

人骨形成蛋白 3 基因 cDNA 部分 序列的 RT-PCR 克隆*

张 涌, 戴 博, 刘建忠, 郑月茂

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 针对人骨形成蛋白 3 基因的 cDNA 序列设计引物, 通过反转录 PCR 技术, 从人骨纤维肉瘤组织中扩增出目的片段。从胶中回收目的片段, 将其与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 经 *Hind*III 酶切鉴定, 进行测序。结果显示所得到的片段大小为 845 bp, 与所设计的序列同源性为 100%, 说明已经成功地扩增、克隆了人骨形成蛋白 3 (hBM P-3) 基因 cDNA 的大部分序列。

[关键词] 骨形成蛋白; RT-PCR; 人骨形成蛋白 3 基因

[中图分类号] Q 781

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)02-0001-05

骨形成蛋白 (Bone Morphogenetic Protein, BMP) 除 BMP-1 外, 都属于 TGF- β 超家族成员, BMP 最初是作为诱骨活性蛋白被发现的^[1]。研究表明 BMP 不仅在胚胎时期的骨骼发育和骨再生修复中起着重要作用, 而且对胚胎发育过程中中胚层的诱导和分化、造血组织的发育以及神经系统的发育和修复等都起着重要作用, 故一度成为国内外研究的热点。由于 BMP 在骨组织中含量甚微, 提取方法烦琐, 重复性差, 可能引起免疫排斥反应等, 故不能满足临床应用和基础研究的需要。随着 hBM P1~13 cDNA 基因的克隆成功^[2], 人们已在大肠杆菌以及 COS、CHO、昆虫等^[3]真核细胞中表达了一些有生物活性的 hBM P, 但截止目前国内外尚未见到有用乳腺细胞表达 hBM P 的报道。鉴于此, 本研究拟通过 RT-PCR 的方法克隆该基因, 为利用转基因动物乳腺生产人骨形成蛋白创造条件。

1 材料和方法

1.1 组织来源

新鲜的人骨纤维肉瘤组织采自第四军医大学西京医院, 用 PBS 冲净血污和表面油脂后, 立即将组

织剪成 1 cm³ 的小块放入冻存管, 液氮中保存备用。

1.2 主要试剂

RNA 提取用 GIBCOL 公司的 TRIzol 试剂; 反转录及 PCR 用大连宝生物公司的 TaKaRa RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver 1.1 试剂盒; 从电泳胶中回收 PCR 产物用上海生工的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒; pMD18-T 载体为大连宝生物公司产品; 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 由本室保存; 从细菌中提取质粒用上海生工的 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒; DEPC 为 AMRESCO 公司产品。

1.3 引物设计合成

用 Primer 5.0 软件设计引物, 各项参数见表 1。

1.4 总 RNA 提取

采用 TRIzol (GIBCOLBRL) 法提取人的总 RNA。与试剂使用说明书上不同的是, 组织块在液氮中研磨后直接加氯仿进行液相分离, 而无须进行匀浆和预离心。

1.5 RNA 的甲醛变性电泳

取总 RNA 9 μ L 进行甲醛琼脂糖凝胶电泳^[4]。电泳结果经凝胶成像系统分析并储存图像。

表 1 引物设计参数

Table 1 The parameters of designed primers

引物 Primer	序列 Sequence	长度/bp Length	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	GC 含量/% GC value	起止序列号 Sequence No.	产物长度/bp Product length
F 上游	5'-acatcgctaaccaagtctga-3'	20	52.9	45.0	675	
R 下游	5'-gagcaataataggcatcaaag-3'	21	52.6	38.1	1519	845

[收稿日期] 2002-05-30

[基金项目] 国家 863 高技术计划项目 (2001AA 213081)

[作者简介] 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和发育生物学研究。

1.6 RT-PCR

将上一步得到的RNA在60℃孵育10 min后立即进行反转录,反转录体系共20 μL,在DEPC水处理过的PCR反应管中依次加入:RNA 9.5 μL, MgCl₂ 4 μL, 10×RNA PCR Buffer 2 μL, dNTP 混合物 2 μL, 特异的下游引物(表1) 1 μL, AMV 反转录酶 1 μL, RNase 抑制剂 0.5 μL。充分混匀后42℃水浴中放置1 h,沸水灭活5 min,冰浴冷却5 min。

