

网络出版时间:2013-09-22 17:09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130922.1709.027.html>

人抗凝血酶 Cys248 位点突变体的构建与真核表达

杨海¹, 王芳宇¹, 李青旺², 胡建宏², 董潇潇¹, 单永红³

(1 衡阳师范学院 生命科学系, 湖南 衡阳 421008; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 南岳生物制药有限公司 产品研发部, 湖南 衡阳 421002)

[摘要] **【目的】**建立一种对人抗凝血酶(AT)Cys248 位点进行定点突变和真核表达的可靠方法,为突变体的结构和功能研究提供原始材料。**【方法】**以人 AT cDNA 序列为模板,设计 1 对反向扩增引物,进行反向 PCR 反应;PCR 产物经连接、测序后,克隆至表达质粒 pcDNA3.1(+)-GFP 上,构建重组真核表达载体 pcDNA3.1(+)-mAT-GFP;用重组载体介导突变基因在山羊乳腺上皮(GME)细胞内表达,收集细胞培养上清液进行表达产物的定性、定量检测。**【结果】**突变基因经测序证实与预期结果一致,且在 GME 细胞内得到高效表达,细胞培养液上清中的突变体质量浓度为 (526 ± 17.3) mg/L。**【结论】**反向 PCR 法是对 AT 基因进行定点突变的可靠方法,AT 突变基因在 GME 细胞内可高效表达。

[关键词] 反向 PCR;人抗凝血酶;Cys248;定点突变;真核表达

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)10-0032-05

Construction and eukaryotic expression of human antithrombin Cys248 site mutant

YANG Hai¹, WANG Fang-yu¹, LI Qing-wang², HU Jian-hong²,
Dong Xiao-xiao¹, SHAN Yong-hong³

(1 Department of Life Science, Hengyang Normal University, Hengyang, Hunan 421008, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Department of Product Research and Development, Nanyue Biopharmaceutical Co., LTD, Hengyang, Hunan 421002, China)

Abstract: **【Objective】**This study aimed to explore a reliable method for site-mutation and eukaryotic expression of human antithrombin (AT) Cys248 mutant, and to provide the original material for the structural and functional research of AT mutant. **【Method】**AT cDNA sequence was taken as template and a pair of inverse amplification primers were designed for inverse polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were connected, sequenced and cloned into the expression plasmid of pcDNA3.1(+)-GFP for the construction of recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)-mAT-GFP. Mutated gene was mediated by the recombinant plasmid and expressed in the goat mammary epithelial (GME) cells, and then the cell culture medium was collected and performed for qualitative and quantitative detection of the mutant. **【Result】**AT gene was successfully mutated by inverse PCR method, and it was expressed in GME cells efficiently. The concentration of the AT mutant was (526 ± 17.3) mg/L in the cell culture medium. **【Conclusion】**Inverse PCR method was reliable for site directed mutation of AT gene, and successfully gaining of AT Cys248 mutants in GME cells medium provided the convenience for its structural and functional

[收稿日期] 2012-12-07

[基金项目] 湖南省自然科学基金-衡阳联合基金项目(13JJ8021);衡阳市科技计划一般项目(2012KN24);衡阳师范学院产学研用一般项目(12CXYY07);衡阳师范学院大学生研究性学习和创新性实验计划项目(CXZX1307)

[作者简介] 杨海(1978—),男,湖南浏阳人,副教授,主要从事生物药物研究。E-mail: yanghai_1223@126.com

research in future.

