

蛋白酶体 $\beta 5$ 亚单位基因真核表达载体的构建

张铁英¹, 柳夏林², 吴明星², 刘奕志²

基金项目: 中国“211 工程”重点学科建设基金资助项目(No. A132001047); 中国 2009 年度花都区科技计划资助项目(卫生系统)(No. 09-HDWS-007)

作者单位:¹(510800) 中国广东省广州市花都区人民医院眼科;
²(510080) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心

作者简介: 张铁英, 女, 毕业于中山大学, 博士, 主治医师。

通讯作者: 刘奕志, 男, 教授, 博士研究生导师. liuyz@yahoo. com. cn

收稿日期: 2010-04-11 修回日期: 2010-05-19

Construction of the recombinant expression plasmid encoding proteasome $\beta 5$ subunit gene

Tie-Ying Zhang¹, Xia-Lin Liu², Ming-Xing Wu², Yi-Zhi Liu²

Foundation items: Key Subject Construction Foundation of 211 Project, China (No. A132001047); Technology project of Huadu District in 2009, China(No. 09-HDWS-007)

¹Department of Ophthalmology, Huadu District People's Hospital, Guangzhou 510800, Guangdong Province, China; ²Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yi-Zhi Liu. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. liuyz@yahoo. com. cn

Received: 2010-04-11 Accepted: 2010-05-19

Abstract

• **AIM:** To clone and construct an eukaryotic expression plasmid containing $\beta 5$ subunit gene, in order to study the mechanism of age-related cataract formation and the prevention measure.

• **METHODS:** Total RNA was extracted from human lens epithelium strain SRA01/04. $\beta 5$ subunit cDNA was amplified by RT-PCR, ligated into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+).

• **RESULTS:** RT-PCR product is about 792bp specific segment. Analysis by restricting enzyme EcoR I and Hind III and DNA sequence showed the inserted $\beta 5$ subunit gene was correct.

• **CONCLUSION:** Eukaryotic expression plasmid pcDNA 3.1- $\beta 5$ is successfully constructed in order to make a basis for the further research.

• **KEYWORDS:** $\beta 5$ subunit; proteasome; genetic recombination

Zhang TY, Liu XL, Wu MX, et al. Construction of the recombinant expression plasmid encoding proteasome $\beta 5$ subunit gene. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(6):1047-1048

摘要

目的: 构建蛋白酶体亚单位 $\beta 5$ 基因真核表达质粒。

方法: 从人晶状体上皮细胞株 SRA01/04 中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增获得 $\beta 5$ 亚单位的全长 cDNA 片段, 将其克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 上。

结果: RT-PCR 法扩增出约 792bp 的 $\beta 5$ 亚单位基因全部编码序列的片段。酶切鉴定和测序分析证实所插入的 $\beta 5$ 亚单位的基因序列完全正确。

结论: 成功构建了蛋白酶体 $\beta 5$ 亚单位基因真核表达重组质粒。

关键词: $\beta 5$ 亚单位; 蛋白酶体; 基因重组

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.06.008

张铁英, 柳夏林, 吴明星, 等. 蛋白酶体 $\beta 5$ 亚单位基因真核表达载体的构建. 国际眼科杂志 2010;10(6):1047-1048

0 引言

蛋白酶体核心部分 20S 的 $\beta 5$ 亚单位, 具有糜蛋白酶样酶活性, 是蛋白酶体所具有的三大主要的酶活性之一^[1]。目前大量研究认为, 蛋白酶体系统是细胞内蛋白质降解的重要途径之一, 而 $\beta 5$ 亚单位在降解蛋白质过程中发挥重要的蛋白水解酶的作用。已有研究证实, 在帕金森综合征、年龄相关性白内障等年龄相关性疾病中, 蛋白酶体的蛋白水解酶功能均不同程度降低^[2]。因此, 我们通过构建 pcDNA3.1- $\beta 5$ 这一真核重组载体, 进行检测, 为探讨年龄相关性白内障的发病机制及防治方法提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人晶状体上皮细胞株 SRA01/04, 大肠杆菌菌株 DH5 α 及真核表达载体 pcDNA-3.1 由本实验室保存; 新生牛血清及 DMEM 培养基 (Gibco 公司); 引物合成 (北京赛百盛公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), 全自动测序由 Invitrogen 公司完成; 限制性内切酶 EcoR I, Hind III 及 T4 连接酶 (Takara 公司); 牛小肠碱性磷酸酶 (BCIP) (上海生工生物工程服务有限公司); RT-PCR 试剂 (Toyobo 公司); 质粒提取试剂盒及脂质体 SuperFect (Qiagen)。

1.2 方法 根据 GeneBank 的 $\beta 5$ 亚单位基因序列设计上下游引物, 在其两端分别加入 Hind III 及 EcoR I 的酶切位点序列。F: 5'-GCCAAGCTTATGGCGCTTGCCAGCGTGT-3', R: 5'-AGAGAATTCTCAGGGGTAGACCCACTAT-3'。从人晶状体上皮细胞株 SRA01/04 中提取总 RNA, RT-PCR 扩增目的 DNA 片段, 凝胶回收目的片段。Hind III 及 EcoR I 双酶切质粒 pcDNA3.1(+) 和回收的目的 DNA 片段, T4 连接酶进行连接, 构建重组质粒, 进行筛选和鉴定。

