维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)02-0119-03

人内皮抑素cDNA克隆和初步表达

张 革，曾昭淳，刘万里

（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：克隆人内皮抑素基因，获得初步表达产物，为进一步研究打下基础。方法：用RT-PCR方法从中国汉族人正常肝组织扩增出内皮抑素cDNA，T/A插入pUCm-T载体、测序、再插入表达载体pKPL-3a，转化大肠杆菌POP2136，42℃诱导表达，SDS-PAGE分析表达蛋白。结果：中国人内皮抑素cDNA开放阅读框架全长552bp，编码184个氨基酸，其85位谷氨酸和98位天冬氨酸密码子的第二位碱基出现改变，但编码的氨基酸不变。结论：构建了中国人内皮抑素的克隆载体和表达载体，初步表达了约20kD人重组内皮抑素。

【关键词】人内皮抑素；分子克隆；序列测定；基因表达

【中国图书分类法分类号】Q785 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-09-27

Cloning and expression of human endostatin

ZHANG Ge, et al

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

【Abstract】 *Objective*: In order to pave a way to cure human tumors, we plan to construct expression vector of human endostatin and produce recombinant endostatin from E.coli. *Methods*: According to the sequence of XVIII collagen gene . cDNA of human endostatin was obtained from the normal liver tissue of a Chinese Han man by RT-PCR . Endostatin cDNA was cloned into PUCm-T vector by T/A cloning technique and sequenced . Then endostatin cDNA was inserted into the PKPL-3a expression vector and the recombined plasmid was transformed into the host strain E.coli POP2136. The endostatin expression was induced by raising the temperature to 42 ℃ and analyzed by SDS-PAGE. *Results*: Endostatin cDNA sequence encoded 184 amino acid residues. The variation in bases encoding Glu85 and Asp98 was discovered in Chinese. Recombinant human endostatin was expressed as inclusion body and the host expressed a 20kD protein which was confirmed with SDS-PAGE analysis. *Conclusion*: The cloning and expression vectors of human endostatin were successfully constructed in our laboratory. Expression vector expressed a 20 kD recombined human endostatin at 42℃.

【Key words】 Human endostatin; Molecular cloning; Sequencing; Gene expression

人内皮抑素（Endostatin）分子量为20kD，含184个氨基酸残基、是XVIII型胶原C末端球状结构域中一个片段，为1997年发现的一种内源性血管生成抑制因子和肿瘤生长抑制因子[1]。在小鼠实验中，内皮抑素能够完全抑制肿瘤的生长，表现出很强的抑肿瘤活性[2]。为了研究人内皮抑素的结构和功能，我们通过RT-PCR构建了人内皮抑素的克隆载体和表达载体，获得了人内皮抑素的全长cDNA，并初步得到表达。

1 材料和方法

1.1 材料

中国汉族人的正常肝组织；pUCm-T克隆载体、*Ecoli* JM109为其宿主菌；pKPL-3a表达质粒和宿主菌POP2136（马大龙惠赠，北京医科大学）；TRZOL RNA提取试剂盒（上海生工），限制性内切酶*Sma*I和*Hind* III，Klenow酶（Promega产品），M-MLV逆转录酶，RNAsin，T4DNA连接酶，Pfu DNA聚合酶，*Taq* DNA聚合酶（MBI产品）。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取：将手术获得的正常肝组织100mg立即置于变性液中，用无RNAase的组织研磨器快速研磨，其余步骤按TRZOL试剂盒说明书操作，并测定RNA含量和电泳检验RNA的质量。

1.2.2 RT-PCR：按“PCR技术实验指南”一书的方法进行。PCR用Pfu DNA聚合酶，95℃变性5min，95℃变性45 s，58℃退火45 s，72℃延伸1min，30次循环；然后加入5U *Taq* DNA聚合酶，72℃延伸15min，以便于PCR产物3'端加上

作者介绍：张 革（1972- ），女，陕西省西安人，硕士生，现在中山医科大学分子生物学实验室，主要研究方向：内皮抑素克隆、表达、纯化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

单个A碱基。

1.2.3 人内皮抑素克隆载体的构建和序列分析：把酚氯仿抽提，乙醇沉淀PCR产物，PCR产物用T/A克隆的方法插入pUCm-T载体中，一步法转染*Ecoli.* JM109感受态细胞，用蓝白斑筛选阳性克隆，酶切鉴定，ABI373测序（上海博亚）。

1.2.4 人内皮抑素的表达载体构建和在大肠杆菌中初步表达：将克隆在pUCm-T载体中经测序正确的人内皮抑素基因片段用PfuDNA聚合酶PCR扩增，20次循环。PCR产物用*Hind* III酶切，低熔点琼脂糖回收片段，大小为560bp。表达载体PKLP-3a先经*Stv* I酶切和Klenow酶补平，再用*Hind* III酶切，低熔点琼脂糖回收，最后与酶切的PCR产物定向连接，构建成大肠杆菌表达质粒PKLP-ES。将此表达质粒转化宿主菌POP2136,筛选和挑选含表达质粒的单菌落在LA培养基中30℃过夜培养，次日加入48℃等量新鲜培养基，迅速放入42℃摇床，振荡4～6h，离心收集菌体进行SDS-PAGE分析。

