DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.014
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
118 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)02-0118-04

hOP-1全长基因克隆及真核表达载体的构建

岳 玲[1],史俊南[2],柴玉波[3],孙叶方[2],荫 俊[4],文玲英[2] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所口腔科,重庆 400042;第四军医大学:[2]口腔医学院牙体病科,[3]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,西安 710032;[4]军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

提 要:目的 证实人牙乳头细胞中OP-1的表达,获得hOP-1全长基因及其高效真核表达载体。方法 提取人牙乳头细胞总RNA,反转录合成cDNA,以特异性引物扩增hOP-1全长基因并克隆入T载体,筛选阳性克隆进行序列测定后。构建高效真核表达载体pCI/OP-1并筛选鉴定。结果 PCR扩增得到一特异性的约1 300 bp的片段,序列测定结果表明与国外已发表的序列完全一致。构建的pCI/OP-1质粒,用于基因转染纯度较好。结论 人牙乳头细胞中首次克隆到hOP-1全长基因,并构建获得该基因高效真核表达载体。

关键词:hOP-1;全长基因;克隆;人牙乳头细胞;真核表达载体
中图法分类号:Q516;Q782;Q785 文献标识码:A

Cloning of hOP-1 full length gene and construction of its eukaryotic expression vector

YUE Ling[1], SHI Jun-nan[2], CHAI Yu-bo[3], SUN Ye-fang[2], YIN Jun[4], WEN Ling-ying[2] ([1]Department of Stomatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Department of Operative Dentistry and Endodontics, College of Stomatology, [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; [4]Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To clone the hOP-1 full length gene from human dental papilla mesenchymal cells for the construction of mammalian expression vector pCI/OP-1. Methods Total RNA was extracted from cultured human dental papilla mesenchymal cells, and the desired cDNA fragment was obtained by RT-PCR with two specific gene primers. The fragment was inserted into T vector, and the resulted plasmid was transformed into DH5. The positive clone was selected and sequenced. Then the gene was subcloned into pCI to construct mammalian expression vector. Results The 1 300 bp specific fragment was obtained. The sequence of the hOP-1 full length gene was consistent with that of the references published. The purified pCI/OP-1 vector was good for gene transfection. Conclusion The hOP-1 full length gene has been cloned from human dental papilla mesenchymal cells for the first time, and the construction of its mammalian expression vector has been obtained. The results have provided basis for the further studies of the roles of OP-1 in tooth development as well as the functions of hOP-1.

Key words: hOP-1; full length gene; clone; human dental papilla mesenchymal cell; mammalian expression vector

成骨蛋白-1(osteogenic protein-1, OP-1)又称骨形成蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7),是转化生长因子(TGF-β)超家族成员之一,具有高效骨诱导活性,可促进骨、软骨,牙本质等硬组织的形成及缺损的修复[1]。有关OP-1的功能和作用国外学者研究较多。但由于天然来源的OP-1含量极低,获得有活性的OP-1蛋白难度较大,使OP-1的作用、研究及应用受到了很大的限制,为了进一步证实OP-1参与人牙齿的发育和钙化,同时通过真核细胞转染获得良好活性的OP-1蛋白,我们采用扩增高GC含量的PCR试剂盒,从人牙乳头细胞中扩增出OP-1全长cDNA基因,测定核苷酸序列,构建pCI/OP-1真核表达载体,为在哺乳动物细胞中表达人OP-1创造了前提条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株质粒,工具酶 载体pGEM-5zf(-)、宿主菌DH5α、表达载体pCI(军事医学科学院五所);*Nhe*Ⅰ、*Xba*Ⅰ、*Sal*Ⅰ、*Eco*RⅠ(TaKaRa);T4 DNA连接酶(TaKaRa)。

1.1.2 主要试剂 细胞培养DMEM、总RNA提取细胞裂解

作者简介:岳 玲(1963-),女,河北省邯郸市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事牙体牙髓病生物学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757368

收稿日期:2003-02-01;修回日期:2003-05-10

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

液(GIBCO); 胎牛血清、胶回收试剂盒(HyClome); 质粒提取试剂盒(Promega); SuperScriptTM Ⅱ 反转录试剂盒(GIBCO); 高 GC 含量 PCR 试剂盒(CLONTECH) 质粒小量纯化试剂盒(QIAgen)。

