

人骨形成蛋白2基因的克隆及序列测定*

华松¹, 贾战生², 武浩¹, 扈苯荃², 杨瑞锋¹, 张涌¹

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 第四军医大学 唐都医院, 陕西 西安 710000)

[摘要] 为了获得人骨形成蛋白2(hBM P-2)基因, 以GeneBank(NM 001200)中的hBM P-2基因编码序列为依据设计引物, 采用RT-PCR技术从人胎盘中获得hBM P-2基因cDNA, 并将其重组到pMD 18-T载体中, 转化到大肠杆菌JM 109后挑选阳性克隆, 经双酶切鉴定并进行测序。结果表明, 获得的基因片断为hBM P-2全编码序列, 同源性为99.9%。

[关键词] 人骨形成蛋白2; RT-PCR; 克隆

[中图分类号] Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0009-05

人骨形成蛋白2(human bone morphogenetic protein 2, hBM P-2)属于转化生长因子 β 超家族中的一员, 具有多种生物学功能, 可以诱导未分化的间充质干细胞向软骨细胞和成骨细胞分化, 进而形成新骨, 在骨折和骨损伤修复过程中发挥着重要作用^[1]。随着转基因技术的发展, 将编码hBM P-2的基因导入骨髓间充质干细胞, 再与合适的载体结合植入骨缺损部位, 以达到修复骨损伤的目的, 这种基因治疗方法已成为新的研究热点。本研究从人胎盘中提取总RNA, 通过RT-PCR方法获得编码hBM P-2的基因, 重组到pMD 18-T载体上后在大肠杆菌JM 109中克隆, 经检测, 所获得的基因序列与基因文库中hBM P-2基因的同源性为99.9%。

1 材料与方法

1.1 材料

人胎盘来源于杨凌示范区医院; RT-PCR试剂盒ThermoScript™ RT-PCR System为Invitrogen公司产品; RNA提取试剂TRIzol为GIBCO公司产品; pMD 18-T载体DNA胶回收试剂盒UNIQ-10柱式质粒小量抽离试剂盒、Taq酶、限制性内切酶BamH I与HindIII均购自大连宝生物工程有限公司; JM 109菌种购自华美生物工程有限公司。PE2400PCR仪为美国Perkin-Elmer公司产品; 台式高速冷冻离心机为德国Sigma公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 参考GeneBank(NM 001200)中hBM P-2 cDNA序列, 用Primer 5.0软件设计特异性的上下游引物, 上游引物为: 5'-GGA GAA GGA GGA GGCAAA GAAA 3'; 下游引物为: 5'-TGCTGTACTA GCGA CACCCACA 3'。

1.2.2 总RNA的提取 将新鲜的人胎盘剪成1 cm³的小块放入冻存管, 立即投入液氮罐中过夜。采用TRIzol法提取人的总RNA, 即: 取8 mg组织, 加少量液氮立即将其研磨成粉末状, 再加入1.0 mL TRIzol摇匀, 移入1.5 mL离心管中, 20℃温育10 min, 然后加入200 μ L氯仿并摇匀, 20℃温育5 min, 以12 000 g低温离心10 min; 将水相移至另一新的1.5 mL离心管中, 加入等体积异丙醇, 以12 000 g低温离心10 min, 弃上清液, 用1.0 mL 750 mL/L乙醇洗涤, 振荡器震荡后, 以7 500 g低温离心10 min, 弃上清液, 于空气中晾干, 加入50 μ L DEPC处理水, 取出5 μ L进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳^[2]。

1.2.3 RT-PCR反应 按试剂盒上的使用说明进行: 准备2个0.5 mL离心管, 分别标上, 。在管中依次加入RNA 5 μ L, 特异性下游引物1 μ L, DEPC处理水4 μ L, 于65℃水浴5 min后, 立即置于冰上; 同时在管中依次加入5 $\times$ cDNA Synthesis Buffer 4 μ L, 0.1 mol/L DTT 1 μ L, RNase Out 1 μ L, DEPC处理水1 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 反

* [收稿日期] 2004-02-26

[基金项目] 国家“863”高技术资助项目(2001AA 213081)

