

[文章编号] 1000-1182(2008)05-0479-03

骨形态发生蛋白-7真核表达载体的构建 及其在MC3T3-E1细胞中的表达

贺俊^{1,2}, 王慧明²

1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 牙科, 浙江 杭州 310016;

2. 浙江大学医学院附属第一医院 口腔医疗中心, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的 构建一个能在MC3T3-E1细胞中表达骨形态发生蛋白-7(bmp-7)基因表达载体。方法 采用RT-PCR技术从人胚肾中扩增人bmp-7基因, 将获得的基因定向插入pcDNA3.1(+)-真核表达质粒中, 测序正确后用脂质体将表达质粒转入MC3T3-E1细胞, 转染后72 h提取细胞全蛋白, 采用Western blot检测BMP-7蛋白表达。结果通过基因测序表明获得的bmp-7与GeneBank登录的序列一致, 构建的质粒为bmp-7/pcDNA3.1(+)-质粒, Western blot检测结果表明bmp-7基因转染MC3T3-E1后能在细胞中表达。结论 成功构建能在MC3T3-E1细胞中表达BMP-7的真核表达载体。

[关键词] 骨形态发生蛋白-7; 成骨; 基因表达

[中图分类号] R783 [文献标识码] A

Construction of eukaryotic vector of bone morphogenetic protein-7 and its expression in MC3T3-E1 cells
HE Jun^{1,2}, WANG Hui-ming². (1. Dental Clinic, Sir Run Run Shaw Hospital Affiliated to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310016, China; 2. Center of Stomatology, The First Hospital Affiliated to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

[Abstract] **Objective** To construct a eukaryotic vector which could express bone morphogenetic protein-7(bmp-7) in MC3T3-E1. **Methods** Bone morphogenetic protein-7 gene was obtained by RT-PCR from human embryo kidney. And after sequencing and electrophoresis the obtained aim DNA fragment was inserted into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+) by using restricted endonuclease and ligase. The DNA sequence of the newly-constructed plasmids was proved right by the gene technic company. And then the new plasmids containing right sequence aim gene were transfected into MC3T3-E1 cells by Lipofectamine 2000. 72 h after transfecting, RT-PCR was performed to show the transfected cells containing the aim gene, and the whole protein of the transfected cells were gathered and used as samples in the next Western blot to test the expression of bmp-7 gene. **Results** DNA sequencing indicated the sequence of the obtained bmp-7 was identical to the reported ones in GeneBank. The electrophoretic map of the products of RT-PCR and restriction enzyme digestion played another evidence that the newly-constructed plasmids were bmp-7/pcDNA3.1(+). The results of Western blot showed that the transfected cells could express BMP-7. **Conclusion** The construction of a eukaryotic vector which could express BMP-7 in MC3T3-E1 was successful.

[Key words] bone morphogenetic protein-7; osteogenesis; gene expression

Urist^[1]在1965年将脱矿骨基质植入不同实验动物的肌组织得到新骨形成, 从而在脱矿骨中发现并命名骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)。BMP在骨形成和骨骼发育过程中起着关键作

用, 它们诱导新骨形成的特性引起生物技术领域许多研究者的兴趣。至今, 已发现了BMP家族的15个成员。有研究^[2]证明, 在BMP超家族中, 有3个成员可以促进异位成骨: BMP-2、BMP-4和BMP-7。本实验构建bmp-7基因的真核表达载体, 通过成骨细胞表达BMP-7蛋白, 拟在下一步将转染目的基因的细胞与生物材料结合, 植入骨缺损动物模型, 进一步研究基因修饰后的成骨细胞的体内成骨能力。

[收稿日期] 2008-02-19; [修回日期] 2008-06-15

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(302670)

[作者简介] 贺俊(1979-), 女, 浙江人, 住院医师, 硕士

[通讯作者] 王慧明, Tel: 0571-87236893

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和菌株 人胚肾由浙江大学医学院附属妇产科医院提供。小鼠成骨样细胞系MC3T3-E1购自日本Riken Cell Bank。感受态细菌DH 5 α 和pcDNA3.1(+)真核表达质粒由浙江大学传染病研究所保存并提供。

1.1.2 主要工具酶及试剂 高保真Taq DNA聚合酶、限制性内切酶、T₄DNA连接酶、Trizol RNA提取试剂、Lipofectamine 2000脂质体转染试剂盒、RevertAid H Minus逆转录试剂盒、高糖DMEM培养基、胰蛋白酶消化液、胎牛血清为美国Invitrogen公司产品。DNA胶回收试剂盒、DNA纯化试剂盒及质粒DNA小量抽提试剂盒为德国Qiagen公司产品。BMP-7单克隆抗体、ECL化学发光试剂及其他Western blot试剂为美国Santa Cruz公司产品。

