

重组人骨形成蛋白-3 的克隆及其在大肠杆菌中的表达

陈亚兵 俞春东 温龙平 曾定

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 厦门 361005)

骨形成蛋白(Bone Morphogenetic Protein, BMP)是一类能诱导异位骨及软骨形成,并在动物的发育和分化中起作用的蛋白质^[1,2,3]。自 Urist 及其同事发现骨形成蛋白以来^[4],已对 8 种人的 BMP 进行了克隆,除 BMP-1 外^[5],BMP-2 至 BMP-8 均与 TGF- β 家族相关,它们能诱导细胞分化,促进骨、软骨及牙本质的形成^[1,6],并在发育、分化和形成过程中起重要作用。最新的研究认为 BMP-1 是一种胶原蛋白酶^[7],进一步揭示了 BMP 家族成员的生物学作用。人的 BMP-3 基因定位于第 4 染色体上,BMP-3 蛋白由 472 个氨基酸组成,包括 N 端的信号肽、中间的前肽及 C 端的成熟肽三部分。BMP-3 的 C 末端与 MBP-2A 及 BMP-2B 有 49% 的序列相同^[5]。本实验室曾检测了 BMP-3 和 BMP-5 在不同组织和细胞中的表达情况,发现它们在一些与骨形成无关的组织和细胞中均有表达,说明了 BMP 在动物和人中有着其他重要的作用^[8]。在此基础上,我们对 BMP-3 进行了克隆及在大肠杆菌中高效表达出 BMP-3-GST 融合蛋白,并用 Western 印迹证明了其活性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、细胞株及总 RNA:测序载体 pCRII 购自美国 Invitrogen 公司,表达载体 pGEX-2T 购自 Pharmacia 公司;人神经母细胞瘤 SK 细胞购自中科院上海细胞所,人的脑、肝、脾、胎盘、胸腺、睾丸的总 RNA 购自美国 Clontech lab. 公司。

1.1.2 引物合成:Bmp-3 专一性引物由美国 Cybersyn 公司合成。

1.1.3 化学试剂及酶类:PCR Kits 为美国 Amersham 公司产品,反转录系统、限制酶、T4DNA 连接酶购自美国 Promega 公司,其它药品及试剂为中国华美公司产品或国产 AR 级试剂。

1.2 方 法

1.2.1 反转录:SK 细胞的总 RNA 及人的脑、肝、脾、胎盘、胸腺、睾丸的总 RNA 用美国 Promega 公司的反转录系统将它们反转录成 cDNA 作为模板进行 PCR 反应。

1.2.2 PCR 法扩增 DNA 及其产物鉴定:PCR 反应条件 94 $^{\circ}$ C 30s, 45 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共进行 40 个循环,PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 基因操作技术和方法:质粒 DNA 提取纯化及从琼脂糖凝胶中分离 DNA 片段分别采用厦门 P&N 生物技术公司生产的“质粒 DNA 快速分离纯化试剂盒”及“DNA 片段快速回收试剂盒”,酶切、电泳连接、转化等常规分子生物学操作按文献[9]的方法进行。

1.2.4 核苷酸序列测定:采用 Sanger 末端终止法,在 ABI 373A DNA 测序仪上进行。

1.2.5 蛋白质的诱导表达:转化菌在含氨苄青霉素(100 μ g/ml)的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,按 10% 接种扩大培养,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ - 1.2,加入 IPTG 至终浓度 1mmol/ml,继续培养 2h。

本文于 1996 年 3 月 20 日收到。

1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):4℃离心收集菌体,用1XSDS上样缓冲液处理,100℃煮沸5min。12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝G-250染色。

2 结 果

2.1 PCR 扩增

利用BMP-3专一性引物,在脑、肝、脾、胎盘、胸腺、睾丸及SK细胞中扩增出一条与预期相符的0.3kb的片段,并在SK细胞中还扩增出一条0.8kb的片段(图1)。

2.2 PCR 产物的克隆及序列分析

从琼脂糖凝胶上将0.3kb的DNA片段回收与pCRII载体连接,转化大肠杆菌DH5α通过蓝/白筛选及EcoRI酶切鉴定,获得含0.3kb插入片段的质粒pCR-BMP-3(图2,3),序列分析表明插入片段序列与文献报道的bmp-3 cDNA序列相同。用EcoRI将bmp-3从pCR-BMP-3质粒上切下,克隆入表达载体pGEX-2T,转化大肠杆菌DH5α,通过酶切分析,获得能表达融合蛋白的菌株(图2,3)

