

ERAP1 基因标准品质粒的构建

冯燕艳 吴卫东 普雄明

摘要 目的 构建人 ERAP1 基因的重组质粒。方法 以成人皮肤组织中总 RNA 为模板、Random 6 mers 为引物反转录合成 cDNA, 用该 cDNA 为模板 PCR 扩增人 ERAP1 基因, 并克隆到 PUC18 载体, 转化入大肠杆菌 DH5 α , 阳性克隆用酶切和 DNA 测序鉴定。计算重组质粒原液复制数浓度并制备梯度浓度标准品, real-time PCR 构建标准曲线。结果 ERAP1 目的片段制备成功, 获得稳定的重组质粒, 保证了目的片段的特异性和序列完整性, 标准曲线参数良好, 标准品阈值循环数 (Ct) 与其相应梯度稀释浓度呈良好线性关系, 扩增效率高。结论 成功地构建了人 ERAP1 基因的荧光定量 PCR 标准品质粒。

关键词 ERAP1 基因 荧光定量 PCR 标准品质粒

[中图分类号] R393

[文献标识码] A

Standard Plasmid Construction of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase - 1 Gene. Feng Yanyan, Wu Weidong, Pu Xiongming. Department of Dermatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang 830001, China

Abstract Objective To clone human ERAP1 cDNA and use it as the standard for real-time quantifying ERAP1 mRNA. **Methods** Total RNA was extracted from the human skin and reverse transcribed to cDNA using Random 6 mers as primer. Amplified ERAP1 cDNA was ligated with pMD 19 T vector and transferred into the E. Coli for replication. The recombinant plasmid picked out from positive clones was amplified by PCR, and then sequenced. This process was used to calculate the standard concentration of recombinant plasmids from real-time quantitative PCR constructing standard curve. **Results** The target fragment of ERAP1 gene was successfully prepared and the recombined plasmid contained the target fragment was stable and kept its sequential integrity and specificity. A good linear relationship was showed between the Standard threshold cycle number (Ct) and its gradient dilution concentration, amplification efficiency. **Conclusion** The real-time fluorescent quantitative PCR reference standards of human ERAP1 gene were successfully constructed.

Key words Endoplasmic reticulum aminopeptidase - 1 gene; Quantitative real-time polymerase chain reaction; Standard plasmid

ERAP1 内质网氨基肽酶 (endoplasmic reticulum aminopeptidase, ERAP) 又名与抗原递呈相关的内质网氨基肽酶, 分布于细胞表面和内质网, 具有复杂多样的生物学功能, 如参与血管形成、蛋白水解、抗原加工和递呈, 调节天然免疫反应、抗细菌等。人类基因组中有 2 个高度同源的 ERAP 基因, 分别编号为 ERAP1 和 ERAP2。研究发现 ERAP1 参与许多恶性肿瘤的发生、发展及浸润转移过程^[1,2]。目前研究发现 ERAP1 基因与强制性脊柱炎和银屑病发病相关, 但对其作用机制和调控机制尚缺乏深入研究^[3,4]。

实时荧光定量 PCR 是目前进行核酸定量检测较为准确的方法, 可检测组织中 mRNA 含量, 标准品的制备是实时荧光 PCR 进行定量的基础。考虑到标准

品的稳定性, 把目的片段重组至质粒中得到稳定的重组质粒, 是制备荧光定量 PCR 标准品的一种策略。本研究采用 T-A 克隆法成功构建了用于 ERAP1 基因实时荧光定量 PCR 检测的标准质粒。

材料与方法

1. 实验材料: 手术切取人类皮肤约 30g。通过 GenBank 报道的人 ERAP1 基因序列, 使用 Oligo 6.0 结合 Primer 5.0 引物设计软件进行引物设计。目的片段大小为 120bp, 由上海生物工程技术有限公司合成, 上游引物 (P1): 5' - ACAGATGGTGTAAAAGGGATGG - 3', 下游引物 (P2): 5' - GCACTGTC-CAAGTGTTCATCAT - 3'。pMD19-T 载体购自宝生物有限公司。pMD19-T 载体购自宝生物有限公司。大肠杆菌 DH5 α 、琼脂糖凝胶 DNA 片段回收纯化试剂盒、质粒 DNA 纯化试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。Real-time PCR 试剂盒、SYBR Green I 试剂购自 QIAGEN 公司。