1.1.3 引物设计 根据GeneBank中已登录的目的基因序列,计算机引物设计软件辅助自行设计引物,上游5'-CGGGATCCATGCACGTGCGCTCACTGCCA-3'(下划线部分为BamH 酶切位点),下游5'-GCA-GATATCCTAGTGGCAGCCACAGGCCCG-3'(下划线部分为EcoR 酶切位点)。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取及RT-PCR扩增 用Trizol常规提取人胚肾总RNA,经逆转录合成cDNA进行PCR反应。采用高保真Taq DNA聚合酶进行PCR扩增,扩增条件为95℃预变性3 min,94℃变性20 s,60℃退火30 s,72℃延伸90 s,扩增32个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物先经琼脂糖凝胶电泳分离,然后用DNA胶回收纯化试剂盒回收纯化,获bmp-7(1 295 bp)基因片段。

1.2.2 bmp-7/pcDNA3.1(+)真核表达质粒的构建 将经同样酶切(BamH /EcoR)纯化的bmp-7片段与pcDNA3.1(+)载体用T₄DNA连接酶4℃连接过夜,连接产物分别转化DH 5 α 感受态细胞,挑取细菌克隆,培养后用质粒DNA小量抽提试剂盒抽提质粒,DNA序列测定及酶切鉴定后,挑取正确序列的克隆大量扩增提取质粒,命名为bmp-7/pcDNA3.1(+),置于-20℃,备用。

1.2.3 Lipofectamine 2000脂质体体外介导bmp-7基因的转染 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基,37℃、5%CO₂培养MC3T3-E1细胞。转染前24 h,取对数生长期细胞,胰酶消化后,按每孔5 \times 10⁵个接种于6孔板中。当细胞生长成70%汇合时用Lipofectamine 2000脂质体包裹质粒,按说明书进

行转染。6孔MC3T3-E1细胞分别转染bmp-7/pcDNA3.1(+)(3孔)和空质粒pcDNA3.1(+)(3孔)。基因转染培养后6 h,每孔加1 mL含20%胎牛血清DMEM培养基,继续培养至24 h,换用新鲜的含10%FCS完全培养基。转染后72 h,提取细胞全蛋白备检。

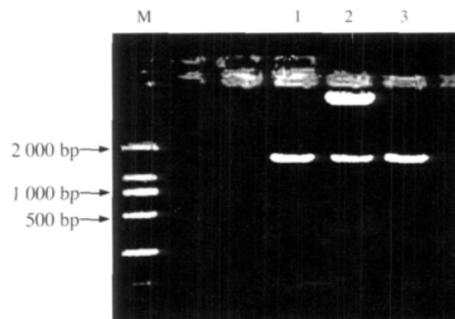
1.2.4 RT-PCR鉴定 分别提取72 h后转染了bmp-7/pcDNA3.1(+)和空质粒pcDNA3.1(+)的细胞,以及正常MC3T3-E1细胞的总RNA,经DNA酶消化后,常规逆转录成cDNA,用相应引物进行PCR扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 Western blot鉴定目的蛋白的表达 转染bmp-7/pcDNA3.1(+)、空质粒pcDNA3.1(+)和未经转染的MC3T3-E1细胞72 h后常规方法提取细胞全蛋白,取40 μ g蛋白,与2 \times 加样缓冲液1:1混匀后煮沸10 min,10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,然后电转移至PVDF膜(Millipore公司,美国,孔径为0.45 μ m),用含体积分数为5%脱脂奶粉的TBS封闭2 h,加兔抗人BMP-7抗体(1:1 000)4℃反应过夜,然后与偶联辣根过氧化物酶的羊抗兔IgG(1:5 000)室温反应2 h,每步反应结束均用含0.05%Tween-20的TBS洗涤3次,每次10 min,最后用ECL(Santa Cruz公司,美国)显色,X线曝光。

2 结果

2.1 扩增产物

RT-PCR后所得的产物经琼脂糖凝胶电泳,所得的条带与预期条带大小符合(图1)。



M: Ladder 2000 DNA Marker; 1: 人胚肾RT-PCR产物bmp-7(1 295 bp); 2: 质粒bmp-7/pcDNA3.1(+)的酶切图谱; 3: 转染bmp-7/pcDNA3.1(+)后的MC3T3-E1细胞RT-PCR产物

图1 RT-PCR及酶切产物电泳图

Fig 1 RT-PCR and restriction products electrophoresis map

2.2 构建质粒鉴定

抽提后的构建质粒酶切鉴定,酶切产物电泳,所得条带与预期条带大小相符(图1)。构建质粒用通用的T7引物测序,测得的bmp-7基因序列与GeneBank已报道的序列完全符合。

