

[文章编号] 1671-587X(2025)01-0051-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250107

小鼠SGK1基因真核表达载体的构建及鉴定

张丽娜¹, 巴隆¹, 孟峻²

(1. 内蒙古医科大学附属医院临床检验诊断教研室, 内蒙古 呼和浩特010059; 2. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 内蒙古 呼和浩特010050)

[摘要] **目的:** 构建含有小鼠血清和糖皮质激素诱导激酶(SGK)1基因的真核表达载体pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry, 并观察载体在转染HEK293细胞后的表达情况。**方法:** PCR法扩增SGK1目的基因片段, 并与经过Hind III和Sbf I双酶切的pcDNA3.1-MYC-C-mcherry载体连接。酶切和测序验证成功后, 采用脂质体转染法将pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry转染至HEK293细胞中, Western blotting法测定HEK293细胞中真核表达载体的表达情况。**结果:** 酶切载体条带位于5 200 bp, 目的基因条带位于3 100 bp, 与预期结果相符。Snap Gene软件比对, pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry的测序结果与预期序列一致, 表明真核表达载体pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry构建成功。Western blotting法观察到转染后的HEK293细胞在相对分子量49 000附近显现出明显的条带, 真核表达载体pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry成功表达。**结论:** 成功构建真核表达载体pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry, 为后续研究SGK1基因对小鼠受精卵细胞早期发育的作用机制奠定了基础。

[关键词] 血清和糖皮质激素诱导激酶1; 真核表达载体; HEK293细胞; 载体构建; 质粒

[中图分类号] Q132 **[文献标志码]** A

Construction and identification of eukaryotic expression vector of mouse SGK1 gene

ZHANG Lina¹, BA Long¹, MENG Jun²

(1. Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

ABSTRACT Objective: To construct an eukaryotic expression vector pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry which containing mouse serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK) 1 gene, and to observe its expression in the transfected HEK293 cells. **Methods:** The SGK1 target gene segments were amplified by PCR method, and the segments were ligated to the pcDNA3.1-MYC-C-mcherry vector which was doubly-digested with Hind III and Sbf I. After successful verification by enzyme digestion and sequencing, the pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry expression vector was transfected into the HEK293 cells by liposome transfection. Western blotting method was used to determine the expression level of eukaryotic expression

[收稿日期] 2024-03-06 [录用日期] 2024-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360109, 81660267); 内蒙古自治区科技厅自然科学基金项目(2021MS08158)

[作者简介] 张丽娜(2000—), 女, 内蒙古自治区乌兰察布市人, 在读硕士研究生, 主要从事临床生物化学及生殖分子生物学方面的研究。

[通信作者] 孟峻, 主任检验师, 硕士研究生导师(E-mail: nmfrank@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

vector in the cells. **Results:** The vector band was located at 5 200 bp and the target gene band was located at 3 100 bp, which was consistent with the expected results. The sequencing results were also consistent when compared with the expected sequence by Snap Gene software, which indicated that the eukaryotic expression vector pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry was successfully constructed. Successful expression of the eukaryotic expression vector pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry was observed by Western blotting method, in which the transfected cells showed well-defined bands near the relative molecular mass of 49 000. **Conclusion:** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry is successfully constructed, laying a solid foundation for the subsequent study on the transition mechanism of SGK1 gene in the early development of mouse fertilized egg cells.

KEYWORDS Serum and glucocorticoid-induced kinase 1; Eukaryotic expression vector; HEK293 cells; Vector construction; Plasmids

