维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)05-0563-05

带信号肽人胰岛素原突变体的构建及在 COS-7 细胞中的表达

兰丽珍[1], 邓华聪[1], 孙 辽[2], 郑 丹[1], 弓军胜[2], 刘东方[1], 郑宏庭[1]

(1.重庆医科大学临床学院内分泌科,重庆 400016;2.山西医科大学第一医院,太原 030001)

【摘 要】目的:构建带信号肽人胰岛素原突变体的真核表达载体并在 COS-7 细胞表达出成熟的人胰岛素。方法:采用 PCR 体外定点突变技术(PCR-SDM),将普通细胞内 furin 蛋白酶的识别和切割位点 Arg-X-Lys-Arg-样序列,引入人胰岛素原 C 肽两端,同时加上信号肽、Kozak 序列和限制性内切酶的酶切位点并克隆至载体 pcDNA3.1(+)中,构建成人胰岛素原突变体的真核表达载体,经测序验证后转染 COS-7 细胞,RT-PCR、Western 印迹、放射免疫法检测其在 COS-7 细胞中的表达。结果:DNA 测序结果表明在预期位点突变符合要求,经 RT-PCR、Western 印迹、放射免疫鉴定,构建的人胰岛素原突变体的真核表达载体转染的 COS-7 细胞可表达、分泌人成熟胰岛素。结论:构建了人胰岛素原突变体的真核表达载体,并成功地在 COS-7 细胞中获得人胰岛素的分泌表达。

【关键词】胰岛素原;定点突变;克隆;基因表达;COS 细胞

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-11-04

Construction of a mutant human proinsulin gene with signal peptide code and detection of its expression in COS-7 cells

LAN Lizhen, et al

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

【Abstract】*Objective*: To construct a mutant of human proinsulin with signal peptide code, so that it may be expressed in eukaryotic system to produce mature human insulin in COS-7 cells. *Methods*: Human proinsulin gene was mutated by the polymerase chain reaction (PCR) for the site-directed mutagenesis method. Two furin recognized sites of Arg-X-Lys-Arg-motifs were introduced into human proinsulin. Signal peptide, Kozak sequence and restriction enzyme cutting site were added and cloned into pcDNA3.1(+) vector and verified by sequencing analysis. Eukaryotic expression vector was constructed and transfected into COS-7 cells. Insulin were evaluated respectively with RT-PCR, radioimmunoassay and Western blot analysis. *Results*: The sequencing analysis showed that the mutation sites were correct, and the mutant of human proinsulin was constructed successfully. Human insulin mRNA was highly expressed in transfected COS-7 cells, and secretive recombinant human insulin was detected in the culture supernatant of transfected COS-7 cells by Western blotting. *Conclusion*: A mutant human proinsulin eukaryotic expression vector is obtained and secretive recombinant human insulin is successfully expressed in COS-7 cells.

【Key words】Proinsulin; Site-directed mutagenesis; Gene expression; COS cells

应用非内分泌细胞构建具有分泌胰岛素功能的目的细胞是 1 型糖尿病基因治疗的研究热点。由于非内分泌细胞中缺乏将胰岛素原转换为胰岛素的 PC2 和 PC3 酶,无法表达具有生物活性的成熟胰岛素[1,2]然而,在具有组成性分泌途径的普通细胞中的胞内普遍存在蛋白质前体加工酶 Furin,能特异性识别 Arg-X-Lys/Arg-Arg[3]序列。因此,本研究拟采用 PCR 体外突变技术(PCR site-directed mutagenesis, PCR-SDM)改造胰岛素原基因,使胰岛素原 B-C 和 A-C 连接处的氨基酸序列突变为可被 Furin 识别和切割的位点,同时加上信号肽和 Kozak 序列构建了真核表达载体,并进行在 COS-7 细胞中表达的研究,以期能用分泌胰岛素的普通细胞治疗糖尿病。

