

• 论 著 •

SV2A 基因真核表达质粒构建及其在 HEK293T 细胞中的表达^{*}

张晓敏,王培昌,刘 静[△]

(首都医科大学宣武医院检验科,北京 100053)

摘 要:目的 构建鼠突触囊泡蛋白 2A(SV2A)基因的真核表达质粒,并瞬时转染至人胚肾细胞(HEK293T)中,对其表达进行鉴定。**方法** 以 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织的 cDNA 为模板,扩增得到长 2 239 bp 的 SV2A 基因编码序列,将此序列插入到真核表达载体 p3×Flag-CMV-10 多克隆位点区域中,得到真核表达质粒 p3×Flag-CMV-10-SV2A,转化后挑取单克隆菌落经双酶切鉴定后送公司测序,将构建成功的重组质粒转染至 HEK293T 细胞中,利用蛋白质印迹法(Western blot)检测 SV2A 基因的表达情况。**结果** 成功构建 p3×Flag-CMV-10-SV2A 重组质粒,并在转染至 HEK293T 细胞后,验证了相应蛋白表达。**结论** 利用分子克隆技术成功构建了 p3×Flag-CMV-10-SV2A 真核表达质粒并在 HEK293T 细胞中正确表达,为后续实验奠定了基础。

关键词:SV2A 基因; 分子克隆; 重组质粒; 基因表达
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.03.005 **中图法分类号:**R742.1
文章编号:1673-4130(2020)03-0274-04 **文献标识码:**A

Construction of eukaryotic expression plasmid of SV2A gene and its expression in HEK293T cells^{*}

ZHANG Xiaomin, WANG Peichang, LIU Jing[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract: **Objective** To construct the eukaryotic expression plasmid of mouse synaptic vesicular protein 2A (SV2A) gene and transfer it to human embryonic kidney cells (HEK293T) for identification. **Methods** The cDNA of APP/PS1 double transgenic mouse hippocampal tissue was used as template to amplify the 2 239 bp long SV2A gene coding sequence, which was inserted into the eucaryotic expression vector p3×Flag-CMV-10 polyclonal site area, and the eucaryotic expression plasmid p3×Flag-CMV-10-SV2A was obtained. After transformation, the monoclonal colonies were selected and identified by double enzyme digestion and then sent to the company for sequencing, and the constructed recombinant plasmid was transformed into a successful one western blot was used to detect the expression of SV2A gene in HEK293T cells. **Results** The recombinant plasmid p3×Flag-CMV-10-SV2A was successfully constructed, and the expression of the protein was verified after transfection into HEK293T cells. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid p3×Flag-CMV-10-SV2A is successfully constructed by using molecular cloning technology and expressed in HEK293T cells, which lay a foundation for further experiments.

Key words:SV2A gene; molecular cloning; recombinant plasmid; gene expression

突触神经递质释放功能障碍与各种中枢神经系统疾病的发病机制密切相关,突触的数量改变也与许多脑部疾病有关^[1-2],如阿尔茨海默病、癫痫等疾病^[3-4]。突触囊泡蛋白 2A(SV2A)是一种膜蛋白,特异性表达于突触囊泡中,主要调节脑内动作电位依赖

性神经递质释放。研究发现,SV2A 与癫痫的发病机制及治疗存在密切联系,SV2A 基因敲除小鼠出生后不久即表现出严重的癫痫发作^[5]。据报道,不同类型的癫痫动物和癫痫患者脑内 SV2A 蛋白表达水平均有不同程度的改变,以 SV2A 为治疗靶点的抗癫痫药

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81472007);北京市医管局人才培养计划“登峰”项目(DFL20180803)。
作者简介:张晓敏,女,研究生在读,主要从事分子生物方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:wsliu.jing@163.com。
本文引用格式:张晓敏,王培昌,刘静. SV2A 基因真核表达质粒构建及其在 HEK293T 细胞中的表达[J]. 国际检验医学杂志,2020,41(3):274-277.