血清和糖皮质激素诱导激酶 (serum and glucocorticoid-induced kinase, SGK) 1作为血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶家族的重要成员之一, 具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性^[1]。最初, SGK1作为糖皮质激素应答基因由乳腺肿瘤细胞中克隆出来^[2], 人类 SGK1基因定位于6q23染色体^[3]。SGK1几乎分布于哺乳动物的所有组织中, 尽管在多数组织中的表达水平普遍较低, 但其对外界刺激较为敏感^[4-5]。当细胞受到血清或糖皮质激素的刺激时, SGK1基因的表达可以在30 min内迅速提高5~10倍^[6]。在哺乳动物体内, SGK1通过磷酸肌醇3激酶和3-磷酸肌醇依赖性激酶被胰岛素及生长因子激活^[7]。SGK有3种不同但高度同源的异构体, 即SGK1、SGK2和SGK3, 分别由位于不同染色体上的3个不同基因产生^[8]。SGK由3个结构域组成, 分别是N端可变区、催化区和C端尾部, 并且SGK1的调控严格受时间和空间限制^[9]。在许多正常细胞和转化细胞中, SGK1的表达、酶活性、蛋白稳定性和亚细胞定位均受严格的刺激依赖调节^[6]。SGK1可参与调节运输、神经兴奋性、激素释放及凝血^[10]。同时, SGK1对高血压^[11]、糖尿病^[12]、炎症^[13]和自身免疫性疾病^[14]等多种疾病的发生发展有一定的影响。SGK1是激素调节离子通道的关键酶^[4], 同时还与细胞分化、细胞周期调控和有丝分裂稳定性有关^[15]。本实验通过构建SGK1基因真核表达载体, 为进一步研究SGK1基因在小鼠受精卵细胞早期发育中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 HEK293细胞购自北京全式金生物技术有限公司, 目的基因由本课题组

合成; *Sbf*I、*Xba*I和*Hind*III等限制性内切酶购于美国 Thermo Scientific 公司, 载体 pcDNA3.1-MYC-C 购自广州辉骏生物科技有限公司, SGK1抗体购于武汉 proteintech 公司, Prime STAR Max Premax (2×) 和 TaKaRa Taq 由日本 TaKaRa 公司提供, 质粒小提试剂盒购于广州亿涛生物科技有限公司, ClonExpress II One Step Cloning Kit 连接酶购于南京诺唯赞公司, SDS-PAGE 凝胶速配试剂盒及预染蛋白 Marker 购于北京索莱宝公司, SDS-PAGE 上样缓冲液购于南京 Bio-Channel 公司, 微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 购于上海碧云天生物技术公司, ECL 化学发光试剂盒购于美国 Pierce Biotechnology 公司, β -actin 抗体购于上海 SantaCruzbio 公司, 脱脂奶粉购于飞净公司, Lipofectamine™ 2000 试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。超净工作台 (中国苏净安泰公司), 低温离心机 (型号: Heraeus Fresco 17) 和紫外分光光度计 (型号: Nanodrop 2000c) 均购自德国 Thermo Scientific 公司, CO₂ 恒温培养箱 (型号: Binder C150) 购自德国 BINDER 公司, 多功能摇床 (型号: SI1201) 购自美国 ENVIRO-GENIE 公司, 垂直电泳槽 (型号: Mini Trans-Blotting) 和凝胶自动成像仪 (型号: Gel DOC XR+) 均购自美国 Bio-Rad 公司, 基因扩增仪 (型号: Hema 9600) 购自中国 HEMA 公司, 纯水机 (型号: TTCHZ) 购自中国天创公司。

1.2 引物设计 结合实验要求, 利用 Snap Gene 软件设计 SGK1 引物: 上游引物, 5'-TCAGAAGAG-GATCTGGCAAGCTTGATGAAACAGAGAAG-GATGGG-3'; 下游引物, 5'-CTCGCCCTTGCTC-

