维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253-3626(2004)02-0124-03

# K562 细胞未知基因 KH 的开放阅读框架在大肠杆菌中的表达

何於娟[1], 欧一衡[2], 张 彦[1], 刘小珊[3], 马凌娣[1], 涂植光[1], 蒋纪恺[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院临床生化教研室,重庆 400016;2. 重庆市永川市人民医院,重庆 402160;
3. 重庆医科大学临床学院血液科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建 K562 细胞未知基因 KH 的开放阅读框架(open reading flame,ORF)的原核表达体系。方法:采用 DNA 重组技术构建 KH 基因片段的开放阅读框架(KH-ORF)的表达载体 pCI-neo-KH-ORF,热休克法转化大肠杆菌 BL21(DE3)plysS,IPTG 诱导后,SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的表达。结果:经 IPTG 诱导 0.5h 后 KH-ORF 在 BL21(DE3)plysS 中获得表达,表达产物以包涵体形式存在,分子产量约 24kD。结论:成功构建了 KH-ORF 的原核表达体系,为进一步研究其功能奠定了基础。

【关键词】K562 细胞;KH 基因;开放阅读框架;原核表达
【中国图书分类法分类号】Q781 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-09-16

# The expression of open reading frame of unknown KH gene from K562 cells in E. coli.

*HE Yujuan, et al*

(*Department of Clinical Biochemistry, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the prokaryotic expression system of open reading frame of KH gene (KH-ORF), an unknown gene in K562 cells. *Methods*: The 225bp KH-ORF cDNA was cleaved from plasmid pGEM-T-easy-KH-ORF with EcoRI and SalI and subcloned into the pCI-neo Mammalian Expression Vector cutted with the same restriction endonucleases. The recombinant expression plasmid was transfected into BL21 (DE3) plysS by hot-shock assay. Induced by IPTG, the recombinant protein product was tested by SDS-PAGE. *Results*: 24kD KH-ORF product was obtained as inclusion bodies in BL21 (DE3) plysS after the expression vector had been induced by IPTG for 30 minutes. *Conclusion*: The construction of prokaryotic expression system of KH-ORF is successful.

【Key words】K562 cells; KH gene; Open reading frame; Prokaryotic expression

苦参是我国传统的常用中药,具有抗炎、抗肿瘤等作用,苦参碱是其主要的生物碱。K562 细胞是一株分化极差、具有多向分化潜能的人红白血病细胞,是体外诱导分化实验的常用模型。前期研究表明,一定浓度的苦参碱可诱导 K562 细胞向成熟方向分化,并且显著影响 K562 细胞的细胞周期、端粒酶活性细胞骨架以及 c-myc 和 N-ras 等原癌基因的表达[1~5]。为进一步研究苦参碱诱导 K562 细胞分化的分子机制,我们运用了能检出低丰度表达基因的差异显示逆转录 PCR 技术(DDRT-PCR),进行苦参碱作用 K562 细胞后的早期 mRNA 的差异显示分析与研究。结果发现并克隆了一个未知差示 cDNA 片段(668bp),GenBank 的登录编号为 BM077298、dbEST ID 10245338(网址为 http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html),我们暂命名为 KH 基因,其中含有 204bp(68 个氨基酸)的完整开放阅读框架(open reading frame, ORF)。在进行此未知片段全长克隆的同时,为先窥视该基因可能存在的功能,对其现有的 ORF 进行了功能预测和原核表达研究。

作者介绍:何於娟(1972- )女,讲师,博士,
主要研究方向:肿瘤逆转的分子机制。

基金项目:国家自然科学基金项目(NO:39670881;30171150)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

胰化蛋白胨与酵母提取物为 Oxide 产品；限制性内切酶 EcoR Ⅰ与 Sal Ⅰ为 TaKaRa 产品；T4 DNA 连接酶为 Promega 产品；DNA marker(GeneRuler$^{TM}$ 1kb DNA Ladder)为 MBI 产品；Prestained SDS－PAGE standards 为 TaKaRa 产品；IPTG 为 Promega 产品；其它为进口或国产分析纯试剂

### 1.2 KH－ORF 引物

由 Primer Premium 5.0 分析设计，TaKaRa 合成，用于扩增 KH－ORF 上游引物与下游引物的 5′端除 2～4 个保护碱基外，分别引入了 EcoR Ⅰ与 Sal Ⅰ两个限制性内切酶位点(下划线标示)，因此 KH－ORF 的 PCR 产物大小为 225bp

上游引物：5′－AggAATTCATggAggATC－3′

下游引物：5′－gAAggTCgACTCATCggCTT－3′

### 1.3 质粒和菌株

包含 225bpKH－ORF 的 pGEM－T－easy－KH－ORF 克隆质粒(3243bp)自建；表达质粒 pCI－neo Mammalian Expression Vector(5472bp)购自 Promega 公司，受体菌为 BL21(DE3)plysS 购自 Promega 公司

