

• 基础实验研究论著 •

hVPS4A 基因克隆及真核表达载体的构建

夏剑波, 席金瓯, 刘 贲, 王维鹏

(湖北省妇幼保健院检验科, 武汉 430070)

摘要:目的 克隆人细胞空泡蛋白分选因子 4A(human vacuolar protein sorting 4A, hVPS4A)基因, 构建其真核表达质粒。方法 以 Huh7 细胞 cDNA 为模板, 设计引物扩增全长 hVPS4A 基因, 再将目的基因插入到真核载体 pRK5 中。重组质粒经 PCR、酶切和 DNA 测序确认。结果 从 Huh7 细胞 cDNA 中扩增得到约 1 350 bp 大小的目的片段, 经回收、纯化、酶切后与载体 pRK5 连接, 转化 DH5 α 大肠杆菌。选择 PCR 鉴定阳性的重组质粒, 经 EcoR I 单酶切可见约一条 5 900 bp 片段; 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切可得到 4 600 bp 和 1 350 bp 两个片段, 分别与载体 pRK5 和目的片段 hVPS4A 预期大小一致; DNA 测序结果显示插入片段与 hVPS4A 参考序列一致。结论 成功构建了含 hVPS4A 基因的真核表达载体, 为进一步研究 hVPS4A 的生物学功能提供了条件。

关键词:人细胞空泡蛋白分选因子 4A; 基因克隆; 真核表达

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)13-1665-03

Cloning of human vacuolar protein sorting 4A gene and construction of eukaryotic expression vector

Xia Jianbo, Xi Jinou, Liu Zhi, Wang Weipeng

(Department of Clinical Laboratory, Hubei Provincial Maternal and Child

Health Care Hospital, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: **Objective** To clone human vacuolar protein sorting 4A gene(hVPS4A) and to construct its eukaryotic expressive plasmid. **Methods** Primers were designed to amplify the full length hVPS4A by PCR using cDNA of Huh7 cell as a template, then the target DNA was inserted into the eukaryotic vector pRK5. The recombinant plasmid was confirmed by PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing. **Results** A 1 300 bp fragment was successfully amplified by PCR from the cDNA of Huh7 cells. After recycled, purified and ligated with the vector pRK5, the recombinant plasmid was transformed into E. coli DH5 α . The positive recombinant plasmid identified by PCR was selected and digested by EcoR I to get a 5 900 bp fragment; and two fragments including 4 600 bp and 1 350 bp were obtained using EcoR I and Hind III digestion; the size of these two fragments were consistent with the pRK5 target fragment and the inserted hVPS4A as expected. Moreover, DNA sequencing results confirmed that the inserted fragment was in accordance with the hVPS4A reference sequence. **Conclusion** The eukaryotic expression vector containing hVPS4A gene is constructed successfully, which provides the condition for further study on the hVPS4A biological functions.

Key words: human vacuolar protein sorting 4A; gene clone; eukaryotic expression

细胞空泡蛋白分选因子 4(Vacuolar protein sorting 4, VPS4)是 ATP 酶 AAA 家族(ATPase associated with a variety of cellular activities)成员之一, 其生物学功能主要是参与细胞蛋白分选、胞膜融合和蛋白降解等多种细胞活动^[1-2]。在病毒与宿主细胞的相互作用中, VPS4 扮演着重要的角色。VPS4 是病毒蛋白在宿主体内的合成及运输不可缺少的因子, VPS4 功能障碍可能抑止病毒的运转和释放^[3]。hVPS4 基因编码两种同源蛋白即 hVPS4A 和 hVPS4B。为了更深入地探索 hVPS4 的生物学功能, 本研究从细胞中克隆得到 hVPS4A 基因, 并构建真核表达载体。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 PCR 扩增仪 PTC-200 型为美国 MJ 公司提供, 凝胶成像系统为美国 UVP 公司提供; M-MLV 逆转录酶、RNasin 和 Oligo(dT)15 购自美国 Promega 公司; 限制性内切酶 EcoR I、Hind III、高保真 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒均为日本 TaKaRa 公司生产; Trizol 试剂、DMED 细胞培养基购自美国 Invitrogen 公司; DNA

分子量标准 DL2000 和 1kb DNA Ladder 购自上海天根公司; 真核表达载体 pRK5 和大肠杆菌 DH5 α 均为本科室保存; 引物合成及 DNA 测序送交北京华大基因公司完成。