[作者简介] 华松(1976-), 男, 江西九江人, 在读硕士, 主要从事动物胚胎工程及干细胞研究。

[通讯作者] 张涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程与发育生物学研究。

转录酶(Thermoscript RT) 1 μL 。将 摇匀后移入中, 先 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 再 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 然后加入 1 μL RNase H, 再于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。接着做 PCR 反应, 从上述反应液中取出 2 μL 置于 200 μL 离心管中作为 cDNA 模板, 依次加入上下游引物各 1 μL , 10 $\times$ Taq 酶 Buffer II 5 μL , Taq 酶 0.5 μL , dNTP 1 μL , 并加灭菌水至 50 μL , 混匀后置于 PCR 仪上, 先 94 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 min, 然后以 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2.5 min, 共 30 个循环, 再以 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物的纯化 PCR 扩增后, 按文献[2]的方法对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 再根据 PCR 产物纯化试剂盒上的使用说明纯化目的条带。

1.2.5 目的片段克隆 将纯化的 PCR 产物与 T 克隆载体 pMD18-T 连接。取 1 μL 回收的 DNA 加入到等量的 pMD18-T Vector 中, 再加入灭菌水 3 μL 及含有 T4 DNA 连接酶的缓冲液 Solution I 5 μL , 混匀后在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下反应过夜。取 3 μL 转化至 100 μL JM 109 感受态细胞中, 在含有 X-Gal, IPTG 及氨苄青霉素的培养基上于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h, 然后进行蓝白斑筛选培养, 挑取白斑接种于含 5 mL LB (含 60 mg/L Amp) 的试管中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 200 r/min 振荡培养过夜。按照 UNIQ-10 柱式质粒小量抽离试剂盒使用说

明提取质粒。

1.2.6 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind*III 对纯化的质粒进行双酶切。质粒 6 μL , *Bam*H I 0.5 μL , *Hind*III 0.2 μL , Buffer Y/L 1 μL 和灭菌水 2.5 μL 混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 3 h, 琼脂糖凝胶电泳检查酶切结果; 此外取纯化质粒 2 μL 为模板, 在与 1.2.3 步骤相同的条件下进行 PCR, 用琼脂糖凝胶电泳进一步检测克隆质粒中的 hBMP-2 基因。

1.2.7 目的片段的序列测定 挑取阳性菌落做穿刺培养过夜, 送往大连宝生物工程有限公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 细胞总 RNA 的提取结果

对 RNA 提取试剂盒提取的人胎盘细胞总 RNA, 采用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 结果(图 1)未见明显降解, 符合试验要求。

2.2 PCR 扩增结果

以经 RT-PCR 合成的 cDNA 第一条链为模板进行 PCR 反应, 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 2)可见, 在 1 500 bp 与 1 200 bp 间有 1 条清晰的带, 大小约为 1 343 bp。说明扩增产物与预期的结果一致。

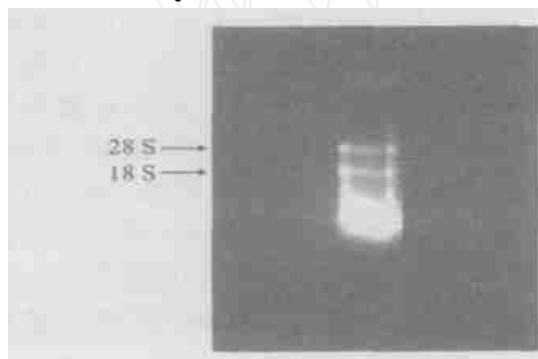


图1 总RNA的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Aldehyde denaturalized electrophoresis of total RNA

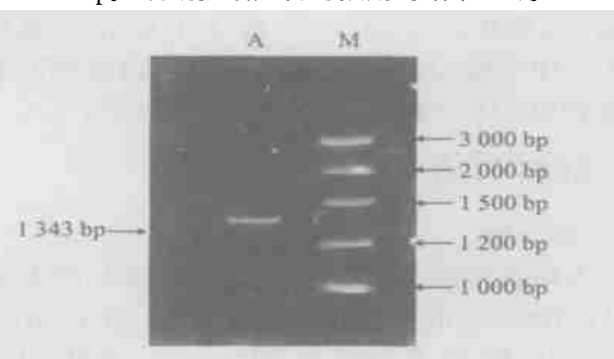


图2 PCR产物的电泳结果

M. DNA 样标; A. PCR 产物

Fig. 2 Electrophores of PCR product

M. DNA marker; A. PCR product

2.3 重组质粒的双酶切与PCR分析结果

提取质粒后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图3。由图3可见, 在 3 500 bp 左右处有 1 条清晰的带。pMD18-T (2 692 bp) 与目的基因(1 343 bp)重组后构成环状分子, 与相同大小的线状分子相比, 电泳速度要快, 说明重组成功。采用限制性内切酶 *Bam*H I 与 *Hind*III 对重组质粒进行双酶切后, 经琼脂糖凝胶电泳可明显看出与预期大小相同的 2 条带(图4), 其

