大鼠 Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 质粒的构建、基因结构分析及鉴定*

况春燕[1]，杨 藩[2,3]
(1. 贵州省人民医院 心内科，贵州 贵阳 550002；2. 西北农林科技大学 动物医学院，陕西 杨凌 712100；3. 陕西省干细胞工程技术研究中心，陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **目的**：大鼠 Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 基因重组表达质粒的构建及其基因结构分析。**方法**：通过 UCSC(http://genome. ucsc. Edu/)分析大鼠瞬时受体电位通道 4(TRPC4)及其家族基因组结构，并通过 NCBI 确定了 TRPC4 的蛋白结构域，通过 BioGPS (http://biogps. org/#goto = welcome)分析其表达模式；PCR 扩增大鼠 TRPC4 蛋白编码区域(CDS)，并通过限制性内切酶与穿梭载体 pDOV-mCMV-MCS-EGFP-3FLAG 进行连接，其产物转化细菌感受态细胞；挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定，并对阳性克隆进行测序验证，测序正确的克隆即为目的质粒，命名为 pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG；将该质粒转染 HEK293 细胞进行腺病毒包装，并命名为 Ad- pDOV -mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG，通过 Western blot 验证蛋白的表达。**结果**：生物学分析发现 TRPC4 蛋白保守的 TRP-2、ANK 及 TRP 结构域，通过 BioGPS 分析发现 TRPC4 在杏仁核和海马中表达明显，在血管内皮细胞中也有表达；PCR 克隆获得 3 000 bp 的 TRPC4 CDS 序列，CDS 被亚克隆到表达载体 pDOV-mCMV-MCS- EGFP-3FLAG 中，酶切鉴定及测序验证正确；进行腺病毒包装后的病毒可以在 HEK293 细胞中表达 TRPC4-EGFP- 3FLAG 融合蛋白，Western blot 证实其为含 flag 标签的蛋白且大小为 128 KDa。**结论**：成功构建了大鼠 TRPC4 的腺病毒表达载体 Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG。

[关键词] 质粒，Ad -pDOV-mCMV-MCS-EGFP-3FLAG；瞬时受体电位通道 4；大鼠；腺病毒；基因结构
[中图分类号] R392 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)02-0130-06
DOI:10. 19367/j. cnki. 1000-2707. 2017. 02. 002

Construction of Ad-CN1035-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG Plasmid in Rat and An Analysis of Its Gene Structure

KUANG Chunyan[1], YANG Fan[2,3]
(*1. Department of Cardiovascular Diseases, the Peopleś Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 3. Stem Cell Engineering Technology Research Center of Shaanxi Province, Yangling 712100, Shaanxi, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To construct TRPC4 expression vector and to analyze rat TRPC4 protein domain. **Methods**: TRPC4 domain of rats and its family genome structure was analyzed by using UCSC (http://genome. ucsc Edu /). The structural domain of it was determined with NCBI, and its expression pattern analyzed with BioGPS. TRPC4 coding sequence (CDS) was amplified by PCR and sub-cloned into pDOV-mCMV-MCS-EGFP-3FLAG vector. Right clones were testified by PCR, and further confirmed by sequencing. To get Ad-CN1035-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG adenovirus. pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG was transfected into 293 based on AdMax system, and western blot was used to test the TRPC4-EGFP-3Flag fusion protein. **Results**: Conservative structural domains TRP-2, ANK, and TRP of TRPC4 protein were found through biological analysis. As well, BioGPS analysis results showed TRPC4 expresses obviously in a-

*[基金项目]国家自然科学基金(81360034,81560056)
网络出版时间:2017 - 02 - 17 网络出版地址:http://www. cnki. net/kcms/detail/52. 1164. R. 20170217. 1104. 006. html

mygdala, and hippocampus, and in heart and endothelial cells too. TRPC4 full-length CDS was about 3000bp and sub-cloned into the adenovirus expression vector pDOV-mCMV-MCS-EGFP-3FLAG. The sequence was confirmed by enzyme digestion test. The TRPC4-EGFP-3FLAG fusion protein in packaged adenovirus expressed in HEK293 cells, and was identified by western blot. The size of the flag-tagged protein was about 128 Kda. **Conclusion**: Rat Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG expression vector was constructed successfully.