Key words: inverse PCR; human antithrombin; Cys248; site directed mutation; eukaryotic expression

在对蛋白质结构和功能的研究与应用中,点突变体的构建起着非常关键的作用^[1-2]。目前,蛋白质点突变体主要用于蛋白质互作区域、蛋白质的修饰位点以及蛋白质在细胞内的定位等研究之中^[3]。随着点突变体构建技术的不断成熟,点突变体新的结构和生物活性日益受到各国科学家的重视。

构建基因点突变体的主要方法有 2 种。一种是重组 PCR 突变法,即分别设计 2 对引物,进行 2 次 PCR 扩增,再将扩增后的突变 DNA 片段进行酶切、连接,形成完整的突变基因序列,插入至表达载体;此方法虽技术成熟,但是过程繁琐、耗时较长、容易出错。另一种是试剂盒突变法,即运用生物公司提供的基因点突变试剂盒,完成基因定点突变操作;该方法虽有一定的操作程式,但需要对引物进行反复优化,且试剂盒价格高昂,使其推广应用受到一定程度的限制。随着分子生物学技术的不断发展和进步,采用反向 PCR 法对目的基因进行定点突变已引起人们的重视^[4]。

人抗凝血酶(Antithrombin,AT)是血液中重要的抗凝蛋白,为单链糖蛋白,分子质量为 58 ku,含有 432 个氨基酸残基,由 4 条寡聚糖侧链(96,135,155 和 192 位)组成,含 3 个二硫键(Cys8-Cys128, Cys21-Cys95 和 Cys248-Cys430)。AT 在人血浆中的含量约为 150 mg/L,是一种稀有蛋白^[5],除具有抗凝血功能外,科学家还发现其具有重要的抗血管生成活性,具有这种功能的 AT 具有共同的结构基础,即蛋白 C 端环状结构断裂^[6-7],这一发现为抗肿瘤等血管生成性疾病的药物研发提供了重要思路。基于 AT 分子 Cys248 位点在维持其 C 端环状结构中的重要作用,本研究拟选择 Cys248 作为点突变位点,运用反向 PCR 方法将 AT 的 Cys248 定点突变为 Arg248,以期 AT 的抗血管生成研究提供素材。



正向引物为:5'-TCAGCATCTATGATGTAC-CAG-3';反向引物为:5'-TCTCGACTCTCCAT-CAGCCTT-3'。在反向引物的 5' 端加入 TCT 3 个碱基,这 3 个碱基编码精氨酸(Arg),从而替代编码

1 材料与方法

1.1 材料

大肠埃希菌 DH5α 和模板质粒 pShuttle-AT,由衡阳师范学院生物工程实验室保存;真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-GFP,购自上海希匹吉生物技术公司;DNA 聚合酶 KOD-plus,购自东洋纺生物技术公司;核酸内切酶、T4 多聚核苷酸激酶、T4 DNA 连接酶以及 DNA Marker 等,购自大连宝生物有限公司;质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、胶回收试剂盒,购自 Promega 生物技术公司;脂质体 Lipofectamine 2000,购自 Invitrogen 有限公司;AT 标准品和鼠抗人 AT 单克隆抗体,购自 Sigma 公司;AT 定量检测试剂盒(Elisa 法),美国 DSL 公司产品。

1.2 山羊乳腺上皮(Goat mammary epithelial, GME)细胞的分离与纯化

取小块山羊乳腺组织,用剪刀剪碎,加入到含一定浓度胶原酶的 MEM(Hyclone,美国)溶液中,37℃摇床上过夜;加入 DNA 酶后,37℃摇床上 15 min;室温条件下 200 g 离心 5 min;MEM 溶液悬浮细胞沉淀,重复离心(条件同前),直至细胞悬液清亮;将细胞悬液过孔径 53 μm 滤膜,使 GME 细胞留在滤膜上;用 MEM 溶液洗脱滤膜,获得 GME 细胞。GME 细胞经原代培养后,调整密度为 2.5×10⁵ mL⁻¹,接种于 12 孔板中,于 37℃、饱和湿度环境下培养,细胞培养基为 MEM,同时添加体积分数 10% 的胎牛血清、10 ng/mL 的上皮生长因子、10 μg/mL 的胰岛素以及 10 μg/mL 的双抗(青霉素-链霉素)。

1.3 Cys248 点突变体引物的设计

根据 NCBI 公布的 AT cDNA 编码区序列及其对应的氨基酸序列,设计 1 对用于反向 PCR 扩增的引物(由上海生工生物工程公司合成),并对合成的引物进行磷酸化处理。设计的引物信息如下:

