

甲状旁腺素相关蛋白 cDNA 的克隆 及其在大肠杆菌中的表达*

刘红兵 熊卫东 安乃莉 姚立红 钊理强 张智清

(中国预防医学科学院 病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘 要 采用 RT-PCR 方法从中国人肾癌细胞株中克隆到甲状旁腺素相关蛋白(Parathyroid hormone related protein, PTHrP)cDNA, 其核苷酸序列与国外发表资料相比, 有 6 个核苷酸不同, 其中仅 92 位密码子的不同导致氨基酸变异, 即由脯氨酸变为丝氨酸。将克隆的 PTHrP cDNA 插到原核表达载体 pET-3a 的 T7 噬菌体启动子下游, 转化大肠杆菌后得到高效表达, 并经 Western blot 和生物学活性检测对表达产物作了鉴定。

关键词 甲状旁腺素相关蛋白, 克隆, 表达

分类号 Q753 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0332-36

甲状旁腺素相关蛋白(Parathyroid hormone related protein, PTHrP)最初是从伴有高钙血症的肿瘤病人体内发现的, 其分子量约 23kD, 由 141 个氨基酸组成^[1]。随着研究的不断深入, 发现 PTHrP 广泛存在于机体多种组织中, 以自分泌或旁分泌形式释放, 参与钙磷代谢、骨骼再生、组织分化等^[2]。在病理情况下, PTHrP 的异常表达与恶性肿瘤的骨转移有关, 并表现为机体的恶性高钙血症^[3]。最近有研究表明, PTHrP 可抑制血管平滑肌细胞的增殖, 起到调节血管张力和扩张血管作用, 因而可能为冠状动脉成形术后再狭窄的治疗提供新的手段^[4]; 还有报道给大鼠注射抗 PTHrP 单克隆抗体对大鼠乳腺癌的骨转移有抑制作用^[5]。但有关 PTHrP 的研究在国内尚属空白, 为进一步研究 PTHrP 与疾病的关系, 探讨针对性治疗途径, 我们从中国人的肾癌细胞中克隆了 PTHrP 的 cDNA, 并在大肠杆菌中得到高效表达。

1 材料和方法

1.1 质粒

pGEM-T 购于 Promega 公司, 可直接克隆 PCR 产物。pET-3a 为本室保存, 含有 T7 噬菌体启动子, 将目的基因插到该启动子下游, 用 IPTG 诱导表达。

1.2 细胞株

肾癌细胞株 GRC, 北京医科大学附属北大医院泌尿研究所提供; 用于生物学活性检测的 ROS17/2.8 细胞株由美国哈佛大学医学院 Juppner 教授提供。

* 国家高技术研究发展计划项目资助(No. 102-08-01-03)。

收稿日期: 1998-03-25, 修回日期: 1999-04-26。

1.3 细胞总 RNA 的提取

采用一步酸酚法, 参阅文献[6]。收集 10^6 细胞悬浮于 0.1 mL 变性液 (40 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 枸橼酸, 0.5% 十二烷基肌酸钠, 0.1 mol/L 2-巯基乙醇) 中, 依次加入 2 mol/L pH 4.0 醋酸钠 0.1 mL, 1 mL 酸酚及 0.2 mL 氯仿/异戊醇, 离心后, 将上清重复抽提 1 次, 用 2.5 倍无水乙醇低温沉淀 RNA。

1.4 cDNA 的合成及 PCR 反应

逆转录反应体积为 20 μ L, 含细胞 RNA 1 μ L, PTHrP 下游引物 1 μ L, 10 \times 逆转录 Buffer 2 μ L, 50 mmol/L MgCl₂ 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 0.1 mol/L DTT 2 μ L, MLV 逆转录酶 1 μ L, 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 70 $^{\circ}$ C 10 min 终止反应。以上述产物为模板进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μ L, 含 10 \times Buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 3 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 反转录产物 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 μ L (3u)。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 45 s, 65 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5 PCR 产物的克隆

将 PCR 产物纯化后与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 菌后, 在含 X-gal 及 IPTG 的平板上培养, 挑选白色菌落, 经快提质粒及酶切鉴定后获得阳性克隆。