2. 实验方法: (1) 使用异氰酸胍、三氯甲烷抽提法提取人皮肤组织总 RNA; 将约 30g 皮肤组织中加入液氮中研磨, 尽量磨碎, 加入 1ml TRNzol, 15 ~ 30℃ 静置 5min, 4℃ 13000r/min 离心 10min, 吸上清于一新管中, 加入 200 μ l 氯仿, 上下颠倒剧烈振荡 15s, 15 ~ 30℃ 静置 2 ~ 3min, 4℃ 13000r/min 离心

15min,将上清液小心转移到 Rnase-free 的 1.5ml 离心管中,加入等体积的异丙醇,混合均匀。15~30℃ 静置 10min,4℃ 12000r/min 离心 10min。弃去上清,1000μl 70% 的乙醇洗涤 1 次沉淀,4℃ 7500r/min 离心 5min,倒掉液体,静置干燥,待乙醇挥发干净,加 30μl ddH₂O 水,反复吹打溶解,-70℃ 保存。得到的总 RNA 使用核酸蛋白分析仪测定纯度和浓度。1% 琼脂糖电泳检测后,可见 28S、18S、5.8S 条带,RNA 纯度在 1.80 以上,总 RNA 质量符合要求。(2)反转录合成 cDNA:反转录反应使用 TAKARA 公司 AMV 反转录酶按 40μl 体系进行反转录,使用 QIAquick PCR Purification Kit 进行 cDNA 的纯化。(3)PCR 扩增目的基因:以所提取并纯化的 cDNA,进行普通 PCR,扩增出标准 DNA 片段。配置 25μl 反应体系进行 PCR 反应,PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3min,94℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,35 次循环,72℃ 延伸 5min。对 PCR 产物 2% 琼脂糖电泳,对目的片段进行切胶回收。(4)重组质粒 pMD19-T Vector-GAPDH 的转化、筛选及鉴定:将胶回收产物以 1:3 比例由 T₄ DNA 连接酶连接到 pMD19-T Vector,将连接产物转化入 DH5α 感受态细胞中,涂布在含 X-GAL 和 IPTG 的氨苄青霉素平板中。37℃ 过夜培养,约 14h 后菌落形成,挑选白色菌落,进行菌落 PCR 检测,检测阳性者,加入有 5ml 氨苄 LB 培养基的 15ml 离心管中,于 37℃ 摇床中震荡培养 12~16 h,收集菌液送上海生工进行测序,Chromas 软件分析测序结果。(5)质粒提取及酶切:测序正确菌液提取质粒,使用 Promega 公司的 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System 的试剂盒提取质粒,以 BamH I 进行过夜酶切使其线性化,酶切产物用 DNA 纯化回收试剂盒进行纯化。测 A260 和 A280 以分析纯度,并计算原始拷贝浓度。(6)Real-time PCR 标准曲线的建立:1)梯度浓度标准品质粒溶液的准备:通过公式计算回收纯化产物(DNA)原液的拷贝数。计算公式如下:DNA 拷贝数(copies/μl) = $C \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / M \times 660$,其中 C 为质粒 DNA 的质量浓度(ng/μl),M 为质粒 DNA 的碱基对数(空载体碱基对数 + 插入目的片段碱基对数), 6.02×10^{23} 为阿佛加德罗常数。将重组质粒标准品原液进行 10 倍倍比稀释成 $10^8 \sim 10^4$ copies/μl 梯度数量级的标准品,进行 Real-time PCR 扩增。2)荧光定量 PCR 测标准曲线:检测使用 QuantiTect SYBR GREEN 试剂(Qiagen)进行 real-time PCR (Light Cycler 2.0, Roche)生成 ERAP1 基因的标准曲线。Real-time PCR 反应体系:SYBR Green 荧光染料 10μl,上下游引物各 0.5μl,质粒 DNA 2μl,ddH₂O 7μl;反应条件:Denaturation 95℃ 5min;Amplification 95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,45 个循环;Melting curve 95℃ 1s,40℃ 1s。

