维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0009-03

大鼠肝再生增强因子编码区的 cDNA 克隆和原核表达

马华锋，刘 杞
（重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010）

【摘 要】目的：克隆大鼠肝再生增强因子（ALR）编码区cDNA并进行原核表达。方法：提取新生大鼠肝脏总RNA为模板，以寡聚dT为引物逆转录合成第一链cDNA，再以我们设计的PCR引物进行PCR扩增获取大鼠肝再生增强因子编码区双链cDNA；以基因重组技术构建大鼠ALR的原核表达质粒，然后将重组表达质粒转化至大肠杆菌内以IPTG诱导表达。结果：成功克隆出大鼠肝再生增强因子编码区cDNA，其序列与以前报道的完全一致；构建的大鼠ALR原核表达重组质粒在大肠杆菌内高效表达rALR融合蛋白，其表达量占菌体蛋白30 %。结论：大鼠肝再生增强因子编码区cDNA的克隆及其在大肠杆菌的高效表达为ALR的深入研究奠定了基础。

【关键词】大鼠肝再生增强因子；cDNA 克隆；基因表达
【中国图书分类法分类号】R512 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-09-05

The cDNA clone of the coding region of rat augmenter of liver regeneration gene and its prokaryotic expression

MA Huafeng ,et al
(Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: To clone the coding region cDNA of rat augmenter of liver regeneration (rALR) and to express it in prokaryotic cells. *Methods*: Total RNA of new born rat liver was extracted as a template, first strand of cDNA was synthesized by reverse transcription with olig(dT)-primer and then amplified by PCR with the primers designed by ourselves. The rALR cDNA identified by gene sequencing was cloned into plasmid pET32a by means of recombinant gene technology. The recombinant plasmid pET32a-rALR was transformed into E.coli BL21 (DE3) and recombinant rALR fusion protein was expressed under the induction of IPTG. *Results*: The cDNA containing integrity coding region of rALR was obtained, and its sequence was in correspondence with that reported. The rALR fusion protein was expressed with high efficiency in E.coli BL21 (up to 30% of total bacterial soluble protein) with the recombinant plasmid pET32a-rALR constructed. *Conclusion*:The cDNA clone of rALR and the expression of rALR protein will be helpful for the advanced study of ALR.

【Key words】 Rat augmenter of liver regeneration; cDNA clone; Gene expression

肝再生增强因子（ALR）是近年才发现的一种新型促肝再生因子[1]。鉴于对肝细胞生长因子（HGF）及转移生长因子α（TGF-α）在治疗上的渺茫前景，因此肝再生增强因子成为近年研究的热点。我们已经克隆了人肝再生增强因子（hALR）的编码区cDNA[2]，为了对ALR深入研究以及比较二者的异同，我们拟克隆大鼠ALR编码区cDNA，构建其原核重组表达质粒并在大肠杆菌内作原核表达。

1 材料与方法

作者介绍：马华锋（1972- ），男，住院医师、硕士。
主要研究方向：乙型肝炎免疫发病机理。

1.1 材料

1.1.1 工具酶及试剂 限制性内切酶、Taq DNA 多聚酶及 T4 DNA 连接酶均为加拿大MBI 产品；质粒DNA 提取及 DNA 胶回收试剂盒为上海华舜产品；总RNA 提取盒（Rneasy Total RNA Purification System）为QIAGEN 公司产品；第一链cDNA 合成试剂盒为PHARMACIA 产品。dNTP 为 PROMEGA 产品；IPTG 为 SIGMA 产品。

1.1.2 质粒及菌株 原核表达质粒pET32a(+) 为美国NOVA-GEN 公司产品；大肠杆菌DH5 α及BL21（DE3）为本研究所提供。

1.1.3 实验动物 两天龄Wistar 大白鼠为重庆医科大学动物中心提供。

1.2 实验

1.2.1 PCR 引物设计 参照Hagiya 等报道的大鼠肝再生增强因子cDNA 序列以PEDESIGN 引物设计软件设计一对引

维普资讯 http://www.cqvip.com

物交上海基康生物工程公司合成。上游引物P1：5'-TCGGATCCATGCGGACCCAGCAGAAGCGGGAC-3'，下游引物P2: 5'-GCAAGCTTTTAGTCACAGGAGCCGTCTTCCAG-3'，下划线部分分别为BamH Ⅰ与Hind Ⅲ酶切位点。

