

先天性核性白内障家系致病基因的克隆及在真核细胞中的表达

郑建秋 刘平 傅松滨

Clone and expression of the candidate genes in eukaryotic cell of a congenital inherited nuclear cataract in vitro

Zheng Jianqiu, Liu Ping, Fu Songbin. Eye Hospital, First Clinical Collage of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Abstract Objective Congenital inherited cataract is a sort of eye disease of childhood which can cause loss of visual acuity. Genetic diagnosis and treatment is the main trend to prevention and treatment of congenital inherited cataract. This study was to clone the sequence of mutation type GJA8 gene(mGJA8) from a congenital inherited nuclear cataract family and study its expression and location in eukaryotic cell lines in vitro. **Methods** The periphery blood samples of 16 members were collected in this family, including 7 members with congenital inherited cataract. The mGJA8 gene was amplified from this family's DNA by PCR. The DNA was cloned into plasmid pGEM-T and then was digested by restriction enzyme. The amplified products were cloned into eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1 for construction of recombinant plasmid pEGFP-N1-mGJA8. The accuracy of pEGFP-N1-mGJA8 was confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. Final pEGFP-N1-mGJA8 and pEGFP-N1 plasmids were transfected into COS-7 cell lines by lipofectin. The expression and localization of pEGFP-N1-mGJA8 and pEGFP-N1 fusion protein were detected under the fluorescence microscope. The two fusion proteins were identified by immunohistochemical staining. **Results** Confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing, recombinant plasmid pEGFP-N1-mGJA8 was constructed correctly. The pEGFP-N1-mGJA8 and pEGFP-N1 fusion protein was expressed in transfected COS-7 cells, showing the green fluorescence. pEGFP-N1-mGJA8 fusion protein showed the positive reaction in cells for Biotin SP-HRP, presenting the brown staining. Biotin SP-HRP was absent response in pEGFP-N1. **Conclusion** The mGJA8 gene is cloned successfully, and the pEGFP-N1-mGJA8 fusion protein can be expressed in COS-7 cells, which offers a foundation for further study of the mechanism of this congenital inherited nuclear cataract family.

Key words congenital inherited cataract; GJA8; mutation; plasmid; Cx50

摘要 目的 克隆 1 个先天性核性白内障家系致病基因 - 突变型 GJA8(mGJA8), 研究其编码的蛋白质在真核细胞系中的表达和定位。 **方法** 从研究发现的先天性核性白内障家系患者基因组中扩增突变型 mGJA8, 克隆入载体 pGEM-T, 然后酶切, 定向克隆到真核表达质粒 pEGFP-N1 中, 构建 pEGFP-N1-mGJA8 重组表达质粒, 然后用限制性内切酶消化和 DNA 测序鉴定, 最后通过脂质体包埋转染法, 用 pEGFP-N1-mGJA8 和 pEGFP-N1 质粒转染 COS-7 细胞, 荧光显微镜观察其在 COS-7 细胞内的表达, 采用细胞免疫组织化学法验证蛋白表达。 **结果** 经双酶切和 DNA 序列测定, 证实致病基因 mGJA8 重组质粒构建成功, 荧光显微镜观察在 COS-7 细胞上致病基因 mGJA8 蛋白表达, 细胞免疫组织化学法显示致病基因表达蛋白在 COS-7 细胞中特异性表达。 **结论** 成功克隆出该家系的致病基因 mGJA8, 并且完成了该致病基因在体外真核细胞中的特异性表达, 为进一步研究该家系的发病机制奠定基础。

关键词 先天性核性白内障; GJA8; 突变型; 质粒; Cx50

分类号 R 7730.4 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)08-0664-04

本课题为黑龙江省博士后基金(LRB-05-451)、黑龙江省青年科学基金(QC07C93)资助

作者单位:150001 哈尔滨医科大学第一临床医学院附属眼科医院(郑建秋、刘平);150001 哈尔滨医科大学(傅松滨)

通讯作者:傅松滨(E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn)

