

[文章编号] 1000-1182(2007)05-0487-03

· 专栏论著 ·

人骨形态发生蛋白-2基因克隆及真核表达载体的构建

周 诺, 黄旋平, 廖 妮, 韦山良, 梁飞新, 麦华明
(广西医科大学附属口腔医院 口腔颌面外科, 广西 南宁 530021)

[摘要] 目的 克隆人骨形态发生蛋白-2(hBMP2)基因片段, 构建pcDNA3.1-hBMP2真核表达质粒。方法 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术, 从人骨肉瘤中扩增出人骨形态发生蛋白-2基因片段, 通过DNA重组技术将该基因片段重组于pcDNA3.1真核表达载体上, 构建pcDNA3.1-hBMP2重组质粒, 通过用PCR扩增、酶切电泳分析及DNA测序的方法对重组DNA进行鉴定。结果 经PCR扩增、酶切电泳分析和DNA测序证实, 本实验构建的重组质粒目的基因片段为人BMP2-cDNA。结论 本实验成功克隆了hBMP2基因并构建其真核表达质粒。

[关键词] 骨形态发生蛋白-2; 基因克隆; 真核表达载体

[中图分类号] R782.4 [文献标识码] A

Cloning of human bone morphogenetic protein-2 gene and the construction of its eukaryotic expression vector ZHOU Nuo, HUANG Xuan-ping, LIAO Ni, WEI Shan-liang, LIANG Fei-xin, MAI Hua-ming. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective To clone human bone morphogenetic protein-2(hBMP2) gene and construct its eukaryotic expression vector pcDNA3.1-hBMP2. Methods Human BMP2 gene was amplified by RT-PCR method from human osteosarcoma cells and constructed into eukaryotic expression vector pcDNA3.1-hBMP2. The gene in the vector pcDNA3.1-hBMP2 was identified by PCR amplification, enzyme digestion and DNA sequencing. Results The cloned DNA was confirmed to be hBMP-2 gene. Conclusion In this study, hBMP2 gene is successfully cloned and its eukaryotic expression vector pcDNA3.1-hBMP2 is constructed, which provides the foundation of using BMP2 gene therapy to accelerate new bone formation in distraction osteogenesis.

[Key words] bone morphogenetic protein-2; gene clone; eukaryotic expression vector

骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)被认为是骨形态发生蛋白家族中诱导成骨作用最强的细胞因子^[1]。本课题组前期研究^[2]表明, 下颌骨牵张成骨过程中, 局部牵开区转化生长因子-1、BMP-2等持续高表达, 促进了牵张区新骨形成。本实验从人骨肉瘤细胞中克隆人BMP-2基因片段并构建其真核表达载体pcDNA3.1-hBMP2, 为用基因治疗技术加速牵张成骨形成的实验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

多通道PCR扩增仪(PE公司, 美国), 低温高

速离心机(美国基因公司), 凝胶电泳成像分析系统(Bio-Rad公司, 美国), 恒温摇床(武汉蓝锐电子技术有限公司), 电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 主要试剂

人骨肉瘤组织(广西医科大学附属口腔医院提供), Trizol总RNA提取试剂和pcDNA3.1(+)质粒(Invitrogen公司, 美国), 逆转录试剂盒(MBI公司, 美国), DNA Marker(Takara公司, 日本), RT-PCR引物(上海生工生物工程有限公司合成), 胶回收试剂盒(Bioer公司, 日本), TaqDNA聚合酶、Not I和EcoR限制性内切酶(Promega公司, 美国)。

1.3 总RNA的提取

将新鲜人骨肉瘤组织置于液氮中并转于-80超低温冰箱保存, 取出约100 mg, 加入1 mL Trizol液研磨, 组织匀浆后, 按Trizol法提取组织总RNA。

1.4 RT-PCR合成BMP2-cDNA

经过纯化处理的RNA即可用于逆转录合成

[收稿日期] 2007-01-23; [修回日期] 2007-05-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30160088); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(桂科基0448058)