第 248 位的半胱氨酸(Cys)的 3 个碱基 TGT。

1.4 重组突变基因表达载体的构建

以 pShuttle-AT 重组质粒为模板(20 ng),采用高保真的 DNA 聚合酶 KOD-plus 及上述引物进行

反向 PCR。反应体系为 50 μL :10 $\times$ PCR buffer 5 μL , 10 mmol/L 的 dNTPs 5 μL , 20 mmol/L 的 Mg_2SO_4 3 μL , 2.5 U/ μL 的 KOD-plus 1 μL , 10 mmol/L 的正、反向引物各 1 μL , 10 mg/L 的 DNA 模板 1 μL , 无离子 H_2O 33 μL 。反应条件为:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min,56 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,25 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 保温过夜。同时设以 pShuttle 空质粒为模板的对照。

PCR 反应结束后,对扩增产物进行 8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,切下特异性 PCR 片段(837 bp,555 bp),用胶回收试剂盒进行回收。将回收产物加入 *Dpn* I 酶处理 1 h 后,用 DNA 片段回收试剂盒进行回收;取 20 μL 回收产物,加入 T4 DNA 连接酶,16 $^\circ\text{C}$ 过夜进行 DNA 片段连接;将 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶加入到纯化后的连接产物中进行酶切反应,将纯化后的酶切产物(1 392 bp)与 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切后的空载体 pcDNA3.1(+)-GFP 于低温下连接,并用连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α ,随机挑取 5 个菌落进行摇菌,提取质粒进行测序,将测序正确的重组质粒命名为 pcDNA3.1(+)-mAT-GFP。

1.5 重组表达载体转染 GME 细胞

培养 GME 细胞,待其汇合度达 70%~80%时,进行脂质体转染操作。分别取 1 μg 经鉴定正确的重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-mAT-GFP 和 5 μL 脂质体溶液,加入到 250 mL MEM 培养基中,室温孵育 10 min,然后将二者混合,室温孵育 20 min。孵育结束后,将含脂质体和 DNA 的混合液加入到用 MEM 培养的 GME 细胞中,于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 4 h,去除脂质体,换上含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,7~8 d 后,收集细胞培养液上清,4 $^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min,去除细胞碎片,将含有突变体的上清液分装,于-70 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.6 表达产物的定性与定量分析

取新鲜或冻存的细胞培养上清 20 μL ,与 10 μL 2 $\times$ 上样缓冲液混匀,煮沸 10 min,在 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶中进行 SDS-PAGE,直至溴酚蓝到达胶底部;将目标蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,经封闭、抗体孵育、洗涤操作后,压片显影。

表达产物的定量检测采用美国 DSL 公司的 Elisa 检测试剂盒,具体操作按该试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 AT 编码区 cDNA 的定点突变

以质粒 pShuttle-AT 为模板,运用 1 对针对

Cys248 位点的反向 PCR 引物,扩增出了长度约 800 和 550 bp 的 2 条特异性条带(图 1),与预期结果相符。

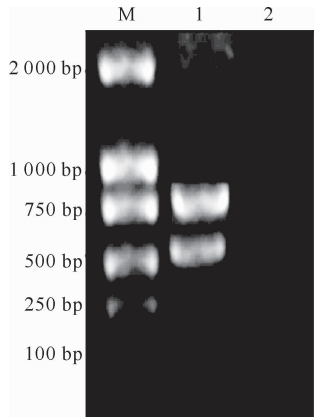


图 1 人 AT 基因反向 PCR 产物的电泳检测
M. DNA marker;1. 以 pShuttle-AT 为模板的扩增产物;
2. 以 pShuttle 空质粒为模板的扩增产物

Fig. 1 Electrophoresis detection of inverse PCR
amplification products of human AT gene
M. DNA marker;1. Amplification products whose template
was plasmid of pShuttle-AT;2. Amplification products
whose template was vacant plasmid of pShuttle