先天性白内障是儿童主要致盲性眼病之一,手术是治疗该病的主要手段,但手术治疗的滞后性及术后并发症均对儿童视力的发育及恢复造成严重的影响。从分子遗传学角度研究和揭示该病的致病基因,明确疾病的发病机制,从基因水平上进行诊断和治疗是今后防治该病的发展趋势^[1-2]。本研究将 1 个先天性核性白内障家系致病基因-突变型 GJA8 (mGJA8) 所编码的蛋白质在真核细胞系中的表达和定位,以期为进一步研究该家系的发病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 家系基因组 选择一先天性核性白内障家系 3 代 16 例成员,其中 7 例发病,抽取每例成员静脉血 5 ~ 10 mL,提取基因组 DNA,确定致病基因为 mGJA8^[3]。

1.1.2 主要试剂及仪器 PFU 高保真酶(北京天为时代科技公司);限制性核酸内切酶 *Nhe* I、*Xho* I(日本东洋坊生物公司);耐热 *Taq* DNA 聚合酶和 T4DNA 连接酶(美国 Mbi 公司);脂质体 lipofectamine、转染试剂盒、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);一抗 Connexin50 (H-65)(美国 Santa 公司);引物 oligo(dT)(上海生物工程公司);胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、SP-HRP 免疫组织化学试剂盒(美国鼎国生物公司);Gene Amp PCR System 2400 型 PCR 仪(北京 Elmer 公司);Mighty Small II 蛋白电泳仪(美国 Phamacia 公司);荧光显微镜(上海长方光学仪器有限公司)。

1.1.3 菌株、细胞及载体 大肠杆菌 DH 和 COS-7 细胞株(鼎国生物);真核表达载体 pEGFP-N1(Clontech 公司);pGEM-Tvector(Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增及引物的设计与合成 以家系患者的基因组为模板进行 PCR 扩增,获取目的基因 mGJA8、GJA8 第 2 个外显子是 Cx50 全长编码区。根据 Genbank GJA8 基因序列(NM-005267)和 pEGFP-N1 特点,按照酶切位点对侧翼序列的要求设计克隆引物序列并附带相应的酶切位点。上游引物:5' GGCTAGC GAAATGGGCGACTGGAGTTTCC3' (下划线为 *Nhe* I 酶切位点);下游引物:5' AGCTCGAGTACGGTTAGATCG TCTGACCTGGCT3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点)。反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 40 s,60 °C 40 s,72 °C 1 min 反应 25 个循环,72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。

1.2.2 扩增产物的检测 将含有目的片段的胶在紫外检测仪上切下,然后用胶回收试剂盒回收 mGJA8 DNA 片段。取回收产物 3 μL 行琼脂糖凝胶电泳,检

测回收效果。

1.2.3 pEGFP-N1-mGJA8 真核表达载体的构建 目的基因片断 mGJA8 与载体 pEGFP-N1 用 *Nhe* I 酶和 *Xho* I 酶进行双酶切,胶回收后通过 *T₄* 连接酶进行连接,连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,涂布含有卡那霉素的 LB 平板,提取质粒分别用双酶切和基因测序鉴定所筛选的目的基因片断阳性克隆。

1.2.4 荧光显微镜观察 pEGFP-N1-mGJA8 融合蛋白在 COS-7 细胞中的表达 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化处于对数生长期的人 COS-7 细胞,接种于 6 孔板中,每孔 (150 ~ 250) × 10³ 个细胞,37 °C、50% CO₂ 培养过夜,至细胞达 70% ~ 80% 平板面积时,采用脂质体转染法,取 pEGFP-N1-mGJA8 质粒 2 μg、lipofectamine 10 μL,与适量无血清、无抗生素的 DMEM 混合摇匀成转染液按脂质转染试剂盒说明书转染 pEGFP-N1-mGJA8,以未转染细胞为筛选对照。转染后 5 h 换液,在不含胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,48 h 后用荧光显微镜观察蛋白是否表达以及蛋白在细胞中分布特点。

1.2.5 免疫组织化学检测蛋白在细胞中的表达 将处于对数生长期的人 COS-7 细胞,接种于 6 孔板中(孔中放置盖玻片),每孔 (150 ~ 250) × 10³ 个细胞,37 °C、50% CO₂ 培养过夜,至细胞达 70% ~ 80% 平板面积时,采用脂质体转染法,分别转染 pEGFP-N1-mGJA8 及 pEGFP-N1。转染 48 h 后多聚甲醛固定。采用 Biotin SP-HRP 免疫组织化学试剂盒检测蛋白在细胞中的表达。

