

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)03-0196-03

人骨形成蛋白 4 成熟肽 cDNA 的克隆及其在大肠杆菌中的表达

秦云^{1,2}, 陈苏民¹, 关路媛¹, 陈南春¹, 张立藩²(第四军医大学¹基础部生物化学与分子生物学教研室,²航空航天医学系航空航天生理学教研室, 陕西 西安 710033)Cloning of mature peptide cDNA gene of human bone morphogenetic protein 4 and its expression in *Escherichia coli*QIN Yun^{1,2}, CHEN Su-Min¹, GUAN Lu-Yuan¹, CHEN Nan-Chun¹, ZHANG Li-Fan²¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, ²Department of Aerospace Physiology, School of Aerospace Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To clone the cDNA coding for human bone morphogenetic protein 4 mature peptide (hBMP4m) and to express the peptide in *Escherichia coli*. **METHODS:** Total RNA from human placenta was extracted and the cDNA coding for hBMP4m was obtained by RT-PCR using placenta total mRNA as the template. The cDNA was cloned into expression vector pDH2 and transformed to *Escherichia coli* DH5 α . After the sequence of the inserted gene was confirmed as designed, pDH2-hBMP4m/DH5 α was induced at 42°C. **RESULTS:** Mature peptide cDNA coding for hBMP4m was obtained and was proven to have the sequence as designed. The expression vector pDH2-hBMP4m was constructed. After the vector was transformed into DH5 α and induced at 42°C, the target protein, hBMP4m, accounted for 41.5% of the total bacterial protein. **CONCLUSION:** We have successfully cloned the cDNA coding for hBMP4m and constructed the vector capable of expressing hBMP4m at a high level.

【Keywords】 human BMP-4; cDNA cloning; recombinant proteins

【摘要】目的 克隆编码人骨形成蛋白 4(hBMP4)成熟肽的 cDNA 基因,并在大肠杆菌中表达。方法:从人胎盘组织中提取总 RNA,以其为模板,采用 RT-PCR 方法得到编码 hBMP4 的成熟肽段(hBMP4m) cDNA,克隆入表达载体 pDH2 中,转化大肠杆菌 DH5 α 温度诱导表达。结果 获得 hBMP4m cDNA

基因,成功克隆入温度诱导表达载体 pDH2, DNA 序列分析证实所插入的 hBMP4m cDNA 序列与设计预期一致,将获得重组表达质粒 pDH2-hBMP4m 转化大肠杆菌 DH5 α 中,经温度诱导,目的蛋白占细菌总蛋白的 41.5%。结论 采用分子克隆的方法得到编码 hBMP4 成熟肽段的 cDNA,克隆入表达载体,在大肠杆菌中成功获得 hBMP4 成熟肽的高效表达。

【关键词】人骨形成蛋白 4 cDNA 克隆,重组蛋白质类
【中图分类号】Q816 **【文献标识码】**A

0 引言

骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是一种促分化因子,除 BMP1 外都属于转化生长因子 β 家族。目前已经发现有 20 几种人 BMP,它们具有诱导骨形成的活性,可以诱导异位软骨或骨组织的形成^[1]。但 BMP 是多功能的分化因子,不同的 BMP 功能有区别。

BMP4 是骨形成蛋白家族的一员,其成熟肽由 116 个氨基酸组成,其氨基酸序列与 BMP2 具有很高的同源性,活性形式为二聚体。除了诱导骨组织的形成外,BMP4 具有多种生理功能,而其对造血系统的作用最引起关注。BMP4 对造血组织具有重要作用,是胚胎时期造血组织形成所必须的,它能使胚胎干细胞向造血细胞分化,并能促进受损伤的造血组织再生恢复^[2-5],这种特有的对造血组织的作用,使得 BMP4 在治疗造血系统疾病方面具有广阔的应用前景。BMP 最早是从新鲜骨骼组织获得的,但从骨组织提取 BMP 的生产难以有严格的质量控制。用培养的哺乳类细胞去生产 BMP 表达量低,价格昂贵。因此通过基因工程在原核生物中大量表达 BMP 成为其走向临床应用的经济之路。对 BMP2 原核表达的研究已经很多,而 BMP4 只有少量的真核表达用于实验室研究^[6],对 BMP4 原核表达的研究较少。我们从人胎盘组织中克隆 hBMP4 的成熟肽(hBMP4m)基因,并在大肠杆菌中表达,为开拓 BMP4 的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 新鲜人胎盘组织为西京医院妇产科馈赠,质粒 pDH2 为本课题组构建和保存,Trizol 试剂、

收稿日期 2004-11-09; 修回日期 2004-12-20

作者简介 秦云(1974-)男(汉族),内蒙古自治区呼和浩特市人,博士(导师张立藩,陈苏民)。Tel. (029)83374516 Ext. 13 Email. qinsuixin@163.com

