DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.007
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
298 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)04-0298-03

抗心肌肥大多肽GCIP表达载体的构建

周见至,李晓辉,张海港,唐 渊,王晓芹 (第三军医大学基础医学部药理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 化学合成DNA片段后利用基因工程技术,克隆入含有T7启动子的原核表达质粒。方法 采用分二段化学合成G蛋白竞争性抑制肽(G-protein competed inhibition of peptide, GCIP)基因的方法,酶切后先定向克隆到pEGFP-N1质粒中,再用*Xho*Ⅰ和*Sma*Ⅰ切下含完整基因的片段,插入*Xho*Ⅰ和*Sma*Ⅰ处理的pIVEX2.3-MCS质粒,构建能在*E coli* BL21(DE3)pLysE和RTS500系统中表达的质粒。经转化DH5α大肠杆菌,筛选出阳性转化子,并用酶切及测序鉴定。结果 通过基因工程技术,构建了pIVEX2.3MCS-GCIP表达质粒,经测序鉴定结果与设计的完全相符。结论 成功构建了GCIP的重组表达质粒。

关键词:GCIP基因;重组;pIVEX2.3-MCS;pEGFP-N1
中图法分类号:Q782;Q789 文献标识码:A

Construction of expression vector for prophylactic myocardial hypertrophy GCIP polypeptide

ZHOU Jian-zhi, LI Xiao-hui, ZHANG Hai-gang, TANG Yuan, WANG Xiao-qin (Department of Pharmacology, College of Medicine Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant plasmid for expressing peptides of G-protein competed inhibition of peptide (GCIP) under the control of T7 promoter. Methods Two nucleotide fragments were synthesized, and double-stranded oligonucleotide was inserted into pEGFP-N1 plasmid vector. The total GCIP gene was digested with *Xho*Ⅰ and *Sma*Ⅰ, and subcloned into the plasmid pIVEX2.3-MCS for expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysE or RTS500 system. Positive clones were screened and identified with restriction endonuclease, and pIVEX2.3MCS-GCIP plasmid was identified by DNA sequencing. Results By DNA recombination techniques, the pIVEX2.3MCS-GCIP plasmid was constructed and confirmed by DNA sequencing. Conclusion The expression plasmid, which includes the GCIP gene is under the control of T7 promoter, has been cloned successfully.

Key words: GCIP gene; recombination; pIVEX2.3-MCS; pEGFP-N1

心肌肥大是许多心脏疾病的一种共同病理反应,研究表明无论牵张刺激或是体液内分泌物质如内皮素、血管紧张素Ⅱ、去甲肾上腺素等诱导心肌肥大的信号转导过程中G蛋白起着重要作用[1]。新近报道G蛋白竞争性抑制肽(G-protein competed inhibition of peptide, GCIP)在转基因实验动物模型上,对手术逆向主动脉缩窄模型的心肌肥大及内皮素、血管紧张素Ⅱ等刺激的-MAPK活性改变均具有很好的抑制效果[2~5],具有广阔的研发应用前景。

本实验拟通过基因工程程技术,采用化学合成DNA片段再先后克隆入pIVEX2.3-MCS质粒的策略,构建GCIP基因的原核表达载体。为进一步研究其表达及抗心肌肥大活性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌DH5α菌株分子遗传教研室惠赠,pEGFP-N1质粒万瑛博士惠赠,pIVEX2.3MCS质粒购于Roche公司。

*Xho*Ⅰ、*Sma*Ⅰ、*Pst*Ⅰ酶(TakaRa公司)、T_4DNA连接酶、*Taq*酶(promega公司)、质粒抽提试剂盒、DNA琼脂糖胶回收试剂盒(Roche公司)。DNA片段由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA系列的化学合成

第1条:5′-TCGAGCTXXX …XXXGTCGACTAAACGTTCTCTGCA-3′(60 bp)

第2条:5′-GAGAACGTTTAGTCGACXXX…XXXAGC-3′(52 bp)

第3条:5′-GAGGTCGACXXX…XXX-3′(85 bp)