2 结果

2.1 目的基因的克隆

以携带致病基因 DNA 为模板扩增 mGJA8 目的基因,将产物进行琼脂糖凝胶电泳,在 1 300 bp 处可见清晰明亮的目的条带,与 Genbank 中公布的片断大小相等(图 1)。



图 1 mGJA8 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳 M:Marker DL 2 000 1:mGJA8 基因 PCR 产物(1 300 bp)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of mGJA8 gene M:Marker DL 2 000 1:PCR product of mGJA8 gene (1 300 bp)

2.2 重组质粒的提取

挑选 pEGFP-N1-mGJA8 质粒阳性克隆进行双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳,结果显示在 1 300 bp 左右处

可见目的条带(图2)。

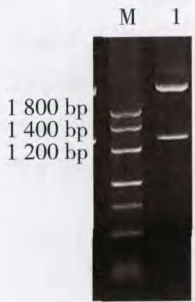


图2 pEGFP-N1-mGJA8 重组质粒酶切电泳 M;DNA marker 1:pEGFP-N1-mGJA8 酶切重组质粒(1300 bp)
 Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pEGFP-N1-mGJA8 plasmid cut by enzyme M;DNA marker 1: results of pEGFP-N1-mGJA8 plasmid cut by enzyme(1300 bp)

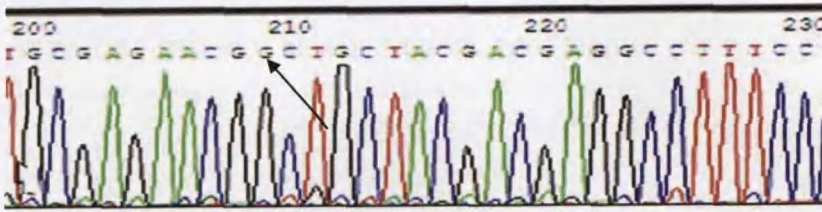


图3 克隆 mGJA8 目的基因部分测序图(箭头为碱基 T→G)
 Fig. 3 DNA sequencing of mGJA8 gene (arrow for T→G)

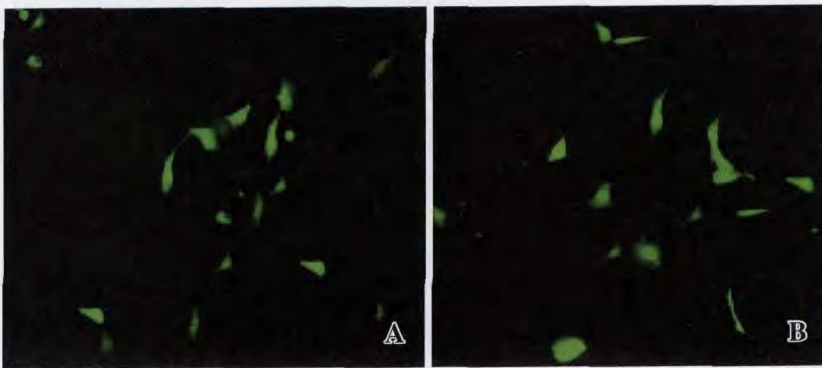


图4 荧光显微镜观察 pEGFP-N1 和 pEGFP-N1-mGJA8 融合蛋白在细胞中的表达及定位(×200) A:pEGFP-N1 转染 COS7 细胞 B:pEGFP-N1-mGJA8 转染 COS7 细胞

Fig. 4 Expression and localization of pEGFP-N1 and pEGFP-N1-mGJA8 fusion protein in COS-7 cells lines under the fluorescence microscope (×200) A: expression and localization of pEGFP-N1 protein B: expression and localization of pEGFP-N1-mGJA8 fusion protein