[作者简介] 周 诺(1960-), 男, 广西人, 教授, 博士

[通讯作者] 周 诺, Tel: 0771-5358645

cDNA, 按逆转录试剂盒说明先合成cDNA第1链, 然后以其为模板进行PCR反应。根据GeneBank中hBMP-2的mRNA核酸序列(NM 001200)设计引物: 上游引物为(P1)5'-CCGGAATTCATGGTGGCCGGG-ACCCGCTGTCTTCT-3'(下划线为EcoR 酶切位点), 下游引物为(P2)5'-GAATGCGGCCGCTAGCGACA-CCCACAACCCTCCA-3'(下划线为Not 酶切位点)。取扩增终产物5 μL加入溴酚蓝3 μL, 与DL2000 Marker一起用质量分数为1.2%琼脂糖凝胶作电泳。切下目的条带, 按胶回收试剂盒操作说明从琼脂糖凝胶中回收PCR扩增产物BMP2- cDNA片段。

1.5 pcDNA3.1-hBMP2真核表达载体的构建

将回收获得的目的基因(hBMP2- cDNA片段)和pcDNA3.1(+)质粒分别用EcoR、Not 作双酶切, 产物经酚-氯仿抽提后, 用T4 DNA连接酶于16℃连接12 h, 将两者连接后转化感受态大肠杆菌JM109, 将转化菌接种于含氨苄青霉素的LB平板上37℃孵育过夜, 挑选白色阳性克隆菌落, 经扩增后, 用质粒提取试剂提取重组质粒pcDNA3.1-hBMP2。

1.6 pcDNA3.1-hBMP2真核表达载体的鉴定

1.6.1 酶切电泳鉴定 将提取的质粒(pcDNA3.1-hBMP2)用EcoR、Not 作双酶切, 取酶切后产物及未酶切的pcDNA3.1-hBMP2真核表达载体各5 μL, 分别加入溴酚蓝3 μL, 作琼脂糖凝胶电泳、鉴定。

1.6.2 PCR鉴定 分别以获得的重组质粒pcDNA3.1-hBMP2(10 μL)和pcDNA3.1(10 μL)空质粒为模板, 加入缓冲液5 μL、dNTP 5 μL、P1、P2各2 μL、Taq DNA聚合酶1 μL, Mg²⁺ 3 μL, 加ddH₂O把反应体积调至50 μL, PCR反应条件设定: 94℃变性5 min, 94℃ 30 s、55℃ 45 s、72℃ 45 s, 循环30次, 最后72℃延伸5 min。取扩增产物5 μL加入溴酚蓝3 μL, 用质量分数为1.2%琼脂糖凝胶作电泳分析。

1.6.3 测序鉴定 将所提取重组质粒pcDNA3.1-hBMP2经纯化处理后, 送上海生工生物工程有限公司进行测序, 并与GeneBank报道的hBMP2 mRNA专用软件作比较。

2 结果

2.1 总RNA电泳结果

所提取的总RNA经质量分数为1.2%琼脂糖凝胶电泳, 可见明显的28S、18S、5S三个条带, 分光光度法测定A_{260 nm}/A_{280 nm}为1.886, 表明所获得的总RNA无明显的降解且有较高的纯度, 产物可用于下一步实验(图1)。