按下列反应组成在冰上调制反应液:灭菌蒸馏水 64.5 μL, 10×LA PCRTM Buffer II (Mg²⁺ free) 8 μL, MgCl₂ 6 μL, 特异上游引物(表1) 1 μL, TaKaRa LA TaqTM 0.5 μL。将20 μL 反转录产物全部加入上述PCR体系中,混匀后将这100 μL PCR反应体系置于PCR仪反应孔中。94℃反应2 min,然后以94℃变性30 s, 52.5℃退火30 s, 72℃延伸1.5 min为1个循环,循环35次。72℃再延伸10 min。

1.7 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

制备10 g/L的琼脂糖凝胶,同时加入溴化乙啶(EB)至1 mg/L;取PCR产物10 μL与6×Loading Buffer 2 μL,混匀后点样,电泳。在凝胶成像分析系统中分析结果,储存电泳图谱。

1.8 PCR产物的胶回收

按照上海生工UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒使用说明操作。

1.9 PCR产物的酶切鉴定

取PCR产物8 μL,加10×Buffer R⁺ 2 μL, ddH₂O 9.5 μL,限制性内切酶Hind III (10 U/μL) 0.5 μL,混匀后,于37℃温箱放置3 h。琼脂糖凝胶电泳检查酶切结果。

1.10 目的片段的克隆

取4 μL PCR胶回收产物,加入Ligation Solu-

tion I 5 μL和pMD18-T载体1 μL,于16℃连接过夜。用连接产物5 μL转化感受态大肠杆菌DH5α,涂布于含氨苄青霉素(60 mg/L)的LB琼脂板上。37℃培养16 h后,4℃放置2 h。进行蓝白斑筛选,挑取白斑接种于含5 mL LB(含60 mg/L Amp)的试管中,37℃ 200 r/min振荡培养过夜。

1.11 质粒的提取

按照上海生工UNIQ-10柱式质粒小量抽提试剂盒使用说明操作。

1.12 重组质粒的酶切和PCR鉴定

取质粒纯化产物4 μL,加10×Buffer R⁺ 4 μL, ddH₂O 1 μL,限制性内切酶Hind III (10 U/μL) 1 μL,混匀后,于37℃温箱放置3 h。琼脂糖凝胶电泳检查酶切结果。取纯化质粒1 μL为模板,以1.6步骤中的引物在相同条件下进行PCR,琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.13 目的片段序列测定

挑取阳性菌落做穿刺培养过夜,由大连宝生物公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 人骨纤维肉瘤总RNA的完整性

采用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检查提取的总RNA的完整性。从图1可以清晰地看到,28S和18S rRNA两条主带,跑在最前面的5S rRNA带也隐约可见。以上结果说明提取的总RNA纯度较高,无明显降解,是完整的,完全符合实验要求。

2.2 人骨纤维肉瘤部分hBMP-3 cDNA的扩增

用特异引物(表1)从人骨纤维肉瘤组织中扩增了部分hBMP-3 cDNA。从图2可以看出,得到了单一的目的条带(845 bp)。

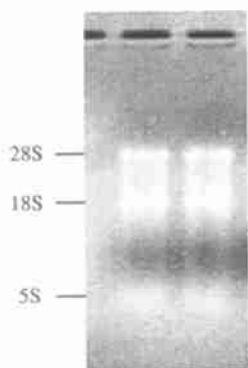


图1 总RNA的甲醛变性电泳
Fig 1 Formaldehyde denaturalized electrophoresis of total RNA

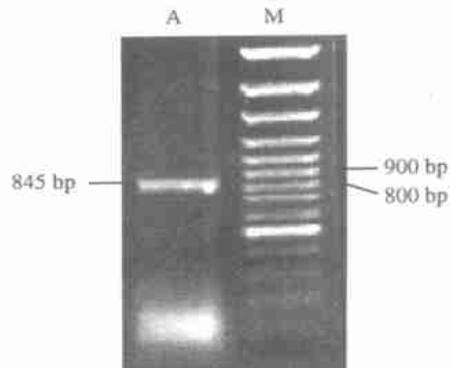


图2 PCR产物的电泳结果
A. PCR产物;M. DNA 样标
Fig 2 Electrophoresis of PCR product
A. PCR product;M. DNA marker

2.3 扩增片段的单酶切分析

采用限制性内切酶 *Hind* III (10 U/ μ L) 对目的片段进行单酶切 3 h, 经琼脂糖凝胶电泳, 明显看出一条带, 说明目的条带已被完全切开, 成为 427 bp 和 418 bp 两种片段的混合物(图 3), 与文献[2]报道结果一致, 初步证明得到的 PCR 产物为目的片段。