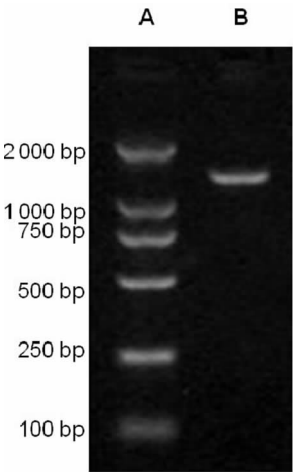
1.2 引物设计 参照 Genbank 中 VPS4A 基因的参照序列(NM_013245.2), 采用 Primer Premier 5.0 软件分析, 分别设计扩增 hVPS4A 全长基因的引物。上游引物序列为: 5'-CGG AAT TCA TGA CAA CGT CAA CCC TCC AG-3'(引入 EcoR I 酶切位点, 下划线部分); 下游引物为: 5'-CCC AAG CTT ACC TCC CAC CTT CAC CAT TG-3'(引入 Hind III 酶切位点, 下划线部分)。扩增区域为 hVPS4A 核苷酸 129~1 479 nt, 包含全长 hVPS4A 编码区, 扩增长度为 1 351 bp。

1.3 hVPS4A 基因克隆、重组质粒构建及鉴定 Trizol 试剂提取 Huh7 细胞总 RNA, 逆转录获得 cDNA, 再经 PCR 获得 hVPS4A 基因全长编码序列的 DNA 片段。逆转录反应体系为 25 μ L: 细胞总 RNA 1 μ g 和 Oligo(dT)15 引物 0.5 μ g 用 8 μ L 二乙基焦磷酸酰胺水溶解, 然后 70 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 迅速置于冰上冷却, 短暂离心后加入 5 $\times$ 缓冲液 5 μ L、10 mmol/L dNTP 1 μ L、RNasin 0.5 μ L、M-MLV 逆转录酶 1 μ L, 加水补齐至 25

μL,混匀后 37 ℃ 反应 1 h。逆转录产物 cDNA 为模板用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL:5× PrimeSTAR 反应缓冲液 10 μL、dNTP 4 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL,HS DNA Polymerase 0.5 μL,模板 2 μL,加水至 50 μL。PCR 反应条件为:95 ℃ 3 min;随后 98 ℃ 10 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 60 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物纯化后与 pRK5 载体分别用 EcoR I 和 Hind III 双酶切,DNA 经凝胶回收纯化,两者混合后用 T4 DNA 酶 16 ℃ 连接过夜。连接产物转化 DH5α 菌,在含氨苄青霉素的 LB 平板上培养 16 h 后挑取单个菌落,扩菌提取质粒,PCR 阳性克隆再用酶切和 DNA 测序鉴定。

2 结 果

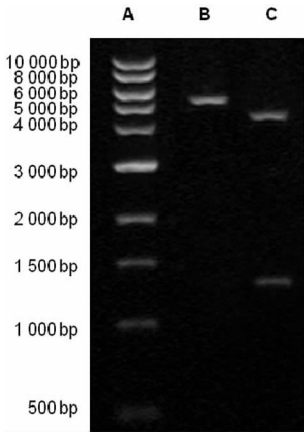
2.1 PCR 扩增 hVPS4A 基因 以 Huh7 细胞的总 RNA 为模板,RT-PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在约 1 350 bp 处可见一条特异的条带,与 hVPS4A 片段预期大小一致,见图 1。



A:DL 2000;B:目的片段。

图 1 hVPS4A 基因 PCR 扩增产物电泳图

2.2 重组质粒的酶切鉴定 取经 PCR 鉴定的阳性重组菌,提取质粒,酶切后经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。用 EcoR I 单酶切可见一条约 5 900 bp 的条带,与预期的重组质粒大小一致。用 EcoR I + Hind III 双酶切可得到的一条约 4 600 bp 的载体片段和一条约 1 350 bp 的插入片段,大小均与预期一致,如图 2 所示。重组质粒命名为 pRK5-hVPS4A。



A:1kb DNA Ladder;B:重组质粒单酶切片段;C:重组质粒双酶切片段。

图 2 重组质粒 pRK5-hVPS4A 酶切鉴定凝胶电泳图

2.3 重组质粒 pRK5-hVPS4A 测序结果 经 PCR 及酶切鉴定正确的重组质粒送测序,通过与参照序列比对,真核质粒中插入的 hVPS4A 目的片段与参照序列完全一致,且其读码框正确,证明真核表达质粒 pRK5-hVPS4A 构建成功。