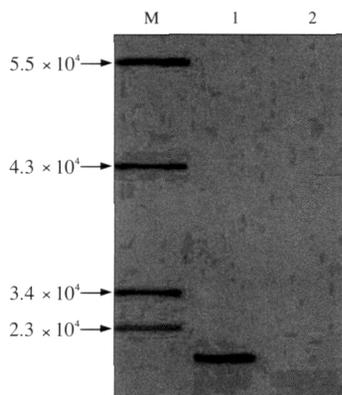
2.3 RT-PCR检测结果

转染MC3T3-E1细胞的RT-PCR扩增产物可见目

的基因条带(图1),而转染空质粒和未转染的细胞扩增未见条带。

2.4 Western blot结果

转染了bmp-7/pcDNA3.1(+)细胞提取的蛋白,分别在 1.5×10^4 处有一条明显阳性杂交带,而转染空质粒和未转染的细胞提取蛋白未见阳性条带(图2),这表明转染目的基因的细胞表达重组的BMP-7蛋白。



M: Protein molecular weight (MW) Marker; 1: 转染 bmp-7/pcDNA3.1(+) 质粒细胞; 2: 转染 pcDNA3.1(+) 质粒细胞

图2 转染后细胞提取蛋白Western blot结果

Fig 2 Result of Western blot of protein from transfected cells

3 讨论

作为转化生长因子- β 超家族成员,BMP具有多重生物功能。其决定骨愈合连锁反应中的关键步骤,刺激细胞外基质的产生,调节细胞凋亡^[3]。在多个动物模型中,BMP还影响四肢、肾脏、眼、心脏和皮肤的发生和发育^[4-7]。但是BMP在骨形成中的作用在诸多功能中是研究最普遍最深入的一个方面。BMP调节骨愈合过程中的3个关键步骤,细胞趋化和有丝分裂、分化和骨化^[3]。在3个可以促进异位成骨的BMP中,不同剂量的BMP-2可以促进软骨内或者膜内成骨^[8]。BMP-7可以促进软骨旁细胞向软骨细胞分化^[9]。

BMP的骨诱导特性已实验性应用到动物和人身上。BMP-2和BMP-7已经进行了临床检验和应用来促进骨折愈合,治疗骨不连,提高脊柱融合和治疗大块骨缺损。

目前有3种方法可以获得骨形态发生蛋白。最初,从脱矿骨中提取和纯化得到BMP,但是从大量的脱矿骨中,只能得到很少量的BMP,而且,获得的BMP量因标本而异。Blum等^[10]报道113份脱矿骨基质中BMP-2的浓度明显不同。第2个方法是,通过对基因的重组在体外产生BMP蛋白,这个方法目前应用于重组人BMP-2和BMP-7的产生。第3个是基

因治疗途径,与第2个方法不同,并非传递蛋白本身,而是传递bmp基因,通过细胞在成骨微环境中直接分泌BMP。重组蛋白和分子克隆方法可以稳定持续产生BMP。

本实验采用的pcDNA3.1(+)是一个具有多克隆位点的真核表达载体,质粒中含有人类巨细胞病毒CMV作为早期强启动子,使重组蛋白有效高水平表达,bmp-7插入BamH和EcoR酶切位点之间,利用CMV强启动子启动进行目的蛋白的转录和翻译。本实验基于第3种方法,将bmp-7基因序列克隆到真核表达载体pcDNA3.1(+)中,用脂质体转染成骨细胞,RT-PCR检测到转染细胞中有目的基因,Western blot法检测到目的蛋白的表达,下一步拟用有限稀释法并用G418进行筛选,再将筛选所得的高效稳定表达目的蛋白BMP-7的成骨细胞和生物材料相结合,植入体内骨缺损部位,高效稳定分泌BMP-7,从而达到基因治疗骨缺损的目的。

[参考文献]

- [1] Urist MR. Bone: Formation by autoinduction[J]. Science, 1965, 150(698): 893-899.
- [2] Croteau S, Rauch F, Silvestri A, et al. Bone morphogenetic proteins in orthopedics: From basic science to clinical practice [J]. Orthopedics, 1999, 22(7): 686-695.
- [3] Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: From basic science to clinical applications[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83-A Suppl 1(Pt 1): S1-S6.
- [4] ten Dijke P, Fu J, Schaap P, et al. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A Suppl 3: 34-38.
- [5] Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily[J]. Endocr Rev, 2002, 23(6): 787-823.
- [6] Goumans MJ, Mummery C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice[J]. Int J Dev Biol, 2000, 44(3): 253-265.
- [7] Yoon ST, Boden SD. Osteoinductive molecules in orthopaedics: Basic science and preclinical studies[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, (395): 33-43.
- [8] Wang EA, Rosen V, D'Alessandro J, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(6): 2220-2224.
- [9] Dieudonné SC, Semeins CM, Goei SW, et al. Opposite effects of osteogenic protein and transforming growth factor beta on chondrogenesis in cultured long bone rudiments[J]. J Bone Miner Res, 1994, 9(6): 771-780.
- [10] Blum B, Moseley J, Miller L, et al. Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix[J]. Orthopedics, 2004, 27(1 Suppl): S161-S165.

(本文编辑 汤亚玲)