

人胰岛素样生长因子 II 基因的克隆与表达^{*}

王保莉¹, 王凤泽¹, 张 涌^{2*}, 郭蔼光¹

(1 西北农林科技大学 生命科学学院; 2 生物工程研究所, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 采用 RT-PCR 方法成功地从人胎盘组织扩增出 hIGF-II 基因。将其连入表达载体 pET 30a(+) 质粒中, SDS-PAGE 结果证明, pET 30a(+)-hIGF-II 在大肠杆菌 BL 21(DE3) 中获得高效表达, 目的蛋白占总菌体蛋白 35% 左右。

[关键词] 胰岛素样生长因子 II; 基因克隆; 基因表达

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0133-03

人胰岛素样生长因子 II (hIGF-II) 是由 67 个氨基酸组成的一类多肽因子, 其在胚胎发育、体外培养细胞的增殖与分化及中枢神经系统中均起重要作用^[1]。IGF-II 作为调节多肽, 与许多肿瘤的发生发展有一定的关系, 多种肿瘤细胞中均发现有 IGF-II mRNA 的表达^[2]。Feldman 等^[3]研究证实, IGF-II 能促进多种神经元的存活、生长与分化, 提示其在临床治疗神经系统疾病方面具有潜在的应用价值。组织中 IGF-II 含量极低, 依靠纯化天然的 IGF-II 难以满足基础研究和临床应用的需要。因此, 利用基因工程技术获得重组 hIGF-II, 不仅将大大促进其基础研究, 特别是结构与功能领域的研究, 而且将为其早日进入临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 组 织

试验所用胎盘购自陕西省杨凌示范区人民医院。

1.2 质粒和菌种

克隆载体 pMD-18T 购自陕西宝泰克生物科技有限责任公司; 表达载体 pET30a(+), 受体菌 JM 109 及 BL 21(DE3) 由陕西省农业分子生物学重点实验室保存。

1.3 工具酶和试剂

限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 及 Trizol 试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; 其余产品均由陕西宝泰克生物科技有限责任公司提供。

1.4 PCR 引物

参考 Gene Bank 登录的 IGF-II 序列 (XM_028189) 自行设计。由上海生工生物工程技术有限公司合成。其序列如下:

上游引物: 5' GC GAA TTC ATG GCT TAC CGC CCC AGT G 3'

下游引物: 5' TA CTA TCA CTC GGA CTT GGC GGG 3'

在上游引物序列中加有一 *EcoR* I 酶切位点 (方框内); 下游引物加有 2 个终止密码子。

1.5 RNA 提取及逆转录反应

按照 Trizol 说明书进行总 RNA 的提取。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 无明显降解后, 进行以下逆转录反应: 1 μ L Oligo-d(T)₁₈ (500 mg/L), 5 μ g 总 RNA 加水至 12 μ L, 70 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 冰浴骤冷 5 min, 然后加入 5 $\times$ 第一链缓冲液 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, RNasin 1 μ L (30 U/ μ L), M-MLV 逆转录酶 1 μ L (200 U/ μ L), 轻轻混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min, 70 $^{\circ}$ C 加热 15 min 终止反应。

1.6 PCR 扩增

取上述逆转录产物 1 μ L, 加入上下游引物进行 PCR 反应, 于 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min, 用于扩增 hIGF-II 的 cDNA。

1.7 克隆与测序

纯化 PCR 产物, 连接到克隆载体 pMD-18T

* [收稿日期] 2002-10-25

[基金项目] 国家“863”计划项目 (2001AA 213081); 西北农林科技大学重点专题基金项目

[作者简介] 王保莉 (1960-), 女, 陕西西安市人, 教授, 博士, 主要从事分子生物学研究。

上,转化至感受态宿主菌 JM 109 中,经蓝/白斑筛选,挑取白色菌落,抽提质粒酶切及 PCR 初鉴。送宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.8 表达载体的构建

将连有 hIGF-II 的质粒 pMD-18T 和载体 pET30a(+) 分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切,然后加入 T4DNA 连接酶进行连接,转化感受态大肠杆菌 BL 21,在含有卡那抗性的平板上进行培养过夜,挑取阳性克隆进行 PCR 及 *EcoR* I + *Hind* III 双酶切初步鉴定。