中 1 384 bp 与目的片段的理论值 1 343 bp 加上载体的一段序列相符, 说明目的片段成功地克隆到 pMD18-T 载体的 T 位点。以纯化的重组质粒为模板, 在相同条件下进行 PCR 反应, 琼脂糖凝胶电泳后有 1 条约为 1 343 bp 的带(图4), 初步可证明得到的 PCR 产物为目的片段。

2.4 目的片段序列分析

目的片段序列分析结果见图5, 划线部分的引物序列之间为目的基因, 引物两边是载体上的残余序列, □为突变后的碱基。经Blast 软件分析发现, 所克隆的基因包括hBM P-2 的完整读码框, 与GeneBank

中登录的hBM P-2 cDNA 相比, 同源性达99.9%。只有第629位的G突变成A, 但由于遗传密码的兼并性, GCA与GCG都是编码丙氨酸(A la), 没有发生移码突变, 因此并没有引起蛋白质多肽链的变化, 所对应的氨基酸序列见图6。

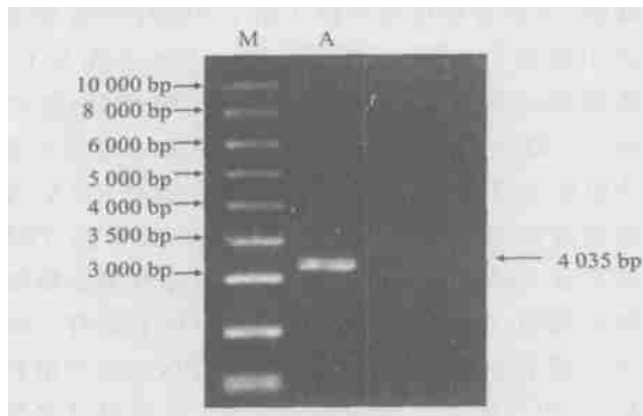


图3 重组质粒的电泳结果

M. DNA 样标; A. 重组质粒

Fig 3 Electrophoresis of reconstructed plasmid

M. DNA marker; A. Reconstructed plasmid

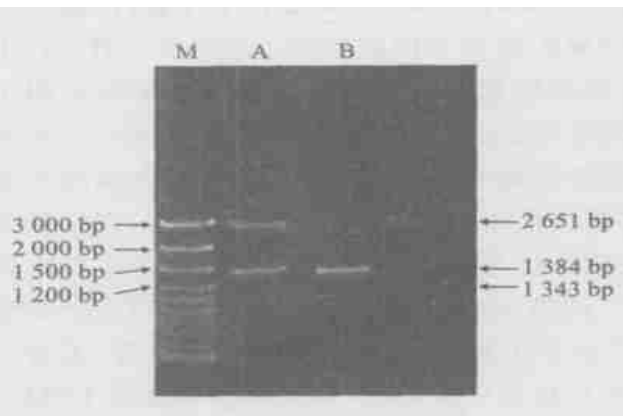


图4 重组质粒的PCR与双酶切结果

M. DNA 样标; A. 双酶切结果; B. 重组质粒PCR产物

Fig 4 PCR and double restriction endonuclease digestion of reconstructed plasmid

M. DNA marker; A. Double restriction endonuclease digestion; B. PCR product of reconstructed plasmid

```

gagaaggagg aggcaaagaa aaggaacgga cattcggtcc ttgcgccagg cggcaccgag
agagtttttc catgtggacg ctcttttcaat ggacgtgtcc ccgcgtgtct ctttagacgga
ctgcgggtctc cttaaaggctc accatgggtgg ccgggaccgc ctgtcttcta gcgttgctgc
ttccccaggt cctcctgggc ggcgcgggtg gcctcgttcc ggagctgggc cgcaggaagt
tcgcggcgcc gtcgtcgggc cgcctctcat ccagccctc tgacgaggtc ctgagcgagt
tcgagttgcg gctgctcagc atgttcggcc tgaacacagag acccaccccc agcagggacg
ccgtgggtgcc cccctacatg cttagacctgt atcgcaggca ctcaggtcag ccgggctcac
ccgccccaga ccaccggttg gagagggcag ccagccgagc caacactgtg cgcagcttcc
accatgaaga atcttttgaa gaactaccag aaacgagtgg gaaaacaacc cggagattct
tctttaattt aagttctatc cccacggagg agtttatcac ctcagcagag cttcaggttt
tccgagaaca gatgcaagat gctttaggaa acaatagcag tttccatcac cgaatttaata
tttatgaat cataaaacct gcaacagcca actcgaaatt ccccgtgacc agacttttgg
acaccaggtt ggtgaatcag aatgcaagca ggtgggaaag ttttgatgtc acccccctgt