[**Key words**] plasmid, Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG; transient receptor potential canonical 4; rats; adenovirus; gene structure

冠心病、高血压等心血管疾病发病的共同环节为血管内皮损伤及损伤后的不良修复,既往观点认为,损伤内皮的修复主要依靠损伤部位邻近未受损内皮细胞的迁移和增殖,但因其为终端分化细胞,修复能力有限造成损伤后的不良修复[1]。最新的研究发现,外周血和骨髓的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)能归巢到损伤血管局部,修复损伤内皮,促进损伤血管的再内皮化[2-3]。瞬时受体电位通道 4(transient receptor potential canonical 4,TRPC4)是钙库操纵性钙通道(store-operated calcium channals,SOCs)的成员之一,在 SOCs 中发挥膜通道的作用[4]。沉默人类冠状动脉内皮细胞的 *TRPC*4 基因,可抑制其细胞的增殖、迁移及管状形成能力[5]。EPCs 作为内皮细胞的前体细胞,TRPC4 是否也参与调节其生物学行为,目前未见报道。为研究 TRPC4 对 EPCs 功能的影响,本研究尝试构建大鼠 TRPC4 基因的表达质粒(pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG),并对其基因功能进行分析,为下一步的实验奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

Agarose(Biowest 公司),In-Fusion Kit(Clontech 公司),1 kp DNA Marker 及 T4 DNA Ligase(Fermentas 公司),Primer Star、感受态细胞(Takara 公司),2 × Tap 酶 Mix、小抽试剂盒及胶回收试剂盒(天根公司),内切酶(NEB 公司),pDOV. mCMV. MCS. EGFP. 3FLAG 载体及 *Nhe*I & *BamH*I 内切酶(纽恩生物科技有限公司), AdMax 包装系统(加拿大 microbix 公司),TRPC4 的 CDS 引物、测序引物 CMV-MF 由 Invitrogen 合成;阳性克隆测序由华大基因完成。

1.2　方法

1.2.1　大鼠 TRPC4 编码序列的克隆与载体构建　利用 PCR 的方法获取目的基因 TRPC4 的 CDS,引物序列 TRPC4-5′为 AAC CCC GGT CCG GCT AGC GCC ACC ATG GCT CAG TTC TAT TAC AAA C,TRPC4-3′为 GCC AGA TCC GCC GGA TCC CAA TCT CGT GGT CAC ATA ATC T。将目的基因与酶切的线性化载体 pDOV. mCMV. MCS. EGFP. 3FLAG 进行定向连接,其产物转化细菌感受态细胞。对长出的克隆进行菌落 PCR 鉴定,再对阳性的克隆进行测序和 BLAST 比对分析,测序引物 CMV-MF 为 TCA TTC TAT TGG CTG AGC TGC G、GFP-R 为 TCA GCT TGC CGT AGG TGG CAT;比对正确的即为构建成功的目的质粒,命名为 pDOV-mCMV-TRPC4 -EGFP-3FLAG。最后将构建好的表达载体进行超纯去内毒素抽提。

1.2.2　病毒包装及滴度测定　用 AdMax 包装系统进行腺病毒包装,将以上构建好的目的穿梭质粒 pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 与腺病毒骨架质粒共转染到 HEK293 细胞, 7 ~ 15 d 出现病毒空斑,待完全病变后收集上清液,即得到经病毒包装后的目的质粒,命名为 pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG;继之进行病毒的扩增及纯化,将滴度为 10^{10} ~ 10^{11} PFU/L 的病毒 10 μL,感染 HEK293 细胞,待细胞全部病变后,加入约 10% Nonidet P 40 (NP40)500 μL 以裂解细胞。收集细胞裂解物,离心,弃细胞碎片收集上清。每 100 mL 上清加入病毒沉淀液(20% PEG8000,2.5 mol/L NaCl)50 mL,冰上静置 1 h 沉淀病毒。12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,将沉淀物悬浮在 10 mL 密度为 1.10 g/mL CsCl 溶液中(溶剂为 20 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)4 ℃ 7 000 r/min 离心 5 min,收集病毒悬浮液。加入的 1.40 g/mL CsCl 溶液(溶剂同上)2.0 mL,再加入 1.30 g/mL CsCl 溶液 3.0 mL。最后加入 5 mL 的病毒悬浮液,22 800 r/min,4 ℃ 离心 2.5 h。收集 1.30 ~ 1.40 g/mL 密度的病毒条带至透析袋中(透析袋使用前用 10 mmol/L 的 ED-