1 材料与方法

作者介绍:兰丽珍(1970-),女,主治医师,博士,
主要研究方向:糖尿病分子病因学及基因治疗研究。

基金项目:国家自然科学基金项目(30070356)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

真核表达载体 pcDNA3.1(+)购自 Clontech 公司,COS-7 细胞购自中科院上海细胞所,pfu 及 Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶、DNA 连接试剂盒、*Pyrobest* DNA Polymerase LA Taq DNA 聚合酶、Marker 购自大连 TaKaRa 公司;PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自美国 OMIGA 公司,DOTAP 转染试剂购自 Roche 公司,其它生化及化学试剂为国产或进口分析纯。质粒 PHIL-D2-PIN,由北京大学薛强博士惠赠,含有编码人胰岛素原全长的 cDNA 序列、E. coli JM109 由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 胰岛素原基因的定点突变 根据人胰岛素原基因序列和真核表达载体的要求,设计引物在 B-C 和 C-A 连接处引入 furin 蛋白酶的识别位点,并在 B^{10} 位把组氨酸诱变为天冬氨酸,同时加上信号肽、Kozak 序列和酶切位点,引物序列如下,划线部分是 furin 蛋白酶识别位点。

F01:5'-CTA GCT AGC GAA TTC GCC ACC ATG GCC CTG TGG ATG CGC CTC CTG CCC CTG CTG GCG CTG CTG GCC CTC T-3'(70 base)

F02:5'-G CTG GCG CTG CTG GCC CTC TGG GGA CCT GAC CCA GCC GCA GCC TTT GTC AAT CAG CAC CTT TGT GGT TCT GAC CTG G-3'(77 base)

F03:5'-ACC CGT CGT AAA CGT GAA GAC CTT C-3'(25 base)

F04:5'-AG GGA TCA CGT CAA AAG CGT GGC-3'(23 base)

R01:5'-TTT TCC TTT TGC GGC CGC GGA TCC TCA GTT GCA GTA GTT CTC CAG-3'(45 base)

R02:5'-CC ACG CTT TTG ACG TGA TCC CTC GAG-3'(26 base)

R03:5'-TC TTC ACG TTT ACG ACGGGT CTT GGG TG-3'(28 base)引物由 TaKaRa 合成。

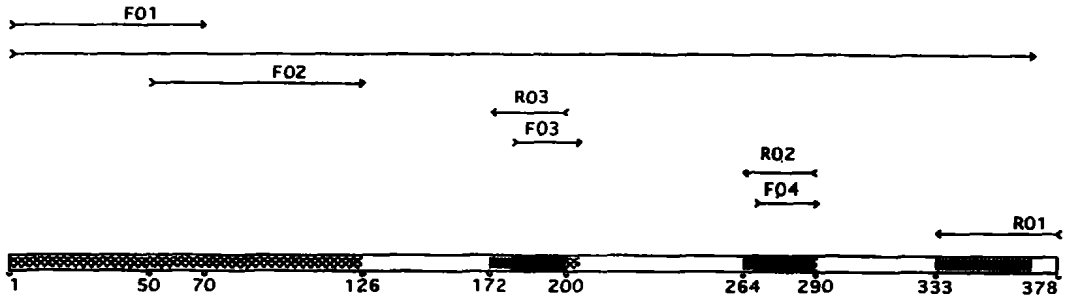


图 1 PCR 模式图

(如图 1)首先以 PHIL-D2-PIN 质粒(含人胰岛素原基因 cDNA)为模板,分别以 F02/R03,F03/R02,F04/R01 为引物进行 PCR 扩增,扩增条件为:94℃ 1min 后 98℃ 10s,55℃ 30s,72℃ 10s,共 30 个循环,末次循环后置 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增产物 PCR1,PCR2,PCR3 胶回收后作为第二次 PCR 的模板,以 F01/R01 为引物进行全长基因 PCR 扩增:先进行 DNA 链延伸反应,50μl 体系中 PCR1、PCR2、PCR3 产物各 10μl,10 × *TaKaRa LA* Buffer 5μl,dNTP8μl,94℃ 5min,在 10min 内冷却至 55℃,加入 *TaKaRa LA Taq* 酶 1μl 后,保温 5min,72℃ 5min。此反应液为 DNA 延伸液。再用 DNA 延伸液进一步进行 PCR 反应,反应条件为:先 94℃ 1min,进入 30 个循环 98℃ 10s,55℃ 30s,72℃ 30s,最后 72℃ 10min 充分延伸。1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 重组真核表达载体 pcDNA3.1(+)/mPIN 的构建和鉴定 电泳回收纯化 380bp 的 PCR 产物,以限制性内切酶 EcoR1 和 Not1 消化并与相同限制性内切酶处理的载体 pcDNA3.1(+)连接,转化 E. coli JM109,提取质粒进行酶切鉴定正确后进行序列分析(测序由上海申友生物工程公司完成。)其 DNA 的酶切、回收、连接、及质粒的转化及抽提,琼脂糖凝胶电泳等按文献[4]提供的方法进行。