1.9 外源基因的诱导表达

重组质粒 pET30a(+)-hIGF-II 转化 BL 21 (DE3) 受体菌,接种单菌落于 LB/KAN (50 mg/L)

```

CA GGT C G A C G A T T G C G A A T T C A T G G C T A C C G C C C A G T G A G A C C C T G T G C G G C
                                     A Y R P S E T L C G
G G G G A G C T G G T G A C A C C C T C A G T T C G T C T G T G G G G A C C G C G G C T T C T A C
G E L V D T L Q F V C G D R G F Y
T T C A G C A G G C C C G A A G C G T G T G A G C G T C G C A G C G T G G C A T C G T T G A G
F S R P A S R V S R R S R G I V E
G A G T G C T G T T T C C G C A G C T G T G A C C T G G C C T C C T G G A G A C G T A C T G T G C T
E C C F R S C D L A L L E T Y C A
A C C C C G C C A A G T C C G A G T G A T A G T A A A T C T C T A G A
T P A K S E end
  
```

测序结果表明,所克隆的序列与 Gene Bank 中登录的碱基序列完全相同,可以认为是获得了人的 IGF-II 基因。

2.3 融合表达载体的构建

将连有 hIGF-II 基因的载体 pMD-18T-IGF-II

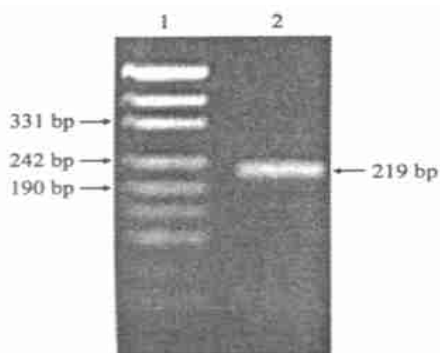


图 1 hIGF-II 全长 cDNA 产物的 PCR 电泳分析

1. pUC19 DNA / *Msp* I (*Hpa* II) 标准分子量; 2. PCR 产物

Fig 1 Electrophoretogram of PCR product of full length of hIGF-II cDNA

1. pUC19 DNA / *Msp* I (*Hpa* II) marker; 2. PCR product

2.4 pET30a(+)-hIGF-II 的诱导表达

重组质粒经转化入 BL 21 (DE3) 后,进行单菌落培养,再在 LB 培养基中进行诱导表达。经 SDS-

培养液, 37 °C 培养过夜。取上述过夜菌接种于新鲜的 LB/KAN 培养液, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6, 然后加 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷) 至终浓度为 1.0 mmol/L, 30 °C 诱导 4 h 后,离心收集菌体, SDS-PAGE 分析,以鉴定诱导表达结果。

2 结果

2.1 hIGF-II 基因的 PCR 扩增结果

提取人胎盘组织的总 RNA, 逆转录得到 cDNA 第一链, 以此为模板, 利用特异性引物进行 PCR 扩增, 获得约 219 bp 的片段, 见图 1。

2.2 测序结果

测序结果如下:

以 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 回收特定的插入片段, 定向连入到表达载体 pET30a(+) 上, 转化大肠杆菌 BL 21 (DE3), 得到含有重组质粒 pET30a(+)-hIGF-II 的工程菌, 酶切鉴定表达载体构建正确。结果见图 2。

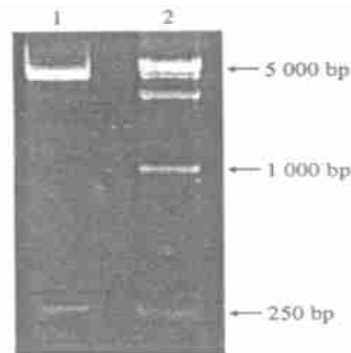


图 2 pET30a(+)-hIGF-II 酶切分析

1. pET30a(+)-hIGF-II / *EcoR* I + *Hind* III

双酶切结果; 2. DL 15 000 标准分子量

Fig 2 Analysis of recombinations pET30a(+)-hIGF-II by endonuclease digestion

1. pET30a(+)-hIGF-II / *EcoR* I + *Hind* III;

2. DL 15 000 marker

PAGE 蛋白电泳分析, 重组质粒 pET30a(+)-hIGF-II 转化菌诱导后在约 14 ku 处出现一条主带, 与预计的产物条带大小相符, 而无目的片段插入和