$TANa_2$ 煮沸 10 min)。在透析缓冲液(蔗糖 50 g, 1 mol/L pH 为 8.0 的 Tris-HCl 液 10 mL, 1 mol/L $MgCl_2$ 溶液 2 mL 定容至 1 000 mL)中,4 ℃透析过夜,中间更换透析液 1 次。收集病毒,于 -80 ℃保存。最后进行病毒滴度测定。

1.2.3 构建的 Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 质粒验证 利用过表达腺病毒质粒 pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 目的基因携带 Flag 标签,使用 Flag 抗体检测过表达腺病毒质粒 Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 转染 293T 的细胞样品,Western blot 法检测样品中是否有 TRPC4-EGFP-3FLAG 融合蛋白的表达。

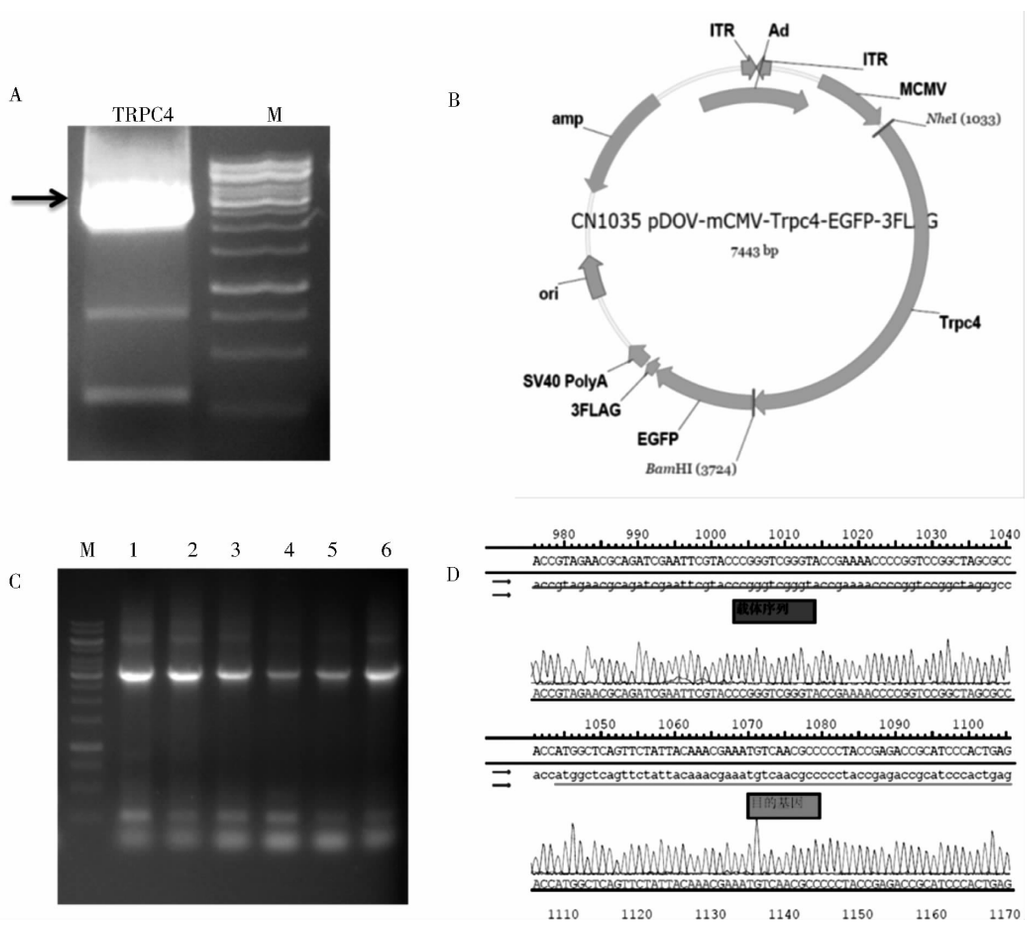
1.3 大鼠 TRPC4 编码序列克隆及生物学分析

通过 UCSC(http://genome. ucsc. Edu/)分析大鼠 *TRPC*4 基因及其家族基因组结构,采用 NCBI (http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/) 确定 TRPC4 的 AAA_4 蛋白结构,利用 BioGPS 分析 TRPC4 在各组织中的表达,通过 http://genemania. org/ 预测 TRPC4 的作用网络。