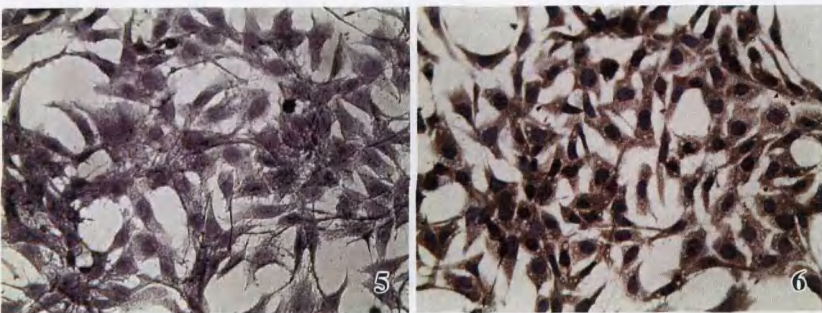


图5 pEGFP-N1 转染细胞 免疫组织化学染色阴性(×200) 图6 pEGFP-N1-mGJA8 转染细胞 免疫组织化学呈棕褐色阳性染色(×200)

Fig. 5 Immunohistochemical staining for pEGFP-N1 cells, showing absent reaction(×200)

Fig. 6 Immunohistochemical staining for pEGFP-N1-mGJA8 cells shows brown staining(×200)

2.3 重组质粒的测序

提交 Genbank 进行 Blast 比对,证实了所克隆的片断正确,且目的片断准确地插入多克隆位点(图3)。

2.4 荧光显微镜的观察

空质粒 pEGFP-N1 和突变型 pEGFP-N1-mGJA8 转染 COS-7 细胞,获得野生型 COS7-pEGFP-N1 和突变型 COS7- pEGFP-N1-mGJA8 细胞。在荧光显微镜下发现,与未转染的 COS7 细胞相比,pEGFP-N1 和 pEGFP-N1-mGJA8 编码的蛋白均有 GFP 表达,即在 488 nm 波

长下发出绿色荧光,说明转染成功。COS7-pEGFP-N1 细胞和 COS7-pEGFP-N1-mGJA8 细胞在细胞核与细胞质中均有荧光,所不同的是,前者细胞核内的荧光强度明显较胞质中强,而后者在细胞质中表达的趋势要强些(图4)。

2.5 免疫组织化学鉴定蛋白在细胞中的表达

免疫组织化学检测显示采用 SP-HRP 免疫组织化学试剂盒检测,阳性结果显示棕褐色。pEGFP-N1 转染细胞无阳性表达(图5),pEGFP-N1-mGJA8 转染细胞为棕褐色,呈阳性表达,证明 mGJA8 在细胞中有表达(图6)。

3 讨论

本课题组前期通过对 1 个先天性核性白内障家系致病基因的突变筛查,获得了 1 个新的突变位点(GenBank EF672108),即与先天性白内障有关的缝隙连接蛋白 Connexin50(Cx50)的编码基因 GJA8 第 2 个外显子的第 191 个碱基发生 1 次杂合突变 T > G,导致其编码的第 64 位氨基酸由缬氨酸变成甘氨酸^[3-5]。本实验将研究致病基因 GJA8 的突变型(mGJA8)在体外真核细胞中表达、定位和鉴定,为进一步了解该致病基因所表达蛋白的功能,揭示该家系的发病机制奠定基础。

既往研究^[6-9]表明 GJA8 基因有多个不同位点的突变,与不同国家、不同表现型的先天性白内障的发病机制相关。人类 GJA8 基因定位于 1q21.1, GJA8 基因 DNA 约 16 121 bp,包含 2 个外显子,其 cDNA 编码 440 个氨基酸组

成 $\alpha 8$ 缝隙连接蛋白 Cx50。GJA8 第 2 个外显子 1 321 bp 直接转录翻译 Cx50,它是构成细胞间缝隙连接的基本结构单位,包括 2 个细胞外结构域、4 个跨膜区及细胞内环,是参与物质交换的通道。

本研究成功克隆出该家系致病基因,将其导入细胞中,观察其在细胞中的表达和功能。pEGFP-N1 质粒是穿梭载体,其最显著的特征是载体在外源基因的 3' 端有增强的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因,构建的 pEGFP-N1 载体将携带起始密码子而不带终止密码子的 mGJA8 基因克隆到 GFP 表达载体 pEGFP-N1 中,这种 N 端融合蛋白并不改变天然 GFP 的荧光性质,这种克隆策略使得目的基因克隆在 GFP 基因的 N-末端,两者共用 1 个复制子,这就保证只要观察到 GFP 的表达,就说明 Cx50 蛋白已经表达^[10]。正常 Cx50 蛋白主要存在于晶状体纤维细胞上^[11],本研究成功完成了该突变蛋白在细胞中的表达,说明 1 个氨基酸的改变并未影响其蛋白在真核细胞上的表达。