物左乙拉西坦及其类似物目前已被广泛应用于临床^[6-8]。然而 SV2A 调控癫痫的作用机制仍未可知,为了进一步研究 SV2A 基因在癫痫等神经系统疾病中的功能,本文构建了鼠 SV2A 基因的真核表达质粒,并在 HEK293T 细胞中进行了表达与鉴定,旨在为进一步研究 SV2A 在神经系统疾病中的机制及作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 真核表达载体 p3×Flag-CMV-10 和 HEK293T 细胞均为中科院生物物理研究所惠赠;菌株 Top10 感受态细胞、DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒、T4 DNA 连接酶、500 bp DNA ladder 和 D15000+2000 DNA ladder 购自中国北京 Tiangen 公司;HindⅢ、EcoR I 限制性内切酶、CutSmart 购自美国 NEB 公司;5×All-In-One RT Master Mix 购自加拿大 Abm 公司;Trizol、Lipo3000 购自美国 Invitrogen 公司;DMEM 培养基、胎牛血清、双抗购自美国 Gibco 公司;BCA 蛋白水平测定试剂盒、5×Tris-甘氨酸蛋白电泳缓冲液、10×电转液、5×蛋白上样缓冲液购自中国北京 Solarbio 公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Millipore 公司;抗 Flag 抗体购自美国 Sigma 公司;抗 β-actin 抗体及对应二抗购自中国北京中杉金桥公司;PCR 仪购自美国 ABI 公司;高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;曝光仪购自中国上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 获得 cDNA 用 Trizol 法提取 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织 RNA^[9],用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA:以 RNA 为模板,加入 5×All-In-One RT Master Mix。PCR 程序为:25℃ 10 min;42℃ 15 min;85℃ 5 min;冷却至 4℃,即获得模板 cDNA。

1.2.2 获得目的基因 依据 GenBank 数据库中鼠 SV2A(基因 ID: 64051)基因 mRNA 的序列(NM_022030.3),设计巢式 PCR 引物,应用 Primer-Blast 设计第 1 对引物,引物序列为 F1:5'-TCC AGG CCC TAG TTC CTC TC-3',R1:5'-TGT GCC TGC CAT CCC TAA AG-3'。根据基因编码区序列设计第 2 对引物,分别在上下游引物中加入 HindⅢ 和 EcoR I 酶切位点,并加入相应的保护碱基,引物序列为:F2:5'-CCC AAG CTT ATG GAA GAA GGC TTT CGA GAC -3',R2:5'-GGA ATT CTC ACT GCA GCA CCT GTC C-3'。引物由中国生工生物工程技术服务有限公司合成。以 cDNA 为模板,分别以 F1、R1 和 F2、R2 为引物,进行两轮 PCR 扩增,条件为:95℃ 预

变性 30 s;95℃ 变性 10 s;56℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 10 min;冷却至 4℃。扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳分离并在紫外灯下切胶回收目的条带,回收、纯化扩增产物采用 Tiangen 的 DNA 回收试剂盒。

1.2.3 重组质粒的构建 用限制性内切酶 HindⅢ 和 EcoR I 分别对载体 p3XFlag-CMV-10 和 SV2A 的基因扩增产物进行双酶切,酶切体系 50 μL。酶切载体时:载体 10 μL,10×Cut Smart 5 μL,两种内切酶各 1 μL,体系用 ddH₂O 补齐。酶切目的基因时:DNA 产物 43 μL,10×Cut Smart 5 μL,两种内切酶各 1 μL。目的基因扩增产物 37℃ 孵育 2 h,载体孵育时间延长至 4~6 h。将全部酶切产物用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳分离,并对目的条带切割回收。将回收的目的基因与载体以 3:1 的比例混合,加入 T4 DNA 连接酶和 T4 DNA Buffer,室温连接 1 h。将连接产物转化至感受态大肠杆菌 Top10 中,37℃ 200 r/min 摇菌 45 min,将转化后的菌液接种于加有氨苄青霉素的 LB 固体培养基,37℃ 孵箱过夜培养。挑取多个单克隆菌落,分别置于 10 mL 加入氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 200 r/min 摇菌 12~14 h,用 Tiangen 质粒小提试剂盒提取质粒。