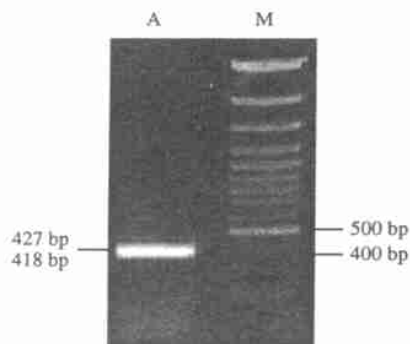


图3 目的片段的酶切分析

M. DNA 样标; A. *Hind* III 酶切结果

Fig. 3 Restriction endonuclease digestion of target fragment

M. DNA marker; A. *Hind* III endonuclease digestion

2.4 重组克隆的酶切和 PCR 分析

以纯化的阳性重组质粒为模板, 以相同的引物在相同的条件下进行 PCR 反应。从图 4 可以看出, 重组质粒 PCR 产物与目的条带大小完全相同。从重组质粒酶切出的片段与从目的片段酶切出的片段大小也完全相同。这与预期的结果完全一致。由此可

以判断, 所需的片断克隆成功。

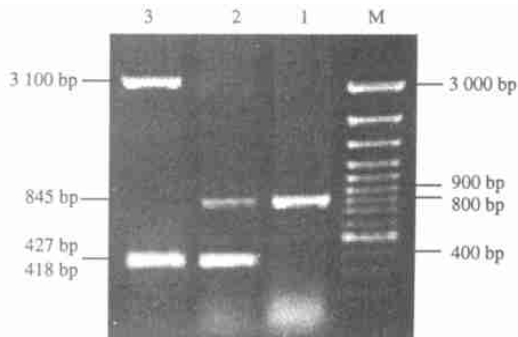


图4 重组质粒的 PCR 与酶切分析

M. DNA 样标; 1. 重组质粒 PCR 产物; 2. PCR 产物 *Hind* III 酶切分析; 3. 重组质粒 *Hind* III 酶切分析

Fig. 4 PCR and restriction endonuclease digestion of reconstructed plasmid

M. DNA marker; 1. PCR product of reconstructed plasmid; 2. Restriction endonuclease digestion of PCR product by *Hind* III; 3. Restriction endonuclease digestion of reconstructed plasmid by *Hind* III

2.5 hBM P-3 部分 cDNA 核苷酸序列的测定

将纯化后的目的片段连接到 pMD 18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH 5 α , 经过蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆后送至测序公司, 用 DNA 序列自动分析仪测定重组质粒, 得到了 hBM P-3 部分 cDNA 核苷酸序列(图 5)。该序列由 845 个核苷酸组成, 与预计的完全一致。划线黑体部分的引物序列之间为目的片段, 引物两边是载体上的残余序列。

```

AACGACGGCC AGTGCCAAGC TTGCATGCCT GCAGGTCGAC GATTACATCG
CTAACCAAGT CTGAAAACAT TTTGTCTGCC AACTGTATT TCTGTATTGGA
GAGCTAGGAA ACATCAGCCT GAGTTGTCCA GTGTCTGGAG GATGCTCCCA
TCATGCTCAG AGGAAACACA TTCAGATTGA TCTTCTGCA TGGACCCTCA
AATTCAGCAG AAACCAAGT CAACTCCTTG GCCATCTGTC AGTGGATATG
GCCAAATCTC ATCGAGATAT TATGTCCTGG CTGTCTAAAG ATATCACTCA
ATTCTTGAGG AAGGCCAAAG AAAATGAAGA GTTCCTCATA GGATTTAACA
TTACGTCCAA GGGACGCCAG CTGCCAAAGA GGAGGTTACC TTTTCCAGAG
CCTTATATCT TGGTATATGC CAATGATGCC GCCATTTCTG AGCCAGAAAG
TGTGGTATCA AGCTTACAGG GACACCGGAA TTTTCCCCTT GGAAGTGTTC
CCAAATGGGA TAGCCACATC AGAGCTGCCC TTTCCATTGA GCGGAGGAAG
AAGCGCTCTA CTGGGGTCTT GCTGCCTCTG CAGAACAACG AGCTTCCTGG
GGCAGAATAC CAGTATAAAA AGGATGAGGT GTGGGAGGAG AGAAAGCCTT
ACAAGACCCT TCAGGCTCAG GCCCTGAAA AGAGTAAGAA TAAAAAGAAA
CAGAGAAAGG GGCCTCATCG GAAGAGCCAG ACGCTCCAAT TTGATGAGCA
GACCCTGAAA AAGGCAAGGA GAAAGCAGTG GATTGAACCT CGGAATTGCG
CCAGGAGATA CCTCAAGGTA GACTTTGCAG ATATTGGCTG GAGTGAATGG
ATTATCTCCC CCAAGTCCTT TGATGCCTAT TATTGCTCAA TCTCTAGAGG