将重组突变基因的质粒进行 DNA 测序,对测序获得的 AT 突变序列和 AT 模板序列进行 DNA 序列对照,测序结果(图 2)表明,编码 Cys248 位点的 3 个碱基 TGT 已突变为 TCT,表明定点突变获得成功。

2.2 重组表达载体 pcDNA3.1(+)-mAT-GFP 对 GME 细胞的转染

利用脂质体将重组表达载体 pcDNA3.1(+)-mAT-GFP 转染 GME 细胞,48 h 后于荧光显微镜下观察细胞变化。因重组表达载体内含有 GFP 绿色荧光蛋白报告基因,故在转染 48 h 后,与未转染的 GME 细胞(图 3A)相比,转染重组质粒的 GME 细胞在荧光显微镜下可以见到绿色荧光(图 3B)。以上结果说明,重组质粒转染 GME 细胞后,目的基因获得表达。

2.3 突变基因在 GME 细胞中的表达

对细胞培养液内的突变体进行定量、定性分析。通过 Western blot 检测,证实细胞培养液内含有目标蛋白(图 4)。用 ELISA 法进一步对突变体进行定量分析,结果显示,突变体在 GME 细胞培养液中的质量浓度达到(526 $\pm$ 17.3) mg/L。以上结果说明,真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-介导突变基因在 GME 细胞中得到了高水平表达。

Query	721	GAGCTCACTGTTCTGGTGCTGGTTAACACCATTACTTCAAGGGCCTGTGGAAGTCAAAG	780
Sbjct	721	GAGCTCACTGTTCTGGTGCTGGTTAACACCATTACTTCAAGGGCCTGTGGAAGTCAAAG	780
Query	781	TTCAGCCCTGAGAAACACAAGGAAGGAACTGTTCTACAAGGCTGATGGAGAGTCGTGTTCA	840
Sbjct	781	TTCAGCCCTGAGAAACACAAGGAAGGAACTGTTCTACAAGGCTGATGGAGAGTCGTCTTCA	840
Query	841	GCATCTATGATGTACCAGGAAGGCAAGTTCCGTTATCGGCGCGTGGCTGAAGGCACCCAG	900
Sbjct	841	GCATCTATGATGTACCAGGAAGGCAAGTTCCGTTATCGGCGCGTGGCTGAAGGCACCCAG	900
Query	901	GTGCTTGAGTTGCCCTTCAAAGGTGATGACATCACCATGGTCCTCATCTTGCCCAAGCCT	960
Sbjct	901	GTGCTTGAGTTGCCCTTCAAAGGTGATGACATCACCATGGTCCTCATCTTGCCCAAGCCT	960

图 2 人 AT Cys248 位点突变基因与人 AT 基因 DNA 序列的比较
Query 为人 AT 基因序列,Sbjct 为人 AT Cys248 位点突变基因序列

Fig.2 DNA sequence BLAST between human AT Cys248 site mutated gene and human AT gene
Query means human AT gene sequence;Sbjct means human AT Cys248 site mutated gene sequence