1.1.3　引物设计　　扩增 hOP-1 全长基因引物末端引入酶切位点, 大连宝生物公司合成。

引物 1　5′-CTAGCTAGCATGCACGTGCGCTCACT-3′

引物 2　5′-GCTCTAGATTAGTGGCAGCCACAGGC-3′

1.2　方法

1.2.1　人牙乳头细胞的获取及培养　　人牙乳头细胞来源于正常合法引产的 5 月胎儿, 无菌条件下, 暴露切开牙槽粘膜, 在相应处挖取乳前牙和乳磨牙牙乳头, 采用常规组织块培养法, 进行牙乳头细胞原代培养、鉴定, 取培养第 4 代细胞用于实验。

1.2.2　总 RNA 提取　　收集 1× 10^6 个第 4 代人牙乳头细胞, 按试剂盒说明提取总 RNA, 对所提 RNA 电泳鉴定及用分光光度法进行纯度和含量检测。

1.2.3　反转录合成 cDNA 第 1 链　　按照 GIBCO 公司 SuperScriptTM Ⅱ 反转录试剂盒说明, 将所提的人牙乳头细胞总 RNA 反转录为 cDNA 第 1 链。

1.2.4　PCR 扩增目的片段　　根据以上反转录获得的 cDNA 第 1 链, 用所设计的 1 对 hOP-1 基因全长段引物, 按 CLONTECH 公司的高 GC 含量 PCR 试剂盒说明, 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 95 ℃变性 1 min, 95 ℃ 15 s, 53 ℃ 60 s, 72 ℃ 90 s, 35 个循环, 72 ℃延伸 50 min。将 PCR 产物电泳鉴定后, 按凝胶回收试剂盒说明对含目的 DNA 片段的凝胶进行回收、纯化。

1.2.5　T 载体的制备　　pGEM-5zf(-)质粒常规 *Eco*R Ⅴ酶切后回收, 加入 100 mol/LdTTP 1 μl, Taq 酶 2 U, 72 ℃ 1 h, 电泳、凝胶回收纯化。

1.2.6　核苷酸序列分析　　在 T4DNA 连接酶的作用下, 将回收纯化的 PCR 目的片段与 T-载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 挑取转化生长的菌落, 提取质粒, 对所提质粒用 *Nhe* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将酶切和 PCR 扩增鉴定的阳性克隆提取质粒, 进行全自动序列测定。

1.2.7　表达载体的构建、细菌转化和克隆筛选鉴定　　将测序正确的 T/OP-1 和 pCI 表达载体分别用 *Nhe* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 酶切、电泳和回收, 以 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化 DH5α, 随机挑取转化生长的菌落, 提取质粒, 用 *Nhe* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 及 *Eco*R Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 进行双酶切鉴定。

1.2.8　真核细胞转染质粒的提取　　提取质粒按 QIAGEN 小提质粒试剂盒操作步骤进行。紫外分光光度计测定含量和纯度。自以下步骤开始均需无菌操作, 即异丙醇沉淀 DNA, 10 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 加 1 ml 70% 乙醇, 离心去除乙醇, 置无菌超净台干燥, 用 50 μl 无菌水重悬 DNA, －20 ℃保存备用。

2　结果

2.1　总 RNA 提取

将所提取的人牙乳头细胞总 RNA 电泳, 见图 1, 可见 28 S, 18 S 和 5 S 3 条带, 分光光度法测定 A_{260}/A_{280} = 1.849, 表明所获得的总 RNA 无明显的降解且有较高的纯度。

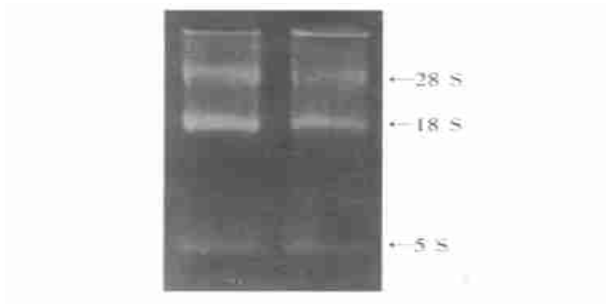
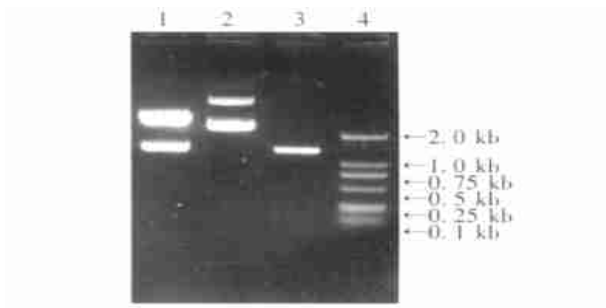


