维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)03-0337-03

血管生成抑制剂 arresten 的 cDNA 一步法克隆与原核表达

何爱彬 , 曾昭淳

(重庆医科大学基础医学院生物化学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:克隆与表达 arresten;方法:从正常的肝组织提取总 RNA,逆转录成 cDNA,根据软件 RNASTRUCTURE3.5 设计两对引物,巢式 PCR 扩增 arresten 基因,其中每个内引物 5'端加上特殊核苷酸,PCR 产物用 T4 DNA Polymerase 处理后直接与用 NdeI,EcoRI 酶切的表达质粒 pTYB1 连接,转化大肠杆菌 ER2566。筛选重组子,诱导表达。结果:快速一步法克隆表达了 arresten。讨论:一步法克隆快速,高效。

【关键词】cDNA 克隆;巢式 PCR;一步法克隆

【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】 【收稿日期】2003-00-00

Direct cloning of the newest angiogenesis inhibitor, arresten

HE Aibin , et al

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

【Abstract】*Objective*: To clone and express the new angiogenesis inhibitor, arresten. *Methods*: The total RNA was extracted from the normal human liver, and then was reversely transcribed mRNA to cDNA and arresten cDNA was amplified by nestle-PCR. After being treated by T4 DNA polymerase, the arresten cDNA was linked with the linear vector pTYB1 digested by NdeI and EcoRI. And then the complete ER2566 was transfected by recombinant vector, the recombination was screened and the expression of the interest protein was induced by IPTG. *Results*: The arresten was cloned by one-step cloning method with PCR product treated by T4 DNA polymerase. *Conclusion*: This method can be used to clone the interest gene more easily and quickly than T-A clone and others.

【Key words】cDNA clone; Nestling PCR; T-A clone

1997 年 Folkman 发现了血管生成抑制因子内皮抑素,其为 XVIII型胶原的非胶原末端[1],体内体外实验证实了其能显著抑制血管生成的生物学活性,且没有耐药性,目前已经进入临床实验。2000 年 George 等人陆续发现了四型胶原的 α1,α2,α3 链的非胶原末端分别对应一种血管生成抑制因子,即 arresten, canstatin, tumstatin[2~4]。George 利用大肠杆菌克隆表达的 arresten 为 229 个氨基酸,分子量为 26kD 的多肽,能抑制人脐静脉内皮细胞的增殖,阻止内皮细胞的管腔化。这提示 arresten 是另一具有临床价值的肿瘤血管生成抑制因子,尽管如此,但没有相关体内实验验证其抑制血管生成活性,因此本文克隆了中国人的 arresten,为研究来自上述胶原的肽段抑瘤共同机理与开发血管生成抑制剂,为治疗肿瘤打下基础。

作者介绍:何爱彬(1976-),男,硕士生,
主要研究方向:血管生成抑制剂的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人肝组织由重庆医科大学临床学院外科手术室提供;大肠杆菌 ER2566;质粒 pTYB1 由湖北大学生命科学院微生物室保存(赠送)。引物由上海博亚合成;EX-Taq 酶,T4 DNA Polymerase, dNTP 购自 Takara 公司;T4DNA 连接酶,protein marker 购自 Promega;DNA marker 购自 MBI。IPTG 为 SIGMA 产品,琼脂糖胶回收试剂盒为 QIAGEN 产品。其他试剂为国产或进口分装分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 取液氮处理的正常肝组织 100mg,用 Trizol 提取总 RNA,溶于 TE 后 -20℃保存备用。

1.2.2 RT-PCR 扩增(含 arresten cDNA)的大片段引物为:

P1:AGG CCC CGA TGG GTT GC

P2:CTA TAA GGC ACT TTA CGG TTT TC

逆转录:取总 RNA 4μl, olig(dT)18μl, DEPC 处理的纯水 6μl,(混匀),70℃保温 5 min;立即置于冰浴;加入 5×逆转氯

维普资讯 http://www.cqvip.com

酶缓冲液 5μl，10mmol/L dNTP 2μl，RNAsin 2μl，M－MLV 逆转录酶 1 μl(2000U)，室温放置 5 min 后，42℃ 保温 60 min，70℃ 保温 10 min，立即置于冰浴。

PCR 扩增：灭菌纯水 15.5μl，缓冲液 2.5μl，10mmol/L dNTP 0.5μl，10μmol/L 的引物 P1，P2 各 2μl，EX－Taq 酶 0.5μl，逆转录产物 2μl(模板)；95℃ 预变性 5min；循环条件：95℃ 45s、63℃ 45s、72℃ 45s；30 个循环后，72℃ 保温 7min。