1.6 核苷酸序列的测定

将上述阳性克隆制备质粒作模板, 采用荧光标记的双脱氧链终止法, 在 ABI 377 型自动 DNA 测序仪上测定核苷酸序列。

1.7 PTHrP 在大肠杆菌中的表达

用 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶消化回收不含信号肽的 PTHrP cDNA, 连接到同样酶消化的质粒 pET3a 上, 转化宿主菌 DH5 α 。筛选出阳性克隆后, 再提取质粒转化宿主菌 BL21 (DE3)。接种单个菌落到 LB 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 $OD_{600nm} \approx 0.6$, 加入 IPTG 至终浓度 1 mol/L, 继续培养 2~6 h。

1.8 SDS-PAGE 及 Western blot

将菌体或其它样品溶于 SDS-PAGE 样品缓冲液, 上样到 15% 分离胶和 3% 浓缩胶, 恒压 150 V 电泳约 1 h, 然后用考马斯亮蓝染色, 或在 Bio-Rad 电转仪上将蛋白转移到硝酸纤维膜, 低温恒压 80 V 4 h。将膜置 10% 脱脂奶中 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后, 依次与抗 PTHrP (1-34) 单克隆抗体及 HRP 标记的抗鼠 IgG 反应, 4-氯-1-萘酚显色。

1.9 生物学活性检测

ROS 17/2.8 细胞用 F12 培养基在 24 孔板培养成片后, 将不同浓度的 PTHrP 加入到 1 mL 含 0.2 mmol/L IBMX 的 F12 培养基中, 刺激 COS 17/2.8 细胞 5 min。吸出培养基以终止反应, 用 0.5 mL 1-正丁醇抽提 cAMP, 然后用放射免疫法检测^[7]。

2 结 果

2.1 引物的设计

我们根据国外发表的 PTHrP 核苷酸序列^[8], 设计了 3 条引物, 其序列为:

P1: 5'-TAGGATCCACGATGCAGCGGAGACTG-3'

P2: 5'-TACATATGGCTGTGTCTGAACAT-3'

P3:5'-TAGGATCCTTATCAATGCCTCCGTGAATC-3'

用 P1 和 P3 为引物可扩增包括信号肽的全基因序列, 而用 P2 和 P3 则可扩增成熟蛋白的基因序列。为了克隆方便, 在 P1 和 P3 的 5' 端加了 *Bam*HI 识别序列, 在 P2 的 5' 端加了 *Nde*I 识别序列。这样, 以 P2, P3 为引物扩增的 PCR 产物可以方便地插到 pET-3a 的 *Nde*I 与 *Bam*HI 之间。

2.2 PTHrP cDNA 的克隆与鉴定

采用酚法从 GRC 细胞提取总 RNA, 用 PTHrP 下游引物(P3)作反转录, 再以所得到的 cDNA 为模板, 用 P1, P3 两个引物扩增出约 0.53kb 片段, 命名为 PTHrP(a); 用 P2, P3 两个引物扩增出 0.43kb 片段, 命名为 PTHrP(b)。二个片段大小分别与带信号肽和不含信号肽的 PTHrP 基因相符。

将上述两种 PCR 产物分别与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 宿主菌, 在含 IPTG 及 X-gal 的平板上筛选白色菌落, 快提质粒酶切鉴定, 获得阳性克隆 pGEM-T/PTHrP(a) 和 pGEM-T/PTHrP(b)。分别挑单菌落活化提取双链模板, 以通用引物双向测序, 得到全核苷酸序列。我们所克隆的 PTHrP 基因全长为 534 个碱基, 编码 177 个氨基酸。与国外发表序列相比, 有 6 个碱基不同, 导致相应的密码子变化情况如下: 29 位 GGT \rightarrow GGG, 92 位 CCC \rightarrow TCC, 93 位 GTC \rightarrow GTG, 95 位 TTT \rightarrow TTC, 108 位 ACT \rightarrow ACC, 122 位 CCT \rightarrow CCC, 其中 92 位密码子的不同导致氨基酸变异, 即由脯氨酸变为丝氨酸, 其余没有导致氨基酸序列改变。