```

图5 hBM P-3 部分 cDNA 核苷酸序列

Fig. 5 Partial hBM P-3 cDNA nucleotide acid sequence

2.6 hBM P-3 部分 cDNA 的氨基酸序列

相应的 280 个氨基酸的排列(图 6)。

由 hBM P-3 部分 cDNA 核苷酸序列, 推导出了

```
IATKSENILSATLYFCIGELGNISLSCPVS GGCSHHAQRKHIQIDLSAWTLKFSRNQSQLGLHLSVD
MAKSHRDMISWLSKDITQFLRKAKENEEFLIGFNITSKGRQLPKRRLPFPEPYILVYANDAAISEPE
SVVSSLQGHRNFPTGTVPKWDHSHIRAAALSIERRKKRSTGVLLPLQNNELPGAQYQYKKDEVWEERKP
YKTLQAQAPKSKNKKKQKRGPHRKSQTLQFDEQTLKKARRKQWIEPRNCARRYLKVDFAIGWSEW
IISPKSFDAYYC
```

图 6 从 hBM P-3 部分 cDNA 核苷酸序列推导的部分氨基酸排列

Fig 6 Amino acid arrangement deduced from the sequence of partial hBM P-3

3 讨论与结论

3.1 关于 TRIZOL 法提取总 RNA

TRIZOL 试剂的说明书上明确指出提取 RNA 首先要进行“匀浆”这一步。可是, 通过对照试验发现, 在从组织中提取 RNA 时, 在液氮中研磨后加入 TRIZOL 试剂, 可以直接进入下面“液相分离”的步骤, 没有必要使用匀浆器。试验证明, 使用匀浆器后, 不仅 RNA 产量下降, 而且质量也急剧下降。此外, 根据作者的经验, 冷冻离心机对于从肿瘤组织中提取 RNA 是十分必要的。

3.2 关于 RT-PCR 中的引物

PCR 引物与试验成败关系重大。引物设计中应尽量使 GC 含量在 50%~60%, 但对 GC 含量的要求并非是绝对的。本试验所用引物的 GC 含量分别为 45.0% 和 38.1%, 均低于 50%, 但最终恰恰是利用这对引物得到阳性片段。同时, 引物设计还应考虑到选择退火温度(T_m)相互接近的 2 条引物, 这一点对于获得阳性片段至关重要。本试验使用了与 T_m 非常接近的 1 对引物, 其中上游引物 T_m 值为 52.9 °C, 下游引物 T_m 值为 52.6 °C, 其差值为 0.3 °C, 最后所设退火温度为 52.5 °C, PCR 一次获得成功。

此前, 笔者曾用一对特异引物扩增 hBM P-3 基因 cDNA 全长, 结果扩增出一条长度为 855 bp 的特异性条带, 经测序证实其与人第四号染色体 BAC 库中一段序列具有 100% 的同源性, 而与人骨形成蛋白没有关系, 说明这段条带是假阳性扩增。究其原因, 是在做反转录时使用了非特异性引物 oligo dT-A adaptor Primer 和 Random 9 mers。而在扩出 845 bp 的 hBM P-3 基因 cDNA 序列时, 反转录中直接使用了特异的下游引物。这说明在做 RT-PCR 时, 反转录中直接使用特异引物效果更佳。

3.3 关于 RT-PCR 中克隆目的片段的长度与试验难易程度的关系

资料显示, RT-PCR 目的片段的长度对试验结

果影响很大。一般来说, 目的片段越短, 越容易进行 RT-PCR 克隆。1997 年, 陈亚兵等^[5]用 RT-PCR 的方法得到了长度为 300 bp 的 hBM P-3 cDNA 片段。1998 年, 朱帮福等^[6]得到了长度为 400 bp 的 hBM P-3 cDNA 片段。笔者曾试图扩增出 hBM P-3 cDNA 的全长片段, 设计了相关的引物并进行了多次的努力, 但最终未能如愿。2002 年, 曹阳等^[7]将长度为 2.366 kb 的人乳铁蛋白基因分 4 段分别扩增, 然后连接成完整片段。受此启发, 笔者将 hBM P-3 cDNA 分为 2 段来克隆, 于是设计了 2 对引物, 结果利用其中 1 对引物得到目的片段, 证明这种方法是值得考虑的。

