

技术与方法

重组人 CK2 β 亚基的原核表达、纯化与鉴定*刘新光 梁念慈¹⁾ 马润泉²⁾

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023)

摘要 将构建成功的人蛋白激酶 CK2 β 亚基 cDNA 的重组质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 IPTG 诱导下表达, 表达蛋白大多数以不溶形式存在. 6L (约 10.2 g) 表达菌抽提得到约 20 mg 的可溶性表达产物, 通过 P11 磷酸纤维素一步层析分离, 得到 6.8 mg 纯化蛋白. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示纯化的蛋白为一分子质量 26 ku 的单一蛋白带. 蛋白质印迹结果证明: 纯化的表达产物与抗人 CK2 β 抗体可发生特异性免疫反应. CK2 β 亚基对 CK2 α 有激活作用, 纯化的 CK2 α 和 β 亚基在等摩尔混合时即可组成有最大生物活性的全酶. 实验结果有力地证明了克隆表达与纯化的重组蛋白是人蛋白激酶 CK2 β 亚基.

关键词 人蛋白激酶 CK2 β 亚基, 表达载体 pT7-7, 原核表达, 蛋白质纯化, 酶动力学分析

学科分类号 Q51, Q55, Q812

蛋白激酶 CK2 是真核细胞中普遍存在的一种信使非依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶. 它是由两个催化亚基 (α 或 α') 和两个调节亚基 (β) 组成的不均一四聚体^[1-4]. CK2 有两个显著特点^[3,4]: 一是它既可利用 ATP 也可利用 GTP 作磷酸供体; 二是它可磷酸化的底物目前有近 200 种, 底物涉及到细胞功能的许多方面. 根据克隆的 cDNA 推导出的人蛋白激酶 β 亚基的多肽链长度为 215 个氨基酸^[1,2]. 从人组织提取纯化的天然 CK2 中的 β 亚基的分子质量为 26 ku^[1,2]. 目前 CK2 β 亚基的确切作用还不完全清楚, 但它可作为调节亚基对 CK2 α 亚基和其他蛋白质起调节作用^[1-4]. 该酶在细胞中的含量较少, 提取纯化得到研究所需的量较困难. 真核细胞中 CK2 均以四聚体形式存在, 只有在变性条件下亚基才能解聚, 研究单一亚基的功能较为困难, 因此利用基因工程方法, 分别克隆并表达重组蛋白激酶 CK2 的两个亚基对于深入研究该酶具有十分重要的意义. 笔者在用 RT-PCR 扩增出人蛋白激酶 CK2 β 亚基 cDNA 后与原核表达载体 pT7-7 进行基因重组的基础上^[5], 在大肠杆菌中表达了重组人蛋白激酶 CK2 β 蛋白, 并对其进行了纯化和性质的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒载体: 大肠杆菌 BL21 (DE3) 由卫生部武汉生物制品研究所引进, 原核表达载体

pT7-7 由美国哈佛医学院的 Tabor 教授^[6] 惠赠.

1.1.2 试剂: 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 为美国 Calbiochem 公司产品. 小鼠抗人 CK2 β 亚基的 McAb 由丹麦 Issinger 教授^[7] 惠赠. ATP, GTP, 硝酸纤维素膜购自 Sigma 公司, P11 磷酸纤维素和 P81 磷酸纤维素滤纸系 Whatman 产品. ABC (AP) 免疫检测试剂盒购于华美生物工程公司. [γ -³²P] ATP 和 [γ -³²P] GTP 为北京亚辉生物医学工程公司产品, 其余为国产分析纯产品.

1.2 方法

1.2.1 人蛋白激酶 CK2 β 亚基 cDNA 重组质粒 pTCKB 的克隆与测序: 克隆使用的是原核表达载体 pT7-7, 克隆与测序方法见作者以前的报道^[5].

1.2.2 细胞转化与原核表达: 将经作者 DNA 测序验证的 pTCKB 转化感受态表达菌 BL21 (DE3), 挑取单菌落加 10 ml 含 Amp 的 LB 培养基过夜振荡培养, 次日按 500 ml 培养基 (10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 5 g/L NaCl, 75 mg/L Amp) 加 2.5 ml 过夜培养菌, 一次培养 2 000 ml, 于 37 °C 剧烈振荡培养, 当 A_{595} 到达 0.5 时, 加 IPTG 诱导表达. 继续培养 4 h 后收获细菌, 称湿重, 于 -20 °C

* 国家自然科学基金 (39870900) 和广东省高教厅重点学科经费资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

²⁾ 中山医科大学生物化学教研室, 广州 510089.