1.2.3 COS-7 细胞的培养与转染 COS-7 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,37℃ 5% CO_2 的培养箱中培养。当细胞长至 60%~80% 汇合时,利用脂质体(DOTAP,Roche 产品),将构建的突变人胰岛素原的表达质粒 pcDNA3.1(+)/mINS 导入上述细胞,对照组用空载体 pcDNA3.1(+)转染。转染后 24h 更换细胞培养液,转染后分别于 48、72h 收集细胞和培养上清,进行 RT-PCR、RIA、Western 印迹分析。

1.2.4 RT-PCR 分别取 COS-7 细胞 48、72h 的细胞和培养上清,Tripure Tm Isolation Reagent 提取 RNA,先逆转录合成 cDNA,再以引物 P1:5'-GCCCTCTGGGGACCTGAC-3' 和 P2:5'-TGCAGTAGTTCTCCAGTTGGTA-3' 进行 PCR,扩增产物进行电泳分析。

1.2.5 表达蛋白产物的测定 (1)Western 印迹分析:转染 48、72h 后,分别收集 10^6 个 COS-7 细胞及其培养上清液。SDS 煮沸法裂解细胞并收集上清,紫外分光光度法测定蛋白浓度后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳并电转移至 PVDF 膜上,用鼠抗人胰岛素抗体(Santa Cruez 公司产品)进行免疫反应,化学发光检测细胞及其培养液中胰岛素的表达情况。(2)放射免疫分析法:进一步用经典测定胰岛素的放射免疫的方法定量检测细胞培养上清液中胰岛素的表达水平(北京海科锐生物技术中心产品)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 人胰岛素原基因的定点突变

应用 PCR 的重叠延伸法指导定点诱变，经两轮 PCR 扩增出带有信号肽和 Kozak 以及目的突变的基因片段(378bp)，见图 2。测序证明扩增片段符合要求。如下：

GTG*GAATTC* GCCACC **ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCT**
GGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTCAATCAGCACCITFGTGGTT
CT [G] ACCTGGTGGAGGCTCTGTACCTGGTGTGTGGGGAACGTGGTTTCTTCTACACACC
CAAGACCCGTCGT [A] AA [CG] TGAAGACCTTCAAGTGGGTCAAGTTGAACTTGGTGGGGG
TCCTGGTGCGGGTTCTCTTCAACCTTTGGCTCTCGAGGGATCAC [G] TCAAAAGCGTGGC
ATTGTGGAGCAGTGCTGCACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAACTGGAGAACTACTGCA
ACTGAGGATCC*GCGGCCGC*CG

改造后的人胰岛素原 cDNA 序列(斜体划横线的为 EcoR1 和 Not1 的酶切位点，阴影部分为 Kozak 序列，粗体字是增加的信号肽，框内的是突变的碱基)

reformed human proinsulin cDNA(italic and lineation part are enzyme site of EcoR1 and Not1, shadow part are Kozak sequence, bold are added signal peptide, intra-frame part are mutant base.)