反转录酶购自 Promega 公司; PCR 产物纯化试剂盒为赛百盛公司产品。限制性核酸内切酶 *Klenow* 酶及 *T4* DNA 连接酶购自 Takala 公司。根据 GenBank 登录的人 BMP4 cDNA 序列 [BC020546], 针对其编码成熟肽区域的序列, 设计一对引物, 在两引物的 5' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Xba* I 限制性内切酶切位点, 并在成熟肽区域加入起始码 ATG。上游引物 P1 序列为 5'-CG GAATTC ATGAAGCATCACTCACAGCGG-3'; 下游引物 P2 序列为 5'-TGC TCTAGA TTA TCAGCG-GCACCACATCC-3', 其中下划线部分为限制性酶切位点。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 人胎盘总 RNA 的提取和定量 具体操作参照 Life Technologies 公司的 Trizol 试剂说明书进行。用紫外分光光度计测量所提取的 RNA A 值。

1.2.2 RT-PCR 取 3 μ g 总 RNA, 按 Promega 公司的反转录标准步骤, 以 oligo(dT) 为引物合成 cDNA 第一链。取 2 μ L 逆转录产物为模板, 加入 10 mmol/L dNTP 1.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 50 mmol/L MgSO₄ 1 μ L, 两引物各 10 pmol/L, 补水至 50 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 按下述参数循环 35 次: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s。再在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 mL PCR 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析。按照 Wizard PCR 产物纯化试剂盒说明书操作纯化 PCR 产物。

1.2.3 pDH2-hBMP4m 重组质粒的构建和鉴定 质粒 pDH2 及纯化后的 hBMP4 成熟肽基因 PCR 扩增产物用 *EcoR* I 和 *Xba* I 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h, 酶切后的载体和片段 DNA 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳、赛百盛 Gel DNA 纯化试剂盒回收, 两者在 *T4* DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 连接 24 h, 构建 pDH2-hBMP4m 重组质粒, 转化至大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中, 在含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 培养基的平皿上 30 $^{\circ}$ C 培养 20 h, 随机挑选单菌落接种于 3 mL LB 培养基 (含 100 mg/L Amp) 的试管中, 30 $^{\circ}$ C 旋转培养过夜。收集菌体, 用碱裂解法提取质粒 DNA, 经 *Xba* I 和 *EcoR* I 双酶切鉴定, 选酶切鉴定正确的克隆细菌, 经培养碱裂解法提取质粒 DNA, *EcoR* I 单酶切 1 h, *Klenow* 补平 45 min, *T4* DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接 24 h, 转化至大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中, 在含 Amp 的 LB 培养基的平皿上 30 $^{\circ}$ C 培养 20 h, 随机挑选单菌落接种于 3 mL LB 培养基 (含 100 mg/L Amp) 的试管中, 30 $^{\circ}$ C 旋转培养过夜。碱裂解法提取质粒 DNA, 选取 *EcoR* I 单酶切不开的克隆进行测序。

1.2.4 序列测定 取酶切鉴定正确的重组克隆进行

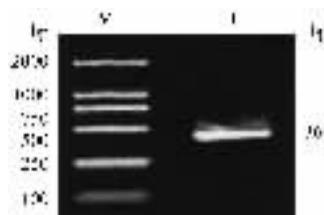
序列测定, 由上海基康生物工程有限公司完成。

1.2.5 表达 挑取测序正确克隆的菌种, 30 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 按 3% 的比例转接到含 Amp 的 LB 中, 30 $^{\circ}$ C 培养 2 h, 42 $^{\circ}$ C 分别诱导 1, 2, 3, 4, 5, 6 和 7 h。收菌, SDS-PAGE 分析未诱导与诱导及诱导不同时间的蛋白表达情况。

2 结果

2.1 RT-PCR 法获取编码 hBMP4 成熟肽段 cDNA

提取的人胎盘总 RNA 适当稀释后经紫外分光光度计分析, $A_{260\text{nm}}:A_{280\text{nm}}=2.06$ 。经 RT-PCR 扩增得到约 368 bp 的片段 (Fig 1)。

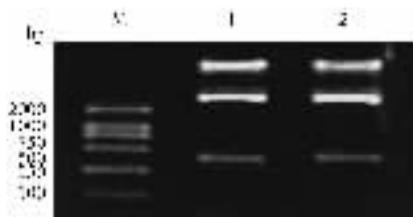


M: DNA Marker DL2000; 1: hBMP4 mature cDNA.