图 1　总 RNA 的琼脂糖凝胶

Fig 1　Agarose elecrophoresis of total RNA

2.2　RT-PCR

人牙乳头细胞总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 行琼脂糖凝胶电泳, 可见大小约 1 300 bp 的特异性扩增产物, 见图 2。



1: Identification of recombinant plasmid; 2: T/OP-1 plasmid; 3: PCR fragment; 4: DL2000 Marker

图 2　重组质粒的酶切鉴定

Fig 2　Identification of recombinant plasmid with enzyme digestion

2.3　T/OP-1 克隆与鉴定

PCR 片段与 T 载体连接转化后, 提取质粒酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳见大小约 1 300 bp 的电泳带。

2.4　序列分析

将 T/OP-1 基因重组质粒进行核苷酸序列测定, 结果与已发表的来源于人胚胎组织 cDNA 文库的 OP-1 全长基因序列完全一致。

2.5　pCI/OP-1 表达载体的构建

将测序正确的 T/OP-1 和 pCI 分别用 *Nhe* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 酶切, 回收目的片段。在 T4DNA 连接酶的作用下, 将回收纯化的目的片段与 pCI 表达载体连接, 构建示意图见图 3。

2.6　pCI/OP-1 表达载体的酶切鉴定

OP-1 目的片段与 pCI 表达载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 随机挑取转化生长的菌落, 提取质粒, 对所提质粒用 *Nhe* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 及 *Eco*R Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 进行双酶切, 电泳鉴定, 见图 4。

2.7　真核细胞转染质粒提取

质粒 pCI/OP-1 经高质量 QIAGEN 小提质粒试剂盒提取纯化后, 紫外分光光度计检测纯度, 其 A_{260}/A_{280} 的比值为 1.80, 说明提取纯化的质粒较好, 基本无蛋白、RNA 及酚的污染, 可用于基因转染。

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

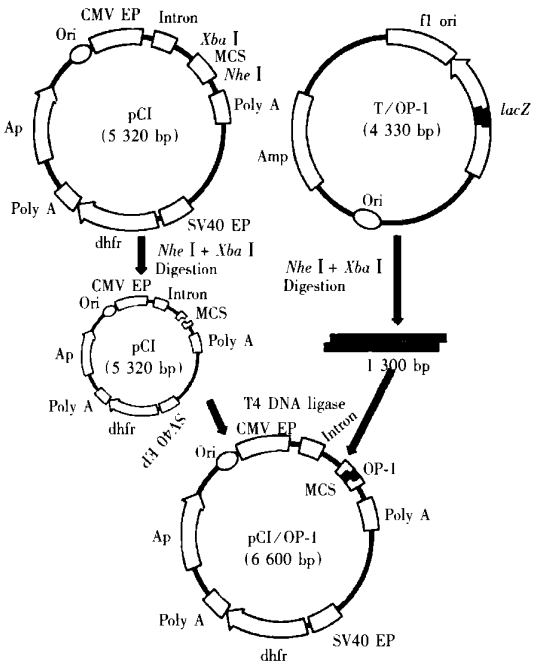
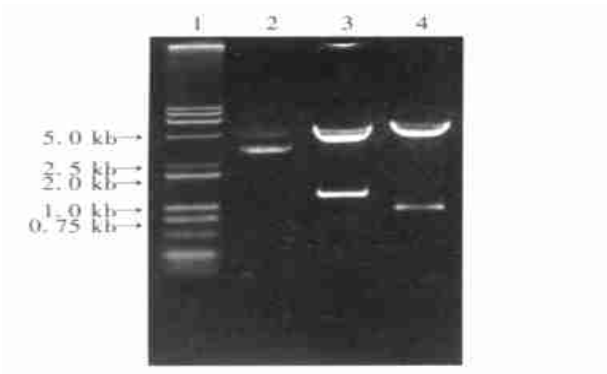


图 3 pCI/OP-1表达载体的构建示意图

Fig 3 Scheme for the construction of pCI/OP-1 expression vector



1: DNA Marker; 2: pCI/OP-1 expression vector; 3: Identification with *Nhe* Ⅰ and *Xba* Ⅰ; 4: Identification with *Eco* RⅠ and *Sal* Ⅰ