第4条:5′-TAGCCCGGGXXX…XXX-3′(85 bp)

考虑到经济、操作方便及可靠性等因素我们选择了分2段(4条)合成,再先后克隆入表达载体的方法。分析GCIP基因和pEGFP-N1质粒的酶切图谱,未能在GCIP上找到位置比较合适,且pEGFP-N1质粒的MCS上也有的常用内切酶的位点,因此只能人为引入酶切位点;分析GCIP基因序列发现第27个碱基由G改为C后不影响其阅读框(因GTG和GTC编码的都是同一个氨基酸:缬

基金项目:重庆市科委课题资助项目(20010725)
Supported by the Scientific Committee of Chongqing (20010725)
作者简介:周见至(1971—),男,贵州省安顺市人,硕士,讲师,主要从事信号转导分子药理方面的研究。电话:(023)68753397
收稿日期:2002-09-25;修回日期:2003-04-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

氨酸) 这样就在 GCIP 基因上的第 25~30 的位置引入了 *Sal* Ⅰ的酶切位点, 如此可以把 GCIP 基因分两次克隆入 pEGFP-N1 质粒。

1.2.2　pIVEX2.3MCS-GCIP 表达载体的构建　　构建策略见图 1, 第 1 条和第 2 条合成的单链寡核苷酸, 经过退火后可直接形成带 *Xho* Ⅰ 和 *Pst* Ⅰ 粘性末端的双链 DNA, 克隆入 pEGFP-N1 质粒, 筛选出的阳性克隆命名为 pEGFP-A 质粒。第 3 条和第 4 条合成的单链寡核苷酸为 3′端互补的结构, 经 PCR 循环在 *Taq* 酶作用下延伸成双链 DNA, 反应条件: 94 ℃ 30 秒, 60 ℃ 30 s(每一循环增加 0.3 ℃), 72 ℃ 30 s, 30 个循环。pEGFP-A 和 PCR 扩增的第 2 片段都用 *Sal* Ⅰ和 *Sma* Ⅰ双酶切, 纯化后做连接即可把第 2 片段定向克隆入 pEGFP-A 质粒, 筛选的出阳性克隆含有完整的 GCIP 基因, 称之为 pEGFP-GCIP。pEGFP-GCIP 的 GCIP 基因的两端带有 *Xho* Ⅰ和 *Sma* Ⅰ位点, 用这两个酶切下 GCIP 基因, 电泳后用胶回收试剂盒回收 GCIP 基因再克隆入 pIVEX2.3-MCS 质粒, 阳性克隆含有完整的 GCIP 基因, 称之为 pIVEX2.3MCS-GCIP。