ACCATGAGGAAGGAATCCACAGG-3', 用于后续目的基因扩增。

1.3 扩增目的基因及目的片段的回收 ①扩增目的基因片段。将构建好的含目的基因的真核表达质粒作为模板, 应用Prime STAR高保真酶进行PCR反应, 扩增SGK1基因目的片段, 反应体系共50 μL : 质粒模板0.5 μL , SGK1上游引物2 μL , SGK1下游引物2 μL , Prime STAR Buffer 10 μL , Prime STAR Max Premix (2 \times) 0.5 μL , dNTP Mixture 4 μL , ddH₂O 31 μL 。扩增条件: 96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min, 96 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性退火15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共30个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min, 于16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。待目的基因片段扩增完成, 行1%琼脂糖凝胶电泳, 并加入10 μL Marker对照, 以此验证扩增是否达到预期效果。②回收目的基因片段。紫外光下, 使用已高压灭菌的手术刀切取目标DNA条带置于干净EP管中; 将Buffer G按3倍胶体积加入至胶块中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热10 min至完全融化; 之后再添加1倍胶体积的异丙醇, 上下颠倒; 将上述融化的液体移至微量DNA吸附柱中, 静置2 min后12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min, 弃去管中滤液; 吸附柱中添加500 μL Buffer G溶液, 室温12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min, 弃去滤液; 将已混入无水乙醇的650 μL Buffer W溶液加入离心管, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min, 弃去滤液; 空载吸附柱12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心2 min, 去除残液, 放于洁净1.5 mL无酶离心管中, 向吸附膜中心加入10 μL Buffer B溶液, 常温放置1~2 min使反应完全进行; 最后, 混合物12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min, 进行洗脱纯化, 获得的目的基因片段用于后续实验。

1.4 载体双酶切及酶切产物回收 ①载体双酶切割。准备1支0.2 mL无酶EP管, 加入5 μg pcDNA3.1-MYC-C-mcherry载体, 采用Hind III和Sbf I酶对其进行切割。酶切体系: 3 μL 10 \times Buffer溶液, Sbf I和Hind III酶各1.5 μL 及5 μg pcDNA3.1-MYC-C-mcherry载体。将上述组分充分混合, 加入无酶水调整总体积至30 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切60 min。反应结束后, 取30 μL 产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析, 以验证双酶切效果。②酶切产物的回收。紫外光下, 高压灭菌手术刀裁切琼脂糖凝胶上的目标线性化载体条带, 并将其移至1.5 mL无菌EP管中, 参照微量琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒说明书回收载体片段。

1.5 目的片段与载体连接 取0.2 mL的ClonExpress II One Step Cloning Kit连接酶置入干净EP管中, 使酶切后回收的基因片段与载体DNA连接。构建的连接体系: 100 ng酶切载体、100 ng PCR回收目的基因、1 μL 的ClonExpress II One Step Cloning Kit连接酶和2 μL 的5 \times CE II缓冲液, 无酶水调整总体积至10 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育连接30 min, 冰浴5 min, 即可获得连接产物。

1.6 连接产物转化感受态细胞 在1.5 mL的无酶EP管中加入100 μL 冰浴解冻的大肠杆菌DH5a感受态细胞和10 μL 连接产物(在冰浴中完成), 颠倒混合离心管, 冰浴30 min; EP管于42 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴60 s后迅速转移至冰水混合物中, 继续冰浴3~5 min; 吸取300 μL LB培养基至EP管中, 并用移液枪吹打混匀, 放入200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中振荡培养1 h; 接着, 在含有100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄西林(Ampicillin)抗生素的LB平板上将菌液均匀涂抹(该步骤在超净工作台完成); 室温放置使培养基充分固化, 将平板倒置放入37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中, 过夜培养。

1.7 菌落PCR鉴定阳性转化子 于洁净EP管配制菌检PCR混合液, 菌检PCR体系: 上下游引物各0.2 μL , TaKaRa Taq Max 5 μL , 添加无酶水定容至10 μL 。制备好的混合液均匀分配至无菌八联排管中。超净工作台上, 筛选出8个独立菌落并进行合适的标记。经高压灭菌移液枪头轻触培养基菌落一侧后, 移至八联排管中, 轻摇使菌落撒入液体, 弃枪头。然后进行PCR扩增, 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预加热5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, 共25个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸3 min, 于16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增完毕后, 向PCR管中注入2 μL 10倍稀释的Loading缓冲液, 吸取10 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析, 同时加入10 μL 的DNA Marker比较及鉴定, 筛选出正确的菌落进行后续的摇菌及测序工作。