结 果

1. 总 RNA 的提取与检测:琼脂糖凝胶电泳检查提取的总 RNA,其条带清晰,1% 琼脂糖凝胶电泳 100 伏 15min 电泳结果见图 1。

2. DNA 片段普通 PCR 产物电泳:以 cDNA 为模板进行普通 PCR,ERAP1 基因 PCR 产物电泳图见

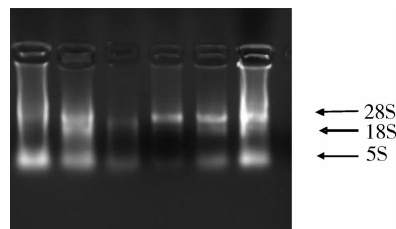


图 1 RNA 电泳图

图 2。

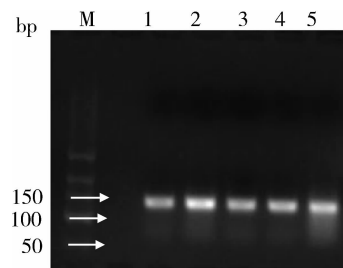


图 2 ERAP1 基因 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳图

M. marker; 1. 空白对照; 2~6. 样品

3. 酶切质粒电泳:提取的质粒需要经过酶切线性化后,才能进行梯度稀释进行标准曲线的生成。酶切线性化质粒电泳结果如图 3。

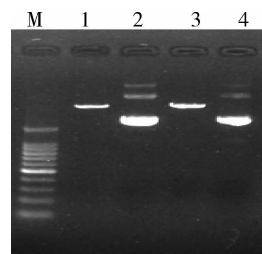


图 3 PUC18-ERAP1 重组质粒双酶切鉴定

M. marker; 1、3. 质粒酶切后; 2、4. 质粒酶切前

4. 重组质粒的测序鉴定:重组质粒酶切片段测序,将测序结果与 GenBank 提供的序列比较,结果完全重合,表明重组质粒 PUC18-ERAP1 构建成功。

5. 基因标准曲线图:基因标准曲线制备,不同梯度质粒 $1, 1 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-3}, 1 \times 10^{-4}$ 和 1×10^{-5} ng/μl real-time PCR 标准曲线图,标准曲线图由软件自动生成,结果见图 4。real-time PCR 构建的标准曲线(图 4)斜率达 -3.935,灵敏度达 1.0×10^4 拷贝/毫升,线性范围为 $1.0 \times 10^4 \sim 1.00 \times 10^8$ 拷贝/毫升,阈值循环数(Ct)与 PCR 体系中起始模板量的对数值之间有着良好的线性关系($r^2 = 0.978$),扩增效率高($E = 89.916\%$)。经过熔解曲线测定,其