Tel: (0759) 2388501, E-mail: gdmepres@gdmc.edu.cn

收稿日期: 1999-03-30, 修回日期: 1999-08-16

冻存备用。

1.2.3 人CK2 β 表达菌的提取: 将三次培养的共6L培养菌约10.4g细菌加136ml缓冲液A(20mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1mmol/L EDTA, 0.5mmol/L EGTA, 7mmol/L β -巯基乙醇, 0.05mol/L NaCl, 0.5mg/L亮抑酶肽, 0.7mg/L胃抑酶肽A)于冰浴中超声破碎,加DNase I于4℃水解DNA 60min。以30000g, 4℃离心10min,弃上清(S-I),沉淀(P-I)再用含100mmol/L NaCl的缓冲液A适量,于4℃搅拌抽提过夜,以30000g, 4℃离心10min,弃沉淀(P-II),获得的上清(S-II,含20mg蛋白)将用于下述层析分离纯化的样品。

1.2.4 人CK2 β 亚基蛋白的纯化: 所有操作均在4℃进行。用含0.1mol/L NaCl的缓冲液A平衡P11磷酸纤维素柱(1cm×9cm, 7ml),上样蛋白用含1mol/L NaCl的缓冲液A 100ml进行线性洗脱,按每管5ml进行收集。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳合并仅有一条蛋白质带的收集管(共3管),透析后蛋白质定量,分装冻存于-20℃备用。

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按Laemmli方法,制备0.75mm厚的12%的分离胶进行。粗提物和离心过程中的电泳凝胶用考马斯亮蓝R-250染色,最后纯化产物的电泳凝胶采用银染方法染色,拍摄照片。

1.2.6 蛋白质定量和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白质密度扫描: 蛋白质定量按Bradford等^[8]的方法,以牛血清白蛋白为标准。表达的CK2 β 蛋白占菌体总蛋白的比例则用密度扫描仪扫描电泳凝胶后得出。

1.2.7 蛋白质印迹实验: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,凝胶上的蛋白质电转移至硝酸纤维(NC)膜上,按文献[7]和ABC(AP)检测试剂盒的说明书进行操作。即NC膜用含BSA的溶液封闭,然后依次与小鼠抗人CK2 β 亚基的McAb(一抗)、生物素偶联山羊抗小鼠抗体(二抗)和抗生物素偶联的碱性磷酸酶(AP)作用,再加底物NBT与BCIP显色,拍摄照片。

1.2.8 蛋白激酶CK2的活性测定: 按文献[9,10]方法稍行修改。酶反应总体积为35 μ l,反应混合液中含50mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 150mmol/L KCl, 10mmol/L MgCl₂, 50 μ mol/L ATP或GTP, [γ -³²P] ATP或GTP 1.85×10⁴ Bq(比活1.85×10¹⁴ Bq/mol),去磷酸化酪蛋白2g/L,

通过加重酶启动反应,30℃反应10min后取30 μ l点至P81磷酸纤维素滤纸上终止反应,阴干,用85mmol/L磷酸洗涤数次,80℃烤干后,加闪烁液于液闪仪计数。每分钟催化1pmol [γ -³²P] ATP或GTP上的³²P转移到酪蛋白上所需的酶量为1个酶单位。

1.2.9 单独CK2 α 与CK2全酶的酶动力学分析: 通过固定酪蛋白的浓度(2g/L),改变ATP或GTP的浓度(12.5、25、50、100 μ mol/L),每一浓度均设只加同样浓度的ATP或GTP而不加CK2 α 或CK2全酶的空白对照管。每一浓度做三个平行管,每种情况下的CK2 α 亚基为28pmol,而全酶中纯化的CK2 α 和 β 亚基则均为28pmol。在标准条件下测定CK2活性,每一浓度测定管与空白对照管的差值即为该浓度下的反应速度,本实验重复三次。采用Hanes-Woolf作图法(即[S]对[S]/V作图),并根据直线回归方程 $y = bx + a$, $K_m = a/b$, $V_{max} = 1/b$,得出单独CK α 亚基与全酶两种情况下的对ATP的 K_m 值与 V_{max} 和对GTP的 K_m 值与 V_{max} 。