2 结 果

2.1 RT-PCR获取人内皮抑素的基因片段

用TRZOL提取肝组织总RNA、经电泳分析，清晰可见28S和18S两条rRNA带，说明总RNA没有明显降解。根据人XVIII型胶原的cDNA序列[1]、经PCgene软件分析、设计了两条引物用来扩增人内皮抑素，引物1（P1）：5'-ATG CAC AGC CAC CGC GAC TT-3'；引物2（P2）：5'-GGG AAG CTT CTA CTT GGA GGC AGT CAT-3'（上海生工合成）。P2 5'端带有HindIII限制性内切酶位点（下划线部分）。先把总RNA逆转录为cDNA，以cDNA为模板，再用引物P1、P2和PfuDNA聚合酶，扩增出一条560bp的产物（见图1）。



图1 人内皮抑素PT-PCR产物
（2%琼脂糖电泳）
1：DNA marker、Φ x 174/Hinfl
(726.731.553.500.427.417.413、311.249)
2：人内皮抑素的PT-PCR产物

2.2 内皮抑素的亚克隆和cDNA序列分析

PCR产物经TaqDNA聚合酶在3'末端加上单个A，用T/A克隆方法快速插入到PUCm-T载体中，筛选阳性克隆进行序列分析，测序结果见图2。

2.3 人内皮抑素表达载体的构建和初步表达

```
1   CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG CTC CAC CTG GTT GCG CTC AAC AGC CCC CTG TCA
      H   S   H   R   D   F   Q   P   V   L   H   L   V   A   L   N   S   P   L   S
61  GGC GGC ATG CGG GGC ATC CGC GGG GCC GAC TTC CAG TGC TTC CAG CAG GCG CGG GCC GTG
      G   G   M   R   G   I   R   G   A   D   F   Q   C   F   Q   Q   A   R   A   V
121 GGG CTG GCG GGC ACC TTC CGC GCC TTC CTG TCC TCG CGC CTG CAG GAC CTG TAC AGC ATC
      G   L   A   G   T   F   R   A   F   L   S   S   R   L   Q   D   L   Y   S   I
181 GTG CGC CGT GCC GAC CGC GCA GCC GTG CCC ATC GTC AAC CTC AAG GAC GAG CTG CTG TTT
      V   R   R   A   D   R   A   A   V   P   I   V   N   L   K   D   E   L   L   F
241 CCC AGC TGG GAG GCT CTG TTC TCA GGC TCT GA[G] GGT CCG CTG AAG CCC GGG GCA CGC ATC
      P   S   W   E   A   L   F   S   G   S   E   G   P   L   K   P   G   A   R   I
301 TTC TCC TTT GA[T] GGC AAG GAC GTC CTG AGG CAC CCC ACC TGG CCC CAG AAG AGC GTG TGG
      F   S   F   D     G   K   D   V   L   R   H   P   T   W   P   Q   K   S   V   W
361 CAT GGC TCG GAC CCC AAC GGG CGC AGG CTG ACC GAG AGC TAC TGT GAG ACG TGG CGG ACG
      H   G   S   D   P   N   G   R   R   L   T   E   S   Y   C   E   T   W   R   T
421 GAG GCT CCC TCG GCC ACG GGC CAG GCC TCC TCG CTG CTG GGG GGC AGG CTC CTG GGG CAG
      E   A   P   S   A   T   G   Q   A   S   S   L   L   G   G   R   L   L   G   Q
481 AGT GCC GCG AGC TGC ATC CAC GCC TAC ATC GTG CTC TGC ATT GAG AAC AGC TTC ATG ACT
      S   A   A   S   C   H   H   A   Y   I   V   L   C   I   E   N   S   F   M   T
541 GCC TCC AAG TAG
      A   S   K  终止密码
```

图2 人内皮抑素cDNA的序列和其氨基酸序列

注1：□代表突变的碱基Glu[85](GAA→GA[G])、Asp[99](GAC→GA[T])