1.8 质粒提取 实验开始前先检查缓冲液Buffer P中是否添加RNase A, 洗涤缓冲液Buffer PW中是否掺杂无水乙醇。收集菌体, 取2支无酶EP管分别添加1.5 mL过夜培养菌液, 室温12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min, 弃去培养基; 每管沉淀物添加250 μL 缓冲液I, 移液枪吹散沉淀, 使细菌沉淀重悬; 试管中添加250 μL 缓冲液II, 紧闭管盖, 混合8~10次, 室温静置3 min, 彻底分解菌体; 管中加入350 μL

缓冲液Ⅲ, 颠倒8~10次, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min富集沉淀; 移液枪将上清液转移至吸附柱, 相同转速再离心1 min, 使质粒紧密结合在吸附膜上; 在混合液中添加500 μL 缓冲液EF, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min, 弃去滤液; 接着, 向同一EP管中加入500 μL Buffer PW溶液, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min, 弃掉上清液, 此步骤重复1次; 空吸附柱 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min后, 打开管盖, 使残留乙醇缓慢挥发; 之后, 将吸附柱置于一无菌EP管中, 吸取30 μL TE缓冲液试剂, 垂直滴入吸附膜中央, 确保液体在室温静置2 min充分作用, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心2 min, 管底沉淀物即获得的质粒DNA, 用于后续实验。

1.9 酶切鉴定及质粒测序验证 酶切鉴定体系: 1 μL 的质粒, 1 μL $10\times$ Buffer, 0.5 μL *Xba* I, 0.5 μL *Hind* III, 7 μL 无酶水, $37\ ^\circ\text{C}$ 切割60 min。取10 μL 酶切质粒样品和10 μL DNA Marker, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测。将酶切获得的片段送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证, 从而进一步验证pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry真核表达载体是否构建成功。

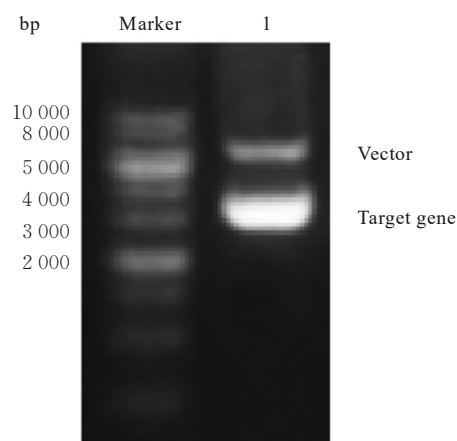
1.10 细胞培养与转染 将HEK293细胞置于含有10%胎牛血清、 $100\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素及 $100\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素的培养基中培养, 并于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件的培养箱中培养(按时更换培养液); 定期观察细胞的生长情况, 收集处于对数生长期的细胞; 待所收集的细胞密度达到80%时, 依据Lipofectamine™ 2000试剂盒说明书的要求转染HEK293细胞; 培养24 h, 转染5 μg pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry DNA。

1.11 Western blotting法检测HEK293细胞中pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry的表达 真核表达载体pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry转染至HEK293细胞48 h后, 离心收集目的细胞, 离心并用PBS缓冲液清洗3次, 去除残留培养液; 加入细胞裂解液提取蛋白, 使用BCA定量试剂盒测定其浓度; 蛋白质变性冷却至室温, 使用12%的分离胶进行SDS-PAGE电泳分离, 采用恒压恒流方式将分离后的蛋白质转移至PVDF膜上, $50\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂牛奶室温密封1 h; 加入一抗稀释液, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 特异性结合目标蛋白; 取出NC膜, 使用TBST溶液进行3次每次10 min的洗涤; 使用辣根过氧化物酶标记二抗, 室温下振荡孵育2 h, NC膜用TBST溶液漂洗3次, 每次10 min, 去除多余二

抗; 采用化学发光技术使膜显影, 检测细胞中的蛋白表达情况。未转染组和空载体pcDNA3.1-MYC-C转染组参照载体pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry转染组的操作步骤, anti- β -actin抗体作为内参和anti-MYC标签抗体行蛋白电泳检测。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