3 讨 论

包膜病毒感染宿主后,病毒包膜可与宿主细胞膜融合,病毒得以进入宿主细胞。病毒将核衣壳释放入细胞内,再经脱壳和生物合成阶段,子代病毒与宿主细胞上的一些结构蛋白装配成核衣壳,从宿主细胞膜获得包膜,组成完整的具有感染性的子代病毒,以出芽方式释放到细胞外^[4]。科学家研究发现宿主因子 VPS4 在此过程中起有重要作用。已有许多研究对 HIV、HBV 和 HSV 等病毒感染与 VPS4 的关系进行的相关研究^[5-7]。有研究通过对 VPS4B 单体进行了晶体分析,发现 VPS4B 蛋白由 5 个不同结构区组成,包括能与 ESCRT-III 底物结合的 N-末端 MIT 结构域、大 AAA ATP 酶结构域、小 AAA ATP 酶结构域、反向三链的 β 结构域和一个 C-末端螺旋。VPS4 可在溶液中形成复合体,并可与 ATP 结合^[8]。VPS4A 和 VPS4B 某些显性负相突变体由于反应位点失去功能,所以失去了 ATP 酶结合和 ATP 酶水解的生物学功能,进而使其与 ATP 的结合受到抑制,从而影响体内病毒的复制或释放过程^[9]。

由于 hVPS4A 和 hVPS4B 是同一基因编码,且两者约有 80% 同源性。因此,hVPS4A 与 hVPS4B 在结构和功能上有诸多相同之处,本文作者在以前的研究中,成功构建 hVPS4B 质粒和其负性突变体,并且在对 hVPS4B 与 HBV 的研究中也发现,失去活性的 hVPS4B 负性突变体在体内和体外均可抑制 HBV 的复制^[10-11]。当前为了对 hVPS4 基因有更深入地研究,本文克隆了 hVPS4B 的另外一个同源基因 hVPS4A,并成功获得真核表达载体,经鉴定其序列与 hVPS4A 参照序列完全一致,这为下一步研究 hVPS4A 提供了必要的工具。

参考文献

[1] Hill CP, Babst M. Structure and function of the membrane deformation AAA ATPase Vps4[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2012,1823(1):172-181.

[2] Landsberg MJ, Vajjhala PR, Rothnagel R, et al. Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4:advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding[J]. Structure, 2009, 17(3):427-437.

[3] Babst M, Davies BA, Katzmann DJ. Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis[J]. Traffic, 2011,12(10):1298-1305.

[4] Rossman JS, Lamb RA. Viral membrane scission[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2013, 29(5):551-569.

[5] Kieffer C, Skalicky JJ, Morita E, et al. Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding[J]. Dev Cell, 2008, 15(1):62-73.

[6] Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. The structural biology of HIV assembly[J]. Curr Opin Struct Biol, 2008, 18(2):203-217.

[7] Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, et al. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(24):10205-10210.

[8] Shestakova A, Hanono A, Drosner S, et al. Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III[J]. Mol Biol Cell, (下转第 1669 页)

疗也十分棘手^[2]。

本研究显示从嗜麦芽窄食单胞菌的病区分布看,重症监护室(ICU)和呼吸内科所占的比例最高,达到 39.22% 和 25.49%,原因是这 2 个病房患者往往年龄偏大,多有严重的基础疾病,且住院时间较长,普遍应用广谱抗菌药物,并发严重呼吸衰竭时需要进行气管插管和机械通气等侵入性操作。干部病房住院患者也存在年龄偏大、抵抗力弱等因素,故其所占比例也较高,为 11.76%。从标本来源分布看,呼吸道标本所占比例最高,为 80.39%,占总量的五分之四,在各种标本中具绝对优势,说明嗜麦芽窄食单胞菌以引起呼吸道感染为主。另外,尿液、脓液、血液和其他组织液等多种标本均分离出嗜麦芽窄食单胞菌,说明它可以引起多种部位感染。因此,应该引起临床足够的重视,积极做好预防和治疗措施,避免该菌的发展和蔓延。

嗜麦芽窄食单胞菌对大多数常用抗菌药物都耐药,对临床使用的全部抗菌药物几乎都有耐药的报道,对部分抗菌药物甚至表现出高度耐药^[3]。嗜麦芽窄食单胞菌自身可产生金属 β 内酰胺酶,故绝大多数嗜麦芽窄食单胞菌都表现出对亚胺培南和美洛培南天然耐药。国内外很多研究都发现嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南耐药率高于 90%,甚至高达 100%^[4]。本研究显示,51 株嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南和美洛培南耐药率均达到 100%,多重耐药菌株为 45 株,占细菌总数的 88.2%。这给临床治疗带来很大的困难,应该引起临床医生的高度关注。

嗜麦芽窄食单胞菌经常表现出对 3 种或 3 种以上结构不相关的抗菌药物耐药,即多重耐药性。导致其出现多重耐药的机制很多,质粒、整合子、转座子等可转移元件携带耐药基因转移便是其中之一。

