维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0596-04

LMP-3 功能区真核表达质粒的构建

杨渝勇,倪卫东

(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建 LMP-3 功能区真核表达重组质粒。方法:设计合成 LMP-3 活性区引物,应用 PCR 方法,扩增其基因片段,亚克隆至真核表达质粒 pEGFP-N1,最终构建重组表达质粒 pEGFP-N1-LMP-3,同时进行酶切鉴定和测序。结果:PCR 扩增 LMP-3 基因序列正确,构建的重组表达质粒 pEGFP-N1-LMP-3 经 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切及测序鉴定正确。结论:成功获得真核表达重组质粒 pEGFP-N1-LMP-3,为进一步研究其成骨功能奠定基础。

【关键词】LIM 矿化蛋白;质粒;构建;表达

【中国图书分类法分类号】Q71 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-26

Construction of eukaryotic expression recombinant plasmid containing functional regeion of LIM mineralization protein-3

YANG Yu-yong, et al

(*Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct an eukaryotic expression recombinant plasmid containing functional regeion of LIM mineralization protein-3. *Methods*: Functional regeion of LIM mineralization protein-3 was amplified by PCR with primers, then inserted into pEGFP-N1 to generate eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-LMP-3. The recombinant plasmid was identified by restriction enzyme and sequencing. *Results*: The gene fragment encoding LMP-3 was amplified correctly by PCR. Enzyme digestion and identical sequencing showed that the recombinant eukaryotic expression plasmid was right constructed. *Conclusion*: Recombinant eukaryotic expression plasmid of LMP-3 has been successfully obtained, suggesting a foundation for the further studies on the bone formation.

【Key words】LIM mineralization protein; Plasmid; Construction; Expression

LIM 矿化蛋白(LIM mineralization protein, LMP)是一个细胞内非分泌的骨生成诱导蛋白,1998 年由 Boden 等[1]在研究糖皮质激素促骨髓间充质细胞向成骨细胞分化机制中发现,是成骨细胞分化的正性调节因子,可促进骨钙素的分泌和骨结节的形成,在骨的矿化过程中发挥重要作用。LMP 是骨诱导信号通路中一个早期细胞内因子,可以促进多种骨诱导因子的分泌,如 BMP-2, BMP-4, BMP-7、BMP-6 和 TGFβ1 等,使成骨信号放大,启动骨形成的激联反应。现已发现 3 种亚型,其中 LMP-1 和 LMP-3 具有成骨作用。笔者应用 PCR 方法,成功构建含有 LMP-3 功能区的真核表达质粒,为进一步研究其用于骨缺损的治疗奠定了基础。

作者介绍:杨渝勇(1971-),男,硕士,研究方向:骨折愈合基础与临床。

通讯作者:倪卫东,男,副教授,E-mail: niweidong18@163.com。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

质粒 pET43.1a-LMP-3 由美国 Pittsburgh 大学 Pola 博士馈赠,包含 LMP-3 优化后的全长 cDNA 序列。大肠杆菌 $DH5_{\alpha}$ 由新桥医院中心实验室保存。质粒提取试剂盒和低熔点凝胶回收试剂盒(Omega)、*Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ限制性核酸内切酶、RT-PCR 试剂盒(Takara),PCR 引物由上海博亚公司提供。

1.2 PCR 扩增 LMP-3 的活性片段

设计和目标质粒多克隆位点匹配的上下游引物,上游引物加入 *Hind* Ⅲ酶切位点和保护性碱基(下划线部分),下游引物加入 *EcoR* Ⅰ酶切位点和保护性碱基,序列如下:上游 5'-CCCAAGCTTGTCGTCAGCGTCGTCGTGGTG-3';下游 5'-CCGGAATTCGAGTTCGGCATGGGGTCAGGTG-3。扩增 pET43.1a-LMP-3质粒和 pEGFP-N1 质粒。小量提取质粒,以 pET43.1a

维普资讯 http://www.cqvip.com

-LMP-3 为模板 PCR，反应体系按试剂盒说明书。电泳分离，在紫外灯下仔细切取目的条带，过柱纯化。

1.3 真核表达质粒 pEGFP-N1-LMP-3 的构建及鉴定

EcoR Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 分别双酶切质粒 pEGFP-N1 和 LMP-3 PCR 产物，低熔点凝胶回收 LMP-3 片段和线性化的 pEGFP-N1 质粒，Takara 高效连接液连接，转化 DH5α 感受态细菌。挑选转化的菌落，Omega 质粒小抽试剂盒提取质粒。对阳性重组体进行 *EcoR* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切鉴定，阳性者应该切出 2 条带，一条为 4.7kb，为 pEGFP-N1 载体，另一条为 0.6kb，为目的条带。同时送上海生物工程有限公司测序。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