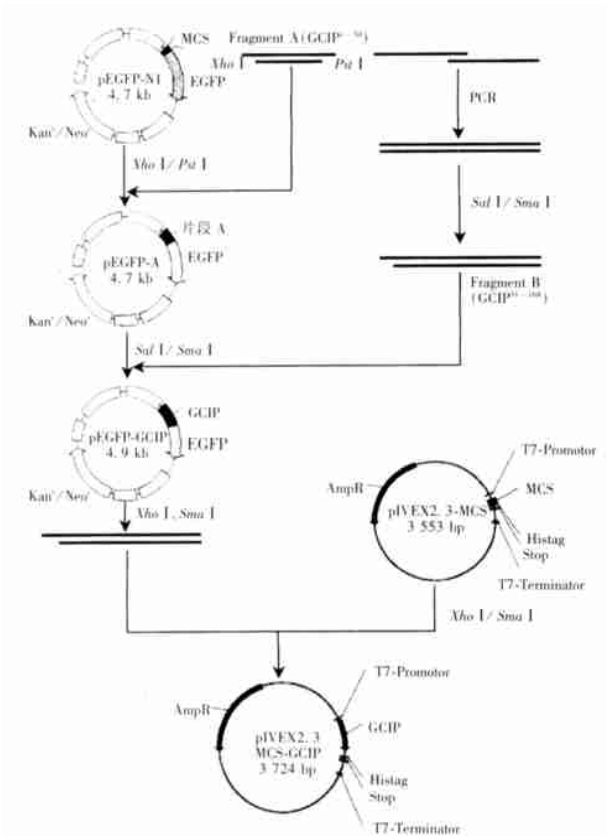


图 1　pIVEX2.3MCS-GCIP 表达载体的构建

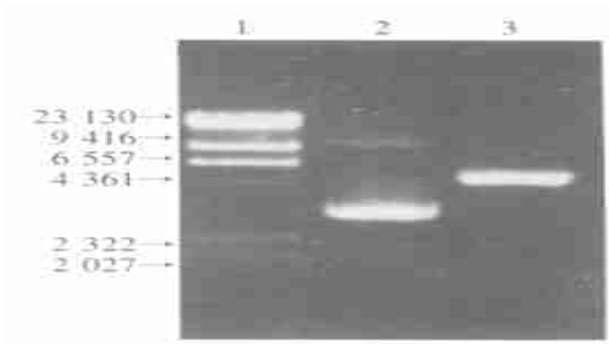
Fig 1　Construction of expression pIVEX2.3MCS-GCIP

1.2.3　重组子的筛选和鉴定　　重组子的筛选挑取 6 个连接产物在含有相应抗生素(pEGFP-A 和 pEGFP-GCIP 用四环素, pIVEX2.3MCS-GCIP 用氨苄青霉素)的平皿上的菌落, 培养于 5 ml LB 培养基中过夜, 提取质粒用于鉴定。PEGFP-A 质粒采用 *Hin*dⅢ和 *Pst* Ⅰ分别进行单酶切后电泳鉴定; pEGFP-GCIP 和 pIVEX2.3MCS-GCIP 采用 *Xho* Ⅰ 和 *Sma* Ⅰ 双酶切电泳鉴定; pIVEX2.3MCS-GCIP 并作测序鉴定。

2　结果

2.1　pEGFP-A 的构建

由于 pEGFP-N1 质粒上的 MCS 中 *Hin*dⅢ酶切位点位于 *Xho* Ⅰ和 *Pst* Ⅰ之间, 即克隆入片段的 PEGFP-A 质粒会丢失 *Hin*dⅢ位点, 而 *Xho* Ⅰ 和 *Pst* Ⅰ 位点仍然存在。如发生短片段自连的质粒, 则 *Hin*dⅢ位点将仍然存在; 如发生非粘性末端直接连接时, 则 *Xho* Ⅰ 和 *Pst* Ⅰ 位点都会丢失。故 *Hin*dⅢ不能切开, 而 *Pst* Ⅰ 能切开, 则说明该质粒为阳性重组子。质粒被酶切后呈线性, 在低浓度 EB 下其电泳带在质粒之后。故可通过 *Hin*dⅢ和 *Pst* Ⅰ 分别对质粒进行单酶切, 如能被 *Pst* Ⅰ 切开, 而不能被 *Hin*dⅢ切开, 则为阳性重组质粒, 见图 2。



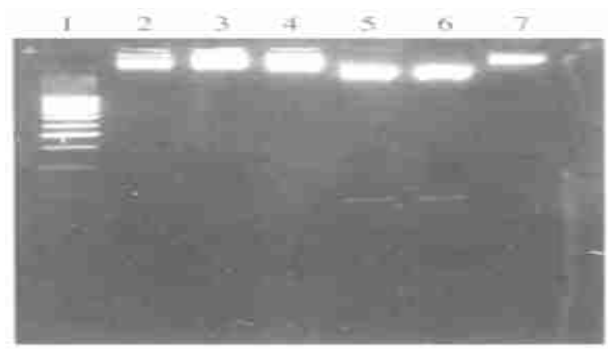
1: Marker; 2: *Hin*d Ⅲ digestion; 3: *Pst* Ⅰ digestion