2 结果

目的基因 $\beta 5$ 亚单位扩增后于 10g/L 琼脂糖电泳, 根据所设计的 $\beta 5$ 亚单位基因的 PCR 引物可知目的基因大小约为 792bp, 电泳后获得的片段与预计相符 (图 1)。以重组质粒为模板 PCR 扩增, 琼脂糖电泳可见一约 792bp

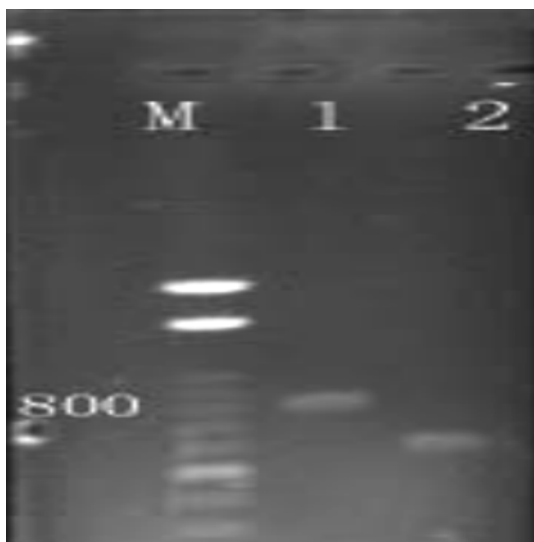


图1 PCR扩增结果 1:β5亚单位 cDNA;2:β-actin;M:Marker。

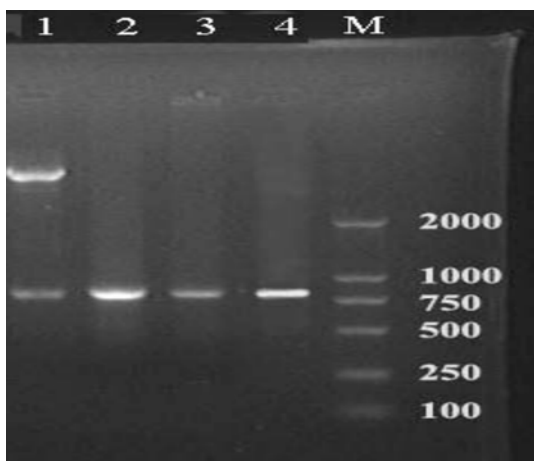


图2 重组质粒 pcDNA3.1-β5亚单位的鉴定 1:限制性内切酶鉴定重组质粒;2:β5亚单位 cDNA;3:限制性内切酶消化 β5亚单位 cDNA;4:PCR方法鉴定重组质粒;M:Marker。

条带。重组质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后电泳,可见一约 792bp 条带,与预计相符(图 2)。重组质粒 pcDNA3.1-β5 亚单位由 Invitrogen 公司进行基因测序,结果显示,各连接位点正确,表达框架与已知相符。

3 讨论

年龄相关性白内障形成的主要原因之一是由于各种

原因造成晶体蛋白质的氧化、磷酸化、乙酰化的蛋白质的翻译后修饰^[3]。如果经过翻译后修饰的蛋白质没有及时清除掉,变性的蛋白质之间会形成交联、聚集,从而改变晶状体的透明度。通常细胞内异常蛋白质的降解主要是通过蛋白酶体途径完成的。大量的研究表明,随着年龄的增长,氧化的和泛素化而未被降解的蛋白质在细胞内堆积,使蛋白酶体系统的降解功能受损,最终导致年龄相关性疾病的形成。蛋白酶体核心部分是 20S 的 β5 亚单位,具有糜蛋白酶活性,能特异性水解异常蛋白质。有研究证实,在年龄相关性白内障患者的晶状体上皮细胞中,蛋白酶体的糜蛋白酶样酶活性显著低于正常人晶状体上皮细胞内蛋白酶体的活性^[4]。与正常晶状体相比,白内障患者晶状体核内蛋白酶体的糜蛋白酶样酶活性以及另外两种蛋白水解酶活性(胰蛋白酶样和肽谷氨酰胺-肽水解酶样)均显著降低^[5]。β5 亚单位在蛋白酶体的组装、成熟以及发挥蛋白水解功能中都起主导作用^[6]。这些研究结果提示,β5 亚单位通过其糜蛋白酶样酶活性降解异常氧化的蛋白质,防止这类蛋白质在晶状体内蓄积,从而对维持晶状体的透明性发挥重要作用。我们通过逆转录扩增 β5 亚单位全长基因片段,并在设计引物时加入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,并将其成功的克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 中,从而首次构建了重组质粒 pcDNA3.1-β5,为进一步研究打下基础。

参考文献

- 1 Orłowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 2000;383(1):1-16
- 2 Ding Q, Reinacker K, Dimayuga E, et al. Role of the proteasome in protein oxidation and neural viability following low-level oxidative stress. *FEBS Lett* 2003;546(2-3):228-232
- 3 Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, et al. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1461-1474
- 4 Andersson M, Sjostrand J, Karlsson J. Proteolytic cleavage of N-Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC by the proteasome in lens epithelium clear and cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 1998;67(2):231-236
- 5 Zetterberg M, Petersen A, Sjöstrand J, et al. Proteasome activity in human lens nuclei correlation with age, gender and severity of cataract. *Curr Eye Res* 2003;27(1):45-53
- 6 Kruger E, Kloetzel PM, Enenkel C. 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* 2001;83(3-4):289-293