2 结果

2.1 酶切鉴定pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry真核表达载体构建成功 通过以上实验步骤所构建的真核表达载体pc-DNA3.1-MYC-SGK1-mcherry, 使用*Xba* I和*Hind* III限制性内切酶对其进行双酶切鉴定, 然后行1%琼脂糖凝胶电泳处理, 载体条带位于5 200 bp, 目的基因条带位于3 100 bp, 与预期结果完全吻合, 表明pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry真核表达载体构建成功。见图1。



Marker: DL 10 000 DNA Marker; Lane 1: pcDNA3.1-MYC-SGK1 plasmid DNA doubly-digested by *Xba* I and *Hind* III.

图1 pcDNA3.1-MYC-SGK1质粒DNA双酶切产物凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoregram of double digestion products of pcDNA3.1-MYC-SGK1 plasmid DNA

2.2 pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry的测序结果

连接目的基因片段与载体, 使用Snap Gene软件对测序结果进行比对, pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry测序结果与预期序列完全匹配。见图2。进一步证实pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry真核表达载体构建成功。

2.3 HEK293细胞中pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry真核表达载体的表达水平

采用脂质体转

NC_000076.6 SGK1	82 1	ATGAAACAGAGAAGGATGGGCTGAACGATTTTATTCAGAAGATTGCCAGCAACACCTATGCATGCAAACACGCTGAA ATGAAACAGAGAAGGATGGGCTGAACGATTTTATTCAGAAGATTGCCAGCAACACCTATGCATGCAAACACGCTGAA
NC_000076.6 SGK1	160 79	GTTCAAGTCCATTTTAAAAATGTCCCATCTCAGGAGCCGGAGCTTATGAACGCTAACCCCTCTCCTCCGCCAAGTCCC GTTCAAGTCCATTTTAAAAATGTCCCATCTCAGGAGCCGGAGCTTATGAACGCTAACCCCTCTCCTCCGCCAAGTCCC
NC_000076.6 SGK1	238 157	TCTCAACAAATCAACCTGGGTCCGTCCCAACCCCTCACGCCAAACCCCTCCGACTTTCACTTCTTGAAAGTGATCGGA TCTCAACAAATCAACCTGGGTCCGTCCCAACCCCTCACGCCAAACCCCTCCGACTTTCACTTCTTGAAAGTGATCGGA
NC_000076.6 SGK1	316 235	AAGGGCAGTTTTGGAAAGTTCTTCTGGCTAGGCACAAGGCAGAAGAAGTATTCTATGCAGTCAAAGTTTTACAGAAG AAGGGCAGTTTTGGAAAGTTCTTCTGGCTAGGCACAAGGCAGAAGAAGTATTCTATGCAGTCAAAGTTTTACAGAAG
NC_000076.6 SGK1	394 313	AAAGCCATCCTGAAGAAGAAAGAGGAGAAGCATATTATGTGAGAGCGGAATGTTCTGTTGAAGAATGTGAAGCACCCCT AAAGCCATCCTGAAGAAGAAAGAGGAGAAGCATATTATGTGAGAGCGGAATGTTCTGTTGAAGAATGTGAAGCACCCCT
NC_000076.6 SGK1	472 391	TTCTGGTGGGCTTCACTTCTCATTCCAGACCCGCTGACAAGCTCTACTTTGTCTGGACTACATTAATGGTGGAGAG TTCTGGTGGGCTTCACTTCTCATTCCAGACCCGCTGACAAGCTCTACTTTGTCTGGACTACATTAATGGTGGAGAG
NC_000076.6 SGK1	550 469	CTGTTCTACCATCTCCAGAGGGAGCGCTGCTTCTTGGAAACACGGGCTCGATTCTACGACGCTGAAATAGCCAGTGGC CTGTTCTACCATCTCCAGAGGGAGCGCTGCTTCTTGGAAACACGGGCTCGATTCTACGACGCTGAAATAGCCAGTGGC
