜上非特意结合的二抗洗干净, 用化学显色法曝光显色, 以鼠抗 GAPDH 作为内参, 观察靶蛋白水平。

2 结果

2.1 使用常规方法扩增无法得到 *NADK2* 基因 ORF 全长

NADK2 cDNA 全长 3 897 bp, 其中, ORF 区域为 1~1 329 bp, 编码 442 个氨基酸。使用 TaKaRa 公司的热启动 *Taq* DNA 聚合酶, 以肝细胞系合成 cDNA 为模板, 扩增 *NADK2* 基因 ORF 全长。当使用克隆引物直接进行扩增时, 无法得到目的条带。通过优化反应条件如延长变性时间, 以及改变扩增方式, 采用降落 PCR 法进行扩增, 并未得到理想效果。我们改用扩增引物进行扩增 (图 1A), 所得片段切胶回收后, 再使用克隆引物进行扩增 (图 1B), 经双酶切处理后, 连入 pSinEGFPiresPURO 载体。PCR 与双酶切鉴定选取阳性克隆, 测序结果显示, 该连接子在 5' 端缺失了一段 233 bp 的片段。重新进行 PCR 及酶切连接后, 又选取了多个克隆进行测序, 虽然这些克隆的 PCR 与双酶切鉴定结果均为阳性, 但测序结果显示这些克隆序列都不完整。这提示, 我们使用常规的 Ex *Taq* DNA 聚合酶没有扩增到完整的目的基因片段。



A: 使用扩增引物进行PCR结果; B: 使用克隆引物PCR结果。M: 标志物。箭头所指为目的条带。

A: the result of PCR with amplification primer; B: the result of PCR with clone primer. M: marker. The target band is indicated with arrows.