1.2.3 arresten 的扩增引物为：

P3：TACATG TCTGTT GATCAC GGCTTC

P4：AATTC GGCTTC TTATGT TCTTCT CATA

反应体系：将大片段 PCR 产物稀释 1000 倍后，取稀释液 1μl 为模板，加纯水 16μl，缓冲液 2.5μl，$MgCl_2$ 1.5μl，dNTP(2.5mmol/L)2μl，引物各 1μl，EX－Taq 0.5μl，PCR 扩增，条件同上。

1.2.4 PCR 产物的处理[5] 反应混合物含 PCR 产物 34μl，2mmol/L dGTP 5.0μl，T4 Buffer5.0μl，0.1% BSA 5.0μl，T4 DNA Polymerase 1.0μl，混匀，25℃ 反应 15min 后，立即置于 75℃ 10min，灭活 T4 DNA Polymerase。溶液回收。

1.2.5 连接与转化 6μl 上一步回收产物，3μl 经 NdeI，EcoRI 酶切后质粒 pTYBl，DNA 连接酶缓冲液 1μl，DNA 连接酶 0.5μl，16℃ 连接过夜；Hananhan 法制备感受态大肠杆菌 ER2566[6]；取连接物 5μl，感受态 ER2566 50μl 于冰上混合，冰浴 30min，44℃ 45s 热激，再冰浴 5min，加 SOC 培养基 200μl，37℃ 250r/min 振荡培养 1h，取 100μl 涂 LA 平板。

1.2.6 分别挑取 24 个单克隆，在 LA 液体培养基中培养 6～8h，取 100μl，加入氯仿 100μl，快速剧烈震荡，10000r/min 离心 10min，各取 5μl 电泳；或 SDS 碱法粗提取质粒，0.8% 琼脂糖电泳，比较质粒大小，找到重组质粒；用 Spermidine 法纯化碱裂解法提取的质粒，用 XbaI 和 EcoRI 双酶切鉴定。

1.2.7 arresten 的诱导表达 在 37℃，100ml LA 中培养含重组质粒的 ER2566 至 LA 的 OD_{600} 值为 0.6～0.8 时，温度改为 30℃，加入 IPTG 至终浓度 0.5mmol/L，诱导表达 3h、5h、9h，分别取一定量培养液，煮沸 10min，制备裂解液，进行 12% SDS－PAGE 电泳。

2 结 果

2.1 提取的总 RNA 在 0.2% DEPC 处理的 1.0% 琼脂糖电泳可见真核细胞的 5.8S，18S，28S 三条核糖体 RNA 带，说明提取的 RNA 基本保持完整，没降解。如图 1。

2.2 PCR 扩增出 865bp 含有 arresten 基因一段 DNA。

2.3 PCR 扩增了 696bp 的 arresten 基因，与预期大小一致。

2.4 抽提质粒比较大小，初步筛选的重组质粒，再用酶切验证正确，送上海博亚公司测序，序列已经提交 GenBank，序列号为：AF536207。序列比较发现第 133 个碱基由 C 突变为 A，但属同义突变，氨基酸仍为精氨酸，可能是由于人种的差异

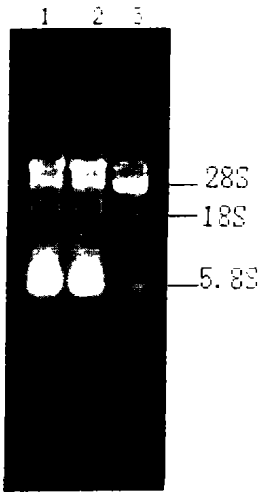


图 1 1，2，3，人肝脏总 RNA

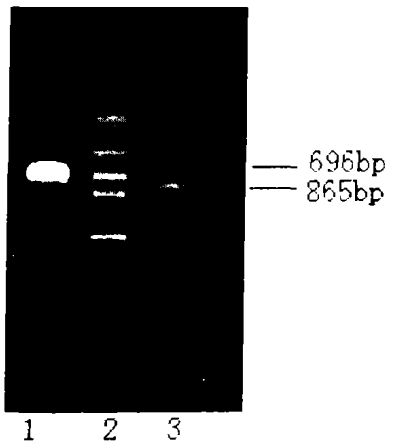


图 2 1，696bpPCR 产物；2. DNA Marker DL2000 (2000，1000，750，500，250，100)；3. 865bpPCR 产物