NC_000076.6 SGK1	628 547	CTGGGCTATCTGCACTCCCTAAACATCGTTTATAGAGACTTAAACCTGAGAATATTCTCTAGACTCCAGGGGCAC CTGGGCTATCTGCACTCCCTAAACATCGTTTATAGAGACTTAAACCTGAGAATATTCTCTAGACTCCAGGGGCAC
NC_000076.6 SGK1	706 625	ATCGTCTCACTGACTTTGGGCTCTGCAAGAGAATATTGAGCATAACGGGACAACATCTACCTTCTGTGGCACGCCT ATCGTCTCACTGACTTTGGGCTCTGCAAGAGAATATTGAGCATAACGGGACAACATCTACCTTCTGTGGCACGCCT
NC_000076.6 SGK1	784 703	GAGTATCTGGCTCCTGAGGTCTCCATAAGCAGCCGATGACCCGGACGGTGGACTGGTGGTGTCTTGGGGCTGTCTCTG GAGTATCTGGCTCCTGAGGTCTCCATAAGCAGCCGATGACCCGGACGGTGGACTGGTGGTGTCTTGGGGCTGTCTCTG
NC_000076.6 SGK1	862 781	TATGAGATGCTCTACGGCTGCCCCGTTTTATAGCCGGAACACGGCTGAGATGTACGACAATATTCTGAACAAGCCT TATGAGATGCTCTACGGCTGCCCCGTTTTATAGCCGGAACACGGCTGAGATGTACGACAATATTCTGAACAAGCCT
NC_000076.6 SGK1	940 859	CTCCAGTTGAAACCAAATATTACAACTCGGCAAGGCACCTCCTGGAAGGCCTCTGCAGAAGGACCGGACCAAGAGG CTCCAGTTGAAACCAAATATTACAACTCGGCAAGGCACCTCCTGGAAGGCCTCTGCAGAAGGACCGGACCAAGAGG
NC_000076.6 SGK1	1018 937	CTGGGTGCCAAGGATGACTTTATGGAGATTAAGAGTCATATTTTCTTCTTTAATTAACCTGGGATGATCTCATCAAT CTGGGTGCCAAGGATGACTTTATGGAGATTAAGAGTCATATTTTCTTCTTTAATTAACCTGGGATGATCTCATCAAT
NC_000076.6 SGK1	1096 1015	AAGAAGATTACACCCCATTTAACCCAAATGTGAGTGGGCCAGTGACCTTCGGCACTTCGATCCCGAGTTTACCGAG AAGAAGATTACACCCCATTTAACCCAAATGTGAGTGGGCCAGTGACCTTCGGCACTTCGATCCCGAGTTTACCGAG
NC_000076.6 SGK1	1174 1093	GAGCCGGTCCCAGCTCCATCGGAGGTCCCTGACAGCATCCTTGTCACGGCCAGTGTGAAGGAAGCAGCAGAAGCC GAGCCGGTCCCAGCTCCATCGGAGGTCCCTGACAGCATCCTTGTCACGGCCAGTGTGAAGGAAGCAGCAGAAGCC
NC_000076.6 SGK1	1252 1171	TTCTCGGCTTCTCTATGCACCTCCTGTGGATTCTTCTCTC TTCTCGGCTTCTCTATGCACCTCCTGTGGATTCTTCTCTC

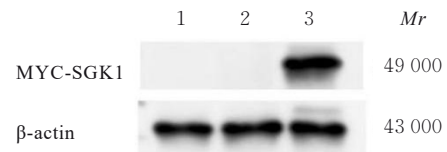
图2 pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry的测序结果

Fig. 2 Sequencing results of pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry

染法将构建的 pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry 真核表达载体转染至 HEK293 细胞中, 采用 Western blotting 法检测 anti- β -actin 抗体和 anti-MYC 标签抗体进行, 未转染组和空载体转染组均未检测到条带, 转染了真核表达载体 pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry 的 HEK293 细胞在相对分子质量为 49 000 处可见一条清晰条带, 结果表明载体构建成功且能正确表达。见图 3。

