维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0229-03

重组原核表达载体 pQE30-hALRIP 的构建及鉴定

邓建川[1],陈 曜[2],孙 航[2],刘 杞[2]

(1.重庆医科大学附属第二医院血液内科,重庆 400010;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:构建人肝再生增强因子相互作用肽(hALR interacting protein, hALRIP)重组原核表达载体并进行鉴定。方法:用聚合酶链反应(PCR)扩增 hALRIP 编码区基因,将 PCR 扩增产物克隆至 pMD18-T 载体中并测序。利用 pQE30 质粒载体构建重组原核表达载体 pQE30-hALRIP,并通过酶切电泳鉴定重组质粒。结果:构建了重组克隆载体 pMD18- hALRIP 和重组表达载体 pQE30-hALRIP,测序及酶切鉴定与预计相同。结论:成功构建了重组原核表达载体 pQE30-hALRIP,为进一步研究该多肽奠定基础。

【关键词】人肝再生增强因子;原核表达;pQE30

【中国图书分类法分类号】R730.23 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-09

Construction and identification of recombinant plasmid pQE30 - hALRIP

DENG Jianchuan, et al

(*Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct a recombinant prokaryotic expression vector pQE30-hALRIP for further research. *Method*: PCR was used to amplify hALRIP codon region. The gene was inserted into pMD18-T vector and sequenced. Then the prokaryotic expression vector pQE30-hALRIP was constructed and identified. *Results*: Clonal recombinant vector pMD18- hALRIP and expression vector pQE30-hALRIP were constructed. DNA sequence analysis and restriction analysis showed both of the vectors were the same as the predicted results. *Conclusion*: Prokaryotic expression vector pQE30-hALRIP is successfully constructed.

【Key words】 Human augmenter of liver regeneration; Prokaryotic expression; pQE30

原发性肝癌,是我国最常见的恶性肿瘤之一,严重危害人民的生命健康。已有研究表明,许多细胞因子参与了肝癌的发生发展过程。肝再生增强因子 (Augmenter of liver regeneration, ALR) 是近年发现并克隆的一种能促进肝脏再生的细胞因子,其在体内多种组织均有表达[1]。人的 ALR(Human augmenter of liver regeneration, hALR) 在维系人的生命中可能起了很重要的作用,其主要生物学作用[2-4]包括参与肝脏再生、抑制 NK 细胞活性,同时发现该因子能以剂量依赖方式刺激肝癌细胞增殖,但是其具体作用机制仍不明。

前期实验中[5]我们利用构建出的人肝癌细胞的 cDNA 噬菌体展示文库筛选出与 hALR 具有相互作用的特异噬菌体克隆, 该特异噬菌体克隆衣壳蛋白展示有约 70 个氨基酸的 hALR 相互作用多肽(hALR interacting protein, hALRIP)。生物信息学分析表明该噬菌体展示肽为 Citron 激酶的一部分,这部分氨基酸可能为 hALR 的膜受体片段。为了进一步证实 Citron 激酶膜上片段具有受体性质并探讨其与 ALR 在肝癌发生、发展的关系,有必要获取该多肽并进行更多深入的实验。pQE30 原核表达载体表达的蛋白带有六聚组氨酸结构,这非常方便于表达蛋白的纯化。本实验拟构建该多肽(含 70 个氨基酸序列)的重组原核表达载体 pQE30 - hALRIP,为今后进一步实验做准备。

作者介绍:邓建川(1970-),男,博士,主治医师,主要研究方向:肿瘤分子机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271178)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株

pQE30 原核表达质粒、E.coli.JM109 菌株为重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存。pMD18-T simple 载体购自大连 Takara 公司。

酶类及试剂 Ex Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *BamH* I 、*Hind* III 及 T4 DNA 连接酶均购自 Takara 公司。DNA Marker 购自 Takara 公司。DNA 回收纯化试剂盒购自 Omego 公司。

1.1.2 引物设计

根据 hALRIP 的 cDNA 序列设计引物,其中上、下游引物 5'端分别引入 *BamH* I、*Hind* III 酶切位点。引物由上海生工公司合成。

维普资讯 http://www.cqvip.com

hALRIP 上游引物:5'-ATAGGATCCTTCAAGCGGAAAGCGAC-3',引物中含有 *BamH* I 酶切位点。

hALRIP 下游引物:5'-AACAAGCTTTCGCTCCTTTGCCTGGC-3',引物中含有 *Hind* III 酶切位点。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 hALRIP 基因