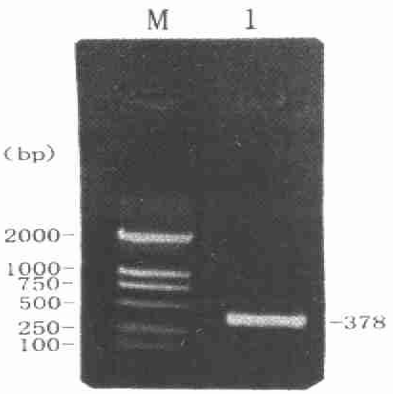


图 2 PCR 扩增的突变基因片段

M:PCR Marker DL2000 1:human proinsulin gene(378bp)

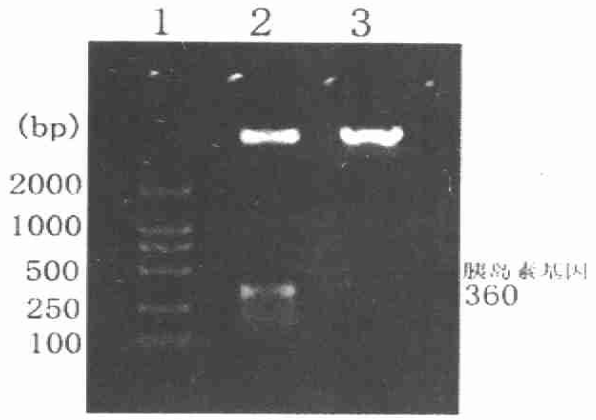


图 3 重组真核表达载体限制性酶切图谱

1:Marker DGL2000 2:pcDNA3.1(+)/mPIN EcoR1 + Not1 双切(5400bp,360bp) 3:pcDNA3.1(+)/mPIN EcoR1 单切

2.2 重组真核表达载体的构建和鉴定。将突变的人胰岛素原 cDNA 构建入表达载体

pcDNA3.1(+)。经转化大肠杆菌提取质粒，用 EcoRI 和 Not1 酶切重组质粒 pcDNA3.1(+)/mINS 进行限制性酶切分析所产生的片段长度分别 5.4kb 和 360bp(见图 3)。经与分子量标准比较，证明成功构建了重组真核表达载体 pcDNA3.1(+)/mINS。

2.3 重组人胰岛素在 COS-7 细胞中表达的鉴定

用 RT-PCR 检测转染细胞人胰岛素 mRNA 的水平，结果表明 pcDNA3.1(+)/mINS 转染的 COS-7 细胞高水平表达人胰岛素 mRNA，而空载体对照细胞和未转染的 COS-7 细胞未检测到人胰岛素 mRNA 的表达(图 4)。

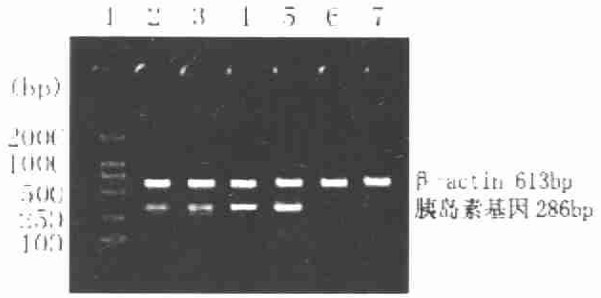


图 4 RT-PCR 产物电泳照片

1:Marker DGL2000 2:RT-PCR of mRNA in the supermatant of pcDNA3.1(+)/mPIN transfected COS-7 cells 48h 3:RT-PCR of mRNA in the supermatant of pcDNA3.1(+)/mPIN transfected COS-7 cells 72h 4:RT-PCR of mRNA in the pcDNA3.1(+)/mPIN transfected COS-7 cells 48h 5:RT-PCR of mRNA in the pcDNA3.1(+)/mPIN transfected COS-7 cells 72h 6:RT-PCR of mRNA in the pcDNA3.1(+) transfected COS-7 cells 7:RT-PCR of mRNA in the COS-7 cells

维普资讯 http://www.cqvip.com

进一步用 Western 印迹分析显示，pcDNA3.1(+)/mINS 转染细胞的培养上清液及其细胞裂解液中出现相对分子质量约 34KDa 的显色带，其分子量与人胰岛素一致；而转染空载体 pcDNA3.1(+)的对照组和未转染组 COS-7 细胞培养物未见表达产物(图 5)。