2 结 果

2.1 人蛋白激酶CK2 β 亚基在大肠杆菌中的表达

人CK2 β 的重组质粒pTCKB转化大肠杆菌BL21(DE3)后经IPTG诱导后可大量表达出一26ku的新蛋白质分子(图1,泳道1),扫描结果(图2)表明表达的CK2 β 蛋白占细菌总蛋白的30%左右,说明重组质粒在大肠杆菌中得到了特异高效表达。图1还显示了细菌的超声匀浆离心的沉淀(P-I)与上清(S-I)以及抽提P-I再离心得到的上清(S-II)中CK2 β 的含量情况。

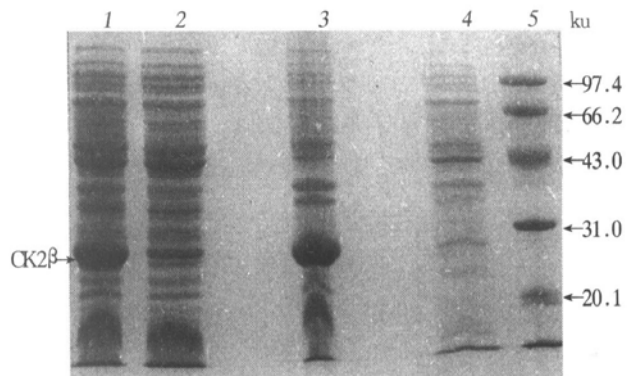


图1 pTCKB转化菌中重组人蛋白激酶CK2 β 亚基的表达
1: pTCKB转化菌粗提物; 2: pTCKB转化菌粗提物的S-I; 3: pTCKB转化菌粗提物的P-I; 4: pTCKB转化菌粗提物的S-II; 5: 分子质量标准蛋白质。

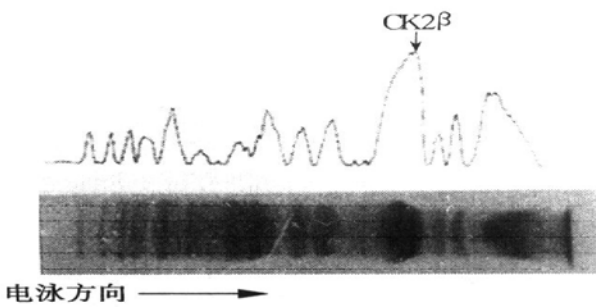


图2 pTCKB转化的IPTG诱导的细菌粗提物的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳的扫描图

2.2 重组人蛋白激酶CK2 β 蛋白的纯化

20 mg的S-II经P11柱的线性洗脱,经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定分部收集的各管,合并只有26 ku蛋白质带的3管,共得到约6.8 mg的纯化蛋白质。

2.3 纯化的表达产物的分子质量

纯化产物的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的银染结果表明(图3):表达产物显示出分子质量为26 ku的一条蛋白带(泳道2),该分子质量与天然CK2全酶中 β 亚基^[1,2]一致;电泳结果还显示纯化的产物基本为均一性蛋白,说明分离纯化是成功的。

2.4 纯化的表达产物的免疫反应

蛋白质印迹结果(图3)显示:该表达产物可与小鼠抗人CK2 β 的McAb特异性反应,在NC膜上呈现一条分子质量为26 ku的显色带(泳道3),而同时转印的另一NC膜与小鼠抗人CK2 α 的McAb(Boehringer Mannheim公司产品)反应则无蛋白质显色带(结果未列出),说明表达的产物不与小鼠抗人CK2 α 的McAb发生交叉免疫反应,从而证明纯化产物是人蛋白激酶CK2 β 亚基。

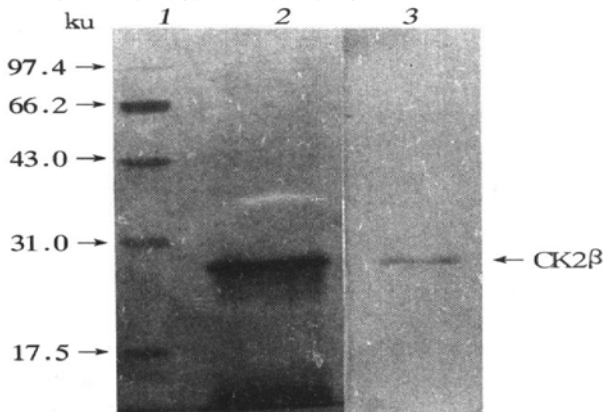


图3 纯化的重组蛋白产物的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹结果

1: 分子质量标准蛋白质; 2: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的银染结果; 3: 蛋白质印迹结果。