### 1.4 重组表达质粒(pCI－neo－KH－ORF)的构建

克隆质粒 pGEM－T－easy－KH－ORF 经 EcoR Ⅰ与 Sal Ⅰ双酶切后，采用华舜小量胶回收试剂盒回收纯化含目的基因 KH－ORF 的 225bp 片段。同一条件下，表达质粒 pCI－neo Mammalian Expression Vector 也经 EcoR Ⅰ与 Sal Ⅰ双酶切后，与上述目的基因连接。连接产物热休克法转化入 BL21(DE3)plysS 菌，氨苄青抗性筛选转化子

### 1.5 重组表达质粒的鉴定

(1)采用限制性内切酶 EcoR Ⅰ与 Sal Ⅰ酶切鉴定插入片段；(2)分别以 pCI－neo－KH－ORF 与 pGEM－T－easy－KH－ORF 为模板，PCR 扩增此 225bp ORF 片段，根据二质粒的大小差异，经琼脂糖电泳鉴定，以证明此片段重组于表达质粒中；(3)为避免假阳性，将酶切与 PCR 鉴定的 pCI－neo－KH－ORF 寄到上海生工公司测序确证

### 1.6 重组菌株的获得及诱导表达

重组表达质粒 pCI－neo－KH－ORF 转化 BL21(DE3)plysS 菌，获得 KH－ORF 工程菌株。重组大肠杆菌菌株于 37℃振荡培养 2h 至 $OD_{600}$=0.6 时，加入 IPTG 诱导重组蛋白的表达，即 37℃继续振荡培养 0,0.5,1,1.5,2.0,2.5,3.0,6.0,12h，分别收集 1～5ml 菌液，迅速于 4℃ 12000r/m 离心 1min，收集菌体。

### 1.7 包涵体的制备及 SDS－PAGE 鉴定

包涵体的制备按本室常规方法进行。包涵体裂解液中加入等体积 2×SDS 上样缓冲液，混匀，100℃变性 5～10min，CBBG－250 法测定蛋白质含量后，按同一蛋白质含量的上样量进行 15%的 SDS－PAGE。

## 2 结 果

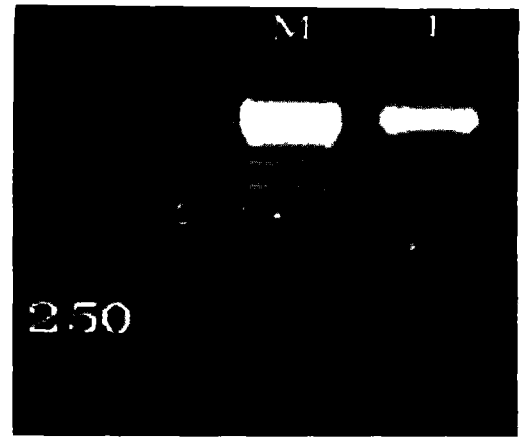



图 1a pCI－neo－KH－ORF 的双酶切鉴定

M:DNA 标准品；1:EcoR Ⅰ与 Sal Ⅰ双酶切 pCI－neo－KH－ORF

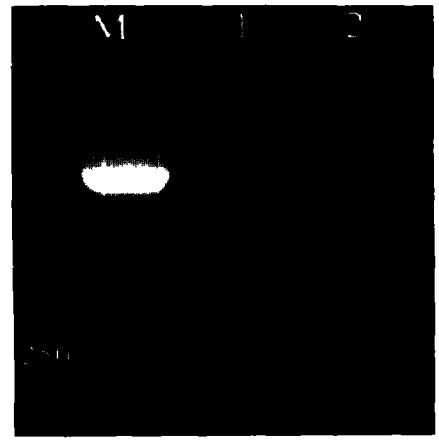



图 1b 重组 pCI－neo－KH－ORF 与重组 pGEM－T－easy－KH－ORF 的 PCR 鉴定

M:DNA marker 1:pCI－neo－KH－ORF 2:pGEM－T－Easy－KH－ORF

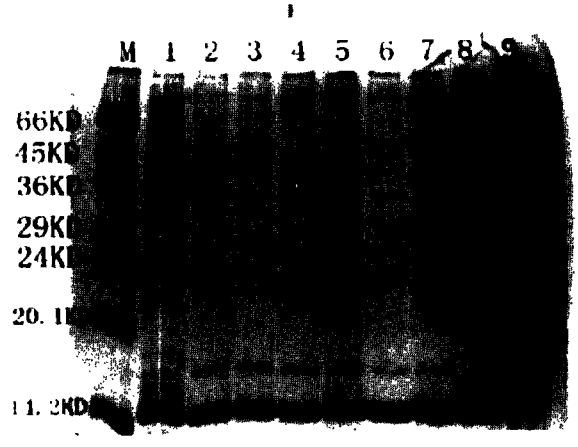



图 2 BL21(DE3)plysS 细菌总蛋白的 SDS－PAGE

M:protein 标准品(14.2,20.1,24,29,36,45,66kD)