PCR 反应总体系 50μl:hALRIP 模板 DNA 1μl,hALRIP 上游、下游引物引物各 0.75μl,Ex Taq DNA 聚合酶 0.5μl,10×缓冲液 5μl,$MgCl_2$ 4μl,dNTPmix 4μl,ddH_2O 34μl。PCR 反应条件:94℃30s、55℃1min、72℃ 30s、30 个循环。扩增完毕后取 5μl 进行琼脂糖电泳观察结果。纯化回收 PCR 产物。

1.2.2 重组克隆质粒 pMD18-hALRIP 的构建

用 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切消化质粒 pMD18-T simple 载体以及 PCR 产物 hALRIP 片段,分别回收酶切产物,在 Ligation Mix 连接酶混合物作用下定向克隆目的片段至 pMD18,将连接产物转化入 E.coli.JM109 感受态细胞中,挑取在含氨苄青霉素的 LB 培养基上生长的单菌落,培养后小量提取质粒,*BamH* I+*Hind* III 酶切筛选阳性重组质粒。取阳性重组质粒测序(Takara 公司)。

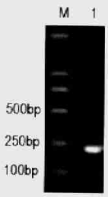
1.2.3 重组原核表达质粒 pQE30—hALRIP 的构建

将重组质粒 pMD18—hALRIP 及质粒 pQE30 分别用 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切,回收纯化目的片段后,在 T4DNA 连接酶作用下定向克隆目的片段至 pQE30 的 *BamH* I、*Hind* III 的酶切位点,继续将连接产物转化入 E.coli.JM109 感受态细胞中,挑取在含氨苄青霉素的 LB 培养基上生长的单菌落,培养后小量提取质粒、*BamH* I+*Hind* III 酶切鉴定插入片段的大小。

2 结 果

2.1 hALRIP 基因的扩增

以与 hALR 具有相互作用的特异噬菌体 cDNA 克隆为模板进行 PCR 扩增,所获产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳,在紫外灯下观察到一条约近250bp 的条带,与预期扩增目的片段大小相符。结果如图 1。

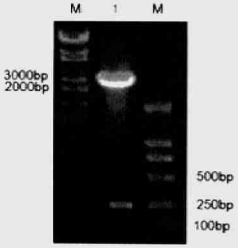


M:DNA marker;1:PCR 产物

图 1 hALRIP 基因的扩增

2.2 pMD18-hALRIP 重组质粒的酶切鉴定

将重组质粒 pMD18-hALRIP 用 *BamH* I、*Hind* III 进行双酶切,分成约 2.5kb 和 250bp 两个片段,与预计相符。结果如图 2。



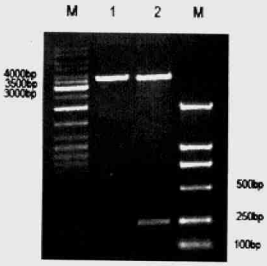
M:DNA Marker;1:*BamH* I 及 *Hind* III 双酶切产物

图 2 pMD18-hALRIP 重组质粒的酶切鉴定

2.3 hALRIP 基因的测序

将阳性重组质粒 pMD18-hALRIP 进行测序,测序结果与前期试验中获得的 hALR 相互作用肽的 cDNA 插入序列一致,同时该重组质粒插入片段 5' 及 3' 端分别有 *BamH* I、*Hind* III 的酶切位点(划线部分),序列如下:

5'-ATAGGATCCTTCAAGCGGAAAGCGACAG
AATGTCAGCATAAACTGTTGAAGGCTAAGGATCA
AGGGAAGCCTGAAGTGGGAGAATATGCGAAACTG
GAGAAGATCAATGCTGAGCAGCAGCTCAAAATTC
AGGAGCTCCAAGAGAAACTGGAGAAGGCTGTAAA
AGCCAGCACGGAGGCCACCGAGCTGCTGCAG AAT
ATCGCCAGGCAAAGGAGCGAAAGCTTGT-3'



M:DNA Marker;1:*BamH* I 单酶切;
2:*BamH* I 及 *Hind* III 双酶切

图 3 pQE30-hALRIP 重组表达质粒的酶切鉴定

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.4 pQE30-hALRIP 重组表达质粒的酶切鉴定

将重组表达质粒 pQE30-hALRIP 分别用 BamH I 单酶切及 BamH I、Hind III 双酶切。线状 pQE30 大小约为 3.5Kb，线状重组表达质粒 pQE30-hALRIP 大小约为 3.7Kb，说明重组质粒大小正确。pQE30-hALRIP 经 BamH I、Hind III 双酶切后，分成 3.5Kb 和 200bp 左右两个片段，与预计相符。结果如图 3。