3 讨论

SGK1 是多种信号转导通路和细胞磷酸化级联反应的纽带^[16], 在各种纤维化疾病 (肺纤维化、糖尿病肾纤维化和克罗恩病) 中, SGK1 存在过度表达^[5]。本课题组^[17]前期通过显微注射 SGK1-mRNA 在小鼠 1-细胞期受精卵中过表达 SGK1, 促使受精卵提前完成 G₂/M 期转变, 缩短受精卵卵裂时间;



Lane 1: Non-transfection group; Lane 2: Empty vector transfection group; Lane 3: Vector pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry transfection group.

图3 Western blotting 法检测 pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry 在 HEK293 细胞中表达的电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expression of pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry in HEK293 cells detected by Western blotting method

并使用不同浓度的 SGK1 抗体作用于体外培养的小鼠 1-细胞期受精卵, 延迟受精卵开始卵裂的时间, 使受精卵发育停滞于 G₂/M 期, 抑制受精卵的早期发育; 同时也发现 SGK1 的激活时间较细胞周期蛋

白依赖性激酶1 (cyclin dependent kinase 1, CDK1) 的激活时间早, 通过CDK1对小鼠1-细胞期受精卵的发育进行调控。上述实验结果表明SGK1在受精卵的早期发育进程中发挥重要作用, 但SGK1参与调控G₂/M期转换的具体机制尚未完全阐明, 有待进一步研究探讨。

本研究通过设计引物并合成SGK1基因序列, 构建pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry真核表达载体, 并对重组载体进行酶切鉴定及测序。电泳结果显示载体条带位于5 200 bp, 目的基因条带位于3 100 bp, 与预期结果相符, 并且测序结果也与预期序列一致, 表明载体成功插入目的基因。为了检测构建的载体能否在细胞中成功表达, 采用脂质体转染技术将含有SGK1基因的表达载体转入HEK293细胞中; Western blotting法检测结果显示: 在相对分子质量约49 000附近出现一条电泳条带, 证实在转染HEK293细胞中SGK1基因可以成功表达。研究^[18]显示: 抑制SGK1过表达能够提高神经胶质对谷氨酸所致毒性的清除效率, 阻止神经胶质细胞衰老和线粒体损伤, 是帕金森病和阿尔茨海默病的关键治疗靶点^[19]。SGK1已被确定为肿瘤促进基因, 在多种恶性肿瘤(胃癌^[20]、肺癌^[21]、乳腺癌^[22]、胶质母细胞瘤^[23]、结直肠癌^[24]和前列腺癌^[25]等)中均观察到SGK1的失调。

综上所述, 采用PCR和双酶切等方法可以成功构建pcDNA3.1-MYC-SGK1-mcherry真核表达载体, 本研究结果为后续细胞实验奠定了基础。同时构建该表达载体对肿瘤和退行性疾病的干预治疗具有重要意义。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

张丽娜参与实验研究、数据采集和论文撰写, 巴隆参与实验研究、文献整理和论文修改, 孟峻参与论文修改和审校。

[参考文献]