1.2.4 重组质粒的鉴定 用 HindⅢ 和 EcoR I 对重组质粒进行双酶切,对产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳,根据酶切片段大小鉴定重组质粒是否构建成功。同时对双酶切鉴定构建成功的重组质粒送中国上海生工生物工程技术服务有限公司进行基因测序,将测序结果与 GenBank 中的 SV2A 的 cDNA 序列进行比对。

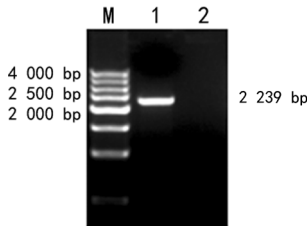
1.2.5 重组质粒的表达 在六孔板中培养 HEK293T 细胞,DMEM 培养基中含有 10%胎牛血清和 1%双抗(青霉素、链霉素),置于 37℃,CO₂ 水平为 5%的恒温培养箱中培养。当细胞生长状态良好,融合度达到 70%~90%时,进行瞬时转染。配制转染试剂 A:125 μL DMEM 培养基与 5 μL Lipofectamine 3000 混合孵育 10 min。配制转染试剂 B:125 μL DMEM 培养基中加入 5 μL P3000 和 2.5 μg p3×Flag-CMV-10-SV2A 质粒或空载体质粒(作为空白对照)。将试剂 A 与试剂 B 混合后在室温下孵育 10 min,再加入六孔板的培养基中混匀继续培养,8 h 后换成新鲜配制的完全培养基,37℃ 培养至 48 h 时收集细胞,加入 1%Triton×100 裂解蛋白。

1.2.6 蛋白质印迹法(Western blot)鉴定 将提取的总蛋白用 BCA 法测定蛋白水平^[10],各取 40 μg 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并转移到 PVDF 膜上(350 mA,2 h)。转膜结束后裁膜,用 TBST 缓冲液

洗膜 3 次,每次 5 min,然后用 5% 的脱脂奶粉持续封闭 2 h,加入特异性的 Flag 抗体(1 : 1 000),4 ℃ 摇床孵育过夜;用 TBST 缓冲液洗膜,每次 5 min,共 3 次;加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠的二抗(1 : 10 000),室温孵育 1 h,再用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min。加入电化学发光液后曝光。以 β -actin 作为内参。

2 结 果

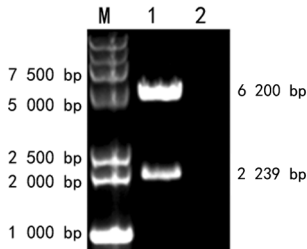
2.1 SV2A 全序列经 PCR 扩增后电泳鉴定 SV2A 基因经 PCR 扩增后对产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,利用紫外凝胶电泳成像系统分析,对照 DNA Marker,在 2 239 bp 左右可见 1 条清晰条带,与预期目的条带大小一致,见图 1。



注:M 表示蛋白标准带;1 表示 SV2A 基因扩增条带;2 表示空白对照。

图 1 SV2A 基因扩增产物

2.2 重组质粒 p3×Flag-CMV-10-SV2A 的酶切鉴定及测序 重组质粒 p3×Flag-CMV-10-SV2A 经 Hind III 和 EcoR I 酶切后进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,经凝胶电泳成像系统分析,可见位于 2 239 bp 处的 SV2A 目的基因片段和 6 200 bp 左右处的 p3×Flag-CMV-10 载体片段,说明 SV2A 基因已成功插入 p3×Flag-CMV-10 载体中,且阳性菌落测序后与 GenBank 检索的 SV2A 的 cDNA 序列进行比对,结果证明 SV2A 正确插入 p3×Flag-CMV-10 载体,见图 2、3。