图 2　pEGFP-A 酶切电泳图

Fig 2　Electrophoresis of pEGFP-A plasmid after restriction analysis

2.2　pEGFP-GCIP 的构建

合成的第 3、4 条寡核苷酸单链 3′端有 20 个碱基互补, 在 *Taq* 酶作用下延伸成双链 DNA 片段 B, 2.5%的琼脂糖凝胶电泳可见扩增片段位于 150 bp 处。片段 B 经 *Sal* Ⅰ 和 *Sma* Ⅰ 双酶切后, 定向克隆入 pEGFP-A 的 *Sal* Ⅰ 位点和 *Sma* Ⅰ 位点之间, 构建成的质粒称之为 pEGFP-GCIP, 它包含了完整的 GCIP 基因。其筛选和鉴定可通过 *Xho* Ⅰ 和 *Sma* Ⅰ 切下 GCIP 基因, 2.5%的琼脂糖凝胶电泳, 如在 180 bp 左右有条带则为阳性克隆, 见图 3。



1: Marker; 2~7: Plasmids

图 3　pEGFP-GCIP 酶切电泳图

Fig 3　Electrophoresis of pEGFP-GCIP plasmid after restriction analysis

2.3　pIVEX2.3MCS-GCIP 的构建

Xho Ⅰ 和 *Sma* Ⅰ 双酶切切下 GCIP 基因后, 插入 pIVEX2.3-MCS 质粒的 *Xho* Ⅰ 位点和 *Sma* Ⅰ 位点之间, 构建成的原核表达载体称为 pIVEX2.3MCS-GCIP。其筛选可通过 *Xho* Ⅰ 和 *Sma* Ⅰ 双酶切后, 2.5%的琼脂糖凝胶电泳, 如在 180 bp 左右有条带则为阳性克隆。筛选出的阳性克隆送上海生工生物工程技术服

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

务有限公司测序。测序结果与预期的完全相符。

3 讨论

心肌肥大是心肌细胞对多种病理刺激的共同应答,是指心肌细胞的体积增大而数量不变。在如高血压、瓣膜病、急性心肌梗死、先天性心脏病及运动性压力负荷增加等血液流变学变化及内皮素、血管紧张素Ⅱ、儿茶酚胺类、转化生长因子β、白介素-1等体液内分泌物质刺激时均能导致心肌肥大,因此发病率极高[1]。在疾病初期心肌肥大有一定的代偿作用,但随着病情发展由心肌肥大引起的肌纤维重构排列紊乱、心肌收缩功能障碍等导致心功能下降,进一步发展为心力衰竭,由心肌肥大而心衰,由心衰而死亡,是上述临床病人的主要死亡原因之一。因此,探索治疗和控制心肌肥大的特异性有效药物不仅是当今世界科学家们面临的主题和研究热点之一,也是我国医学领域亟待解决的重要课题。已有研究表明,无论是血液流变学变化引起的牵张刺激或是体液内分泌物质的刺激(疾病时互为因果),几乎均是通过相应受体及其受体后信号转导过程而诱导心肌肥大、间质纤维化等病理反应[6]。基于这一新的研究发现,人们针对其发病的某一因素如试用内皮素拮抗剂、血管紧张素转化酶抑制剂等进行治疗[7],发现有一定作用。但因素、受体众多,使得疗效仍非常有限。因而,从更深层次开拓特异性防治药物十分必要。

细胞内的信号转导通路是胞外刺激与致心肌肥大的核内基因活化的偶联环节。信号转导过程中G蛋白起着至关重要的作用。G蛋白是由alpha、beta及gamma 3个亚基构成的异三聚体GTP结合蛋白,在内皮素、血管紧张素Ⅱ、去甲肾上腺素等G蛋白偶联受体信号跨膜转导、信号放大及其实现对细胞功能的调控中起着"分子开关"的关键作用[8,9]。研究表明,高血压大鼠心肌肥大时,出现G alpha含量增加和功能增强;内皮素、血管紧张素等G蛋白偶联受体拮抗剂能一定程度地抑制压力负荷所造成的心肌肥大;心肌过量表达G alpha的小鼠发生心肌肥大[10]。上述结果表明,G alpha是介导多种因素导致心肌肥大的关键信号元件。新近报道G alpha的竞争性抑制肽(GCIP)在转基因实验动物模型上,对手术逆向主动脉缩窄模型的心肌肥大及内皮素、血管紧张素Ⅱ等刺激的MAPK活性改变均具有很好的治疗效果[2~5,11],且在试验过程中未观察到任何毒副反应,因此成为极有希望的抗心肌肥大新型药物,而具有广阔的研发应用前景。