2.2 BMP2- cDNA的RT-PCR结果

总RNA经RT-PCR扩增后, 经琼脂糖凝胶电泳,

约在1.2 kb处可见一明显扩增条带, 与预计长度相符, 而阴性对照组未见条带(图2)。

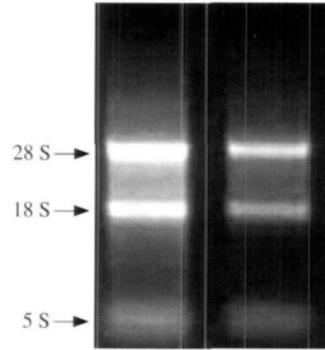
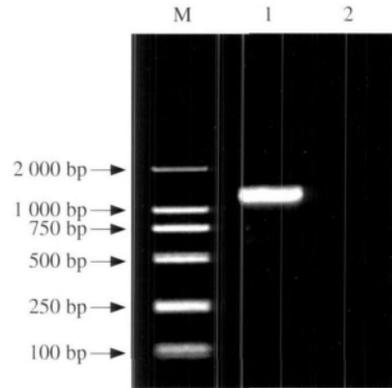


图1 总RNA电泳结果

Fig 1 Gel electrophoresis results of total RNA



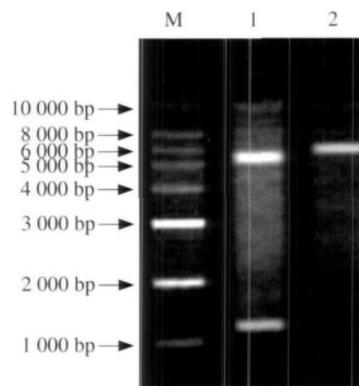
M: DL2000 Marker; 1: 扩增的特异条带(1.2 kb); 2: 阴性对照

图2 BMP2-cDNA RT-PCR产物电泳结果

Fig 2 Gel electrophoresis results of BMP2-cDNA RT-PCR

2.3 重组质粒pcDNA3.1-hBMP2的鉴定结果

2.3.1 酶切电泳鉴定 重组质粒经EcoR/Not 双酶切和未作酶切的重组质粒pcDNA3.1-hBMP2一起电泳后, 前者出现了1.2 kb和5.4 kb两条带(1.2 kb为hBMP2- cDNA产物, 5.4 kb为pcDNA3.1线状质粒), 后者出现6.6 kb条带(重组质粒pcDNA3.1-hBMP2), 初步表明重组质粒构建成功(图3)。

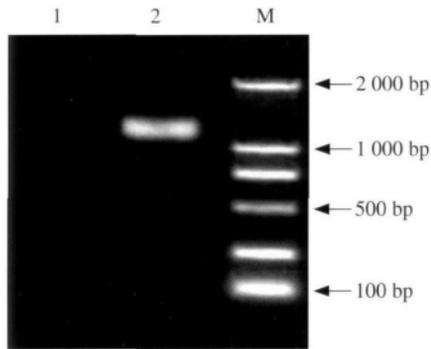


M: DNA Ladder Marker; 1: 酶切产物5.4 kb(pcDNA3.1)和1.2 kb(目的基因); 2: 重组质粒pcDNA3.1-hBMP2(6.6 kb)

图3 重组质粒pcDNA3.1-hBMP2双酶切鉴定

Fig 3 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-hBMP2 by EcoR I and Not I

2.3.2 PCR鉴定 以重组质粒pcDNA3.1-hBMP2为模板的样本,经过PCR扩增后出现了阳性扩增条带,大小为1.2 kb,而以pcDNA3.1空质粒为模板的阴性对照管无扩增条带出现,进一步证实了重组质粒构建成功(图4)。



1: 空质粒对照; 2: 重组质粒扩增基因片段(1.2 kb); M: DL 2000 Marker

图4 重组质粒pcDNA3.1-hBMP2 PCR鉴定

Fig 4 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-hBMP2 by PCR

2.3.3 测序鉴定 测序结果经BLAST软件分析,其核酸序列与GeneBank中hBMP2的mRNA的编码序列(NM 2001200)同源性完全相符,进一步证实本实验所克隆的基因为人BMP2-cDNA。