1.2.2 大鼠肝脏总RNA提取 取两天龄Wistar大白鼠肝脏组织一小块（约米粒大小），迅速以液氮冻硬后磨碎组织，然后参照试剂盒说明提取大鼠肝脏总RNA。

1.2.3 逆转录及第一链cDNA合成及PCR扩增 取大鼠总RNA 5μl（约5μg），参照说明与“First-Strand Reaction Mix”混匀，于37℃水浴中反应1h后，于95℃灭活5min立即置于冰浴中。取将第一链cDNA合成产物10μl作为PCR模板，加入P1、P2（各30 pmol）引物及其它反应成份后进行PCR扩增，PCR参数为：94℃预变性4min后进入循环，94℃1min，51℃1min，72℃1min，共35个循环；循环完成后72℃继续延伸7min。反应完毕后取3μl产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 重组质粒的构建 将胶回收的PCR扩增产物与质粒pET32a(+)分别以BamH Ⅰ和Hind Ⅲ消化。将酶消化的rALR和质粒pET32a(+)按摩尔比3:1进行连接，连接产物以CaCl法转化大肠杆菌DH5α后以含氨苄青霉素的LB培养板筛选。次日挑生长的单菌落提质粒进行BamH Ⅰ/Hind Ⅲ的双酶鉴定及PCR鉴定。最终将重组质粒寄至上海基康公司进行序列测定鉴定。

1.2.5 重组rALR融合蛋白的原核表达 将重组质粒pET32a-rALR以CaCl2法转化至宿主大肠杆菌BL21（DE3），同时转化空质粒pET32a作为对照；次日挑转化的单菌落培养至对数生长期后加入IPTG至终浓度1mmol/L诱导培养4h。收集菌体以SDS-PAGE检测，重组蛋白的表达量经灰度扫描确定。

2 结 果

2.1 大鼠肝总RNA提取

取提取的3ul产物以1%琼脂糖凝胶电泳检测可见清晰的28S与18S RNA条带，结果见图1。



图1 大鼠肝总RNA的提取

Note: 1: MBI Lambda DNA/EcoRI+ HindIII Marker;
2: total RNA of rat liver

2.2 RT-PCR扩增

以大鼠肝总RNA的第1链cDNA为模板可扩增出特异的约400bp大小的DNA片段（见图2）。



图2 rALR cDNA的RT-PCR扩增结果

Note: 1:control; M:MBI DNA Marker 3:rALR

2.3 重组质粒pET32a-rALR的鉴定

重组质粒pET32a-rALR经BamH Ⅰ与Hind Ⅲ消化后成功切出约400bp大小的DNA片段，以PCR方法也扩增出特异的约400bp大小的片段，见图3。说明重组质粒pET32a-rALR构建成功。

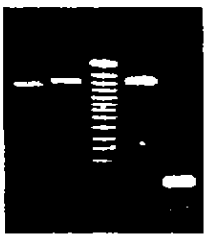


图3 重组质粒pET32a-rALR的鉴定

Note: 1:pET32a-rALR;
2: pET32a (BamH Ⅰ/Hind Ⅲ); M:MBI λ-pUC Mix Marker;
3: pET32a-rALR (BamH Ⅰ/Hind Ⅲ);
4: PCR identification of pET32a-rALR

2.4 rALR cDNA的核苷酸序列测定

所测的rALR cDNA序列经DNASIS软件分析与Hagiya等报道的序列完全一致。

2.5 重组rALR融合蛋白的原核表达

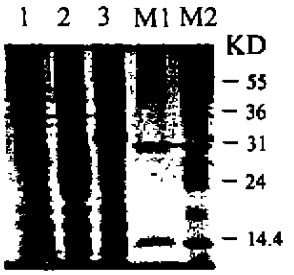


图4 重组质粒pET32a-rALR的原核表达

Note: 1:un-induction of BL21(pET32a-rALR);
2:induction of BL21(pET32a);
3:induction of BL21(pET32a-rALR); M1,M2:protein marker