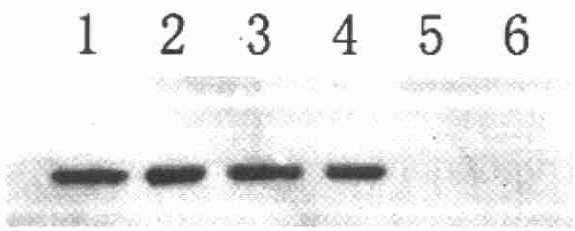


图 5 Western Blotting 照片

1: Western Blotting in the supermatant of pcDNA3.1(+)/mPIN transfected COS-7 cells 48h 2: Western Blotting in the supermatant of pcDNA3.1(+)/mPIN transfected COS-7 cells 72h 3: Western Blotting in the pcDNA3.1(+)/mPIN transfected COS-7 cells 48h 4: Western Blotting in the pcDNA3.1(+)/mPIN transfected COS-7 cells 72h 5: Western Blotting in the pcDNA3.1(+) transfected COS-7 cells 6: Western Blotting in the COS-7 cells

放射免疫测定 COS-7 细胞培养上清液中胰岛素浓度 48h(73.2±12.5)μIU/ml/1.0×10⁶ 个细胞，72h(103.6±16.5)μIU/ml/1.0×10⁶ 个细胞，转染空载体组和无转染组的细胞无胰岛素表达(表 1)。

表 1 转染 48 及 72h 后胰岛素的表达($n=3$，单位 μIU/ml)

组 别	人胰岛素	
	48h	72h
pcDNA3.1(+)	0	0
pcDNA3.1(+)/PINm	73.2±12.5	103.6±16.5

上述结果提示所构建的 pcDNA3.1(+)/mINS 表达载体能够在转染的 COS-7 细胞表达分泌型重组人胰岛素。

3 讨 论

在 1 型糖尿病胰岛素基因治疗研究中，胰岛素原基因转染细胞能否稳定表达具有生物活性的胰岛素，是其成败的关键。目前，应用的胰岛素原基因转染细胞分两大类，一类为包括胰岛 β 细胞在内的神经内分泌细胞，尽管这些细胞含有激素前体转化酶 PC2 和 PC3，能将 C 肽切掉，加工成具有生物活性的胰岛素，但其来源困难，且为终末分化细胞，其应用前景受到限制。另一类为非内分泌细胞，这类细胞缺乏 PC2 和 PC3 酶，不能直接将胰岛素原加工成胰岛素，但在这类细胞普遍表达枯草杆菌蛋白酶的两个家族成员 Furin[5,6] 和 PACE4[7]，它们能特异识别 Arg-X-Lys/Arg-Arg 序列。因此，转染前将胰岛素原基因 C 肽与 A、B 链连接处诱变为含有 Furin 或 PACE4 识别位点的突变体，可以解决普通细胞不能加工胰岛素原的问题。另有研究证明胰岛素 B^{10} 突变，即天冬氨酸代替组氨酸后的胰岛素其稳定性和活性均明显优于普通胰岛素[8]。

构建的表达载体包含胰岛素 N-端的信号肽序列，有助于基因表达产物通过细胞膜从细胞内向细胞外转运。可望在哺乳动物细胞获得分泌型的重组人胰岛素。外源基因在哺乳动物细胞中的表达与多种因素有关。在转录水平主要是启动子和增强子的强弱以及他们之间的配对。在翻译水平受翻译起始序列、eIL-2 磷酸化、顺反子的翻译效率等因素的影响。Kozak[9,10] 研究发现，在真核生物中 ATG 起始密码子周边序列与翻译起始效率密切相关，ATG 密码子应出现在 Kozak 序列中，而且起始密码子前至少 6 个核苷酸的最优序列可提高转录 20 倍以上，特别是 -3 位的 A 和 +4 位的 G 对于 AUG 的识别有最显著的促进作用。为此，在克隆目的基因时，遵循最佳 Kozak 序列最佳表达的原则，在其上游插入最佳 Kozak 序列(GCCACCATGG)，在很大程度上可以提高胰岛素在哺乳动物细胞中的表达水平。