1～9:分别诱导 0,0.5,1,1.5,2.0,2.5,3.0,6.0,12h

维普资讯 http://www.cqvip.com



2.1 表达载体的构建

225bp 的 KH－ORF 片段经定向亚克隆后，对重组表达质粒进行双酶切鉴定，结果可见一条略小于 250bp 的酶切条带，如图 1a。pGEM－T－easy－KH－ORF 克隆质粒大小为 3243bp，pCI－neo－KH－ORF 大小为 5697bp，以两个大小不同的均含目的片段的质粒为模板，PCR 扩增此 225bp KH—ORF 片段，经琼脂糖电泳鉴定，获得了相同的扩增产物，证明此片段确实重组于表达质粒中，如图 1b（图中点样孔附近的大片段是作为模板的质粒带，因 PCR 时模板加样量较大故电泳可见）。经上海生工测序结果证实，确实获得了含 225bp 的 pCI－neo－KH－ORF 表达质粒，结果略。

2.2 KH－ORF 在大肠杆菌中的表达

如图 2 所示，可见 IPTG 诱导 0.5h 后开始有一条分子量约 24kD 的 CBBG－250 染色区带出现，1h 表达最强，与对照组比较初步确认为就是待表达的目的蛋白或多肽分子。电泳时，由于边缘效应的影响，使 M 与 9 泳道的电泳条带出现滞后倾斜现象。

## 3 讨 论

无论是真核表达还是原核表达，外源基因的表达都需要合适的载体和适宜的宿主，这需要筛选大量的载体和宿主以保证外源基因稳定、高效表达。本实验中选用 pCI－neo Mammalian Expression Vector[6]作为表达载体，该质粒是一穿梭质粒，既有一套含 CMV 启动子的完整真核表达体系，也有一套含 T7 启动子的完整原核表达体系，可用于外源基因的稳定、高效表达。将 ORF 片段重组于 pCI－neo Mammalian Expression Vector 上避免了我们为分别完成真核表达和原核表达而进行的多次亚克隆，如果能表达成功，将大大简化操作步骤，节约筛选时间。

大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早，目前应用最广泛的经典表达系统，具有遗传背景清楚，目标基因表达水平高，培养周期短，抗污染能力强等优点，因此我们首先对 KH 基因的 ORF 进行原核表达研究。我们将阳性重组表达质粒热休克法转化入 BL21($DE_3$)plysS 中，获得稳定重组子，IPTG 诱导目的基因表达，SDS－PAGE 观察表达产物大小。从 SDS－PAGE 的结果可以看出，诱导 0.5h 后开始有一条较强的 CBBG－250 染色区带出现，1h 表达最强，与对照组比较初步确认为就是待表达的目的蛋白或多肽分子，分子量约 24kD。我们的 ORF 片段推测表达 68 个氨基酸，换算为蛋白质分子量应约 7.5kD，这与上述电泳结果并不符合。对此，国外已有文献报道，原核生物表达外源基因时，往往存在一些表达后修饰或以包涵体形式存在，使得外源基因的表达产物远大于预计产物大小 5～20kD，我们的结果尚在该误差范围内。由于原核表达体系的翻译后加工能力远不及真核表达体系的精细，原核表达的蛋白尚存在不能形成正确折叠，不能进行磷酸化等修饰，常常形成包涵体具不溶性等等诸多不足之处，有必要将构建的表达载体转化入真核细胞以求稳定表达有活性的蛋白或多肽分子，为进一步研究基因与蛋白的功能奠定基础。我们正在进行该片段的真核表达研究。

## 参 考 文 献

[1] Zhang Yan, Jiang Jikai, Liu Xiaoshan, et al. Differentiation and apoptosis in K562 erythroleukemia cells induced by Matrine[J]. Natural Medicine, 1998; 52(4): 295－299.

[2] 何於娟，蒋纪恺，张 彦，等. 苦参碱作用 K562 细胞表面分化抗原表型的改变[J]. 中草药，2001; 32(8): 730－731.

[3] L. P. Zhang, J. K. Jiang, J. W. O. Tam, et al. Effects of Matrine on proliferation and differeniation in K562 cells[J]. Leukemia Research, 2001; 25: 793－800.

[4] 张 彦，刘小珊，许相儒，等. 苦参碱对 K562 细胞骨架的作用观察[J]. 重庆医科大学学报，2002; 27(4): 386－387.

[5] 何於娟，蒋纪恺，欧一衡，等. 苦参碱对 K562 细胞早期原癌基因表达的影响[J]. 癌症，2002; 21(4): 369－372.

[6] pCI－neo mammalian expression vector systems technical manual, Promega, 2000.