图 3：表达蛋白 Arresten SDS－PAGE 图
1. 重组子 30°诱导 3 小时；
3. 重组子 30°诱导 5 小时；
4. 重组子 30°诱导 9 小时；
5. 空质粒对照 30°诱导
2. 蛋白质分子量标准 (21kD，31kD，66kD，97kD)

图 3

2.5 当培养液中 IPTG 终浓度为 0.5mmol/L，在

维普资讯 http://www.cqvip.com

30℃诱导 5h，arresten 在大肠杆菌表达量达最大，行 12%SDS－PAGE 电泳，目的条带在 26kD 左右，与预期理论计算分子量大小一致。

3 讨 论

3.1 扩增 arresten cDNA 采用了巢式 PCR，是因为用 RNASTRUCTRUE3.5 软件分析模板(序列号为 NM－001845)，发现目的基因末端可能形成很复杂的二级结构，影响引物的退火与基因的扩增，因此，选择了扩增包含 arresten 基因的大片段，以避开了复杂的二级结构。

3.2 基因的克隆方法已经相当成熟，常用的 A－T 载体克隆。由于 Taq 酶在合成 DNA 的同时在 PCR 产物两条链的 3'端各加一个 A，所以 PCR 产物可直接与线性化的、两端加 T 的载体连接，此法连接效率高，但 T 载体不能重复利用。另一种是在 PCR 扩增的引物两端加上酶切位点，试图通过酶切后与相应酶切的载体连接，但是限制性内切酶酶切 PCR 产物末端附近时，效率非常低。因此需要有更好的方法来代替。本研究利用 T4 DNA 聚合酶 3'端到 5'端的外切活性，处理 PCR 产物，与酶切表达质粒连接。

在反应体系中无 dNTP 时，T4 DNA 聚合酶充分表现其外切活性，能连续的从 DNA 的 3'端削到 5'端；但是在反应体系中存在某种脱氧核苷三磷酸时，就会在 DNA 链含有该种核苷酸残基处停下，本研究在两条引物的 5'端都加上适当的核苷酸，通过酶切后能正好和双酶切的质粒末端碱基配对，连接效率非常高，能成功突破前几种方法的瓶颈，成功地一步克隆，所需经费少，只需少量 T4DNA 聚合酶，而且连接效率不比 T－A 连接低。本研究中，arresten 扩增后产物为：

5' TACATGTCTGT－GAATTA 3'

3' AATGTAC－AGACA－CTTAA 5'

在反应体系中存在 dGTP 时，经过 T4DNA 聚合酶作用后，就形成了能与 NdeI，EcoRI 酶切产物连接的粘性末端片段了。如下：

5' TACATGTCTGT－G 3'

3' GTACAGACA－CTTAA 5'

3.3 充分利用了表达质粒的优点，目的产物在氨基端与 4kDa 的 intein 融合表达，融合蛋白能与 chitin (几丁质)结合，容易利用几丁质亲合纯化。纯化的融合蛋白在加入 DTT 时可以从目的蛋白的氨基端切下 intein，回收目的蛋白。

3.4 arresten 为Ⅳ型胶原 α1 链的非胶原末端，Ⅳ型胶原 α2 链末端为 canstatin，Ⅳ型胶原 α3 链为 tumstatin，XVⅢ胶原末端为 endostatin。arresten 的克隆为蛋白纯化提供了原料，也是在毕赤酵母中的大量表达和纯化的前一步。

参 考 文 献

[1] Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, et al. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells[J]. Nat Biotechnol, 2001; 19(1): 29－34.

[2] 何爱彬. 内皮抑素肿瘤抑制作用机制新进展综述[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2002; 29(5): 50－53.

[3] George D. Kamphaus, Pablo C, Colorado, et al. Canstatin, a Novel Matrix－derived Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth[J]. J Biol Chem, 2000; 275(2): 1209－1215.

[4] Yohei Maeshima, Mark Manfredi, Corinne Reimer, et al. Identification of the Anti－angiogenic Site within Vascular Basement Membrane－derived Tumstatin[J]. J. Biol. Chem, 2001; 276(18): 15240－15248.

[5] 刘 振，马立新. 甘露聚糖酶基因在大肠杆菌中的克隆表达[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2002; 28(2): 55－58.

[6] Hanahan. High efficiency transformation of E. coli with plasmids[M]. Gene, 1990; 96: 23－28.