文章编号:1000-5404(2007)08-0743-02

技术方法

人OAZ-ORF2基因真核表达载体的构建及在Hela细胞中的表达

姜 立[1],马文丽[1],柯杰兵[2],彭翼飞[1],李 晋[3],徐 兵[4],郑文岭[1] (南方医科大学:[1]基因工程研究所,[3]人体解剖学教研室,[4]附属南方医院血液病中心;[2]军事体育进修学院军事体育理论教研室,广州 510515)

提 要:目的 克隆人鸟氨酸脱羧酶抗酶蛋白OAZ-ORF2基因,重组至真核表达载体,并在Hela细胞中表达。**方法** 以pET32a-OAZ质粒为模板,PCR法扩增OAZ-ORF2序列,测序鉴定后重组入真核表达载体pEGFP-N1,转染Hela细胞,表达重组蛋白。**结果** PCR产物经琼脂糖电泳证实与目的基因长度一致,测序结果与GenBank公布的OAZ基因的ORF2序列一致。重组载体在Hela细胞中表达OAZ-ORF2蛋白,Western blotting分析在相对分子质量44.5×10^3左右出现新的蛋白条带。**结论** 成功构建人OAZ-ORF2基因真核表达载体,并获得表达。

鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase,ODC)是多聚胺生物合成中的关键酶之一,催化多聚胺生物合成,其活性增强,可导致多聚胺生物合成增加,与肿瘤的发生发展有密切联系。鸟氨酸脱羧酶抗酶(ornithine decarboxylase antizyme, OAZ)是其中的一种调控形式。细胞内该抗酶的过度表达除了能降低细胞内多胺水平,还能抑制细胞的生长。由此推测,OAZ在细胞的生长与分化过程中担任着重要的角色[2,3]。该抗酶蛋白的表达受到精胺的一个称之为frame-shifting的核糖体移位的调控,诱导OAZ蛋白的生成。OAZ转录本的编码是两个不同的阅读框(open reading frame, ORF),ORF1和ORF2。在AZ mRNA的阅读框中,需要有一个+1的翻译移码过程。这两个ORF有部分的重叠。在ORF1的5'端终止密码子处,通常序列为TCCTGATG(199-206),翻译框架达到TGA时,受到精胺的调控进行+1移码,跃过终止密码子TGA上的T,以GAT指导的天冬氨酸为后续,翻译合成ORF2[4,5]。OAZ蛋白结构中,ORF2是OAZ蛋白真正发挥抗酶活性的肽链区段。本研究克隆了人OAZ-ORF2 cDNA的基因序列,并成功在哺乳类动物细胞中表达OAZ-ORF2蛋白,将对进一步研究该基因的功能以及以OAZ为靶点的肿瘤核酸疫苗的制备,具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli. DH5α、真核表达质粒pEGFP-N1、Hela细胞株及pET32a-OAZ质粒由本实验室保存。高保真*Taq*聚合酶、Lipofectamine 2000试剂为Invitrogen公司产品。PCR试剂盒、RT-PCR试剂盒、质粒纯化试剂盒、胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、限制性内切酶*Eco*RⅠ和*Not*Ⅰ及T_4DNA连接酶均购自TaKaRa公司。GFP抗体、BeyoECL Western荧光检测试剂购自Beyotime公司。其余生化试剂均为国产分析纯。引物根据已知OAZ全长cDNA基因序列,针对ORF2区间设计引物。P1(正义):5'-AGCTCGAGATGGATGCCCCTCACCCA-3';P2(反义):5'-CGCAGAATTCTACTCCTCCTCCTCTCC-3'。其中P1添加了*Xho*Ⅰ酶切位点(下划线部分)和起始密码子ATG,P2引物则添加了*Eco*RⅠ酶切位点(下划线部分),用于克隆OAZ基因ORF2区间cDNA序列共483 bp。

1.2 PCR法扩增目的基因

以pET32a-OAZ质粒为模板,选用P1、P2引物对,采用高保真*Taq*聚合酶,反应条件:95 ℃预变性4 min,95 ℃变性1 min,60 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min,30个循环,72 ℃延伸6 min。获取OAZ基因中ORF2的cDNA片段,PCR产物电泳鉴定,全长约504 bp。