2 结果

2.1 pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 质粒构建

从含有大鼠 *TRPC*4 基因的质粒中,利用 PCR 方法扩增 *TRPC*4 基因,得到 3 000 bp 的阳性条带(图 1A)。将目的基因与真核载体连接,连接后的质粒图谱(图 1B)经感受态细胞转化 16 h,随机挑取平板上长出的 6 个转化子进行菌落 PCR 鉴定,结果显示 1 ~6 号均出现 3 000 bp 的阳性目的条带(图 1C),取 1 号转化子测序证实为 100% 正确的目的质粒及载体(图 1D)。



注:A 为 *TRPC*4 基因的 PCR 扩增结果,B 为 *TRPC*4 表达质粒,C 为菌落 PCR 鉴定,D 为阳性菌落测序结果

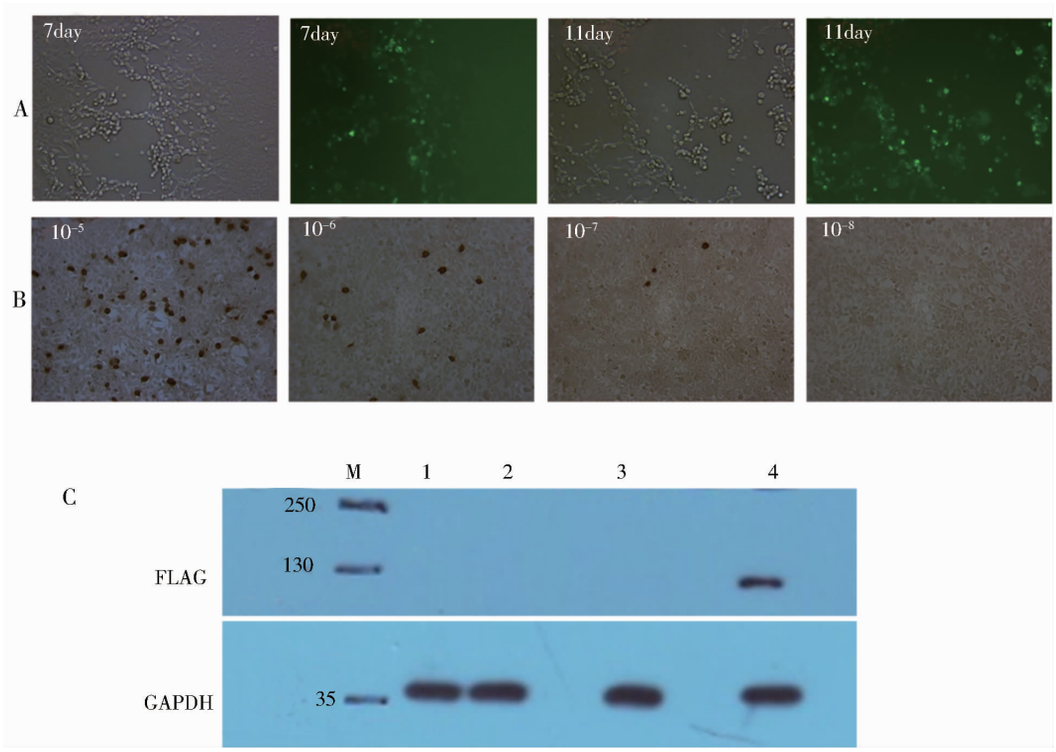
图 1 pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 质粒构建及鉴定

Fig. 1 Construction and identification results of pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG plasmid

2.2 pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 质粒病毒包装、滴度滴定及 western blot 验证

利用 AdMax 系统将目的穿梭质粒 pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 与腺病毒骨架质粒共转染到 HEK293 细胞中重组,获得病毒 Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 后小量扩增, 转染后

第 11 天时观察，结果显示，HEK 293 细胞大量脱落，细胞已经完全病变（图 2A）；继之进行病毒滴度测定，准备好 10 倍梯度稀释的病毒样品，分别感染 HEK293 细胞，48 h 后进行病毒滴度测定，结果也显示其滴度为 9.5×10^{13}（ifu/L）；计算显微镜下视野中阳性细胞的平均个数（图2B）。选择一个梯度视野，此梯度视野中要有 5 ~ 50 个阳性细胞，然后随机选择至少 5 个区域计数。最后进行病毒质粒验证，Western blot 结果显示 128 kDa 处出现目的条带，证实感染 HEK293 细胞中有 TRPC4-EGFP-3FLAG 融合蛋白表达（图 2C），目的质粒构建成功。