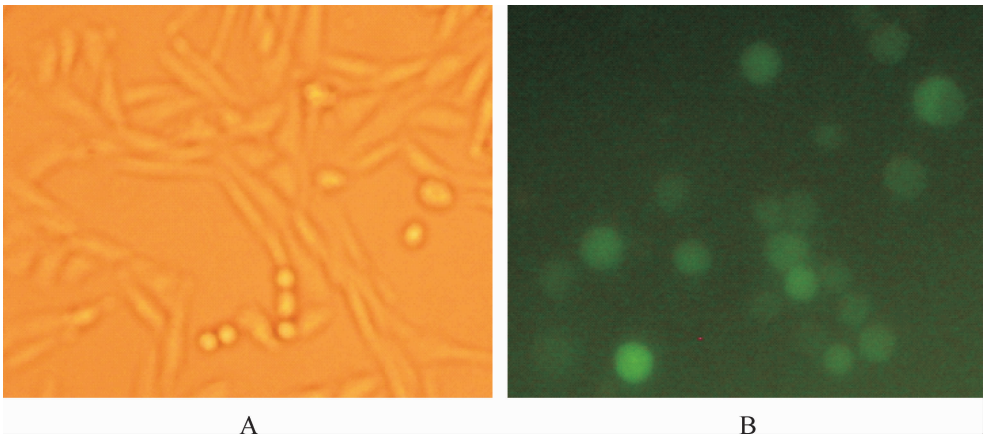


图 3 重组质粒转染前后 GME 细胞的荧光显微检测(200×)
A. 重组质粒转染前的 GME 细胞;B. 重组质粒转染后的 GME 细胞

Fig.3 Fluorescence detection of GME cells before and after recombinant plasmid transfection (200×)
A. GME cells before recombinant plasmid transfection;B. GME cells after recombinant plasmid transfection

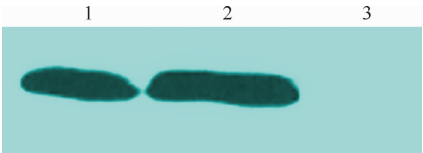


图 4 人 AT Cys248 突变体蛋白的 Western blot 检测
1. AT 标准品;2. 重组质粒转染后的细胞培养液;
3. 未转染重组质粒的细胞培养液
Fig.4 Western blot detection of human AT Cys248 site mutant protein
1. AT standard protein;2. GME cell culture medium after recombinant plasmid transfection;3. GME cell culture medium without recombinant plasmid transfection

3 讨 论

基因定点突变是创造新型蛋白质的主要方法,也是研究蛋白质结构与功能的重要手段,在生物化

学与分子生物学研究中具有不可替代的作用。与先前进行基因点突变的技术方法^[8-9]相比,运用反向 PCR 法对基因进行定点突变,只需设计 1 对常规引物,仅进行 1 轮 PCR 扩增,极大地简化了试验步骤,节省了时间和经费。由于试验过程中采用 *Dpn* I 对模板 DNA 进行消化,随后对酶处理产物进行胶回收,因此进行 PCR 扩增片段连接时,基本排除了模板 DNA 存在的可能性,连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α 后,转化子阳性率可达到 100%,进一步增强了基因定点突变的准确性。此外,应用反向 PCR 技术对基因进行定点突变,无需考虑目的基因中是否具有平末端酶切位点,大大扩展了基因定点突变的应用范围^[10]。研究结果证实,反向 PCR 技术是一种快速构建 AT 基因点突变体的高效方法,具有明显的简易性和较强的实用性。

要实现外源基因的高效表达,表达载体的选择

与构建十分关键。本研究采用反向 PCR 技术,将人 AT 基因编码 Cys248 的碱基 TGT 突变为编码 Arg 的 TCT 后,通过构建 pcDNA3.1(+)-mAT-GFP 真核表达载体,在 GME 细胞内获得了突变基因的高效表达,其质量浓度达到 (526 ± 17.3) mg/L,主要原因是笔者选择并成功构建了突变基因真核表达的适合载体。pcDNA3.1(+)是一个常用的真核表达载体,含有 CMV 启动子和 SV40 序列,因而可介导目的基因在大多数真核细胞内高效表达^[11]。本试验选用 pcDNA3.1(+)作为 AT 突变基因的真核表达载体,为实现重组蛋白在 GME 细胞内的高效表达提供了载体基础。鉴于报告基因在基因体外表达检测中的重要性,在构建表达载体时,笔者特异性地引入了绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因。GFP 性质稳定,通常不影响目的基因表达产物的生物学活性,且能根据 GFP 绿色荧光信号的强弱,对重组蛋白表达情况进行分析,有利于判断转染效率、筛选阳性细胞、确定表达效果。