2.5 纯化的表达产物的其他性质

2.5.1 CK2 β 亚基在构成CK2全酶中的作用: 固定纯化的重组人CK2 α 亚基^[11]的含量(28 pmol),比较在加不同摩尔纯化的重组人CK2 β 亚基混合情况下蛋白激酶CK2的活性。结果(表1)显示加入纯化的重组CK2 β 亚基后CK2的活性明显增加,在 α 与 β 亚基等摩尔混合后其CK2活性是单独CK α 亚基活性的近4倍,但再增加CK2 β 的量并不能导致CK2全酶活性的进一步增加。本结果为CK2 β 亚基激活CK2 α 亚基活性提供了直接证据,而且 α 和 β 亚基等摩尔混合可构成有最大活性的全酶。

表1 CK2 β 亚基对CK2 α 亚基的激活作用

α 与 β 亚基 摩尔比	CK2活性/ mU ($\bar{x} \pm s$)	相对CK2 α 的活性 /%
1:0	326.5 \pm 33.2	100
1:0.2	682.4 \pm 109.0	209 ¹⁾
1:0.6	1093.2 \pm 93.5	335 ¹⁾
1:1.0	1282.9 \pm 76.6	393 ¹⁾
1:1.4	1321.1 \pm 112.2	405 ^{1,2)}
1:1.8	1353.6 \pm 46.4	415 ^{1,2)}

注: ¹⁾ $P < 0.01$ (与 $\alpha:\beta=1:0$ 组比较); ²⁾ $P > 0.05$ (与 $\alpha:\beta=1:1.0$ 组比较)。

2.5.2 纯化的单独CK2 α 亚基和CK2全酶的动力学分析: 根据Hanes-Woolf作图法作出的回归直线,得出的单独CK2亚基对ATP和GTP的 K_m 值和 V_{max} ,以及CK2全酶对ATP和GTP的 K_m 和 V_{max} 结果总结于表2。结果说明:单独CK2 α 时无论对ATP还是对GTP的 K_m 值均小于加等摩尔纯化CK2 β 亚基构成的CK2全酶。但加入等摩尔CK2 β 亚基后CK2活性提高到3.1倍(以ATP作磷酸供体)和2.3倍(以GTP作磷酸供体)。结果也显示无论是CK2 α 还是CK2全酶都既可利用ATP也可利用GTP作为磷酸供体,但纯化酶均显示出对ATP的亲合力大于对GTP的亲合力。

表2 纯化的CK2 α 亚基与构成型CK2全酶的动力学分析

酶	对ATP的		对GTP的	
	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	V_{max}/mU	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	V_{max}/mU
CK2 α	1.7	510.6	31.4	3199.3
CK2 α + CK2 β	5.6	1555.4	43.4	7472.2

3 讨论

pT7-7是一种T7 RNA聚合酶/启动子的原核表达系统,其多克隆位点上游有一强核糖体结合位

点 (rbs) 和起始密码子^[6]. 使用该载体很容易地构建得到目的基因 cDNA 全编码区序列, 从而可表达得到完整的天然蛋白. pT7-7 被推荐为缺乏强 rbs 的基因的表达载体. CK2 是真核细胞存在的酶, 许多种属 CK2 和一些其他蛋白质的表达都使用了 pT7-7 载体. 因目前还没有用真核表达系统成功表达并纯化出人 CK2 的报道, 所以选择了原核表达系统.