注：A 为 Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 质粒病毒扩增 7 天及 11 天的图片（100 ×）；B 为病毒滴度滴定不同梯度的代表图（100 ×）；C 为 Western blot 结果，条带 1、2、3 为对照组、4 为实验组

图 2　Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG 质粒病毒扩增、滴度滴定及 Western blot 验证

Fig. 2　The amplification, titration, and Western blot confirmation of Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG plasmid

2.3　TRPC4 基因的功能分析

采用 UCSC（http://genome. ucsc. edu/）分析大鼠 *TRPC*4 基因组序列与小鼠、人、狗和鸡的同源性，结果发现，各物种 TRCP4 外显子序列相似性很高，尤其是第 2 外显子（图 3A 红色方框所示及图 3B），而且大鼠与小鼠 *TRPC*4 基因还具有很高相似性的内含子序列（图 3A）。大鼠 TRPC4 蛋白的保守区域为 TRP-2、ANK、TRP（表 1 及图 3C）。同时通过对其相互作用的基因进行分析，发现有 20 个基因可能与其相互作用，其中其同系物 TRPC1 与其发生相互作用几率较大（图 3D）。此外，通过 BioGPS 对 TRPC4 表达进行分析，显示 TRPC4 在杏仁核和海马等神经组织中表达明显，在血管内皮细胞中也有表达（图 3E）。

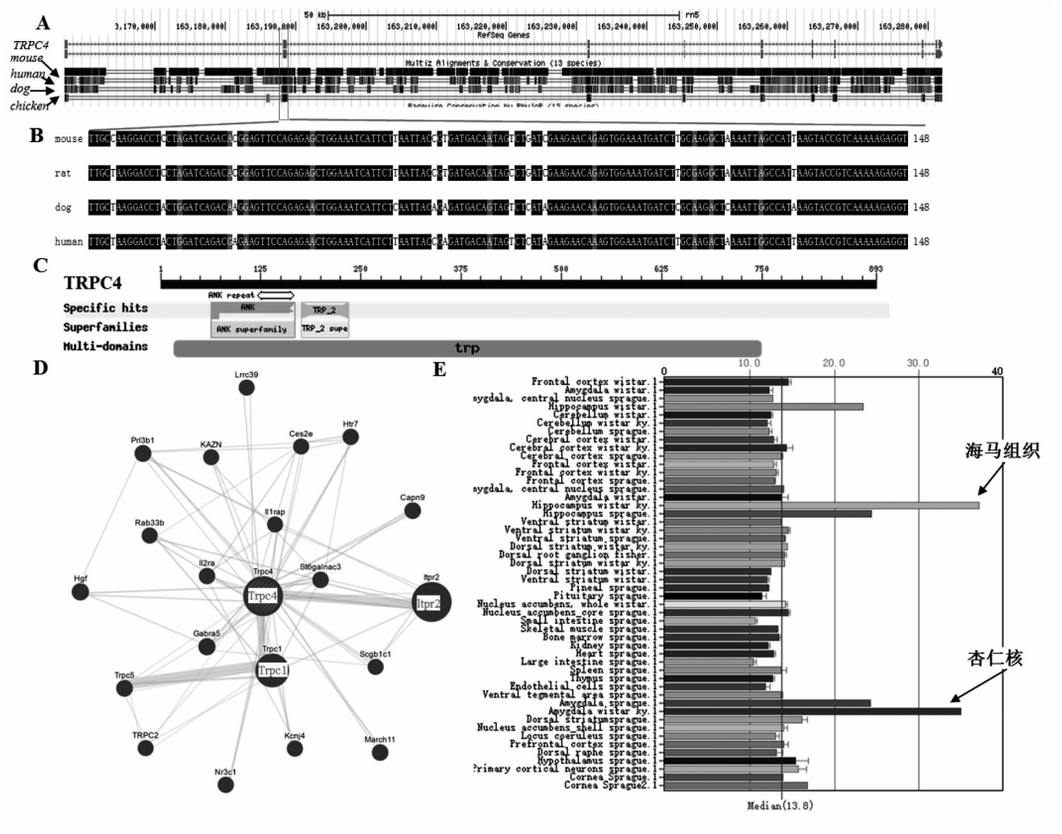
表 1　TRPC4 基因结构的保守结构域统计分析

Tab. 1　A statistics analysis on TRPC4 domain and genomic structure

Domain Name	Interval (aa)	E-value
TRP_2	176 ~ 235	2. 22E-31
ANK	64 ~ 168	6. 81E - 04
trp	17 ~ 749	0. 00E + 00