插入目的片段但未诱导的菌体均无此产物出现(图3)。经光密度扫描测定, 目的蛋白浓度约为 35%, 而且多数是以包涵体的形式存在。

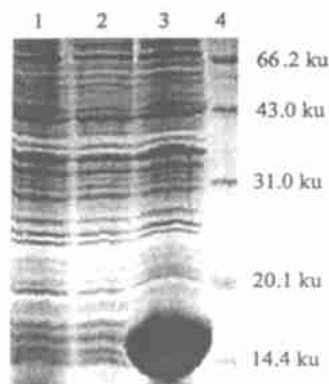


图3 rhIGF-II SDS-PAGE 分析

1 pET30a(+) 经 IPTG 诱导; 2 pET30a(+) -hIGF-II 未经 IPTG 诱导;
3 pET30a(+) -hIGF-II 经 IPTG 诱导; 4 蛋白质标准分子量

Fig 3 SDS-PAGE analysis for rhIGF-II

1 pET30a(+) induced by IPTG; 2 pET30a(+) -hIGF-II uninduced;
3 pET30a(+) -hIGF-II induced by IPTG; 4 Protein molecular weight marker

3 讨论

IGF-II 与胎儿的生长发育密切相关, 有研究表明, IGF-II 基因敲除的小鼠出生时体重是正常小鼠

的 60%^[4]; 另一项研究表明, 胎儿自身分泌的 IGF-II 与胎儿生长关系密切, 其浓度的降低可能是导致胎儿宫内生长迟缓的重要原因之一^[5]。

虽然利用 Bac-to-Bac 和酵母表达系统获得的重组 hIGF-II 具有免疫学活性, 但还是存在着表达量不高的缺陷^[6,7]。Leo T M 等^[8]进行了转 IGF-II 基因小鼠的研究, 实现了相对较高水平的表达, 但将转基因小鼠作为生物反应器来生产药用蛋白及多肽, 成本及技术要求都很高, 距离工业化生产还需时日。大肠杆菌作为基因工程首选的宿主具有成本低、周期短、操作简单等特点, 又由于 IGF-II 结构上不存在糖基化位点, 所以其可在原核中进行表达, 以期获得具有生物活性的产物。IGF-II 为不稳定、小分子量多肽, 易受蛋白酶的降解, 这也是其在非融合表达载体中表达量不高的原因之一, 所以本研究选用融合表达方式, 以提高其表达量。IGF-II 具有 3 对二硫键, 这些二硫键及氢键和一些次级键维持了 IGF-II 特定的构象。在大肠杆菌中富含二硫键的蛋白往往以包涵体的形式生成, 其在复性过程中将产生多种形式的折叠。所以, 如何使包涵体蛋白正确复性, 从而获得具有较高生物活性的产物是原核表达的重要课题之一, 这也是笔者目前正在进行的工作。

[参考文献]

- [1] 周廷冲. 多肽生长因子基础与临床[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992
- [2] Sporn M B, Roberts A B. Peptide growth factors and their receptors I[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 263- 367.
- [3] Feldman E L, Sullivan K A, Kim B, et al. Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival[J]. Neurobiol Dis, 1997, 4: 201- 214.
- [4] DeChiara T M, Efstratidis A, Robertson E J. A growth- deficiency phenotype in heterozygous mice carrying insulin-like growth factor gene disrupted by targeting[J]. Nature, 1990, 345: 78- 80.
- [5] 白波. 胰岛素样生长因子与胎儿生长发育[J]. 国外医学儿科学分册, 2000, 27(1): 4- 7.
- [6] 赵红, 汪承亚, 段宇, 等. 利用 Bac-to-Bac 表达系统高效表达胰岛素样生长因子 II[J]. 南京医科大学学报, 2001, 21(3): 175- 178.
- [7] 李旌军, 黄秉仁. 人胰岛素样生长因子 II 在甲醇营养型酵母 *P. pastoris* 中的表达分泌和性质研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(6): 893- 898.
- [8] Leo T M, Van der Ven, Paul J M. et al. Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and histological changes in the thymus and spleen of transgenic mice over expressing IGF-II[J]. Histochem Cell Biol, 1997, 107: 193- 203.

Cloning and expression of human insulin-like growth factor II gene

WANG Bao-li¹, WANG Feng-ze¹, ZHANG Yong², GUO Ai-guang¹

(1 College of Life Sciences; 2 Biology Engineering Research Center, North West Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Human IGF-II gene was successfully amplified from human placenta with RT-PCR method, then cloned it into expression vector: pET30a(+). pET30a(+)-hIGF-II was highly expressed in BL 21 (DE3) and the recombinant hIGF-II was about 35% of total proteins measured with SDS-PAGE.

Key words: hIGF-II; gene cloning; gene expression