1.3 基因重组及测序

PCR产物回收纯化后,与T载体连接后测序鉴定。确认序列完整后,将PCR产物分别用*Xho*Ⅰ和*Eco*RⅠ进行酶切,酶切产物回收后与经相同双酶切的pEGFP-N1载体进行连接,转化*E. coli.* DH5α菌,挑选阳性菌落。LB培养基(含氨苄青霉素)振培过夜。抽提质粒,经双酶切鉴定和测序后正确后命名为pEGFP-N1-OAZ-ORF2。

1.4 细胞转染

宫颈癌Hela细胞由本实验室保存。细胞贴壁生长于含10% 新生牛血清的DMEM培养基中,用0.25% 胰酶和0.02% EDTA 1∶1混合的消化液进行传代,置37℃、5% CO_2孵箱中培养,每2~3天换液传代,取对数生长期细胞进行实验。严格按照试剂盒操作,用脂质体(Lipofectamine 2000)法,将pEGFP-N1-OAZ-ORF2的质粒转染Hela细胞,以G418筛选。每24小时换液培养,72 h后荧光显微镜观察,挑取阳性克隆扩增培养。

1.5 Western blotting检测

收集10^6个转染细胞与未转染细胞的总蛋白,于12% SDS-PAGE凝胶电泳完毕后转膜。化学发光法检测GFP融合蛋白的表达:将膜浸泡在10%小牛血清中封闭过夜,PBST液洗涤后加入1∶200稀释的GFP抗体,振荡孵育2 h。PBST液洗涤5次

基金项目:广东省自然科学基金[2006-2007(5004737)];广东省生物芯片实验室建设项目(2004-B-60144)
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province [2006-2007 (5004737)] and the Project Funds for Guangdong Biochip Lab (2004-B-60144)

作者简介:姜 立(1975-),男,江苏省南京市人,博士研究生,讲师,主要从事肿瘤的基因治疗方面的研究。电话:(020) 61648209, E-mail: jiangli@fimmu.com
通讯作者:马文丽,电话:(020) 61648210

收稿日期:2006-04-28;修回日期:2007-01-21

加入二抗(1∶1 000 稀释),振荡反应 2 h。PBST 洗涤 4 次后加入新配制的发光试剂,室温 60 s 后,暗室中覆于 X 线片上,曝光 15 s,显影后定影。

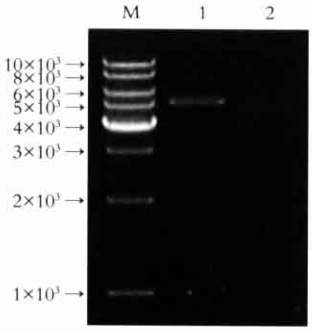
2 结果

2.1 PCR 结果

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,产物长度与目的片段 OAZ-ORF2 的长度一致。

2.2 重组子的构建及酶切鉴定

PCR 产物经酶切后,与相同酶切的 pEGFP-N1 载体进行重组连接,转化 *E. coli.* DH5α 菌,抽提质粒后,经双酶切电泳后,出现 2 条非特异带,其中 1 条长度与目的基因一致,1 条片段大小与未酶切的重组质粒相近。见图 1。



M: DNA 标准; 1: 重组质粒 pEGFP-N1-OAZ-ORF2; 2: *Xho* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切

图 1 pEGFP-N1-OAZ-ORF2 质粒的酶切鉴定

2.3 人 OAZ-ORF2 cDNA 序列测定

与 T 载体连接后,转化细菌后抽提质粒,以 T7 启动子序列为测序引物序列于 ABI3730 测序仪进行 DNA 序列测定,与 GenBank 中公布的相应基因序列经 BLAST 比较,两者一致性 100%。

2.4 Western blotting 分析重组 OAZ-ORF2 蛋白在 Hela 细胞中的表达

OAZ-ORF2 蛋白的相对分子质量为 18.4×10^3,与 EGFP 融合表达的蛋白产物相对分子质量为 44.5×10^3,Western blotting 检测在相应位置呈阳性,而空载体转染组与空白细胞组呈阴性,表明 OAZ-ORF2 基因以融合蛋白形式在 Hela 细胞中得到表达。