pTCKB 是作者通过 RT-PCR 与 pT7-7 克隆而成, 且通过 DNA 测序筛选得到的与 CK2 β 全编码区序列一致的重组质粒^[5]. pTCKB 转化表达菌株 BL21 (DE3), 该菌株含有 IPTG 诱导的 T7RNA 聚合酶基因, 因此用 IPTG 可诱导表达^[6]. 扫描结果表明表达的 CK2 β 蛋白占菌体总蛋白的 30%, 且多为不溶性蛋白, 第一次离心的上清 (S-I) 除了含可溶性 CK2 β 蛋白外, 还含核糖体和较多细菌可溶蛋白. 与 CK2 α 蛋白纯化相比, CK2 β 作为调节亚基, 没有催化活性, 不能测活监测, 其纯化的步骤各实验室不太一致. Jokobi 等^[12] 和 Bodenbach 等^[13] 纯化原核表达的人 CK2 β 使用的层析样品均为 S-I 再超速离心得到的 S-II. Jokobi 等^[12] 采用 DE-52 \rightarrow P11 \rightarrow Mono Q HR5/5 (在 FPLC 条件下) 三步层析, 每步通过合并 A_{280} 超过某一值部分进行下一步层析; Bodenbach 等^[13] 选择 P11 \rightarrow Mono Q HR5/5 (在 HPLC 条件下) 两步层析, 通过每步 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳合并有 CK2 β 部分, 说明从可溶蛋白再次超离的上清进行纯化均需一步以上层析, 结合本实验室的条件和进行从不溶部分抽提可溶蛋白的尝试, 作者将 P-I 加缓冲液 A 于 4 $^{\circ}$ C 搅拌抽提过夜, 离心得到的上清作为纯化的样品, 再根据 CK2 β 对 P11 的亲合力较 CK2 α 还强的特点, 作者采用 P11 一步层析法通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳监测, 发现有 3 个收集管仅含一条 26 ku 的蛋白. 尽管 6 L 约 10.2 g 细菌才得到 20 mg 的 S-II, 但通过 P11 层析的线性洗脱就能分离出 CK2 β 亚基的蛋白, 且可得到 6.8 mg 之多, 得率为 34%. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示纯化的蛋白几乎为均一性蛋白, 说明本实验的层析分离尝试是成功的. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳与蛋白质印迹实验结果证明作者表达纯化产物符合 CK2 β 亚基的分子量 (26 ku) 和免疫反应, 说明它是人 CK2 β 亚基.

蛋白激酶 CK2 是一种既可利用 ATP 也可利用 GTP 作磷酸供体的蛋白激酶. CK2 β 亚基是 CK2 全酶的调节亚基, 它可激活 CK2 α 的催化活性^[1~4]. 本实验中纯化的 CK2 α 亚基与不同摩尔 CK2 β 混合

实验证明了 CK2 β 亚基对 CK2 α 亚基有激活作用, 等摩尔在体外简单混合就可构成有最大活性的全酶, 直接证明了纯化出来的 CK2 β 是有功能的蛋白. 纯化的 CK2 α 与 CK2 全酶的动力学分析表明: 单独 CK2 α 时无论对 ATP 还是对 GTP 的 K_m 值均小于加等摩尔纯化 CK2 β 亚基构成的 CK2 全酶. 但加入 CK2 β 亚基后活性提高到 3.1 倍 (以 ATP 作磷酸供体) 和 2.3 倍 (以 GTP 作磷酸供体), 同样证明了 CK2 β 亚基对 CK2 α 亚基的激活作用. 本实验结果还显示了无论是 CK2 α 还是 CK2 全酶都既可利用 ATP 也可利用 GTP 作为磷酸供体, 但纯化酶均显示对 ATP 的亲合力要大于 GTP, 本实验结果与 Tuazon 等^[14] 综述的各种天然 CK2 对 ATP 和 GTP 的 K_m 值基本一致.

总之, 本实验通过基因克隆成功地在 大肠杆菌 中特异高效表达并分离纯化出的人 CK2 β 蛋白, 不仅其分子量与免疫反应相符, 而且纯化的均一性 CK2 β 蛋白具有激活 CK2 α 作用, 其构成的 CK2 全酶动力学性质也与已知天然的 CK2 基本一致. 由于成功地得到重组表达菌, 且一次纯化得到较多的纯 CK2 β , 对于今后进一步直接研究单独 CK2 β 亚基和 CK2 全酶的性质以及大规模筛选一系列化合物, 直接研究它们对该酶的作用以及进一步研究 CK2 β 亚基与其相关的蛋白质之间的结构与功能的关系, 奠定了坚实的基础.

参 考 文 献

- 1 Issinger O G. Casein kinase: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmac Ther*, 1993, **59** (1): 1~ 30
- 2 Allende J E, Allende C C. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J*, 1995, **9** (5): 313~ 323
- 3 Pinna L A, Meggio F. Protein kinase CK2 ("casein kinase 2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res*, 1997, **3**: 77~ 97
- 4 Guerra B, Issinger O G. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis*, 1999, **20**: 391~ 408
- 5 刘新光, 梁念慈, 马润泉, 等. 重组人蛋白激酶 CK2 β 亚基 cDNA 的克隆与测序. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (2): 228~ 231
- 6 Liu X G, Liang N C, Ma J Q, *et al.* *Chinese J of Biochem & Mol Biol*, 1999, **15** (2): 228~ 231
- 7 Tabor S. Expression using the T7 RNA polymerase/promotor system. In: Ausubel F A, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1990: 16.2.1~ 16.2.11
- 7 Nastainczyk W, Schmidt-Soaniol I, Boldyreff B, *et al.* Isolation and characterization of a monoclonal anti-protein kinase CK2 β subunit antibody of the IgG class for the direct detection of CK2 β -subunit in tissue cultures of various mammalian species and human tumors. *Hybridoma*, 1995, **14** (4): 335~ 339