由于本试验只得到了人骨形成蛋白 3 基因 cDNA 的部分序列, 还不能用作转基因和完整基因的表达, 笔者拟通过重新设计引物, 摸索条件克隆出本次尚未扩增出的部分, 然后通过 PCR 法将其连接成为完整的 hBM P-3 cDNA, 用于转基因的研究。

3.4 关于转基因动物研究中功能基因获得途径的探讨

对功能基因 hBM P-3 的获取, 国内外学者大多采用筛库的方法。1988 年, Wozney 等^[2]从小细胞肺癌 H128 cDNA 文库克隆出 hBM P-3 cDNA 基因, 全长为 1483 bp, 开放阅读框(ORF)1416 bp, 编码 472 个氨基酸的多肽, 包括 N 端信号肽, 中间区域的前肽和 C 端的成熟肽, 翻译后需要加工修饰, 切除信号肽及前肽后才能成为有活性的成熟蛋白分子。1996 年, Hino 等^[8]用探针杂交的方法从人股骨 cDNA 文库中获得了 hBM P-3b。1997 年, 余清^[9]以编码 hBM P-3 成熟肽段的 cDNA 为探针, 用核酸杂交、PCR 等方法, 从人胚肾 cDNA 文库筛得 hBM P 家族一个新基因的部分 cDNA, 与人 BM P-3 在 C 端肽高度同源(85%)。利用筛库的方法获得基因有一定的优点, 但这种方法也存在着工作量大、前期投入高等弊端。所以, 在组织或细胞来源可能的情况下, 通过 RT-PCR 得到所需要的功能基因是一个省时、

省力、省经费的好办法。

3.5 结论

试验结果表明,所克隆出的845 bp的片段与设计片段同源性为100%,序列完全吻合。说明已经成

功地扩增、克隆了人骨形成蛋白3(hBM P-3)基因cDNA的大部分序列,为开展利用转基因动物乳腺生产人骨形成蛋白创造了条件。

[参考文献]

- [1] Urist M R. Bone formation by autoinduction[J]. Science, 1965, 150: 893
- [2] Wozney J M, Rosen V, Celeste A J, et al Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities[J]. Science, 1988, 242: 1528- 1534
- [3] 卢兹凡, 陈苏民, 陈南春, 等. 昆虫杆状病毒表达系统中人骨形成蛋白3的表达及鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(2): 226- 229
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manual[M]. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 366- 369
- [5] 陈亚兵, 俞春东, 温龙平, 等. 重组人骨形成蛋白3的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 生物工程学报, 1997, 13(2): 210- 213
- [6] 朱帮福, 蒲勤, 陈苏民, 等. 人骨形成蛋白-3成熟肽cDNA的克隆、测序及表达[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(3): 249- 251
- [7] 曹阳, 高华颖, 于黎, 等. 人乳铁蛋白基因克隆及细胞表达研究[J]. 遗传, 2002, 24(1): 9- 14
- [8] Hino J, Makoto T, Norimatsu T, et al. cDNA cloning and genomic structure of human bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 223: 304
- [9] 余清. BMP家族一个新基因的部分cDNA克隆[D]. 西安: 第四军医大学, 1997.

Cloning of partial cDNA of human bone morphogenetic protein 3 (hBM P-3) gene by RT-PCR

ZHANG Yong, DAI Bo, LIU Jian-zhong, ZHENG Yue-mao

(Institute of BioEngineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A pair of primers for the amplification of partial cDNA sequence of human bone morphogenetic protein 3 gene were designed, the target fragment was amplified by RT-PCR from the tissue of human bone fiber sarcoma, then was purified from agarose gels and integrated into pMD18-T vector. After being transformed into *E. coli* DH5 α , tested by *Hind*III restriction endonuclease digestion, the positive clone was sequenced. The sequencing result indicated that the size of the fragment cloned is 845 bp, and its sequence homology with the designed one is 100%. The conclusion can be made that the major part of the cDNA of human bone morphogenetic protein 3 (hBM P-3) gene has been successfully amplified and cloned.

Key words: BMP; RT-PCR; hBM P-3 gene