

人釉原蛋白编码区基因真核表达载体 PsecTaq2A-AMG的构建

杨爱玲 徐琛蓉 章锦才 钟良军 殷春一 赵川江

【摘要】 目的 构建人釉原蛋白(AMG)编码区基因真核表达载体 PsecTaq2A-AMG。方法 采用 PCR 技术体外扩增 AMG完整分泌肽编码区。将扩增产物与 PsecTaq2A 分别用 *BamH I* 和 *XhoI I* 行双酶切,将获取的 AMG 目的基因片段连接到双酶切后的 PsecTaq2A,构建重组质粒 PsecTaq2A-AMG,并对重组质粒进行鉴定。结果 PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,可见大小约 519 bp 的特异性条带,与预期结果一致。重组克隆 PsecTaq2A-AMG 酶谱分析与预期结果一致,序列测定结果与 GenBank 中的人釉原蛋白序列完全一致。结论 用此方法可成功构建 AMG 编码区基因真核表达载体 PsecTaq2A-AMG。

【关键词】 人釉原蛋白; 重组质粒; PsecTaq2A-AMG

Construction of the Eukaryotic Expression Vector PsecTaq2A-AMG for Human Amelogenin

YANG Ailing*, XU Chenrong, ZHANG Jincan, et al. (* Oral Medicine of West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to construct a eukaryotic expression vector for human amelogenin (AMG). **Methods** PCR was performed to amplify the AMG encoding region. Amplified fragments for human AMG were recovered and inserted into eukaryotic expression vectors PsecTaq2A. The recombinant plasmid PsecTaq2A-AMG was constructed and their positive clones were identified. **Results** Amplified products were checked by electrophoresis and the results were satisfactory. The recombinant plasmid PsecTaq2A-AMG was analyzed by restriction endonuclease mapping and DNA sequencing. The results of sequencing were consistent with those from GenBank. **Conclusion** The recombinant plasmid PsecTaq2A-AMG was successfully constructed with properly inserted DNA sequence encoding mature amelogenin.

【Key words】 human amelogenin; recombinant plasmid; PsecTaq2A-AMG

基因治疗是现代医学治疗中一个崭新的领域,在牙周病的治疗及诱导牙周组织再生方面,有望提供新的治疗模式。一些学者¹采用骨形成蛋白-7 重组腺病毒载体 AdCMVBMP-7 进行牙周再生的转基因治疗,体外研究及动物实验均取得了成效。釉原蛋白(amelogenin, AMG)在发育期釉基质中比例高达 90%以上,作为一种具有诱导牙周组织再生能力的细胞外基质蛋白,越来越受到广泛关注。构建其适当的真核表达载体是利用它来进行基因治疗的重要环节。重组目的蛋白被表达并分泌到细胞外是进行体内基因治疗的重要目标, PsecTaq2 携带小鼠 Ig 链 V-T2-C 区域的分泌信号,是专为重组基因融合蛋白的分泌而设计的一种真核表达质粒。本研究拟采用 PCR 技术

体外扩增 AMG 完整分泌肽编码区并重组到 PsecTaq2A,为研究重组质粒 PsecTaq2A-AMG 人釉原蛋白融合蛋白在真核细胞中的表达和分泌奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

无菌去离子纯水(自制); dNTP、TaqDNA 聚合酶及 PCR 缓冲液(TakaRa 公司,大连); 限制性内切酶 *BamH I* 和 *XhoI I* (TakaRa 公司,大连); DNA Ligation kit ver 2.0 试剂盒(TakaRa 公司,大连); 小量胶回收试剂盒(上海华舜生物公司); Hema480 PCR 扩增仪(珠海黑马医学仪器有限责任公司); DYY 型垂直电泳槽(北京六一仪器厂); HTS7000Plus 紫外荧光/可见光高效分析仪(PE 公司,美国)。

1.2 目的基因引物设计及合成

采用瑞典 Pharmacia 公司核酸分析软件 DNA SIS 和美国 National Biosciences Inc 研制的分子生物学软件 Oligo 5.0 在计算机上对设计引物进行分析,引物位点选择 AMG 完整分泌肽编码区外显子 3 起始处密码子为 5 端引物起点;终止密码子前一碱基为 3 端引物起点。根据拟选用的真核表达载体

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院口腔内科学教研室(杨爱玲,徐琛蓉,殷春一,赵川江),广东省口腔医院口腔内科(章锦才),新疆医科大学第一附属医院口腔科(钟良军)

PsecTaq2A 酶切位点及阅读框架图谱,在5端引物加上 *BamH I* 酶切位点,3端引物加上 *XhoI I* 酶切位点。

5端引物碱基序列为:5-ATAGGATCCACTACCACCTCATCCTGGGC-3;3端引物碱基序列为:5-GACCTCAGCATCCACTTCCTCCCGCTTGG-3。