近年来整合子介导的耐药性越来越受到学者们关注。整合子-基因盒^[5]系统属于可移动的基因元件,它由两侧的保守区及中间的可变区构成,可变区可含有一个或多个耐药基因。在整合酶的作用下,整合子可以捕获外源性耐药基因并通过自身的转移使携带的基因盒共同转移。整合子可位于细菌的染色体上,也可借助可移动的质粒、转座子在不同细菌之间水平传播,在细菌耐药性的传播中起着重要作用。目前已发现的整合子有 10 多种,其中 I、II、III 类整合子最常见并且与细菌耐药基因的传播关系密切,被合称为耐药整合子(resistance integron, RI),整合子所携带的耐药基因盒现已发现超过 80 种^[6]。已有研究证实, I 类整合子广泛存在于革兰阴性杆菌中,与细菌的多重耐药密切相关。本研究共检测 51 株临床分离的嗜麦芽窄食单胞菌,其中 I 类整合子阳性 7 株菌,占 13.7%,未检测到 II、III 类整合子说明现阶段在本地区嗜麦芽窄食单胞菌中传播以 I 类整合子为主。

从本院临床标本中分离的嗜麦芽窄食单胞菌 I 类整合子携带 5 种耐药基因分别是 aacA4、aadA1、aphA15、catB8 和 dfrA17。其中 aacA4 编码 6'-N-氨基糖苷乙酰转移酶, aadA1 编码氨基糖苷核苷转移酶, aphA15 编码磷酸转移酶,都引起对氨基糖苷类抗菌药物耐药; catB8 编码氯霉素乙酰转移酶,引起对氯霉素耐药; dfrA17 编码二氢叶酸还原酶主要介导甲氧苄啶耐药。这与 7 株 I 整合子阳性嗜麦芽窄食单胞菌耐药表型相吻合。

尽管有文献报道显示整合子在细菌耐药机制的发展和传播中具有非常重要的作用,但是细菌的耐药性并不完全是由整合子介导的,细菌的耐药机制复杂而多样,在细菌的耐药机制中整合子的介导作用只是一小部分^[7]。整合子-基因盒系统的发现,为细菌的耐药机制研究指出了新的方向,耐药基因的捕获和表达系统并能在不同细菌间水平和垂直传播,成为细菌抵抗抗菌药物的又一个强有力的武器。因此,研究临床菌株中整合子的种类、性质和作用机制有利于了解细菌多重耐药的发生和转移机制,更好地控制细菌耐药性的发展,加强临床合理使用抗菌药物,有效防止细菌耐药性的产生并阻止耐药性的传播。

参考文献

- [1] Penzak SR, Abate BJ. Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia: a multidrug-resistant nosocomial pathogen[J]. Pharmacotherapy, 1997, 17(2): 293-301.
- [2] Talmaci I, Varlotta L. Risk factors for emergence of Stenotrophomonas maltophilia in cystic fibrosis[J]. Pediatr Pulmonol, 2000, 30(1): 10-15.
- [3] Zhang Li, Li XZ, Poole K. Multiple antibiotic resistance in Stenotrophomonas maltophilia: involvement of a multidrug efflux system[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(2): 287-293.
- [4] 李红玉, 潘昆皓, 伍锡泉, 等. 广州地区 2000~2003 年嗜麦芽窄食单胞菌的耐药性调查[J]. 国际医药卫生导报, 2005, 11(1): 4-5.
- [5] Cameron FH, Groot Obbink DJ, Ackerman VP, et al. Nucleotide sequence of the AAD aminoglycoside adenyltransferase determinant aadB. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrII in R388[J]. Nucl Acids Res, 1986, 14(21): 8625-8635.
- [6] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8): 608-620.
- [7] 王辉, 陈民钧, 倪语星, 等. 2006 年中国十家教学医院革兰阴性菌耐药状况[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(6): 623-626.

(收稿日期: 2014-01-08)

(上接第 1666 页)

- 2010, 21(6): 1059-1071.
- [9] Adell MA, Teis D. Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex[J]. FEBS Lett, 2011, 585(20): 3191-3196.
- [10] 王维鹏, 夏剑波, 李磊, 等. 重叠延伸 PCR 法构建 VPS4B 基因定点突变真核表达载体[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(1): 57-59.

- [11] Xia J, Wang W, Li L, et al. Inhibition of HBV replication by VPS4B and its dominant negative mutant VPS4B-K180Q in vivo[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32(3): 311-316.

(收稿日期: 2014-01-24)