2.3 PTHrP 原核表达载体的构建

将 pGEM-T/PTHrP(b) 用 *Nde*I + *Bam*HI 双酶解, 回收目的基因片段。将其与用同样酶处理的表达载体 pET-3a 连接, 转化宿主菌 DH5 α , 经快提质粒酶切鉴定后筛选出阳性克隆。重组质粒 pET-3a/PTHrP 的结构见图 1。

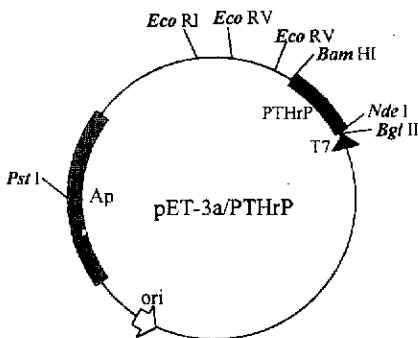


图 1 pET-3a/PTHrP 的结构图

Fig. 1 Structure of pET-3a/PTHrP

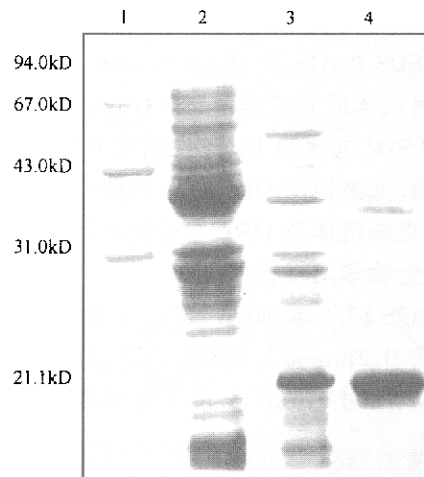


图 2 PTHrP 在大肠杆菌中表达产物的电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis of PTHrP expressed in *E. coli*

1. Molecular weight standards; 2. Non-induced; 3. IPTG-induced; 4. Inclusion body

2.4 PTHrP 在大肠杆菌中的表达及免疫学检测

提取重组质粒 pET-3a/PTHrP, 转化宿主菌 BL21(DE3), 得到表达菌株。挑取单菌落活化过夜后, 1:40 转种, 继续在 37°C 摇床培养 2~3h。加 IPTG(终浓度为 1mmol/L)诱导表达, 6h 后收集菌液离心, 超声后离心收集包涵体。将未诱导和诱导的菌体及包涵体分别溶于蛋白电泳样品缓冲液, 煮沸后作 SDS-PAGE。考马斯亮蓝染色的结果见图 2。可以看到, 诱导后的细菌在分子量 23kD 处有一条明显的蛋白表达带, 该表达产物主要以包涵体形式存在。将 SDS-PAGE 分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 封闭后依次与抗 PTHrP(1-34)单克隆抗体及 HRP 标记的抗鼠 IgG 反应, 以 4-氯-1-萘酚为显色底物, 结果见图 3。

由图可见, 考马斯亮蓝染色的胶上所见的表达条带分子量与 Western blot 的反应条带大小一致, 证实表达产物为 PTHrP。

2.5 PTHrP 生物学活性检测

收集经 IPTG 诱导的 pET-3a/PTHrP 表达菌体, 超声后离心收集包涵体, 7mol/L 盐酸胍裂解后稀释复性, 然后加入 ROS17/2.8 细胞的培养基中, 用 PBS 作阴性对照。测定 ROS17/2.8 细胞内 cAMP 含量, 可反映 PTHrP 活性。结果见图 4, 可以看到不同浓度的重组 PTHrP 刺激 ROS17/2.8 细胞后使 cAMP 水平明显升高。表明大肠杆菌生产的 PTHrP 具有天然分子的生物学活性。

3 讨 论

本研究根据国外发表的人 PTHrP cDNA 序列, 采用 RT-PCR 方法, 从中国人肾癌细胞株中克隆出一段长约 0.53kb 的核苷酸片段, 将该产物插入 pGEM-T 载体作序列测定。

与已发表的序列相比, 共有 6 个核苷酸发生改变。但仅第 92 位密码子的变化导致氨基酸的改变, 即由脯氨酸变为丝氨酸, 这两种氨基酸均属于小氨基酸, 而脯氨酸在蛋白质的高级结构中不能形成螺旋和折叠, 该氨基酸改变的影响尚待进一步研究。