引物由 TakaRa 公司合成并经 HPLC 脱盐纯化定量。

1.3 目的基因体外 PCR 扩增及纯化

PCR 扩增反应体系 50 μ l, dNTP 终浓度 1 mmol/L, 引物终浓度 1 mmol/L, Taq 聚合酶 2.5 U, 采用构建好的重组质粒 PcDNA3.1-AMG 1.5 μ l 为扩增模板², 循环条件为 94 30 s, 62 30 s, 72 1.5 min, 循环次数 30 次。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 目的基因长约 500 bp。紫外灯下迅速切割 570 bp 处凝胶条块, 采用小量胶回收试剂盒提取纯化 PCR 产物。

1.4 重组质粒 PsecTaq2A-AMG 的构建

PCR 胶回收产物与 PsecTaq2A 分别用 *BamH I* 和 *XhoI I* 在 37 K 型通用缓冲液中进行双酶切 2 h, 酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离并经胶回收纯化。将获取的 AMG 目的基因片段连接到双酶切后的 PsecTaq2A。连接反应按试剂盒说明书进行。

1.5 重组质粒 PsecTaq2A-AMG 的转化和筛选

取连接产物 8 μ l 转化感受态大肠杆菌 *E. coli* JM109, 重组质粒经 *BamH I* 和 *XhoI I* 双酶切, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳上初步鉴定阳性克隆子。重组质粒由大连 TakaRa 公司作序列分析鉴定。

2 结 果

2.1 PCR 扩增

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 可见大小约 519 bp 的清晰度高的特异性条带(图 1 带 5), 与预期所得的 AMG mRNA 分泌肽编码区碱基长度一致。

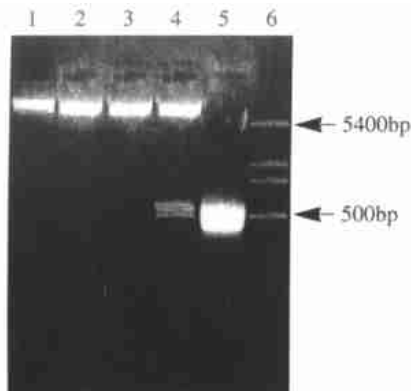


图 1 重组质粒 PsecTaq2A-AMG 酶切鉴定图谱

带 1: PsecTaq2A-AMG; 带 2: *BamH I* 单酶切;

带 3: *XhoI I* 单酶切; 带 4: *BamH I* 和 *XhoI I* 双酶切;

带 5: 釉原蛋白 PCR 产物; 带 6: marker DL2000

Fig 1 The restriction endonuclease map of PsecTaq2A-AMG indentifying

2.2 重组质粒 PsecTaq2A-AMG 的鉴定

2.2.1 重组质粒 PsecTaq2A-AMG 酶谱分析

PsecTaq2A-AMG 双酶切产物在凝胶电泳图谱上清晰可见大小为约 5.2 kb 的载体质粒片段和 519 bp 的釉原蛋白目的片段(图 1 带 4)。519 bp 的釉原蛋白目的片段与 PCR 目的产物电泳条带(图 1 带 5) 平齐。*BamH I* 和 *XhoI I* 单酶切片大小约 5.7 kb(图 1 带 2,3), 与预期结果一致。

2.2.2 重组质粒 PsecTaq2A-AMG 的序列分析

分泌肽序列测定结果与 GenBank 中的人釉原蛋白序列完全一致。连接于分泌肽 N 端的 Ig 链引导序列、C 端的多聚组氨酸基因序列和外源基因片段碱基序列阅读框架完全正确。

3 讨 论

牙周组织再生是牙周病治疗的核心。局部运用生物活性物质在促进牙周再生中起到了一定效果。这些生物介质包括: 各种生长因子, 如血小板衍生的生长因子、转化生长因子、成纤维细胞生长因子及骨形成蛋白³⁻⁷; 细胞外基质蛋白^{8,9}, 如釉基质蛋白; 骨代谢介质, 如前列腺素^{10,11} 及具有强致炎作用的细胞因子如白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- 的阻断剂。利用这些生物活性介质进行牙周病转基因治疗在当前成为极具吸引力的课题。采用哺乳动物细胞表达体系, 重组骨形成蛋白-2 和骨形成蛋白-7 被成功地合成, 所表达的骨形成蛋白在一系列的细胞系中均被证明具有活性¹²。随着釉原蛋白在牙周再生中的作用得到关注, 构建其真核表达载体, 就成为牙周再生基因治疗的重要内容。

运用生物活性物质进行牙周再生的基因治疗时, 这些活性蛋白在病损区局部的活性及浓度均是影响治疗效果的因素。真核载体在哺乳动物细胞表达体系中的表达和翻译受真核细胞调控, 翻译后产物可被剪接加工, 具有良好的免疫原性和生物活性¹³。