以 pET43.1a-LMP-3 质粒为模板的 PCR 产物经电泳显示，在 600bp 处见一明显扩增条带(图 1)。

2.2 pEGFP-N1-LMP-3 表达载体的酶切鉴定

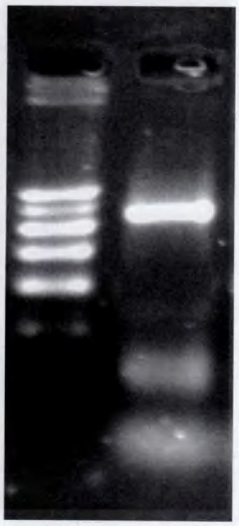


图 1 扩增条带



图 2 2%琼脂糖电泳显示片段

pEGFP-N1-LMP-3 经 *EcoR* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切后，得到分别为 4.7kb 载体片段和 606bps 小片段。2%琼脂糖电泳中可分辨出两个不同大小的片段(图 2)，初步表明载体构建成功。

2.3 pEGFP-N1-LMP-3 质粒测序报告

对鉴定为阳性克隆的质粒送上海吉凯生物公司测序，测序结果如下：GTCGTCAGCGTCGTCGT GGTGGCGGTGGTATGGATTCTTTCAAAGTTGTTCT TGAAGGTCCAGCTCCGTGGGGTTTCCGTCTGCAGG GTGGTAAAGACTTCAACGTTCCGCTGTCTATCTCT CGTCTGACTCCAGGTGGTAAAGCTGCTCAGGCTGG TGTTGCTGTTGGTGACTGGGTTCTGTCTATTGACGG TGAAAACGCTGGTTCTCTGACTCACATCGAAGCA CAAAACAAAATCCGTGCTTGCGGTGAACGCCTGT CTCTGGGTCTGTCTCGCG CTCAGCCAGTACAGTCT AAACCGCAGAAAGCTTCTGCTCCGGCTGCTGACCC