该突变发生在缝隙连接间第 1 个细胞外结构域,虽然能与细胞膜结合并形成完整的缝隙连接,但却不能与邻近细胞的半个缝隙连接接合形成 1 个完整的缝隙连接,从而使相邻细胞间缝隙连接的数量减少^[12]。该突变所在的 Cx50 蛋白第一信号区,参与小离子物质在细胞间的通透,可能还参与通道开放状态,对传递细胞间的生物信息至关重要^[13]。因此该区域结构的改变可能会影响细胞间的物质交换,导致晶状体蛋白的代谢紊乱,进而导致白内障的发生。GJA8 基因表达缝隙连接蛋白的功能已有一定的研究,但该家系 mGJA8 基因所表达蛋白的功能特性尚不确定,本研究成功构建了 mGJA8 基因的真核表达质粒,明确了其蛋白表达情况,为今后该蛋白的功能研究及该家系发病机制的

研究奠定了基础。

参考文献

- 1 李妮,刘谊.常染色体显性先天性白内障的基因定位与克隆[J].眼科研究,2005,23:100-103
- 2 裴雪婷,鲍永珍.先天性白内障的基因诊断[J].眼科研究,2007,25:714-717
- 3 郑建秋,马志伟,孙慧敏.中国东北汉族一个先天性白内障家系致病基因的鉴定[J].中华医学遗传学杂志,2005,22:76-78
- 4 郑建秋,马志伟,孙慧敏.中国东北一个先天性核性白内障家系致病基因的初步研究[J].眼科研究,2005,23:532-534
- 5 Ma Z, Zheng J, Yang F, et al. Two novel mutations of connexin genes in Chinese families with autosomal dominant congenital nuclear [J]. Br J Ophthalmol, 2005, 89: 1535-1537
- 6 Shiels A, Mackay D, Ionides A, et al. A missense mutation in the human connexin 50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62: 526-532
- 7 Berry V, Mackay D, Khalig S, et al. Connexin 50 mutation in a family with congenital "zonular nuclear" pulverulent cataract of Pakistani origin [J]. Hum Genet, 1999, 105: 168-170
- 8 Polyakov AV, Shagina IA, Khlebnikova OV, et al. Mutation in the connexin 50 gene (GJA8) in a Russian family with zonular pulverulent cataract [J]. Clin Genet, 2001, 60: 476-478
- 9 Willoughby CE, Arab S, Gandhi R, et al. A novel GJA8 mutation in an Iranian family with progressive autosomal dominant congenital nuclear cataract [J]. J Med Genet, 2003, 40: 124
- 10 Phillips GN, Jr. Structure and dynamics of green fluorescent protein [J]. Curr Opin Struct Biol, 1997, 7: 821-827
- 11 Dahm R, van Marle J, Prescott AR, et al. Gap junctions containing alpha8-connexin (MP70) in the adult mammalian lens epithelium suggests a re-evaluation of its role in the lens [J]. Exp Eye Res, 1999, 69: 45-56
- 12 Musil LS, Goodenough DA. Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function [J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 2: 875-880
- 13 Pal JD, Berthoud VM, Bever EC, et al. Molecular mechanism underlying a Cx50-linked congenital cataract [J]. Am J Physiol, 1999, 276: 1443-1446

(收稿:2008-11-20 修回:2009-06-29)

(本文编辑:高红)

读者·作者·编者

本刊对中英文摘要的写作要求

论著正文前附 300 字左右的中文摘要,包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词 3~8 个;英文摘要应比中文摘要详细,300 个实词左右。英文摘要的目的部分应概括写出本研究的研究背景和目的;方法部分应写明研究对象的数目、来源、分组情况及所用的研究方法和工具;结果部分应包括研究结果的主要形态学改变、染色的具体形态和具体测试数据。英文摘要的方法和结果部分内容的描述应用一般过去时态。英文关键词 3~8 个,应与中文关键词一致。

综述的中英文摘要不用四要素的写法,可写成指示性文摘,亦给出中英文关键词各 3~8 个;摘要用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等作主语。

(本刊编辑部)