tgatcggtg gactgcacag ggacacgcca accatggatt cgtgggtgaa gtggcccact
tgaggagaaa acaagggtgtc tccaagagac atgttaggat aagcaggtct ttgaccaag
atgaacacag ctgtgtcacag ataaggccat tgctagttaac ttttgccat gatggaaaag
ggcatccctc ccacaaaaga gaaaaacgtc aagccaaaca caaacgcctt aaacgcctta
agtccagctg taagagacac cctttgtacg tggacttcag tgacgtgggg tggaaatgact
ggattgtggc tccccgggg tatcacgcct tttactgcca cggagaatgc ccttttctc
tggtgatca tctgaactcc actaatcatg ccattgttca gacgttggtc acactctgta
actctaagat tcctaaggca tgctgtgtcc cgacagaact cagtgctatc tctgatgctgt
accttgacga gaatgaaaag gttgtattaa agaactatca ggacatggtt gtggagggtt
gtgggtgtcg ctagtacagc aaaattaaat acat

```

图5 hBM P-2 基因的核酸序列

Fig 5 hBM P-2 nucleotide acid sequence

```

MVAGTRCLLALLLPQVLLGGAAGLVPELGRRKF AAASSGRPSSQPSDEV LSEFELRL L
SMFGLKQRPTPSRDAVVPYMLDLYRRHSGQPGSPAPDHLRLERAASRANTVRSFHHEE
SLEELPETS GKTTRRFFNLSSIPT EEFITSAELQVFREQM QDALGNSS FHHRI NY
EIIKPATANSKFPVTRLLDTRLVNQNASRWESFDVTPAVMRWTAQGHANHG FVVEVAH
LEEKQGVSKRHVRISRSLHQDEHSWSQIRPLLVTFGHDGKGHPLHKREKRQAKHKQRK
RLKSSCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIVQTL
VNSVNSKIPKACCVPTELSAISMLYLDENEKVVLKKNYQDMVVEGCGCR

```

图6 从PCR产物推导出的hBM P-2全部氨基酸序列

Fig 6 Amino acid sequence of hBM P-2 deduced from PCR product

3 讨 论

hBM P-2 是转化生长因子 β 超家族中的一员,主要存在于骨髓基质中,对间充质干细胞(M SC)有化学趋化作用,能诱导未分化的M SC 分化为骨细胞,在骨的形成与修复中起关键作用,同时也是骨形成蛋白(BM P)家族中促成骨能力最强的一种。近年来,将体外提取或基因重组的hBM P-2 蛋白应用于骨缺损局部以促进修复获得了一定的效果^[3]。但是仍存在明显的缺点,如外源性hBM P-2 在体内半衰期短,容易被代谢;骨诱导时间短,用量大,需反复使用;蛋白质纯化步骤复杂且昂贵,从而限制了其临床应用^[4,5]。此外,hBM P-2 是典型的跨膜蛋白,外源性hBM P-2 由于不能与其受体发生有效结合,不会引起生物学反应或反应短暂,而内源性合成的hBM P-2 能够插入细胞质膜与受体高效结合,引起一系列的生物学反应,从而最大限度地满足骨再生的必要条件^[6]。目前,将hBM P-2 基因导入BM SC 后再植入骨损伤部位,使其在体内直接表达已成为组织工程研究的焦点。本研究的最终目的是把hBM P-2 基因插入以荧光蛋白为报告基因的真核表达载体pEGFP-C1 后,转染到M SC 中,在荧光显微镜下观