基因工程活性多肽的研制亦是生物医学治疗的重要方向。采用体外重组技术构建真核表达质粒, 体外转染哺乳动物细胞表达体系, 经转化的细胞可表达外源基因产物并分泌到培养基中¹⁴。釉原蛋白基因本身带有一段 48 bp 长的信号肽序列, 但在非成釉细胞中其分泌活性可能受到影响。PsecTaq2 携带的小鼠 Ig 链 V-T2-C 区域的分泌信号, 是专为重组蛋白的高效分泌而设计, 适合于多种细胞系中表达和分泌融合蛋白¹⁵ 的真核质粒。不仅如此, PsecTaq2A 在表达的外源蛋白 C 端带有 6x-His 和 c-myc 标识, 利用 Anti-

His 及 Anti-myc 抗体可以快速方便的检测到外源表达蛋白,并且通过带有 Anti-His 的亲凝胶层析迅速提纯蛋白,大大简化了纯化步骤^{16,17}。较之传统的从组织分离提纯蛋白质,具有来源丰富,提纯工艺简单,成本低的优点。本研究所构建的重组载体 PsecTaq2A-AMG 不仅仅可能为体内基因治疗提供基础,还适用于基因工程生产釉原蛋白,与 GTR 膜技术或组织工程技术结合,有望为牙周再生提供新的选择。

构建 PsecTaq2 重组质粒的关键在于保证包括 Ig 链 V、6x-His、c-myc 及重组 DNA 区域具有正确的阅读框架,本研究所构建的 PsecTaq2-AMG 测序结果表明插入的外源 DNA 碱基未发生错配,且重组质粒具有正确的阅读框架。这为外源片段在真核细胞的正确表达和分泌提供了保证。

参考文献

- 1 Krebsbach PH, Keni G, Franceschi RT, et al. Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(8): 1201-1210
- 2 殷春一,章锦才,张蕴惠. RT-PCR 法体外扩增人釉原蛋白编码区基因. *华西口腔医学杂志*, 2000, 18(增刊): 14-17
- 3 Graves DT, Cochran DL. Periodontal regeneration with polypeptid growth factor. *Curr Opin Periodontol*, 1994: 178-186
- 4 Graves DT, Kang YM, Kose KN. Growth factors in periodontal regeneration. *Compendium Contin Educ Dent*, 1994, 18(suppl): 672-677
- 5 Graves DT, Valentin-Opran A, Delgado R, et al. The Potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine or paracrine factor for human bone cells. *Connect Tissue Res*, 1989, 23(2-3): 209-218
- 6 Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in

- periodontal reconstruction. *J Periodontol*, 1995, 66(6): 506-510
- 7 Lee MB. Bone morphogenetic proteins: Background and implications for oral reconstruction: A review. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(6): 355-365
- 8 Gestrelus S, Andersson C, Jonhasson AC, et al. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(9): 678-684
- 9 Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(9): 658-868
- 10 Marks SCr, Miller SC. Local delivery of prostaglandin E1 induces periodontal regeneration in adult dogs. *J Periodontol Res*, 1994, 29(2): 103-108
- 11 Miller SC, Marks SCr. Alveolar bone augmentation following the local administration of prostaglandin E1 by controlled-release pellets. *Bone*, 1993, 14(3): 587-593
- 12 David LC, John MW. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology*, 2000, 1999, 10(1): 40-58
- 13 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 5-10
- 14 MacColl GS, Novo FJ, Marshall NJ, et al. Optimization of growth hormone production by muscle cells using plasmid DNA. *J Endocrinol*, 2000, 165(5): 329-336
- 15 Coloma MJ, Hastings A, Wims LA, et al. Novel vector for expression of antibody molecules using variable region generated by polymerase chain reaction. *J Immunol Methods*, 1992, 152(1): 89-104
- 16 Evan JJ, Lewis GK, Ramsay G, et al. Isolation of monoclonal antibodies specific for c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(12): 3610-3616
- 17 Lindner P, Bauer K, Krebber A, et al. Specific detection of His-tagged protein with recombinant Anti-His Tag scFv-Phosphatase or scFv-Phage fusions. *Biol Techniques*, 1997, 22(1): 140-149

(2002-09-24 收稿)

(本文编辑 刘 怡)

2003 年第九次全国副省级城市口腔医学学术会议

由全国副省级城市口腔医学协作组主办,四川大学华西口腔医学院和成都市医学会口腔专业委员会承办的“第九次全国副省级城市口腔医学学术会议”,拟于 2003 年 9 月中旬在四川成都举行。会议将安排多名全国知名口腔专家作专题讲座和学术交流,凡有关口腔医学方面的文章均可投稿。来稿请寄 300~500 字以内四段式中文结构式摘要一份。会议期间将举办多个学科的国家级继续教育项目班并授予相应学分,欢迎参加。

截稿日期:2003 年 6 月 30 日(以当地邮戳为准)。

稿件请寄:四川省成都市人民南路三段十四号四川大学华西口腔医学院科研科胡涛、蒋琰收 邮编:610041,请注明会议来稿。

请尽可能同时寄送 Word 文档的电子稿件于 hxkqky@163.com 或交寄软盘。联系电话:028-85502415

全国副省级城市医学协作组
四川大学华西口腔医学院
成都市医学会
2002 年 11 月 22 日