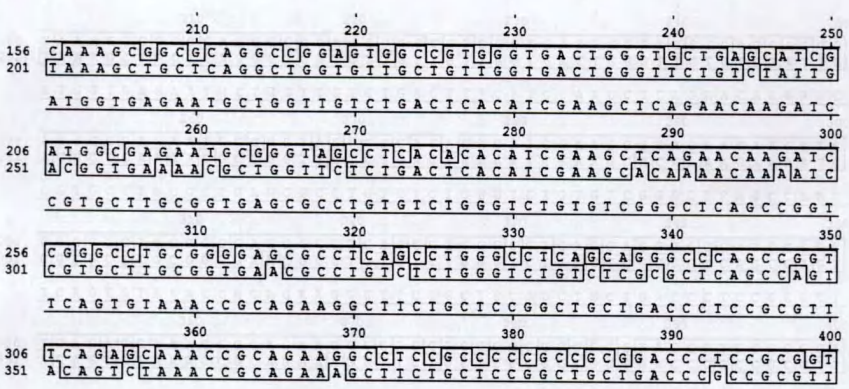


图 3 上为原始 LMP-3 序列，下为优化后的序列，框起的碱基为不同者，但二者编码的氨基酸序列一致

维普资讯 http://www.cqvip.com

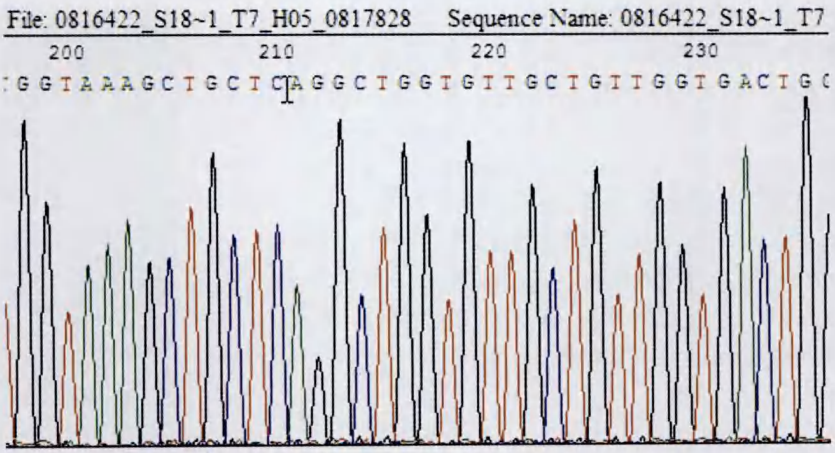


图 4 部分测序结果

GCCGCGTTACACTTTCGCTCCGTCTGTTTCTCTGAA
CAAAACTGCTCGCCCATTCGGTGCTCCTCCGCCTG
CCGACTCTGCTCCACAGCAGAACGGTTGCCGCCCG
CTGACTAACTCTCGCTCTGACCGATGGTCTCAGAT
GCCAGCTTCTTCTGGTCTCGAGCACCACCACCACC
ACCACTAATGTTAATTAAGTTGGGCGTTCCTAGG
CTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCG
CGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACTC(划线部分为插入序列),经过对比,检测质粒中含有目的序列与原始基因相比有 80%的一致性(图 3),表明 pEGFP-N1-LMP-3 质粒构建成功。经用 DNAstar 软件分析,所编码氨基酸序列为:MDSFKVVLEGPAP WGFRLQGGKDFNVPLSISRLTPGGKAAQAGVAVGD WVLSIDGENAGSLTHIEAQNKIRACGERLSLGLSRA QPVQSKPQKASAPAADPPRYTFAPSVSLNKTARPFG APPPADSAPQQNGCRPLTNSRSDRWSQMPASSGL, 与GENEBANK 上 LMP-3CDS 区编码氨基酸序列完全一致(图 4)。

3 讨 论

LIM 矿化蛋白为成骨细胞分化的正向调节因子,含有 LIM 和 PDZ 功能域[2]。LIM 功能域蛋白主要功能是介导特异的蛋白与蛋白间的相互作用,参与细胞的增殖与分化, 其中 Lin-11、Isl-21、Mec-3 3 种蛋白的 C 末端含有相似的结构,即半胱氨酸和组氨酸重复出现而形成锌指结构,因此将含有此种结构的蛋白叫做 LIM 功能域蛋白[1]。PDZ 功能域源于 3 种蛋白的同源序列,即突触后密度蛋白,果蝇大盘状蛋白和 ZO-1 上皮紧密结合蛋白(Postsynaptic density, drosophila discs-large, ZO-1 epithelial tight junction protein),其功能是调节蛋白之间的相互结合,可以识别特异的序列。

在人类有 3 种 LMP 的剪切变体,LMP-1、2、3。LMP-1 有 457 个氨基酸, 含 1 个 PDZ 和 3 个 LIM 功能域。LMP-2 有 423 个氨基酸,含完整的 PDZ 和 LIM 功能域。LMP-2 在第 325 个碱基和 444 个碱基之间有 119 个碱基的缺失,但在第 444 个碱基处有 17 个碱基的插入,由此产生的蛋白含 423 个氨基酸并有完整的 LIM 功能域,但其过度表达时并没有诱导骨的形成。LMP-3 无 LIM 功能域。LMP-3 在第 444 个碱基处同样有 17 个碱基的插入,由此导致阅读框架的移动, 进而使终止密码子位于第 505 和 507 碱基处, 产生含 153 个氨基酸的蛋白, 但没有 LIM 区域功能域。

研究显示转染含 hLMP-1 的质粒的成骨细胞体外可以诱导出骨结节的形成,同样转染 LMP-3 的质粒也可以诱导出成骨细胞骨结节的形成[3]。LMP-2 虽然有完整的 LIM 结构域,但是没有骨诱导活性。说明 LIM 功能域对 LMP 诱导骨的形成并不重要。LMP-3 基因全长为 1 686 个碱基,编码区在第 46 和 507 个碱基之间,pET43.1a-LMP-3 是含有 LMP-3 全长基因,且经过优化的原核表达载体。本研究以 pET43.1a-LMP-3 质粒为模板,以 PCR 技术扩增出目的基因 LMP-3 活性片段 cDNA,采用定向克隆技术将其插入 pEGFP-N1 质粒的多克隆位点,构建了重组质粒。