- 8 Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1): 248~ 254
- 9 Hardie D G. Cyclic nucleotide and Ca^{2+} -independent protein kinases. *Methods Enzymatic Analysis*, 1983, **3**: 474~ 481
- 10 Marshak D R, Carroll D. Synthetic peptide substrates for casein kinase II. *Methods in Enzymology*, 1991, **200**: 134~ 156
- 11 刘新光, 梁念慈, 马润泉. 重组人蛋白激酶CK2 α 亚基的原核表达、纯化与鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **21** (1): 17~ 22
Liu X G, Liang N C, Ma J Q. *Chinese J Biochem & Mol Biol*, 2000, **21** (1): 17~ 22
- 12 Jakobi R, Traugh J A. Characterization of the phosphotransferase domain of casein kinase II by site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1992, **267** (33): 23894~ 23902
- 13 Bodenbach L, Fauss J, Robitzki A, *et al.* Recombinant human casein kinase II. A study with the complete set of subunits (α , α' and β), site-directed autophosphorylation mutants and a bicistronically expressed holoenzyme. *Eur J Biochem*, 1994, **220** (1): 263 ~ 273
- 14 Tuazon P T, Traugh J A. Casein kinase I and II: multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. In: Greengard P, Robison G A, eds. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, 23. New York: Raven Press Ltd, 1991, 124~ 164

Prokaryotic Expression, Purification and Characterization of Recombinant Human Protein Kinase CK2 β Subunit. LIU Xin-Guang, LIANG Nian-Ci (*Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*); MA Jian-Quan (*Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China*).

Abstract Protein kinase CK2 is a heterotetramer ser/thr protein kinase composed by two catalytic subunits (α or α') and two regulatory subunits (β). The recombinant plasmid containing human CK2 β subunit cDNA was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and expressed induced by IPTG. Most of the expressed CK2 β proteins were insoluble. From 6 L (about 10.4 g) bacteria, 20 mg soluble protein was extracted from the insoluble pellet and purified by a single step P11 phosphocellulose chromatography, the yield of purified CK2 β subunit was 6.8 mg. SDS-PAGE analysis of the purified protein showed only one band with molecular mass of 26 ku. Western blot analysis confirmed that the expressed product was human CK2 β subunit. Addition of the CK2 β subunit to CK2 α subunit led to maximum stimulation at a 1:1 molar ratio of both subunits. These results demonstrated strongly that the cloned, expressed and purified recombinant protein was human CK2 β subunit. The large amount of purified recombinant CK2 β protein lays solid basis for further study directly the characteristics of the enzyme and the relationship of structure and function between CK2 β subunit and its interacted proteins.

Key words human protein kinase CK2 β subunit, expression vector pT7-7, prokaryotic expression, protein purification, enzyme kinetic analysis

用改进的 DDRT-PCR 技术进行人胚差异基因筛选*

苟德明 李文鑫¹⁾ 蒋达和 黄健
(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 介绍一种从不同类型细胞或不同生长状态细胞中分离差异表达基因的快速高效 mRNA 差异显示技术, 其特点是利用 Ready-To-Go RT-PCR 反应珠和 Ready-To-Go RAPD 分析珠进行 mRNA 差异显示分析, 使取样步骤降至最低程度, 减少了潜在的取样误差和外源 DNA 污染, 并确保每次反应的高度重复性. 通过银染测序胶分析差异显示的 cDNA 带, 便于 DNA 回收和进一步克隆. 用此方法分析人胚发育早期不同阶段基因的差异表达, 选用 6 条随机引物对 3、4 和 5 周龄人胚进行 mRNA 差异显示分析, 从 2 000 多条带中共分离出 14 个差异产物, 经二次扩增及反向 RNA 印迹确证其中 6 个片段为发育不同阶段差异表达基因.

关键词 人胚胎, 发育, mRNA 差异显示, PCR

学科分类号 Q522

* 中国博士后基金 (207981440) 和武汉大学自强基金资助. ¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (027) 27664548, E-mail: bcdmgou@polyu.edu.hk 收稿日期: 1999-02-01, 修回日期: 1999-08-04