注:M 表示蛋白标准带;1 表示转染重组质粒条带;2 表示空白对照。

图 2 p3×Flag-CMV-10-SV2A 的酶切鉴定

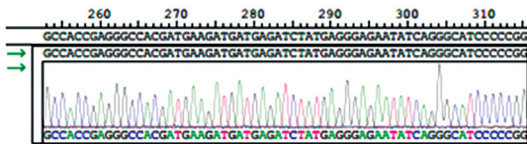
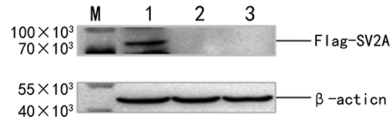


图 3 SV2A 测序结果

2.3 Western blot 分析 SV2A 蛋白在 HEK293T 细

胞的表达 质粒转染 48 h 后收集细胞,裂解后提取蛋白,Western blot 结果显示转染 p3×Flag-CMV-10-SV2A 质粒的 HEK293T 细胞在 82×10^3 左右处可见 1 条明显条带,与预期结果相符,转染空载体 p3×Flag-CMV-10 的 HEK293T 细胞及空白对照组细胞未见 SV2A 蛋白表达,见图 4。



注:M 表示 DNA 标准带;1 表示重组质粒扩增条带;2 表示转染空载体条带;3 表示空白对照。

图 4 SV2A 在 HEK293T 细胞中的蛋白表达

3 讨 论

SV2A 是突触囊泡蛋白 2 的家族成员之一,该蛋白家族还包括 SV2B 和 SV2C,这 3 种同源基因均表达于神经元和内分泌细胞的囊泡中。其中 SV2A 是分布最广泛的一种亚型,主要分布于脑组织中,包括大脑皮层、海马和小脑等部位。它能够调节动作电位依赖的神经递质的释放,维持突触囊泡稳态,并参与内分泌囊泡的胞吐作用^[11-12]。人类 SV2A 基因位于 1 号染色体长臂的 2 区 1 带(1q21.2),包含 14 565 个碱基对,编码了一段有 13 个外显子的约 4 353 个碱基对的 mRNA,翻译成相对分子质量约为 82.6×10^3 的蛋白,共包含 742 个氨基酸^[13]。SV2A 有一段长而保守的 N-末端序列,其中前 57 个氨基酸是与突触结合蛋白-1(SYT-1)C2B 结构域相互作用的部位,SYT-1 是一种 Ca^{2+} 感受器,二者结合可以调节突触的胞吐作用。SV2A 共有 12 个跨膜结构域,其中第 6、7 跨膜结构域之间有 1 个凸向胞质内的大环结构,第 7、8 跨膜结构域之间有 1 个凸向囊泡腔内的大环结构,后者有 3 个 N-糖基化位点,这 3 个位点对于神经肉毒素 BoNT/A 和 BoNT/E 进入神经元至关重要^[14-15]。

本实验过程中利用巢式 PCR 技术扩增目的基因,巢式 PCR 需要设计 2 对引物,通过第 1 对引物扩增出的产物比目的 DNA 片段长,第 2 对引物又称巢式引物,因其扩增的目的片段位于第 1 对 PCR 扩增产物的内部而得名,非目的片段与两套引物同时结合的可能性很小,因此通过该引物可特异性的扩增出位于首轮 PCR 产物内部的 DNA 片段。质粒构建过程中载体的选择至关重要,p3×Flag-CMV-10 是一种常用的带有 3×Flag 标签的真核表达载体,它具有许多优势可保证基因稳定高效的表达,普通的 Flag 标签含 8 个氨基酸残基,而 3×Flag 标签含 22 个氨基酸残基,位于融合蛋白的外表面,具有很高的免疫灵敏度,便于检测和纯化目的蛋白;功能强大的 CMV 启动子能够驱动目的蛋白高水平表达;多克隆位点便于目的