T_m 值为 78.65°C , 主峰位置重叠(图 5)。

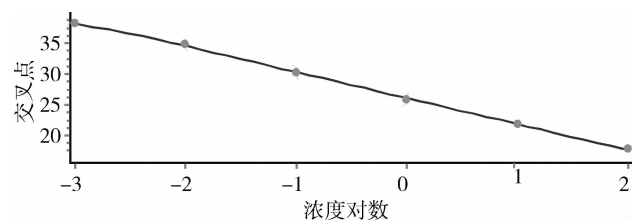


图 4 ERAP1 基因扩增曲线图

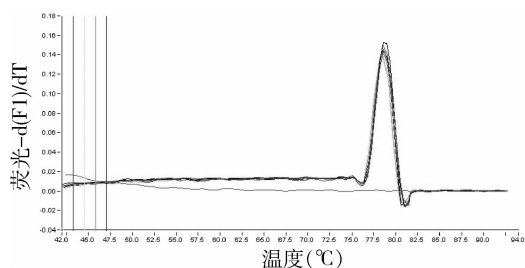


图 5 ERAP1 基因熔解曲线

讨 论

本实验以从人类皮肤中提取全基因组 RNA, 并反转录为 cDNA, 用该 cDNA 为模板 PCR 扩增出 120 bp 的片段, 通过 T - A 连接重组至 pMD19 - T 载体中, 并转化入 DH5 α 受体菌, 经 Amp⁺ 抗性筛选获得阳性克隆。经 PCR 扩增、双酶切鉴定和序列分析, 证明成功构建了标准品重组质粒, 对质粒模板进行不同浓度梯度稀释, 实时荧光定量 PCR 结果分析, 所获得的标准曲线具有较高的扩增效率和良好的线性关系。且 PCR 产物为单一的主峰, 证明该外标准品为 ERAP1 序列上的特异性产物。上述结果表明, 构建的重组质粒完全可以作为 ERAP1 基因荧光定量检测的参照标准。

ERAP1 内质网氨基肽酶 1 基因(endoplasmic reticulum aminopeptidase 1, ERAP1) 又名与抗原递呈相关的内质网氨基肽酶, 位于 5q15, 属于锌指金属基质肽酶 M1 家族中的“缩宫素酶亚家族”, 在人类细胞均由 IFN - γ 和 TNF - α 诱导表达^[5,6]。参与许多生化过程: 在细胞内质网中参与内源性抗原肽的修饰及递呈, 被认为是内质网中参与内源性抗原肽修饰的关键酶^[7], 参与调节血压和血管生成及细胞因子受体的脱落^[8]。而来自 GNF 的数据显示, ERAP1 基因 mRNA 在正常皮肤组织和皮肤肿瘤组织均有表达, 但表达量差别不大。

本实验所需样本为皮肤组织, 由于目前常规活检

手术所取皮肤组织包含部分真皮的纤维组织, 研磨相对困难, 故目前提取皮肤组织 RNA 方法多为使用试剂盒, 虽然提取过程中需要组织较少、实验要求相对偏低, 但费用昂贵, 笔者预实验结果显示所提取 RNA 含量相对较低; 但本研究只需 30g 新鲜皮肤组织, 取材后液氮保存, 随后尽量保持液氮中研磨, 防止 RNA 降解, 随后进行常规异氰酸胍、三氯甲烷抽提法提取人皮肤组织总 RNA, 所提取的基因组 RNA 浓度、纯度也能达到反转录标准, 反转录后 DNA 片段作为 PCR 模板, 也能获得预期效果。荧光染料的优势在于它能监测任何 dsDNA 序列的扩增, 不需要探针的设计, 使检测方法变得简便, 同时也降低了检测的成本。本研究过程中已获得了优化的实时定量 PCR 反应程序, 为继续开展 ERAP1 mRNA 检测创造了良好的条件, 为今后针对性检测不同来源、不同病种 ERAP1 的 RNA 含量, 并为进一步进行功能研究打下了一定基础。

参考文献

- 1 Fruci D, Giacomini P, Nicotra MR, *et al.* Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non - lymphoid human tissues[J]. *Cell Physiol*, 2008, 216(3): 742 - 749
- 2 Liu B, Li DR, Ni P, *et al.* Expression and significance of differentially expressed protein endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in ovarian carcinoma with lymph node metastasis[J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2010, 45(1): 41 - 44
- 3 Sun LD, Cheng H, Wang ZX, *et al.* Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(12): 1005 - 1009
- 4 Stuart PE, Nair RP, Ellinghaus E, *et al.* Genome - wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci[J]. *Nat Genet*, 2010, 41(12): 1000 - 1004
- 5 Tsujimoto M, Hattori A. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1751: 9 - 18
- 6 Forloni M, Albin S, Limongi MZ, *et al.* NF - κ B, and not MYC, regulates MHC class I and endoplasmic reticulum aminopeptidases in human neuroblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 916 - 924
- 7 Saveanu L, Carroll O, Lindo V, *et al.* Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 689 - 697
- 8 Yamamoto N, Nakayama J, Yamakawa - Kobayashi K. Identification of 33 polymorphisms in the adipocyte - derived leucine aminopeptidase (ALAP) gene and possible association with hypertension[J]. *Hum Mutat*, 2002, 19: 251 - 257

(收稿日期: 2013 - 10 - 11)

(修回日期: 2013 - 10 - 24)