2.3 BMP-3 cDNA 在大肠杆菌 DH5α 中的表达

含有pGEX-BMP-3的DH5α菌株经IPTG诱导表达后,用1×SDS上样缓冲液煮沸裂解菌体细胞,经12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,以经IPTG诱导和未诱导的空载体pGEX-2T转化菌及未经IPTG

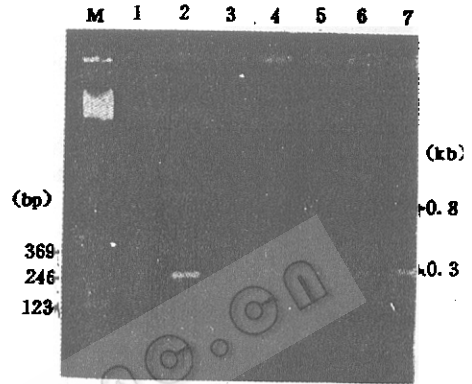


图1 PCR产物的电泳图谱 M.123bp DNA ladder, 1. Brain 2. Liver 3. Thymus, 4. Spleen, 5. Placenta 6. Testis 7. SK cell

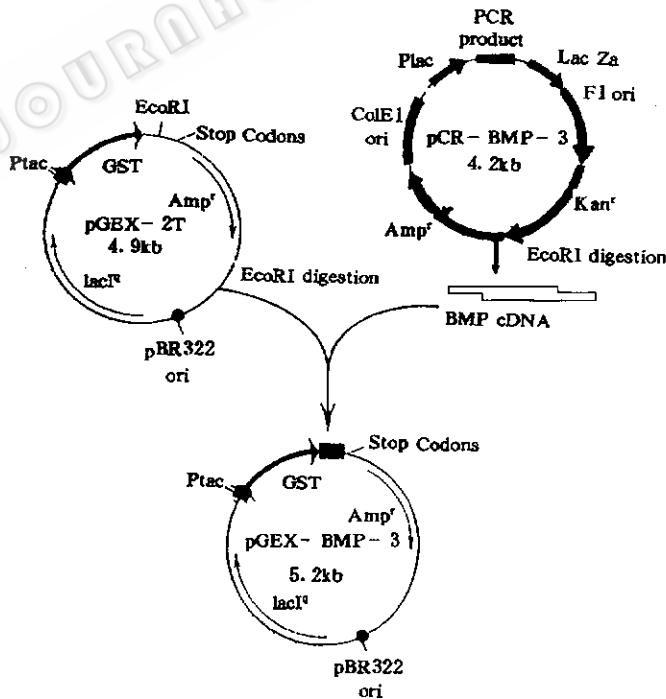


图2 质粒pCR-BMP-3和pGEX-BMP-3的构建

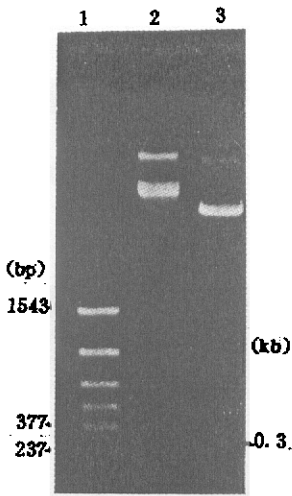


图3 质粒 pCR-BMP-3 和 pGEX-BMP-3 的琼脂糖凝胶电泳图

- 1.kb DNA ladder,
2. plasmid pCR-BMP-3.
3. pCR-BMP-3 + EcoRI,
4. plasmid pGEX-BMP-3,
5. plasmid pGEX-BMP5 + EcoRI