重组质粒pET32a-rALR在大肠杆菌BL21（DE3）内得以高效表达目的蛋白，其表达蛋白分

维普资讯 http://www.cqvip.com

子量约33KD；而对照空质粒在相同位置未见特异蛋白表达带。经灰度扫描测定表达的目的蛋白约占菌体总蛋白的 30%。SDS-PAGE 检测结果见图 4。

3 讨 论

肝再生增强因子（Augmenter of Liver Regeneration, ALR）是1994 年Hagiya 等发现的与肝再生有关的因子。大鼠体内实验中发现肝部分切除后ALR 具有显著增强肝细胞DNA 合成的作用。我们实验室已克隆出人ALR 编码区cDNA、并构建了人ALR 的原核及真核表达重组质粒[3]。由于目前关于ALR 研究尚处于早期、其促肝再生的机制还不清楚，而且当前国内外学者对于ALR 的研究结果还有一些不统一的地方，其中包括rrALR 与rhALR 在体外活性方面的差异。因而对于ALR 的研究还需更加深入进行。因此我们克隆了大鼠ALR 编码区cDNA 并构建其原核表达重组质粒以获取rALR 蛋白，以求进一步研究 ALR 的生物学功能。

Hagiya 报道的ALR 是在大鼠2/3 肝叶切除后的新生肝组织中得到的，而幼年动物肝脏正是生长旺盛时期，其ALRmRNA 含量估计也较高，因此我们选用了以大鼠乳鼠的肝脏为组织来源提取肝脏总RNA 作逆转录及第一链cDNA 合成的模板；以RT-PCR 我们顺利克隆出了rALR 编码区cDNA，其序列与 Hagiya 报道的完全一致。

pET32a 是表达融合蛋白的原核表达质粒，插入的外源基因与本身带有的硫氧环蛋白进行融合表达、而最重要的是以pET32a 表达的蛋白含6 × 组氨酸接头，易于用多聚组氨酸纯化系统进行高效的亲合层析纯化。我们的实验结果也表明pET32a-rALR 在大肠杆菌BL21 中获得了高效表达，表达蛋白占菌体总蛋白的 30 %。

由于与硫氧环蛋白融合表达的外源蛋白大多数情况下均能正常的折叠，因而表达的重组rALR 融合蛋白能够表现出全部生物学活性[4]；即使有影响，也可以用肠激酶对介于硫氧环蛋白与目的蛋白之间的肠激酶位点进行特异性的消化而被去掉异源氨基酸，因此推测该融合蛋白可以用于rALR 的生物学功能研究。

大鼠ALR 编码区cDNA 的克隆及rALR 在大肠杆菌的高效表达，为ALR 的深入研究奠定的基础。

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 demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994;91:8142-8146.

[2] 刘 杞、王志毅，张定凤，等. 人肝再生增强因子阅读框的cDNA 克隆和序列分析[J]. 中华肝脏病杂志，1999; 7 (3):156-158.

[3] 刘 杞，石小枫. 重组人肝再生增强因子原核表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达[J]. 中华肝脏病杂志、2000;8(1):9-11.

[4] F 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]，第1 版，北京：科学出版社，1998;652.

（上接第 8 页）

coronary atherosclerotic plaques[J]. J Clin Invest, 1995;95:2266-2270.

[8] Karsan A, Yee E, Harlan JM. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member[J]. Ai.J Biol Chem, 1996; 271 (44): 27201-27206.

[9] Yang JJ, Kettritz R, Panel Falk RJ, et al. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase[J]. Am J Pathol, 1996;149(5);1617-1620.

[10] Koçkx MM, Cambier BA and Bortiex HE, et al. Roam cell replication and smooth muscle cell apoptosis in human saphenous vein grafts[J]. Histopathology, 1994; 25(4):365-367.

[11] Pierre Golstein. Controlling cell death[J]. Science, 1997;275 (21):1081-1082.

[12] Reed JC. Bcl-2 and regulation of programmed cell death[J]. J Cell Biol, 1994;124:1-3.

[13] Watanabe FR, Brannan CI, Itoh N, et al. The CDNA structure,expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen[J]. J Immunol, 1992;148:1274-1276.

[14] Suda T, Okzaki T, Naito Y, et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell Lineage[J]. J Immunol, 1995;154:3806-3811.

[15] Yamamoto K, Sakoda H, Na kajima T, et al. Accumulation of multiple T cell clonotypes in the synovial lesion of patients with rheumatoid arthritis revealed by a novel clonality analysis [J]. Int Immunol, 1992; 4:1219-1223.