尽管非病毒载体不如病毒载体效率高,但具有安全、易于制作和较高的基因包裹能力等优点。病毒载体虽然转染效率高,但存在免疫反应、插入突

维普资讯 http://www.cqvip.com

变,临床应用受到限制[4]。重组质粒的一个显著的优点是 LMP-3 与 EGFP 基因同时表达,从而获得 pEGFP-N1-LMP-3 融合蛋白,可长期表达。pEGFP-N1 是野生型绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的突变体,适于在哺乳动物细胞内表达,其 64 位和 65 位氨基酸分别由野生型 GFP 的 Phe 和 Ser 突变成 Leu 和 Thr,结果荧光表达明显增强[5]。pEGFP-N1 载体具有以下几方面特点:(1)从结构上看,该质粒具有很强的复制能力,可以满足随宿主细胞分裂时跟随胞质遗传给新生的子细胞,这是保证目的基因稳定表达的因素之一;(2)含有高效的功能强大的启动子 SV40 和 PCMV,可以使目的基因在增殖的细胞中稳定表达;(3)具有多克隆位点,便于目的基因的插入;(4)该载体具有 neo 基因,可以采用 G418 来筛选已成功转染了该载体的靶细胞。这些特殊的结构可以实现目的基因在靶细胞内的稳定表达。GFP 基因片段长度较小(约 717bp),同时本试验的目的基因序列也较小(约 600bp),较其全长序列更易于构建融合蛋白。EGFP 发出的绿色荧光不仅可以作为细胞标记,同时它还避免了一般荧光染料所存在的标记时间短、可能存在污染等问题[6,7]。另一优点是可以通过对绿色荧光的观察,了解目的基因转录发生的时间、组织分布并评价其表达。

pEGFP-N1- LMP-3 重组质粒的成功构建,为研究 pEGFP-N1-LMP-3 融合蛋白的生物学功能打下了实验基础,也为进一步研究其用于骨缺损的治疗创造了条件。

参 考 文 献

[1] Schmeichel KL,Beckerle MC. LIM domains of cysteine rich protein 1(CRP1) are essential for its zyxin-binding function[J]. Biochem J,1998;331(Pt 3):885-892.

[2] Liu Y,Hair GA,Boden SD,et al. Overexpressed LIM mineralization proteins do not require LIM domains to induce bone[J]. J Bone Miner Res,2002;17(3):406-414.

[3] Boden SD,Liu Y,Hair GA,et al. LMP-1,a LIM-domain protein,mediates BMP-6 effects on bone formation[J]. Endocrinology,1998;139(12):5125-5134.

[4] E-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer therapy[J]. J Control Release,2004;94(1):1-14.

[5] Cormack BP,Valdivia RH,Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein(GFP)[J]. Gene,1996;173(1 Spec No):33-38.

[6] Misteli T,Spector DL. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology[J]. Nat Biotechnol,1997;15(10):961-964.

[7] Prasher DC,Eckenrode VK,Ward WW,et al. Primary structure of the aequorea victoria green fluorescent protein[J]. Gene,1992;111(2):229-231.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 595 页)

性能是肯定的,在银粒子作用时间达到 60min 后,其抑菌率为 96.73%($P<0.05$)。但随着时间的推移,其抑菌率无明显变化。且随着时间的推移,金葡菌的自然死亡率也逐渐增加,故导致 240min 时数据无明显统计学差异。在目前研究结果的基础上,我们已获得专利 1 项。我们将进一步研究影响化学液相还原法在医用聚丙烯网片化学镀银效果的各种实验条件,如还原剂的选择,银盐溶液的浓度,化学镀银时的镀速控制等,从而提高其抗菌性能。并进一步研究、测试其在动物体内的抗菌性能,镀银后各种生物力学性能的变化及对其安全性做出评价,为其应用于临床奠定理论和实验基础。

参 考 文 献

[1] Deysine M. Pathophysiology,prevention,and management of prosthetic infections in hernia surgery[J]. Surg Clin North Am,1998;78(6):1105-1115.

[2] 马颂章主译.疝外科学[M].北京:人民卫生出版社,2003.259-269.

[3] 许 军,刘 昶,麻 勇. 腹股沟疝修补术人工材料感染的防治对策[J]. 中国实用外科杂志,2006;26(11):828-830.

[4] 陈 双,曾德强. 疝修补术后人工补片感染的防治[J].中国实用外科杂志,2004;24(6):343-344.

[5] 余国文,张高科,胡 波. 金属系无机抗菌材料研究进展[J]. 工业安全与环保,2004;30(4):34-36.

[6] 赵娣芳,周' 杰,刘 宁. 含银无机抗菌材料的开发及应用[J]. 矿产保护与利用,2005;(3):12-15.

[7] 郭清泉,涂伟萍,陈焕钦. 抗菌涂料用抗菌剂及应用情况[J]. 广东化工,2002;29(1):39-42.

[8] 吉向飞,李玉平,杨柳青,等. 抗菌剂及抗菌材料的发展和应用[J]. 太原理工大学学报,2003;34(1):11-15.

[9] 郭仁宣,苏东明,主译. 腹外疝外科治疗[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社.2003.242-247.

[10] 王绍山. 腹股沟疝修补材料研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志,2005;14(15):2066-2069.

[11] 楚 广,杨天足,刘伟锋,等. 纳米银粉的制备及其应用研究进展[J]. 贵金属,2006;27(1):57-63.

(责任编辑:冉明会)