3 讨 论

目前，在肝再生增强因子与原发性肝癌的关系中发现：ALR 在体外能以剂量依赖方式刺激肝癌细胞增殖，但对原代肝细胞却没有刺激增殖作用[6]。如将 ALR 表达质粒导入肝癌细胞株中，既可促进肝癌细胞增殖，又能增加肝癌细胞抗损伤的能力[7]。尽管 ALR 与肝癌发生、发展有重要关系，但对 ALR 的具体作用机制仍知之甚少。如果能找到与 ALR 发生相互作用的蛋白以及 ALR 的受体，进而揭示 ALR 所激活的信号传导通路，这将有助于我们进一步弄清 ALR 参与肝癌发生、发展的具体机制。

前期实验中我们从人肝癌细胞 cDNA 表达文库筛选出的与 hALR 具有特异相互作用的多肽。该多肽为人 Citron 激酶 N 端的部分片段，初步分析其可能为 hALR 作用的受体[8]。为了进一步证实该发现，需要通过基因重组工程办法获得该多肽片段或整个 Citron 激酶分子以进行相关研究。由于 Citron 激酶分子读码框很长，对其全部读码序列进行克隆困难较大，故我们先对 hALRIP 进行克隆、表达。

本研究首先采用 TA 克隆法 (TA Cloning)[9]将 hALRIP 扩增目的基因克隆至 pMD18-T Simple 载体。pMD18-T Simple 载体由 pUC18 载体改建而成，是一种高效克隆 PCR 产物的专用载体。该载体消除了 pUC18 载体 LacZ 基因上的多克隆酶切位点，再在 pUC18 载体的多克隆酶切位点处导入了 EcoR V 酶切位点，使用 EcoR V 进行酶切反应后，再在两侧的 3'端添加"T"而成。因大部分耐热性 DNA 聚合酶进行 PCR 反应时都有在 PCR 产物的 3' 末端添加一个 "A" 的特性，所以使用该载体可以大大提高 PCR 产物的连接、克隆效率。该载体尽管消除了 LacZ 基因上的多克隆酶切位点，但不影响 β-半乳糖苷酶的正常表达，因此，PCR 产物克隆后仍可以利用 α-互补性进行蓝白菌落的筛选，挑选阳性克隆。另外，由于该载体消除了多克隆酶切位点，克隆后的 PCR 产物将无法使用载体上的限制酶切下，需要在 PCR 扩增引物上导入合适的酶切位点，酶切反应将不会受其它 T 载体上限制酶影响，可以大大提高酶切效率，增加亚克隆成功率。本实验将含 BamH I、Hind III 酶切位点的 hALRIP 目的基因连接至 pMD18-T Simple 载体后，阳性重组质粒经 BamH I、Hind III 酶切鉴定，分成大小两个片段，与预计相符。同时，测序证明重组基因序列与 hALRIP 基因序列完全相符，说明 pMD18-hALRIP 重组质粒(TA 克隆)构建成功，可以进行目的基因的亚克隆。

本实验继续采用 pQE30 原核表达系统构建 pQE30-hALRIP 重组质粒。选用这一载体，是考虑到 pQE30 属于 PDS 质粒家族，带有大肠杆菌 T5 启动子和转录终止信号，能够编码六个组氨酸残基，外源基因经多克隆位点插入后，表达的蛋白带有一个六聚组氨酸接头。六聚组氨酸接头对表达的蛋白的活性及结构影响非常小，但是对表达蛋白的纯化具有非常重要的作用[10]。由于组氨酸的咪唑环能够与金属 Ni^{2+} 形成螯合物，因此利用 Ni^{2+}-NTA 树脂可以快速纯化表达蛋白。基于此，我们将质粒 pMD18-hALRIP 中的目的片段酶切回收后亚克隆至 pQE30 表达载体，酶切鉴定与预期相符，说明重组表达质粒 pQE30-hALRIP 构建成功，下一步可以进行多肽的表达与纯化。

参 考 文 献

[1] Hagiya M D, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: Expression of biologically active recombinant ALR and dem onstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 8142-8146.

[2] 杨晓明，王爱民，周 平，等. 人肝再生增强因子促肝增殖及其抗肝损伤作用[J]. 科学通报，1998; 43: 616-620.

[3] Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases[J]. J Gastroenterol, 2000; 35: 112-119.

[4] Liu XJ, An W, Lei TG. Regulatory effect of hepatic stimulator substance on the proliferation of human heptoma cells[J]. Acta Phsiol Scie, 1998; 50(5): 543-550.