由于目前还未见关于GCIP的体外表达及表达载体的报道,本研究分析GCIP基因内仅有一个半胱氨酸,分子内没有二硫键,且未见其分子需要糖基化或磷酸化的报道,故可选用原核表达系统。RTS500(Rapid Translation System)是美国Roche公司新近研制成功的一种快速高的体外翻译系统,它利用*E. coli*的细菌裂解液中加入T_7 RNA聚合酶,在提供各种核苷三磷酸、氨基酸、转录因子及能量等的支持下,当加入T_7启动子控制下表达质粒时,可高效的转录和翻译出目的蛋白。RTS500试剂盒中提供的pIVEX系列载体带有T_7启动子、RBC(核糖体结合位点)、起始密码子及克隆用的MCS(多克隆位点)等转录和翻译必须的条件;另外的MCS的3′端还编码有6个连续的组氨酸,可以用于纯化的鉴定。故本实验选择RTS500系统作为GCIP的表达系统。对于目的基因序列的获取,较短的可用化学合成的方法,而对于大多数较长的多采用PCR扩增的扩增的方法。化学合成DNA时,一般的DNA合成仪仅能合成120 bp以下的寡核苷酸,而且合成的核苷酸越长其效率就越低,出错的几率也越大。因为GCIP基因全长仅168 bp,加上酶切位点等约为180 bp左右,考虑到经济、操作方便及可靠性等因素我们选择了分二段(4条)合成,再先后克隆入表达载体的方法。构建了pIVEX2.3MCS-GCIP表达质粒,其含有完整的GCIP基因,并处于T7启动子的控制之下。使其能在采用T7启动子的原核表达系统下表达GCIP多肽,这为进一步进行GCIP多肽的表达和纯化及抗心肌肥大生物活性的研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Copper G 4th. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms[J]. Annu Rev Med, 1997, 48: 13-23.

[2] Scheuer J. Catecholamines in cardiac hypertrophy[J]. Am J Cardiol, 1999, 83(12A): 70H-74H.

[3] Akhter S A, Luttrell L M, Rockman H A, *et al*. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit *in vivo* pressure overload myocardial hypertrophy[J]: Science, 1998, 280(5363): 574-577.

[4] Eckhart A D, Duncan S J, Penn R B, *et al*. Hybrid transgenic mice reveal *in vivo* specificity of G protein-coupled receptor kinases in the heart[J]. Circ Res, 2000, 86(1): 43-50.

[5] Zolk O, Kouchi I, Schnabel P, *et al*. Heterotrimeric G proteins in heart disease[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2000, 78(3): 187-198.

[6] Aoki H, Sadoshima J, Izumo S. Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy *in vitro*[J]. Nat Med, 2000, 6(2): 183-188.

[7] Sutsch G, Brunner U T, von Schulthess C, *et al*. Hemodynamic performance and myosin light chain-1 expression of the hypertrophied left ventricle in aortic valve disease before and after valve replacement[J]. Circ Res, 1992, 70(5): 1035-1043.

[8] Gupta M, Zak R. Reversibility of bad-induced changes in myosin heavy chain gene expression[J]. Am J Physiol, 1992, 262(3 Pt 2): R346-R349.

[9] Chien K R, Knowlton K U, Zhu H, *et al*. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response[J]. FASEB J, 1991, 5(15): 3037-3046.

[10] Morgan H E, Baker K M. Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence[J]. Circulation, 1991, 83(1): 13-25.

[11] Rapacciuolo A, Esposito G, Prasad S V, *et al*. G protein-coupled receptor signalling *in vivo* cardiac overload[J]. Acta Physiol Scand, 2001, 173(1): 51-57.

(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net