3　讨论

本研究通过生物学功能分析，从以下几个方面阐述了 *TRPC*4 基因的结构及特性：（**1**）各物种 *TRPC*4 外显子序列相似性很高，而且大鼠与小鼠 *TRPC*4 基因还具有很高相似性的内含子序列，大鼠



注:A 为与小鼠、人类、狗和鸡的同源性分析,B 为第 2 个外显子在不同物种间的序列比对,C 为蛋白的保守区域,D 为大鼠 *TRPC*4 基因预测的作用网络,E 为大鼠 T*RPC*4 基因的表达分析

图 3　*TRPC*4 基因的生物学分析

Fig. 3　Biological analysis on TRPC4 genome

TRPC4 蛋白的保守区域为 TRP-2、ANK 及 TRP;(**2**)TRPC1 与 TRPC4 发生相互作用几率较大;(**3**)TRPC4 在杏仁核和海马等神经组织中表达明显,在心脏及内皮细胞也有表达;此外,成功构建大鼠 TRPC4 腺病毒表达载体 Ad-pDOV-mCMV-TRPC4-EGFP-3FLAG。

SOCs 由基质交联分子 1、Orai 和 TRPC 家族构成,基质交联分子 1 在 SOCs 中发挥感受器作用,它能感受胞内钙库耗竭,激活 Orai 和 TRPC 通道,介导钙库操纵性钙内流,以补充胞内钙[6-7]。TRPC 家族含有 7 个成员(TRPC1 -7),根据其氨基酸序列的相似性分成 3 个亚群,分别为 TRPC1/ TRPC4 /TRPC5(41% 氨基酸序列相似)、TRPC3/TRPC6/TRPC7 (69% 氨基酸序列相似)及 TRPC2[8]。TRPC4 广泛分布在多种组织,包括大脑、内皮细胞及平滑肌细胞等,本研究的生物学分析结果与此一致[9]。TRPC4 呈点状不连续的分布在细胞膜上,且其膜靶点区域与其四聚体的结构并不相关,其受毒蕈碱乙酰胆碱受体调控其钙离子流,而 ML204 为其通道的选择性的内源性的抑制剂[10-13]。TRPC4 通过影响钙内流调节多种细胞及器官的功能,在心血管领域的研究也发现其有重要的作用。有研究报道,在基因敲除小鼠心肌细胞 *TRPC*1/*TRPC*4 基因,其调节的钙内流降低,可明显改善压力诱导的心肌细胞的病理性重塑[14];心肌梗死后降低心肌细胞的 TRPC3/4/6 的表达,其调节的钙内流降低,能改善梗死后心脏的病理性重塑,从而改善心脏的结构和功能[15];上调 TRPC4 和 TRPC3 通道可增加肺动脉平滑肌的钙内流,促进内毒素诱导的肺动脉狭窄[16];此外,TRPC4 在内皮细胞的功能上也发挥重要的作用,Qin 等[5]报道沉默人类冠状动脉内皮细胞 *TRPC*4 基因,通过抑制 VEGF 及 NF-kB 从而减弱由氧化修饰低密度脂蛋白诱导的血管发生。由此可见,*TRPC*4 基因对心血管疾病的发生发展发挥了重要的重用,而 EPCs 为内皮细胞的前体细胞,TRPC4 是否与参与其调控 EPCs 的生物学行为,目前未见报道。