图 4 pCI/OP-1表达载体的酶切鉴定

Fig 4 Identification of pCI/OP-1 expression vector with enzyme digestion

3 讨论

OP-1具有很强的骨诱导作用，无种属特异性地诱导未分化间充质细胞、骨祖细胞向成软骨细胞、成骨细胞分化，能促进各种骨、软骨缺损的修复和重建，促进修复性牙本质、牙骨质的形成，参与神经保护和调节作用等[1~3]，OP-1广泛分布于胚胎的心、脑、肾、骨骼及胎盘等组织[4]，对胚胎的发育起着重要的调节作用，具有十分乐观的临床应用前景。受到了广大学者的青睐，在它的功能和作用方面做了大量的研究，为使OP-1从研究推向临床应用，有取之不尽的、具有高活性的OP-1蛋白，通过基因工程手段获得具有生物活性的OP-1蛋白是目前唯一可行的途径。

由于具有功能活性的OP-1是二硫键连接的二聚体糖蛋白，通过原核表达的OP-1，虽然产量较高，但纯化复杂，经变性和复性处理的OP-1，常常会对活性产生较大的影响。因此，为获得良好活性的OP-1，真核表达系统，尤其是哺乳动物细胞表达系统，才是OP-1的最佳表达体系[5]。Ozkaynak报道[6]，OP-1的cDNA全长1 878 bp，基因开放阅读框为1 296 bp，基因序列中GC含量很高，占基因序列的70 %以上，转录成mRNA后极易形成复杂的二级结构，并有多个外显子。采用常规PCR方法，获得OP-1的全长基因比较困难。国外通常构建cDNA文库，合成寡核苷酸探针，进行文库筛选，获得OP-1的cDNA序列[7]。本研究在人胚胎牙乳头细胞中成功地克隆了人OP-1成熟肽基因的基础上，提取高纯度总RNA，通过对PCR反应条件的反复摸索，在特定的反应条件下，获得了大约1 300 bp的特异性扩增片段，将所获产物进行了克隆和核苷酸序列测定，结果表明hOP-1 cDNA序列正确，未发现变异。这一结果进一步证实了胚胎人牙乳头细胞中有OP-1基因的表达，而且十分保守(黄种人和白种人中序列完全一致)。OP-1在人牙胚发育中可能起到一定的调节作用，参与了人牙乳头细胞向成牙本质细胞分化及牙本质的形成的过程。同时还提示我们，虽然OP-1的DNA序列有一定的特殊性，针对其自身的特点，进行操作和条件的改进，一次性PCR是可以成功的。

由于原核系统表达真核蛋白存在很多困难，为了获得一些具有生物活性的哺乳动物蛋白，人们致力于发展真核表达系统，使生物活性蛋白得到大量生产成为可能。真核表达系统有它独特的基因调控机制、表达载体、宿主细胞、特有的细胞转染及筛选方式等等[8]。为了有效的在真核细胞表达OP-1活性蛋白，保证真核转染质粒的准确性、无菌和高纯度是转染的前提条件。我们将获得的OP-1全长基因，插入pCI真核表达载体，经酶切鉴定，证实所构建的表达载体与预期结果一致，可以用作真核细胞的转染。随后采用QIAGEN公司的高纯度质粒提取试剂盒，无菌条件下提取转染用pCI/OP-1质粒，为有效转染提供了质量保证。

实验首次通过一次性PCR获得hOP-1全长基因，构建并获得无菌、高纯度hOP-1真核表达载体，为进一步探讨人全长OP-1基因在哺乳动物细胞的高效表达，获得人重组OP-1，促进OP-1的实验研究、临床应用及基因工程药物的开发奠定了基础。

参考文献：

[1] Chen X Q, Kidder L S, Lew W D, *et al*. Osteogenic protent-1 induced bone formation in an infected segmental defect in the rat femur[J]. J Orthop

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

Res, 2002, 20(1): 142－150.
[2] Rutherford B, Spangberg L, Tucker M, *et al*. Transdentinal stimulation of reparative dentine formation by osteogenic protein-1 in monkeys[J]. Arch Oral Biol, 1995, 40(7): 681－683.
[3] Giannobile W V, Ryan S, Shih M S, *et al*. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class Ⅲ furcation defects[J]. J Periodontol, 1998, 69(2): 129－137.
[4] Helder M N, Ozkaynak E, Sampath K T, *et al*. Expression pattern of osteogenic protent-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development[J]. J Histochem Cytochem, 1995, 43(10): 1035－1044.
[5] Wang E A, Wozney J Y, Rosen V A, *et al*. Osteoinductive compositions [J]. PCT, 1990, 90(11): 366.
[6] Ozkaynak E, Rueger D C, Drier E A, *et al*. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family[J]. EMBO J, 1990, 9(7): 2085－2093.
[7] Celeste A J, Iannazzi J A, Taylor R C, *et al*. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(24): 9843－9847.
[8] Kaufman R J. Vectors used for expression in mammalian cells[J]. Methods Enzymol, 1990, 185: 487－511.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)02-0121-02