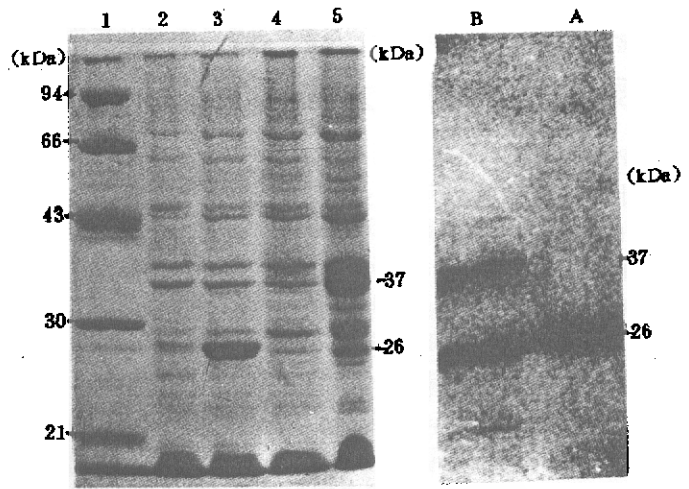


图4 GST-BMP-3 的 12% SDS-PAGE 及 Western 印迹图谱

- 1.Molecular Weight Marker; 2, 3. pGEX-2T; 4, 5. pGEX-BMP-3; 2, 4, A. GST; 3, 5, B. GST-BMP-3

诱导的 pGEX-BMP-3 转化菌为阴性对照,发现在分子量约 37kDa 处多一条非常明显的条带,而在 26kDa 处无明显的条带出现(图 4)。因空载体 pGEX-2T 转化菌经 IPTG 诱导后表达 26kDa 的谷胱甘肽硫转移酶(GST),而 0.3kb 的 BMP-3cDNA 表达的 BMP-3 成熟肽分子量约 11kDa,所以 GST-BMP-3 的分子量约 37kDa。Western 印迹分析亦进一步地证明了这一点。

3 讨论

人的骨形成蛋白-3 cDNA 编码的 BMP-3 前体由信号肽、前肽、成熟肽三部分组成,翻译后的前体需进一步加工修饰,包括切掉信号肽和前肽,才能成为有活性的蛋白。而大肠杆菌缺乏翻译后加工系统,因此 BMP-3 全长基因在大肠杆菌不能表达出有活性的蛋白。为了在大肠杆菌中能表达出有活性的蛋白,我们设计了编码 BMP-3 成熟肽的 cDNA 专一性引物,用 RT-PCR 方法直接克隆了编码 BMP-3 C 端不包括前肽部分的完整成熟肽基因,并在大肠杆菌中以融合蛋白的形式得到表达。这为我们研究 BMP 的生物学活性奠定了基础。以往的研究认为,肾、脑是 BMP 的主要产生位点,它能诱导异位的骨及软骨的形成。因而,BMP 在面部重建、骨折及骨裂的修复,治疗骨质疏松及牙病等方面有重大意义^[6]。另外,在许多与骨形成不相关的组织细胞 BMP 也有表达,显示 BMP 在发育过程中及成熟细胞中具有与骨形成不相关的作用。所以,我们对 BMP-3 进行了克隆和表达并进一步用 Western 印迹证明了其生物活性,为研究 BMP 的生物学功能及其临床应用提供了基础。

参 考 文 献

- [1]Wang E A *et al.*, *Tibtech*, 1993, 11: 13~16.
- [2]Wang E A *et al* *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1988, 85: 9484~9488.
- [3]Wang E A *et al* *Proc Natl Acad Sci. U S A.*, 1990, 87: 2220.
- [4]Urist M R *et al.*, *Science* 1965, 898~899.
- [5]Wozney J M *et al.*, *Science*, 1988, 242: 66.
- [6]Alper J, *Biotechnology* 1993, 11: 649.

[7] Kessler E *et al.*, *Science*, 1996, 271:360.

[8] 温龙平, 陈亚兵, 林旭等, *厦门大学学报*, 1996, 35:244~247.

[9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Laboratory Press, 1989.

Cloning and Expression of rhBMP-3 in *Escherichia coli*

Chen Yabing Yu Chundong Wen Longping Zeng Ding

(*State Lab. for Tumor and Cell Engineering in Xiamen University, Xiamen 361005*)

Abstract Here is shown the cloning and expression of BMP-3 cDNA in *E. coli*. Utilizing specific primers designed according to published sequences, a 0.3kb band was assessed in various human tissues, namely brain, liver, thymus, spleen, placenta and testis, as well as human neuroblastoma SK cells by RT-PCR. The 0.3kb fragment was inserted into pCRII vector and the sequencing result identified it the expected 288 bp BMP-3 cDNA. The expression of this BMP gene fragment was acquired by ligating it with pGEX-2T and transforming *E. coli*. The transformed *E. coli* yielded high level of BMP-3-GST fusion proteins. Furthermore, the activities of the fusion proteins was demonstrated by Western blotting.

Key words Bone morphogenetic protein-3, cloning, fusion proteins