3 讨论

牵张速度受限、治疗周期长、牵张过快和过长容易导致新骨形成不良等问题限制了牵张成骨在临床上的广泛应用。因此,如何促进牵张成骨新骨形成、缩短治疗周期,已经成为了众多学者研究的热点。骨形态发生蛋白是转化生长因子-超家族中的一个家族,是一类具有异位诱导骨形成活性的蛋白,可以诱导间充质细胞分化为软骨和骨,它们的发现和应用将为临床治疗难治性骨折和各种骨损伤提供新的途径,具有良好的应用前景。所以,已有学者试图在牵张成骨中局部应用外源性BMP等生长因子诱导成骨细胞和软骨细胞分化,促进新骨形成,缩短疗程^[3-4]。如王志国等^[5]利用人重组BMP2注射于兔下颌骨牵张间隙后发现,人重组BMP2有明显促进新骨形成作用,并明显缩短牵张成骨术治疗疗程。Kim等^[6]在狗的牵引动物模型中局部注射BMP发现,它在牵引成骨稳定阶段的早期有显著性成骨作用。但是外源性生长因子半衰期短,要求相对大的剂量才能刺激足量骨形成而发挥治疗作用,从而增加临床治疗的成本并可能导致毒性作用的产生^[7]。基因转染技术作为一种新的治疗手段,不仅可以持续、高效的于局部释放内源性生长因子,而且提供的内源性生长因子较基因重组的外源性生长因子具

备更高的生物学效价^[8]。因此设想,能否通过基因转染技术将具有成骨促进作用的骨形态发生蛋白基因转入某些细胞,既可使这些细胞能够在牵张成骨区分泌骨形态发生蛋白并持续一段时间和所需浓度,从而促进新骨形成,也可避免应用外源性骨形态发生蛋白的蛋白质所带来的免疫反应等弊病。基因转移技术的关键是真核表达载体的构建和所构建的载体能否在细胞内表达。基于基因治疗的目的,本实验从人骨肉瘤组织中提取总RNA,通过RT-PCR克隆hBMP2基因片段,将其连接到pcDNA3.1质粒中,获得pcDNA3.1-hBMP2真核表达载体,并通过用PCR扩增、酶切电泳分析及DNA测序的方法对重组DNA进行鉴定,证实本实验构建的重组质粒目的基因片段为人BMP2-cDNA。hBMP2的真核表达载体构建成功,为下一步用基因治疗技术加速牵张成骨新骨形成、缩短牵张成骨治疗周期的实验奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al. Bone morphogenetic protein-2: Biology and applications[J]. Clin Orthop Relat Res, 1996, (324):39-46.
- [2] 周 诺, 梁飞新, 韦山良, 等. TGF-1在下颌骨牵张成骨中的局部表达及作用的实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2004, 20(5):670-673.
ZHOU Nuo, LIANG Fei-xin, WEI Shan-liang, et al. Expression of TGF-1 in mandibular distraction osteogenesis[J]. J Pract Stomatol, 2004, 20(5):670-673.
- [3] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities[J]. Science, 1988, 242(4885):1528-1534.
- [4] Takamine Y, Tsuchiya H, Kitakoji T, et al. Distraction osteogenesis enhanced by osteoblastlike cells and collagen gel[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, (399):240-246.
- [5] 王志国, 胡 静, 邹淑娟, 等. 重组人骨形态发生蛋白-2促进兔下颌牵张成骨的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(3):186-188.
WANG Zhi-guo, HU Jing, ZOU Shu-juan, et al. Recombinant human BMP-2 accelerates bone formation of mandibular distraction osteogenesis in rabbits[J]. West China J Stomatol, 2004, 22(3):186-188.
- [6] Kim IS, Park JW, Kwon IC, et al. Role of BMP, betaig-h 3, and chitosan in early bony consolidation in distraction osteogenesis in a dog model[J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 109(6):1966-1977.
- [7] Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing[J]. Clin Orthop Relat Res, 1998, (355 Suppl):S7-S21.
- [8] Wu D, Razzano P, Grande DA. Gene therapy and tissue engineering in repair of the musculoskeletal system[J]. Cell Biochem, 2003, 88(3):467-481.