腺病毒作为一种病毒载体,其基因组信息完全

清楚,可以插入大片段的外源基因,并易获得较高滴度,目前较为成熟的载体系统有非复制型(如 AdMax)和复制型(又叫溶瘤腺病毒)2 种[17-20]。本研究为进一步研究 TRPC4 对 EPCs 功能的影响,构建 TRPC4 腺病毒的表达载体并采用 AdMax 包装系统,利用 Cre/loxP(或 FLP/frt)重组酶将携带外源基因的穿梭质粒与骨架质粒在 HEK 293 细胞中实现重组,产生腺病毒。该系统具有操作简便、重组效率高、病毒产率高、目的基因表达水平高等优点,并且在使用过程中既可用于体外细胞实验,也可用于动物模型实验,为进一步实验作好充分的准备。此外,本研究还利用 UCSC(http://genome.ucsc.edu/)生物学分析了 TRPC4 在物种间的同源性,发现大鼠 TRPC4 含有保守的 TRP-2、ANK 及 TRP 结构域,并且其与 TRPC1 发生相互作用几率较大,在多种组织细胞有表达,是一非常重要的基因,更重要的是,在心脏及内皮细胞也有表达,这些发现为课题组后续研究 TRPC4 对 EPCs 功能的影响奠定了基础。

4　参考文献

[1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2015》[J].中国循环杂志,2015(31):521-528.

[2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997(5302):964-967.

[3] Kim H, Kim S, Baek SH, et al. Pivotal Cytoprotective Mediators and Promising Therapeutic Strategies for Endothelial Progenitor Cell-Based Cardiovascular Regeneration [J]. Stem Cells International, 2016(2016):8340257.

[4] Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels[J]. Physiological reviews, 2005 (2):757-810.

[5] Qin W, Xie W, Xia N, et al. Silencing of transient receptor potential channel 4 alleviates oxLDL-induced angiogenesis in human coronary artery endothelial cells by inhibition of VEGF and NF-kappaB[J]. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2016(22):930-936.

[6] Kuang CY, Yu Y, Wang K, et al. Knockdown of TRPC1 reduces the proliferation and migration of endothelial progenitor cells[J]. Stem cells, 2012 (3)487-496.

[7] Kuang CY, Yu Y, Guo RW, et al. Silencing stromal interaction molecule 1 by RNA interference inhibits the proliferation and migration of endothelial progenitor cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010 (2):315-320.

[8] 况春燕,黄岚. 瞬时受体电位 1 与心血管疾病关系研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2011 (4):379-381.

[9] Beck A, Speicher T, Stoerger C, et al. Conserved gating elements in TRPC4 and TRPC5 channels[J]. The Journal of biological chemistry, 2013(27):19471-19483.

[10] Myeong J, Kwak M, Hong C, et al. Identification of a membrane-targeting domain of the transient receptor potential canonical (TRPC)4 channel unrelated to its formation of a tetrameric structure[J]. The Journal of biological chemistry, 2014(50):34990-35002.

[11] Tsvilovskyy VV, Zholos AV, Aberle T, et al. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo[J]. Gastroenterology, 2009 (4):1415-1424.

[12] Miller M, Shi J, Zhu Y, et al. Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels[J]. The Journal of biological chemistry, 2011(38): 33436-33446.

[13] Ko J, Myeong J, Yang D, et al. Calcium permeability of transient receptor potential canonical (TRPC) 4 channels measured by TRPC4-GCaMP6s[J]. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology[J]. Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, 2017 (1):133-140.

[14] Camacho LJE, Tian Q, Hammer K, et al. A background Ca^{2+} entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling [J]. European heart journal, 2015(33):2257-2266.

[15] Makarewich CA, Zhang H, Davis J, et al. Transient receptor potential channels contribute to pathological structural and functional remodeling after myocardial infarction [J]. Circulation research, 2014(6):567-580.

[16] Chen GL, Jiang H, Zou F. Upregulation of transient receptor potential canonical channels contributes to endotoxin-induced pulmonary arterial stenosis[J]. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2016(22):2679-2684.

[17] 邓楚钟,潘耀振. 同源重组与 Gibson Assembly 方法构建腺病毒载体[J]. 贵阳医学院学报,2016(4):430-435.

[18] 李腾,李琼,严国强,等. 人 PPARγ 基因过表达重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 南昌大学学报:医学版,2015 (3):19-22,26.

[19] 李书华,龙捷,王红艳,等. MDA-7 基因的腺病毒载体构建及对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响[J]. 现代医药卫生,2014(13):1929-1932.

[20] 周建民,王勤章,丁国富,等. AdMax 系统构建腺病毒载体介导 SCL 基因转染 Cajal 样间质细胞及其表达[J].临床与实验病理学杂志,2012 (1):33-37.

(2016-11-16 收稿,2017-01-25 修回)
中文编辑:吴昌学;英文编辑:苏晓庆