[5] 邓建川，张 林，孙 航，等. 从人肝癌细胞 cDNA 表达文库筛选人肝再生增强因子相互作用蛋白及其活性初步鉴定[J]. 中华肝脏病

(下转第 235 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

卵巢恶性肿瘤是女性生殖道常见的三大恶性肿瘤之一,由于缺乏有效的早期诊断技术及浸润性生长和转移迅速的特点,其死亡率已居女性生殖系统恶性肿瘤之首。活性小分子肽具有结构简单,分子量小,特异性高,穿透性好,不易在体内诱发免疫应答等优点,可作为良好的靶向载体,为卵巢癌的早期诊断和筛查提供了新的途径,噬菌体表面呈现肽库技术为筛选活性小分子肽提供了一种有效工具。

近年来研究发现 Endoglin 的单克隆抗体在动物的肿瘤治疗中具有重要作用[11],本研究以 rhEndoglin 蛋白为靶分子,对噬菌体随机 12 肽库进行筛选。经过 3 轮筛选, 每轮的投入 / 产出比率逐渐升高,特异性噬菌体克隆得到了有效富集。从第 3 轮筛选洗脱物中随机挑取 16 个噬菌体克隆, 竞争性 ELISA 鉴定其中 6 个为阳性克隆, 经 DNA 测序分析,得到 5 种不同的氨基酸序列。

一般而言,利用噬菌体展示肽库筛选出来的噬菌体融合肽与靶分子的结合位点只有位于 Endoglin 的活性位点上,或是小分子肽能够代表不连续表位的有效构象,噬菌体克隆才有可能代表 Endoglin 抗体或受体的结合表位。我们通过竞争抑制实验进一步证实噬菌体克隆能够模拟可与 Endoglin 结合的受体或抗体的结合表位。

Beatty 及 Loomans 等从理论和实验上均证明了非竞争法 ELISA 测定多肽的亲和常数操作简便易行,结果可靠。本实验通过非竞争法 ELISA 检测阳性噬菌体多肽的功能性亲和常数为 $(1.431 \pm 0.293) \times 10^7 mol/L$,说明其与靶分子具有较好的亲和活性。但噬菌体呈现肽的特性并不一定能代表合成多肽的性质,我们将通过分子结构的模拟优化和多肽合成进一步研究其生物学活性。

(通讯作者:梁志清,电话(023)68754409)

参 考 文 献

[1] Miler DW, Graulich W, Karges B, et al. Elevated expression of CD105, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor CD105 cells[J]. Int J Cancer, 1999; 81(4): 568-572.

[2] Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, et al. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels[J]. Oncogene, 2003; 22(42): 6557-6563.

[3] Fonsatti E, Altomonte M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer [J]. Transl Med, 2004; 2(1): 18.

[4] Saad RS, Liu YL, Nathan G, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer [J]. Mod Pathol, 2004; 2(1): 197-203.

[5] Dale JC, Elizabeth BG. Phage display for target-based antibacterial drug discovery[J]. Drug Discovery Today, 2001; 6(7): 721-727.

[6] Vasily VI, Franco F, Anil GM. Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells[J]. Biochem Biophys Acta, 1999; 1448(3): 463-472.

[7] Smith G P, Petrenko VA. Phage display [J]. Chem Rew, 1997; 97 (2): 391-410.

[8] Deleo FR, Yu L, Burritt JB, et al. Mapping sites of interaction of p49-phox and flavocytochromeb with random-sequence peptide phage display libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92: 7110-7114.

[9] Eda K, Eda S, Sherman IW. Identification of peptides targeting the surface of plasmodium falciparum-infected eryth rocytes using a phage display peptide library[J]. Am J Trop Med Hyg, 2004; 71(2): 190-195.

[10] Beatty JD, Betty GB. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. Immunol Methods, 1987; 100(1-2): 173-179.

[11] Shiozaki K, Harada N. Antiangiogenic chimeric anti-endoglin (CD105) antibody: pharmacokinetics and immunogenicity in nonhuman primates and effects of doxorubicin [J]. Cancer Immunology, Immuno therahy, 2006; 2(55): 140-150.

(上接第 231 页)

杂志, 2006; 14: 346-349.

[6] 余慧锋, 刘 杞. hALR 在毕赤酵母菌 GS115 中表达和体外活性检测[J]. 中华肝脏病杂志, 2003; 11: 421-423.

[7] 陈 莉, 孙红柳, 安 威. 重组人肝刺激因子的促增殖和抗损伤作用[J]. 解剖学报, 2003; 34: 155-158.

[8] 邓建川, 刘 杞, 陈 曜, 等. 利用 5'-RACE 技术进行人肝再生增强因子相互作用肽 cDNA5'末端快速扩增及序列分析[J]. 重庆医科大学学报, 2006; 31: 463-465.

[9] Marchuk D, Drumm M, Saulino A, et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products[J]. Nucleic Acids Res, 1991; 19: 1154.

[10] Dabrowski S, Kur J. Cloning and expression in Escherichia coli of the recombination His-tagged DNA polymerases from pyrococcus furiosus and pyrococcus woesei[J]. Protein Expression and Purification, 1998; 14: 131-138.