图1 使用Ex *Taq*扩增*NADK2*基因ORF全长

Fig.1 The full length of *NADK2* gene amplified with Ex *Taq* DNA polymerase

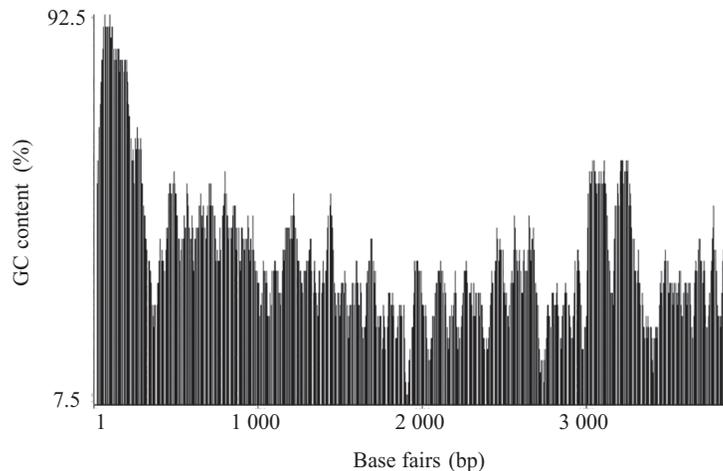


图2 *NADK2* cDNA序列GC含量分析

Fig.2 The analysis of *NADK2*'s cDNA GC content

2.2 *NADK2*基因ORF区域GC含量不均衡

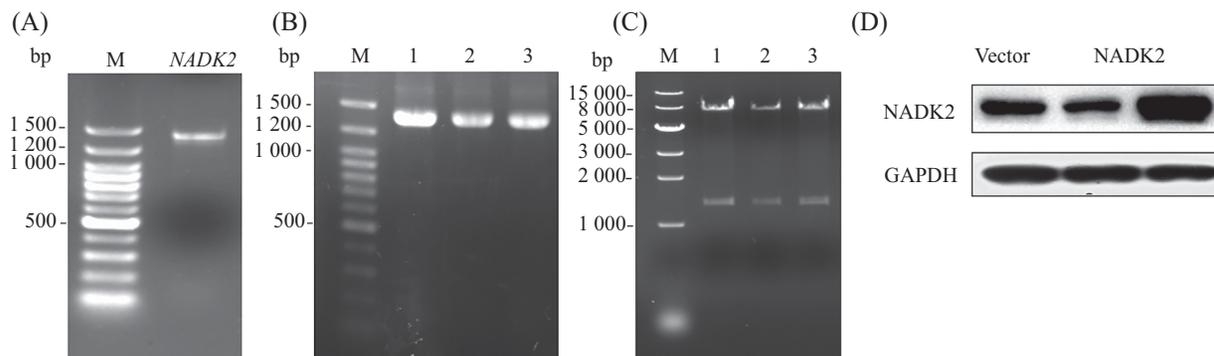
在发现使用常规PCR无法得到*NADK2*基因ORF全长后,我们对*NADK2* cDNA序列进行分析,发现*NADK2* cDNA全长GC含量为31.6%, ORF区域GC含量为50.2%, GC分布非常不均衡。ORF区域5'端起始密码子附近GC含量最高可达92.5%,而3'端终止密码子附近GC含量最低只有27.5%(图2)。我们推测上下游GC含量差异巨大是造成*NADK2*扩增效率低的主要原因,而5'端的GC含量高使其结构稳定,PCR扩增时解链不充分,造成得到的目的片段不完整。

2.3 *NADK2*基因全长的扩增及其表达

发现*NADK2*基因ORF区域GC分布特点后,我们

使用TaKaRa公司的含GC的LA *Taq*缓冲液,并且直接使用克隆引物,用与常规*Taq*酶相同反应条件进行扩增。PCR结果为清晰单一的目的条带(图3A)。之后对PCR产物进行酶切并连接到目的载体上。选取3个克隆进行菌落PCR(图3B)和双酶切鉴定(图3C),结果均未见阳性。同时,测序结果也显示载体构建成功。

为了进一步证明构建的载体可以用于在细胞中过表达*NADK2*,我们用构建的载体转染HepG2细胞,Western blot检测*NADK2*蛋白质水平。结果显示,我们构建的载体可以显著增加细胞内*NAKD2*水平,而转染空载体则不影响其蛋白质水平(图3D)。这表明,*NADK2*基因真核表达载体构建成功。



A: LA *Taq* 扩增结果; B、C: 使用菌落PCR和双酶切对挑取的3个阳性克隆进行鉴定; D: 转染HepG2 细胞后, Western blot检测NADK2蛋白质水平。
A: the full length of *NADK2* gene ORF was amplified by LA *Taq* polymerase; B,C: the positive clones were verified with clonal PCR and double enzyme digestion; D: HepG2 cells were transfected with void vector and *NADK2* vector, and the expression level of *NADK2* protein was detected by Western blot with GAPDH as the loading control.

图3 *NADK2*基因真核表达载体构建成功

Fig.3 Construction of *NADK2* gene eukaryotic expression vector

3 讨论

研究某个目的基因的生物学功能及其介导的生物学功能时,我们经常需要改变目的基因在特定细胞中的表达量,然后对细胞功能进行检测^[2-3]。将目的基因ORF序列插入真核表达载体后,再用该载体转染细胞是升高目的基因表达量的常规方法。PCR技术发明于1988年,是扩增DNA片段的最主要方法。通过PCR技术将微量DNA大幅扩增,产生大量目的DNA片段用于后续研究,是分子生物学最常见的技术之一^[4]。典型的PCR由高温变性、低温退火以及72 °C延伸三步反应组成一个循环。PCR反应经常遇到的一个难题就是富含GC碱基(GC含量>60%)的片段的扩增。

人类基因组含有约 3.4×10^9 碱基,编码3万个左右基因。其中,大约28%的基因位于富含GC碱基的区域^[5]。此外,很多启动子、增强子等多种DNA顺式调节元件也富含GC序列^[6]。对这些基因的功能及其调节的研究都需要使用PCR对这些片段进行扩增。由于高GC含量的DNA片段(GC含量>60%)容易形成高级结构,熔解温度高,在PCR反应时不易解链,造成扩增效率低。本研究中,我们使用常规的高保真酶扩增*NADK2*基因ORF区域时,发现使用克隆引物(带酶切位点序列)无法得到任何条带。而改用与目的片段完全互补的扩增引物(不含酶切位点序列)可以得到一条特异性较强的PCR条带,回收后再以之为模板,使用克隆引物扩增,并酶切连接到目的载体上。但测序结果发现,得到的PCR产物5'端缺失了大小不等的DNA片段。对*NADK2* cDNA序列进