- [1] LI X D, WANG Z Y, JIAO C Y, et al. Hepatocyte SGK1 activated by hepatic ischemia-reperfusion promotes the recurrence of liver metastasis via IL-6/STAT3[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 121.
- [2] SANG Y W, KONG P P, ZHANG S Z, et al. SGK1 in human cancer: emerging roles and mechanisms [J]. Front Oncol, 2020, 10: 608722.
- [3] CICHENAS J, MESKINYTE-KAUSILIENE E, JUKNA V, et al. SGK1 in cancer: biomarker and drug target[J]. Cancers, 2022, 14(10): 2385.
- [4] LANG F, STOURNARAS C, ZACHAROPOULOU N, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 and the response to cell stress[J]. Cell Stress, 2018, 3(1): 1-8.
- [5] LU R Q, ZHANG Y Y, ZHAO H Q, et al. SGK1, a critical regulator of immune modulation and fibrosis and a potential therapeutic target in chronic graft-versus-host disease[J]. Front Immunol, 2022, 13: 822303.
- [6] WEBSTER M K, GOYA L, GE Y, et al. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(4): 2031-2040.
- [7] ZHU M, WU G, LI Y X, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1 (SGK-1) plays a role in membrane trafficking in caenorhabditis elegans [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130778.
- [8] ARTEAGA M F, ALVAREZ DE LA ROSA D, ALVAREZ J A, et al. Multiple translational isoforms give functional specificity to serum- and glucocorticoid-induced kinase 1[J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(6): 2072-2080.
- [9] DI CRISTOFANO A. SGK1: the dark side of PI3K signaling[J]. Curr Top Dev Biol, 2017, 123: 49-71.
- [10] LANG F, STRUTZ-SEEBOHM N, SEEBOHM G, et al. Significance of SGK1 in the regulation of neuronal function[J]. J Physiol, 2010, 588(Pt 18): 3349-3354.
- [11] VALINSKY W C, TOUYZ R M, SHRIER A. Aldosterone, SGK1, and ion channels in the kidney[J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132(2): 173-183.
- [12] LANG F, GÖRLACH A, VALLON V. Targeting SGK1 in diabetes[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(11): 1303-1311.
- [13] DONADEI C, ANGELETTI A, CANTARELLI C, et al. Erythropoietin inhibits SGK1-dependent TH17 induction and TH17-dependent kidney disease [J]. JCI Insight, 2019, 5(10): e127428.
- [14] LAI Y, LUO X Y, GUO H J, et al. PO-322 exerts potent immunosuppressive effects *in vitro* and *in vivo* by selectively inhibiting SGK1 activity[J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(7): 1666-1676.
- [15] TALARICO C, DATTILO V, D'ANTONA L, et al. SGK1, the new player in the game of resistance: chemo-radio molecular target and strategy for inhibition [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(5):

- 1863-1876.
- [16] RITTER M, BRESGEN N, KERSCHBAUM H H. From pinocytosis to methuosis-fluid consumption as a risk factor for cell death[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 651982.
- [17] 张慧灵, 韩迪, 郭文秀, 等. SGK1对Cyclin B/Cdc2通路介导小鼠G1期受精卵卵裂的调控作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(3): 628-637.
- [18] KWON O C, SONG J J, YANG Y, et al. SGK1 inhibition in glia ameliorates pathologies and symptoms in Parkinson disease animal models [J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(4): e13076.
- [19] HEO E J, LEE Y, HYUNG SEO M, et al. Association between SGK1 and α -synuclein in skeletal muscle in an MPTP-induced Parkinson's disease model[J]. *Neurosci Lett*, 2023, 814: 137464.
- [20] YAO Y, JIANG Q, JIANG L, et al. Lnc-SGK1 induced by *Helicobacter pylori* infection and high salt diet promote Th2 and Th17 differentiation in human gastric cancer by SGK1/Jun B signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20549-20560.
- [21] GREENAWALT E J, EDMONDS M D, JAIN N, et al. Targeting of SGK1 by miR-576-3p inhibits lung adenocarcinoma migration and invasion[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(1): 289-298.
- [22] GODBOLE M, TOGAR T, PATEL K, et al. Up-regulation of the kinase gene SGK1 by progesterone activates the AP-1-NDRG1 axis in both PR-positive and-negative breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(50): 19263-19276.
- [23] KULKARNI S, GOEL-BHATTACHARYA S, SENGUPTA S, et al. A large-scale RNAi screen identifies SGK1 as a key survival kinase for GBM stem cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(1): 103-114.
- [24] LEE L Y W, WOOLLEY C, STARKEY T, et al. Serum- and glucocorticoid-induced kinase sgk1 directly promotes the differentiation of colorectal cancer cells and restrains metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(2): 629-640.
- [25] LIU W W, WANG X C, LIU Z P, et al. SGK1 inhibition induces autophagy-dependent apoptosis via the mTOR-Foxo3a pathway[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(8): 1139-1153.