察 hBM P-2 基因的表达情况,从而为带有hBM P-2 基因的M SC 在体内直接表达奠定基础。因此,hBM P-2 基因的克隆是必不可少的。以往的研究都是从骨基质中或胎儿肾细胞中获得总RNA^[7],再利用RT-PCR 得到目的基因,但是RNA 在外界极易降解,试验过程很难掌握。由于hBM P-2 在胎盘组织中也有表达^[8],并且胎盘组织中还存在与RNA 酶结合的蛋白质,能够抑制RNA 酶对RNA 的降解^[9]。因此,本研究以取材简单、来源丰富的人胎盘为组织来源,采用TR Izo1 试剂法提取总RNA,并且是在液氮的保护下研磨胎盘组织而没有按TR Izo1 试剂盒上的说明进行匀浆,经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明RNA 的完整性非常好。张涌等^[10]研究发现,匀浆反而会影响RNA 的产量和质量,原因可能是由于匀浆使RNA 在外界过多暴露引起的。把扩增到的特异片断重组到pMD 18-T 载体上,转化到大肠杆菌内克隆,测序结果经Blast 软件分析发现,所克隆的基因包括hBM P-2 的完整读码框,与GeneBank (NM 001200)中的hBM P-2 cDNA 序列相比,同源性达 99.9%,没有发生移码突变,即成功地克隆出了hBM P-2 基因,为下一步hBM P-2 基因在M SC 中的直接表达创造了条件。

[参考文献]

- [1] Musgrave D S, Bosch P, Ghivizzain S, et al Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone[J]. Bone, 1999, 24(6): 541- 547.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manual[M]. 2th ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 366- 369.
- [3] Baltzer A W, Lattemann C, Whalen J D, et al Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BM P-2 gene[J]. Gene Ther, 2000, 7(9): 734- 739.
- [4] 朱六龙, 戴克戎, 汤亭亭, 等. 骨形成蛋白-2 基因转染人骨髓间充质干细胞诱导异位成骨的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(2): 131- 135.
- [5] 徐小良, 汤亭亭, 戴克戎, 等. 人BM P-2 基因转染的兔骨髓基质干细胞诱导成骨的实验研究[A]. 中国生物医学工程学会生物材料分会组织工程学组 第三届全国组织工程学术会议暨第一届中国国际组织工程会议论文集[C]. 成都: 四川大学出版社, 2002 63- 66.
- [6] Scaduto A A, Lieberman J R. Gene therapy for osteoinduction[J]. Orthop Clin North Am, 1999, 30(4): 625- 633.
- [7] 曾凡杰, 华子春, 胡勤刚, 等. 重组人骨形成蛋白2 在大肠杆菌中的克隆[J]. 东南大学学报(医学版), 2001, 20(3): 158- 160.
- [8] Furuya K, Nifuji A, Rosen V, et al Effects of GDF7/BMP12 on proliferation and the alkaline phosphatase expression in rat osteoblastic osteosarcoma ROS 17/2.8 cells[J]. J Cell Biochem, 1999, 72(2): 177- 181.
- [9] Peter Blackburn, Glynn Wilson, Stanford Moore. Ribonuclease inhibitor from human placenta[J]. Journal of Biological Chemistry, 1977, 252(16): 5904- 5910.
- [10] 张涌, 戴博, 刘建忠, 等. 人骨形成蛋白3 基因cDNA 部分序列的RT-PCR 克隆[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(2): 1- 5.

Cloning and sequencing of Human Bone Morphogenetic Protein 2

HUA Song¹, JIA Zhan-sheng², WU Hao¹, HU Ben-quan², YANG Rui-feng¹, ZHONG Yong¹

(1 Institute of BioEngineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi, Xi'an 710000, China)

Abstract: In order to clone the human bone morphogenetic protein 2 (hBM P-2), a pair of primers were designed based on the coding sequence of hBM P-2 derived from the GeneBanks (NM 001200). The total RNA was extracted from the tissue of human placenta. The target fragment was amplified by RT-PCR, then inserted into cloning vector pMD18-T and transformed into *E. coli* strain JM 109. The result of double restriction endonuclease digestion and the sequencing indicated that the fragment cloned was correct compared with the sequence deposited in GeneBanks, and the homology was 99.9%. Cloning of hBM P-2 gene gives a basis for further expression study.

Key words: hBM P-2; RT-PCR; cloning

(上接第8页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)02-0006-EA

Cloning and sequencing of cDNA of TRAIL from human placenta

ZHANG Ming-feng, TANG Shuang, SONG Hong-wei, ZHANG Yong

(Institute of BioEngineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: According to the cDNA sequence of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) derived from the Genebank (U 37518), a pair of primers were designed. RT-PCR was applied to amplify the whole cDNA of TRAIL gene. The DNA fragment was cloned into pGEM-T Easy vector and transformed into *E. coli* DH5 α host bacteria. Not I endonuclease digestion and sequencing of selected positive cloned bacteria were conducted. Result showed the whole 1 039 bp cDNA of TRAIL was successfully cloned.

Key words: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL); RT-PCR; sequencing; human placenta