为明确序列的差异不是由于 PCR 或者测序的错误所致, 我们采用下述方法排除: 1. 进

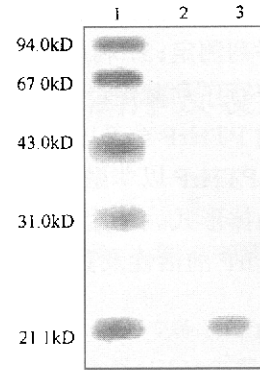


图 3 表达产物的 Western bolt 鉴定
Fig.3 Western blot of expression product
1. Molecular weight standards; 2. Non-induced;
3. IPTG-induced

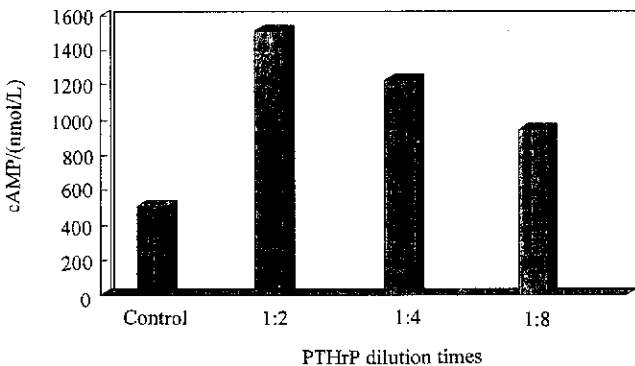


图 4 重组 PTHrP 的生物学活性
Fig.4 Biological activity of rhPTHrP

行两次 RT-PCR, 两次产物分别克隆到 pGEM-T 中; 2. 每批连接产物各挑两个阳性克隆, 分别进行序列测定; 3. 利用片段两侧的通用引物或自己设计合成的特异引物, 从两端对同一克隆进行序列测定。

在明确 PTHrP 全基因序列后, 我们将 PTHrP 成熟蛋白的基因导入原核高效表达载体 pET-3a, PTHrP 以非融合形式得到高效表达, 表达量达菌体总蛋白的 20% 以上, 表达产物为包涵体形式。经盐酸胍裂解后复性, 得到了具有生物学活性的产物。本文为进一步研究 PTHrP 的活性及其与疾病的关系奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] W. J. Burtis, T. Wu, C. Bunch *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**:7151.
- [2] AJP. Yates, G. E. Gutierrez, P. Smolens *et al.* *J. Clin. Invest.*, 1988, **81**:932~938.
- [3] G. J. Powell, J. Southby, J. A. Danks *et al.* *Cancer Res.*, 1991, **51**:3059.
- [4] S. Jono, H. Koyama, A. Shioi *et al.* *J. Bone. Min. Res.*, 1994, **1s**:s183. Abstract.
- [5] T. A. Guise, J. J. Yin, S. D. Taylor *et al.* *J. Clin. Invest.*, 1996, **98**(7):1544~1549.
- [6] 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1990.
- [7] J. Green, C. R. Kleeman, S. Schotland *et al.* *Endocrinology*, 1991, **129**:848~858.
- [8] M. Marguerite, C. Andrew Webb, E. D. Barnara, *et al.* *PNAS.*, 1988, **85**:597~601.

Cloning of a cDNA Encoding Parathyroid Hormone Related Protein and Its Expression in *Escherichia coli**

Liu Hongbing Xiong Weidong An Naili Yao Lihong Dou Liqiang Zhang Zhiqing

(State Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering,
Institute of Virology, CAPM, Beijing 100052)

Abstract cDNA encoding parathyroid hormone related protein (PTHrP) was cloned from Chinese renal carcinoma cells by RT-PCR. Comparison with the published data, six nucleotides are changed, but only one changed nucleotide resulted in the change of relevant amino acid (Pro to Ser). The PTHrP cDNA was inserted into the expression vector pET-3a and expressed in *E. coli*. A 23kD protein is expressed which accounts for more than 20% of total cell protein. The expression product is present as inclusion body and has been characterized by Western blot and biological assay.

Key words Parathyroid hormone related protein, RT-PCR, expression

* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development(No. 102-08-01-03).