个案与短篇

空腹血清甘油三酯正常的老年人脂肪餐后血脂水平的动态观察

Dynamic observation of postprandial lipid levels in old people with normal fasting triglyceride

李国秧[1]，阳 萍[2]，邓小玲[2]，周维芝[2]，幸贵邦[2]（重庆医科大学附属第一医院：[1] 神经内科研究所，[2] 检验科，重庆 400016）

近年来国外研究已表明血脂致动脉粥样硬化(AS)是一种餐后现象，特别是餐后甘油三酯及富含甘油三酯的脂蛋白，因此餐后高血脂的研究将成为研究热点，也可能成为心脑血管疾病一个新的预测指标。为探讨老年期的餐后血脂水平的动态变化，本实验通过脂肪耐量试验(FTT)对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

被研究者均为自愿受检者，无高血压、冠心病、肝病、脑梗塞、糖尿病、肾病等病史，空腹甘油三酯(TG)≤1.70 mmol/L。老年组：30 人，平均年龄 65.9 岁，对照组：30 人，平均年龄 39.5 岁。

1.2 研究方法

1.2.1 脂肪餐 脂肪餐采用国外标准，并结合中国人的饮食习惯，100 g 猪油，2 个鸡蛋，100 g 米饭。

1.2.2 标本采集 禁食 12 h 取静脉血；脂肪餐后(15 min 内吃完)2、4、6、8 h 分别抽取静脉血标本，其间可少量饮水，标本于当日测定。

1.2.3 测定方法 甘油三酯(TG)：甘油三酯磷酸氧化酶法(GPO)，总胆固醇(TC)：胆固醇氧化酶法(CHOD)，高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)，低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)：选择性遮蔽酶法(直接测定法)。

1.2.4 甘油三酯曲线下面积(TG-AUC)[1] TG-AUC＝2(TG2 h＋TG4 h＋TG6 h＋TG8 h)-7TG 空腹，该指标为脂肪餐后血清 TG 变化的总指标，反应 TG 廓清速率。

2 结果

2.1 空腹及脂肪餐后 TG 水平的动态变化

表 1 结果显示老年组和对照组餐后各时间点的 TG 都高于空腹 TG，差别有非常显著性意义($P<0.01$)。老年组空腹、餐后 4、6、8 h 的 TG 都显著高于对照组($P<0.05$)。餐后 TG 达峰情况和 8 h 的恢复情况见表 1、2。

表 1 空腹及餐后血脂结果比较(mmol/L，$\bar{x}\pm s$)

	组别	空腹	餐后 2 h	餐后 4 h	餐后 6 h	餐后 8 h
TC	老年组	4.91±0.63	0.71±0.66	4.65±0.66	4.81±0.69	4.87±0.67
	对照组	0.72±0.68	4.58±0.70	4.56±0.69	4.70±0.74	4.72±0.69
TG	老年组	1.19±0.34#	2.26±0.80***	3.12±1.22***#	2.50±1.65**#	2.09±1.15**#
	对照组	0.94±0.22	2.22±0.66***	2.30±1.06***	2.04±0.92***	1.43±0.37***
HDL	老年组	1.52±0.30	1.38±0.31	1.43±0.31	1.45±0.33	1.57±0.31
	对照组	1.52±0.29	1.42±0.32	1.46±0.32	1.46±0.33	1.56±0.30
LDL	老年组	2.85±0.60	2.63±0.62	2.67±0.61	2.70±0.60	2.82±0.64
	对照组	2.70±0.56	2.52±0.50	2.57±0.55	2.58±0.51	2.72±0.61

与空腹比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，***：$P<0.001$；与对照组比较，#：$P<0.05$

作者简介：李国秧(1950－)，男，上海市人，副主任技师，主要从事临床生化方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023) 89012278

收稿日期：2002-01-12；修回日期：2002-09-01

（下转 127 页）

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