维普资讯 http://www.cqvip.com

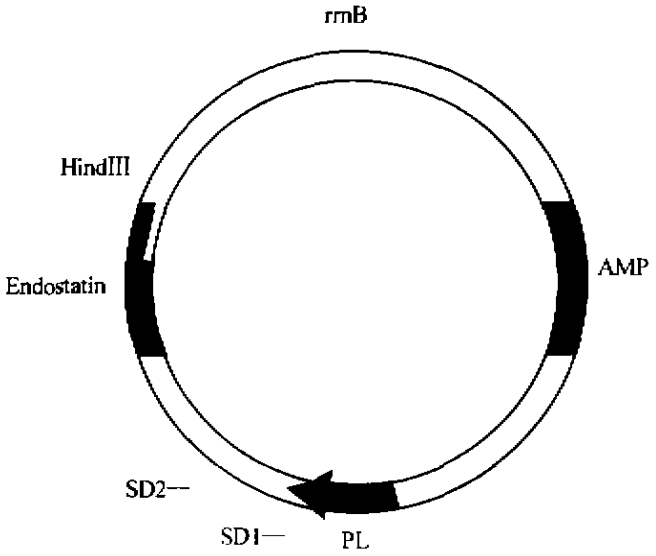


图3 内皮抑素表达载体PKPL-ES的构建

将克隆在PUC m-T载体上的内皮抑素cDNA用HindIII酶切、回收片段，并与预先经*Hind* III酶切的PKLP-3a表达载体定向连接(见图3)，转化POP2136宿主菌，筛选阳性表达菌株，表达菌株经42℃诱导表达。SDS-PAGE分析表明，在分子量20kD处有一明显表达条带，与预期结果一致（见图4）。

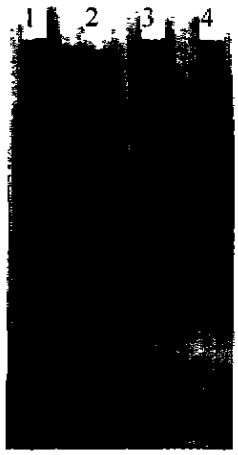


图4 SDS-PAGE分析PKPL-ES在*E.coli*.POP2136的表达产物
1：PKPL-ES在42℃诱导4h
2：PKPL-ES在42℃诱导6h
3：PKPL-ES未经42℃诱导
4：蛋白质分子量marker
(97.4kD,66.2kD,43.31kD,20.1kD,14.4kD)

3 讨 论

新血管生成是肿瘤生长和转移所必需，它不仅为肿瘤生长供给营养，而且提供了转移途径[4]。新血管生成的抑制因子成为抑制肿瘤生长和转移的侯选药物[5]。内皮抑素是已经报道的最有效的、最有潜力的新血管生成抑制剂之一，可抑制动物体内肿瘤的生长，重复使用不会引起耐药性[6]。我们从中国汉族人正常肝组织中提取总RNA，逆转录为cDNA，用高保真的Pfu DNA聚合酶PCR扩增，极大地减小了PCR扩增过程中的碱基突变可能性[7]。应用TaqDNA聚合酶在3`末端加上单个A，使PCR产物与pUCm-T载体方便、快速地构建了pUC-ES克隆质粒。测序的结果，与国外报道的序列相比发现在85位和98位两处有Glu，Asu密码子第三位碱基的改变，但编码的氨基酸不变[3]。由于使用高保真的PfuDNA聚合酶，扩增错配的可能性极小，但还需进一步证实。

O'Reilly 等[1]直接以原核载体表达的内皮抑素包涵体作用于动物肿瘤，发现有缓释作用，有长期的抗肿瘤生长活性，故我们也用原核载体系统来表达人内皮抑素。由于人内皮抑素的cDNA G+C含量高（75%），表达有一定难度，故选用含有高效PL启动子pKPL-3a表达载体。它带有两个SD序列，以及ATG启始密码子和rrnB转录终止子，而内皮抑素自带有TAG琥珀型终止密码。宿主菌*E.coli* POP2136含有CI857基因，编码温度敏感的阻遏蛋白，在30℃时抑制PL启动子表达外源基因；在42℃，阻遏蛋白失活，PL启动子启动SD序列下游的人内皮抑素的cDNA表达，本系统不需要IPTG诱导表达，便于大规模的工业化生产。我们成功地构建了PKLP-ES表达系统，初步在大肠杆菌中得到表达，分子量与预期一致，约20 kD，为进一步进行肿瘤治疗药物研究提供了条件。

参 考 文 献

[1] O'Reilly M.S, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell. 1997;88(2):227-285.

[2] Black W.B. Tumor regression after endostatin therapy[J]. Nature, 1998;391(6666):450

[3] Suk P. Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type 18 collagen and localization of (18) collagen gene to mouse chromosome 10 [J]. Genomics. 1994;19:494-499.

[4] Folkman J, Watson K, Ingber D, et al.. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. [J]. Nature, 1989;339(6219):58-61.

[5] Harris A.L. Are angiostatin and endostatin cures for cancer? [J]. The Lancet, 1998;351:1589-1599.

[6] Boehem T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance[J]. Nature, 1997;390:404-407.

[7] C.W. 迪芬巴赫，G. S.德维克斯勒. PCR技术实验指南[M]. 北京. 科技出版社，1998:29-31.