基因插入;具有多种限制性酶切位点可供选择;内有 Neo 抗性标记,可用 G418 筛选成功转染了重组质粒的细胞;既可用于瞬转也可用于稳转。上述独特的结构优势可保证目的基因在哺乳动物细胞内稳定高效表达且便于检测。HEK293T 细胞来源于人胚胎肾上皮细胞,是一种常用的研究外源基因表达的细胞株,细胞增殖速度快,贴壁生长,但其贴壁强度较低,因此换液时应格外小心。易于转染和稳定表达的特性使其成为一种强大的研究基因功能的工具细胞而被广泛应用。本实验也选用了 HEK293T 细胞作为验证基因表达效果的细胞,结果表明,转染效果理想,重组质粒 p3×Flag-CMV-10-SV2A 成功转染 HEK293T 细胞,且目的蛋白得到稳定正确表达。本结果为进一步研究 SV2A 在癫痫等神经系统疾病中的功能奠定了实验基础。

4 结 论

本实验利用分子克隆的方法成功构建了重组真核表达质粒 p3×Flag-CMV-10-SV2A,通过菌落 PCR、酶切和测序检测了质粒构建的正确性,并在 HEK293T 细胞中验证了其表达情况。p3×Flag-CMV-10-SV2A 真核表达质粒的构建为今后建立稳定表达 SV2A 的细胞模型,为进一步研究 SV2A 的生物学功能及其在神经系统疾病中的作用奠定了实验基础。

参考文献

- [1] FINNEMA S J, NABULSI N B, EID T, et al. Imaging synaptic density in the living human brain[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(348): 348ra96.
- [2] HOLMES S E, SCHEINOST D, FINNEMA S J, et al. Lower synaptic density is associated with depression severity and network alterations[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1529.
- [3] CHAKROBORTY S, HILL E S, CHRISTIAN D T, et al. Reduced presynaptic vesicle stores mediate cellular and network plasticity defects in an early-stage mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2019, 14(1): 7.
- [4] LEPETA K, LOURENCO M V, SCHWEITZER B C, et al. Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders-a review from students to students[J]. *J Neurochem*, 2016, 138(6): 785-805.
- [5] CROWDER K M, GUNTHER J M, JONES T A, et al.

Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A(SV2A)[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(26): 15268-15273.

- [6] LYNCH B A, LAMBENG N, NOCKA K, et al. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(26): 9861-9866.
- [7] WOOD M D, SANDS Z A, VANDENPLAS C A. Further evidence for a differential interaction of brivaracetam and levetiracetam with the synaptic vesicle 2A protein[J]. *Epilepsia*, 2018, 59(9): 147-151.
- [8] RUSSO E, CITRARO R, MULA M. The preclinical discovery and development of brivaracetam for the treatment of focal epilepsy[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12(11): 1169-1178.
- [9] RIO D C, ARES M J R, HANNON G J, et al. Purification of RNA using trizol (tri reagent)[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, 2010(6): 5439.
- [10] OLSON B J, MARKWELL J. Assays for determination of protein concentration[J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2007, 3: 3-4.
- [11] CREVECOEUR J, KAMINSKI R M, ROGISTER B, et al. Expression pattern of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2014, 40(2): 191-204.
- [12] LÖSCHER W, GILLARD M, SANDS Z A, et al. Synaptic vesicle glycoprotein 2A ligands in the treatment of epilepsy and beyond[J]. *CNS Drugs*, 2016, 30(11): 1055-1077.
- [13] ODILE B, PRISCILLA V D A, SÁNCHE I G J, et al. Puzzling out synaptic vesicle 2 family members functions[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 148.
- [14] YAO G R, ZHANG S C, MAHRHOLD S, et al. N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(7): 656-662.
- [15] WEISEMANN J, STERN D, MAHRHOLD S, et al. Botulinum neurotoxin serotype A recognizes its protein receptor SV2 by a different mechanism than botulinum neurotoxin B synaptotagmin[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(5): E154.

(收稿日期:2019-06-28 修回日期:2019-10-25)