行分析发现,其ORF区域GC含量严重不均衡。起始密码子附近GC含量最高可达92.5%,而终止密码子附近最低只有27.5%。我们推测,这是造成*NADK2*基因扩增效率低和片段缺失的原因。

在遇到难以扩增的高GC含量的DNA片段时,可以使用多种方法对PCR条件进行优化,如升高变性温度、调整反应体系中镁离子浓度、或者在反应体系中加入DMSO、甘油等有机试剂等,还可以使用Slowdown PCR和热启动PCR等方法^[1]。除此之外,购买成熟的试剂盒产品也是一种比较简便易行的方案。各大生物公司基本都有此类试剂盒可供选择。在本研究中,我们使用了TaKaRa公司的含GC的LA *Taq*缓冲液来扩增*NADK2*基因ORF区域,得到了较好的效果。Western blot结果表明,我们成功构建了*NADK2*基因真核表达载体。

回顾实验过程,我们发现,起初使用Ex *Taq*进行扩增得到的目的条带分子量比预计结果要小,但由于所得条带特异性较好,我们忽略了这一现象。使用LA *Taq*进行扩增得到的目的条带则与预计大小一致。

*NADK2*是目前已知的唯一定位于线粒体的NAD激酶,对机体正常功能的维持起着重要作用^[7]。*NADK2*的缺失会引起明显的线粒体疾病特征^[8],同时,*NADK2*在脑癌和肝癌中表达失调^[9-10],可能在这些肿瘤的发生发展中起着调控作用。本研究构建获得了*NADK2*基因真核表达载体,为后续研究打下了基础,并且我们的结果对类似高GC含量DNA片段的PCR扩增有一定的参考作用。

参考文献 (References)

- 1 Frey UH, Bachmann HS, Peters J, Siffert W. PCR-amplification of GC-rich regions: Slowdown PCR. *Nat Protoc* 2008; 3: 1312-7.
- 2 任艳萍, 雷小灿, 谢亮亮, 罗 婵, 刘晓华, 石德顺, 等. 乳腺特异性表达催乳素基因载体的构建与检测. *中国细胞生物学学报* (Ren Yanping, Lei Xiaocan, Xie Liangliang, Luo Chan, Liu Xiaohua, Shi Deshun, *et al.* The construction and detection of nuclear transfer vector specifically expressing PRL gene in the mammary gland. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2016; 38(5): 519-26.
- 3 李 俊, 陶贵周, 黄建华. 靶向LOX-1基因RNAi慢病毒载体的构建及鉴定. *中国细胞生物学学报* (Li Jun, Tao Guizhou, Huang Jianhua. Construction and identification of RNAi lentiviral vector targeting human LOX-1 gene. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(7): 973-8.
- 4 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 487-91.
- 5 Saccone S, de Sario A, Della Valle G, Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(11): 4913-7.
- 6 Hapgood JP, Riedemann J, Scherer SD. Regulation of gene expression by GC-rich DNA cis-elements. *Cell Biol Int* 2001; 25(1): 17-31.
- 7 Zhang R. MNADK, a long-awaited human mitochondrion-localized NAD kinase. *J cell physiol* 2015; 230(8): 1697-701.
- 8 Houten SM, Denis S, Te Brinke H, Jongejan A, van Kampen AH, Bradley EJ, *et al.* Mitochondrial NADP(H) deficiency due to a mutation in *NADK2* causes dienyol-CoA reductase deficiency with hyperlysinemia. *Hum Mol Genet* 2014; 23(18): 5009-16.
- 9 高 维, 董士业, 潘飞燕, 刘丹慧. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸激酶2在恶性脑肿瘤中的普遍标志表达. *解剖学报* (Gao Wei, Dong Shiye, Pan Feiyan, Liu Danhui. Nicotinamide adenine dinucleotide kinase 2 is highly expressed in malignant brain tumors. *Acta Anatomica Sinica*) 2015; 46(5): 587-90.
- 10 Zhang R. MNADK, a novel liver-enriched mitochondrion-localized NAD kinase. *Biol Open* 2013; 2(4): 432-8.