本研究采用 PCR 重叠延伸指导的定点突变技术，在胰岛素原基因 C 肽与 A、B 链连接处诱变为含有 Furin 的识别序列(Arg-X-Lys/Arg-Arg)，并引入信号肽、Kozak 序列，以及 B^{10} 诱变为组氨酸，应用真核表达载体 pcDNA3.1(+)构建人胰岛素原突变体，经测序证实诱变和插入位点正确。重组载体在 COS-7 细胞能被成功转染并表达成熟人胰岛素，目前，胰岛素原基因在靶细胞中的表达看来并不十分困难，但要使其表达调控到生理或预想的治疗水平并不容易。在 1 型糖尿病基因治疗中，胰岛素分泌应该是非连续性，需根据血糖浓度调控其释放量，故将其应用与临床并代替胰岛移植还有相当一段距离。另外，用 RIA 方法检测的胰岛素量应包括胰岛素和胰岛素原，我们正在对胰岛素原的转化效率、表达产物的生物活性、胰岛素基因的表达调控和细胞移植做更深入细致的研究。本研究为下一步构建高效稳定表达具有高生物活性胰岛(下转第 575 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Springer, 1995.

[2] 谭 毅,韦 克,顾美礼,等.台盼兰染色小鼠胚泡着床点的研究[J].中国实验动物学杂志,1999;9:69-72.

[3] 郭尧君.SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展[J].生物化学与生物物理进展,1991;18:32.

[4] Paria BC, Lim H, Wang XN, et al. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholestrogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse[J]. Endocrinology, 1998;139:5235-5246.

[5] Giudice LC. Genes associated with embryoric attachment and implantation and the role of progesterone[J]. JReproductive Med, 1999;44(s):165-171.

[6] Latham KE, Garrels JI, Chang C, et al. Quantitative analysis of protein in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one-cell and two-cell stages[J]. Development, 1991;112(4):921-932.

[7] Latham KE, Garrels JI, Chang C, et al. Analysis of embryonic mouse development: construction of high-resolution, two-dimensional gel protein database[J]. Applied and Theoretical Eletrophoresis, 1992;2:163-170.

[8] Latham KE, Garrels J1, Solter D. Alteration in protein synthesis following transplantation of Mouse 8-cell stage Nucleated 1-cell embryos[J]. Developmental Biology, 1994;163, 341-350.

[9] Stewart CL, Kaspaar P, Brunet LJ, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor[J]. Nature, 1992;359(6390):76-79.

[10] Zhang C, Duan E, Cao Y, et al. Effect of 32/27 kDa laminin-binding protein antibody on mouse embryo implantation[J]. J Reprod Fertil, 2000;119:137-142.

[11] Lala PK, Graham CH. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and inhibitors [J]. Cancer Metastasis Rev, 1990;9(4):369-379.

[12] 魏 泓.医学实验动物学[M].四川科技出版社,1997;441.

(上接第 566 页)素的非内分泌细胞奠定了基础。

(致谢:感谢第三军医大学野战外科研究所分子生物学中心对本项研究的大力支持。)

参 考 文 献

[1] Quinn D, Orci L, Moore HPH. Intracellular transport and sorting of mutant human proinsulin that fail to form hexamers [J]. J Cell Biol, 1991;113(5):987-996.

[2] Galloway JA, Hooper SA, Spardlin CT, et al. Biosynthetic human proinsulin. Review of chemistry, in vivo receptor binding, animal and human pharmacology studies, and clinical experience[J]. Diabetes Care, 1992;15(5):666-692.

[3] Van de Ven W. J. M, Roebroek A. J. M, Van Duijnhoven H. L. P. Structure and function of serine proteases[J]. Crit Rev Oncogenesis, 1993;4(2):115-136.

[4] Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 金冬雁译.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1999;35-40,42-49,56,304-306.

[5] Fuller. R. S., Brake, A. J. and Thorner, Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease[J]. Science, 1989;246(4929):482-486.

[6] Bart P. J., Mason O. B., Landsberg K. E., et al. cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protease with cleavage specificity for paired basic amino acid residues[J]. DNA Cell Biol, 1991;10(5):319-328.

[7] Kiefer M. C., Tucker J. E., Joh R., et al. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15[J]. DNA Cell Biol, 1991;10(10):757-769.

[8] Brems DN, Brown PL, Bryant C, et al. Improved insulin stability through amino acid substitution[J]. Protein Eng, 1992;5(6):519-525.

[9] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes[J]. Cell, 1986;44(2):283-292.

[10] Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells[J]. J. Mol Biol, 1987;196(4):947-950.