在突变体的结构和功能研究中,通常需要借助可靠的外源基因表达体系以获得足够数量的蛋白质。哺乳动物乳腺上皮细胞作为一种分泌型细胞,在内外因素的刺激下能够大量分泌目的蛋白。作者以前的研究表明,哺乳动物乳腺上皮细胞是重组蛋白高效表达的理想细胞^[12-13]。本试验构建的重组质粒载体虽然不含有乳腺特异性启动子,但所含有的 CMV 启动子可以确保外源基因在动物乳腺细胞中进行非特异性表达。对表达产物的定性和定量检测表明,GME 细胞具有高效表达外源基因的能力。由于脂质体转染法对表达细胞存在一定的伤害,影响细胞的存活、生长以及重组蛋白的表达,若采用毒性更小的转染介质,重组蛋白的表达量将会得到进一步提高。

综上所述,本研究应用反向 PCR 方法对编码 AT 的 Cys248 基因位点成功进行了定点突变,证实了反向 PCR 法在基因定点突变中的可靠性;通过构建重组突变基因的真核表达载体 pcDNA3.1(+)-mAT-GFP,在 GME 细胞内实现了突变体的高效表达,为下一步进行 AT Cys248 位点突变体的结构和功能研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Mian C, Sartorato P, Barollo S, et al. RET codon 609 mutations; A contribution for better clinical managing [J]. Clinics (Sao Paulo),

2012,67(S1):33-36.

- [2] Gao C, Pan M M, Lei Y J, et al. A point mutation in the DNA-binding domain of HPV-2 E2 protein increases its DNA-binding capacity and reverses its transcriptional regulatory activity on the viral early promoter [J]. BMC Mol Biol, 2012, 13:5.
- [3] Schuster T B, Ouboter D de B, Palivan C G, et al. From fibers to micelles using point-mutated amphiphilic peptides [J]. Langmuir, 2011, 27(8):4578-4584.
- [4] 程 龙, 韩白玉, 侯 莎, 等. 运用新型的反向 PCR 策略高效构建基因的点突变体 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(4):378-382.
Cheng L, Han B Y, Hou S, et al. Site directed mutagenesis by novel inverse PCR strategy [J]. Prog Biochem Biophys, 2011, 38(4):378-382. (in Chinese)
- [5] Muszbek L, Bereczky Z, Kovács B, et al. Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis [J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(S1):67-78.
- [6] O'Reilly M S, Pirie-Shepherd S, Lane W S, et al. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin [J]. Science, 1999, 285(5435):1926-1928.
- [7] O'Reilly M S. Antiangiogenic antithrombin [J]. Semin Thromb Hemost, 2007, 33(7):660-666.
- [8] Zhang B Z, Zhang X, An X P, et al. An easy-to-use site-directed mutagenesis method with a designed restriction site for convenient and reliable mutant screening [J]. J Zhejiang Univ: Sci B, 2009, 10(6):479-482.
- [9] Chang S, Stauffer S, Sharan S K. Using recombineering to generate point mutations: The oligonucleotide-based "hit and fix" method [J]. Methods Mol Biol, 2012, 852:111-120.
- [10] 刘欣毅, 张惠展, 袁勤生. 一种新型的基因定点突变方法及其在 DdsA 突变研究中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(5):415-418.
Liu X Y, Zhang H Z, Yuan Q S. A novel method for site-directed mutagenesis and its application in DdsA mutant research [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2007, 23(5):415-418. (in Chinese)
- [11] 邵喜英, 陈占红, 曹 江, 等. pcDNA3.1(+)-CYP19-GFP 真核表达质粒构建 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2011, 40(2):189-194.
Shao X Y, Chen Z H, Cao J, et al. Construction of eukaryotic expression plasmids containing green fluorescent protein gene and CYP19 WT or its variants [J]. J Zhejiang Univ: Medical Sciences, 2011, 40(2):189-194. (in Chinese)
- [12] Yang H, Li Q W, Han Z S, et al. Recombinant human antithrombin expressed in the milk of non-transgenic goats exhibits high efficiency on rat DIC model [J]. J Thromb Thrombolysis, 2009, 28(4):449-457.
- [13] Yang H, Li Q W, Han Z S, et al. High level expression of recombinant human antithrombin in the mammary gland of rabbits by adenoviral vectors infection [J]. Anim Biotechnol, 2012, 23:89-100.