3 讨论

从最初哺乳类动物细胞中克隆出 OAZ 基因至今,已陆续发现有 OAZ1、OAZ2 和精子特异性的 OAZ3 基因。其中 OAZ1,也就是通常所说的 OAZ 基因,其表达的蛋白产物对于鸟氨酸脱羧酶有特异的拮抗作用。鸟氨酸脱羧酶是多胺代谢中的限速酶,控制着鸟氨酸脱羧生成腐胺的过程。在生长旺盛的组织,如胚胎、再生肝和肿瘤组织中,ODC 酶的活性明显增高。而 OAZ 能够特异的拮抗 ODC 的催化活性,减少细胞内多胺的生成,因此成为研究抑制肿瘤细胞恶性增殖的切入点[6]。

OAZ 蛋白对 ODC 的抑制作用不是直接降解 ODC,而是与 ODC 结合后,通过 26S 蛋白酶降解 ODC,是一种在翻译后水平调节酶活性的机制。ODC 是一个二聚体酶,亚基间的聚合与解聚非常迅速。OAZ 对于 ODC 单体蛋白有非常高的亲和力,形成 AZ:ODC 的蛋白聚合体,促进 ODC 被 26S 蛋白酶降解。在人 OAZ 蛋白的 227 个氨基酸组成中,C 末端的第 121 ~ 227 位氨基酸结合 ODC 蛋白,并抑制其活性。降解需要 OAZ 蛋白 N 末端的第 70 ~ 120 位氨基酸链的存在。而这两部分正是 OAZ1 蛋白真正起催化作用的多肽链,也就是本实验所克隆表达的结果[7]。

本研究通过体外重组,成功的在哺乳动物细胞中表达出了 OAZ 基因的 ORF2 部分,蛋白产物为 OAZ1 蛋白 C 末端的 160 氨基酸多肽,是 OAZ 全长 228 个氨基酸多肽真正起催化活性的部分。该蛋白与 EGFP 共表达,形成融合蛋白,既保留了 OAZ 真正起催化活性的部分,又带有荧光激发活性,利于细胞内该蛋白功能的定位检测。本研究应用基因克隆技术构建 OAZ 真核表达质粒重组体,转染至 Hela 细胞并成功表达。流式细胞仪检测转染后的细胞显示有细胞周期的改变,与 Newman 等[3]报道的 OAZ 过度表达能够使某些肿瘤如肝癌细胞增殖减慢、细胞周期停滞于 G_1 期相吻合,OAZ 通过抑制 ODC 酶活性,减弱细胞内多聚胺浓度,使肿瘤细胞增殖减慢。因此可以作为肿瘤抑癌候选基因,有进一步研究其在肿瘤代谢调控的意义。目前正尝试将 OAZ 基因构建入腺病毒载体,并转染于宫颈癌大鼠模型体内,为开展宫颈癌的基因治疗奠定基础。

关键词: 鸟氨酸脱羧酶抗酶蛋白;真核表达; Hela 细胞
中图法分类号: R394-33 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] Hoffman D W, Carroll D, Martinez N, *et al*. Solution structure of a conserved domain of antizyme: a protein regulator of polyamines[J]. Biochemistry 2005, 44(35): 11777 - 11785.

[2] Mangold U. The antizyme family: polyamines and beyond[J]. IUBMB Life, 2005, 57(10): 671 - 676.

[3] Newman R M, Mobascher A, Mangold U, *et al*. Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression [J]. J Biol Chem, 2004, 279(40): 41504 - 41511.

[4] Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Identification of nuclear export signals in antizyme-1[J]. J Biol Chem, 2003, 278(45): 44791 - 44798.

[5] Schipper R G, Cuijpers V M, De-Groot L H, *et al*. Intracellular localization of ornithine decarboxylase and its regulatory protein, antizyme-1 [J]. J Histochem Cytochem, 2004, 52(10): 1259 - 1266.

[6] Schenkel H, Hanke S, De-Lorenzo C, *et al*. P elements inserted in the vicinity of or within the Drosophila snRNP SmD3 gene nested in the first intron of the Ornithine Decarboxylase Antizyme gene affect only the expression of SmD3[J]. Genetics, 2002, 161(2): 763 - 772.

[7] Keren-Paz A, Bercovich Z, Porat Z, *et al*. Overexpression of antizyme-inhibitor in NIH3T3 fibroblasts provides growth advantage through neutralization of antizyme functions[J]. Oncogene, 2006, 25(35): 5163 - 5172.

(编辑 郭建秀)