Fig 1 Human BMP4 mature cDNA

图 1 从人胎盘提取总 RNA 反转录获得 hBMP4 成熟肽基因

2.2 pDH2-hBMP4m 质粒的构建及酶切鉴定 转化后的平皿上长出约 200 个单菌落, 挑选 2 个单菌落, 少量培养后提取质粒, 分别用 *EcoR* I/*Xba* I 酶切, 电泳显示所有质粒均能切下与预期大小相符的片段, 表明 2 个质粒都符合所设计构建的表达质粒酶切图谱。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳结果见 Fig 2, 该重组质粒命名为 pDH2-BMP4m。



M: DNA Marker DL2000; 1, 2: Vector 1, 2.

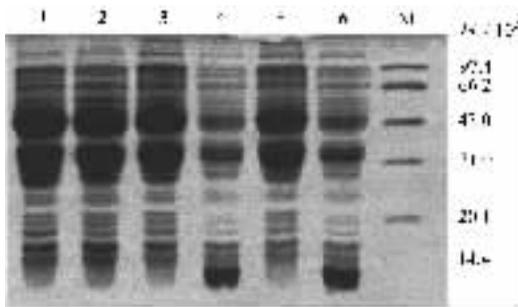
Fig 2 Enzyme digest result of recombinant vector pDH2-hBMP4m by *EcoR* I and *Xba* I

图 2 pDH2-hBMP4m 重组质粒 *EcoR* I/*Xba* I 酶切鉴定结果

2.3 pDH2-hBMP4m 的序列分析 对 pDH2-hBMP4m 重组质粒进行序列分析。结果表明, 本实验所克隆的 hBMP4m 编码区基因的核苷酸序列与设计预期的完全一致。

2.4 pDH2-hBMP4m 在大肠杆菌中的表达 将 pDH2-hBMP4m 重组质粒转化感受态大肠杆菌

DH5 α 涂板 30 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 见平板长出约 400 个克隆, 随机调取 6 个单克隆到 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 中 30 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 42 $^{\circ}$ C 诱导 6 h. 可见 4 号及 6 号菌在 M_r 为 13 000 处有明显的表达蛋白, 薄层激光光密度扫描占表达总量的 41.5% (Fig 3).

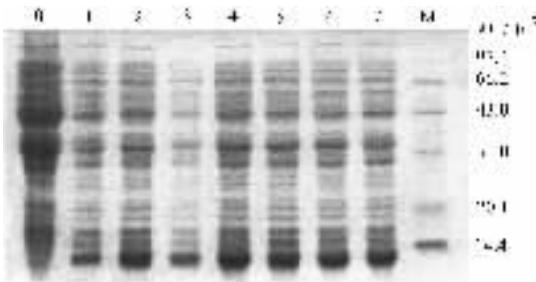


1-6: Clone 1-6; M: Low molecular mass protein marker.

Fig 3 SDS-PAGE of six clones after 6 h inducible culture at 42 $^{\circ}$ C

图 3 DH5 α /pDH2-hBMP4m 在 42 $^{\circ}$ C 诱导表达 6 h 克隆筛选蛋白电泳图

2.5 不同时间对 pDH2-hBMP4m 在大肠杆菌中的诱导表达蛋白的影响 选取表达量高的 6 号克隆作为 DH5 α /pDH2-hBMP4m 菌种, 取少量分别转接到 7 个含 Amp 的 1 mL LB 的摇菌管中, 30 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 分别在 42 $^{\circ}$ C 诱导 1, 2, 3, 4, 5, 6 和 7 h, 收取未诱导及不同诱导时间的样品做蛋白电泳, 可见诱导时间为 4 h, 蛋白表达量最大, 并不再随时间变化, 结果见 Fig 4.



0: Non-inducible control; 1-7: Cultures incubated for 1-7 h at 42 $^{\circ}$ C; M: Low molecular mass protein marker.

Fig 4 SDS-PAGE of DH5 α /pDH2-hBMP4m cultured for 1-7 h at 42 $^{\circ}$ C

图 4 DH5 α /pDH2-hBMP4m 在 42 $^{\circ}$ C 诱导表达 1~7 h 蛋白电泳图

3 讨论

作为一种诱导分化因子, BMP 具有多种功能, 除了诱导成骨外, BMP 对造血、神经等系统都有重要作用, 其中 BMP4 对造血系统的作用值得重视, BMP4 不

同于其他造血因子, 它可以促进骨髓红系、粒系、血小板的全面增殖, 作用广泛; BMP4 对造血系统的诱导分化作用不同于 BMP2、7, 三者都可以促进造血干细胞向血细胞的分化, 但 BMP4 在促进干细胞分化的同时, 仍保护了相当数量的干细胞, 促骨髓增殖能力更持久, 而 BMP2、7 则只是促进了干细胞的分化, 作用短暂^[7]. 因此 BMP4 的临床应用前景非常广阔. 由于真核表达 BMP 量很低, 价格昂贵. 因此我们计划利用原核生物表达 hBMP4m, 经过纯化、复性, 获得有活性的产品, 为其走向临床应用奠定基础.

我们取胎盘作为首选组织, 成功地提取了总 RNA, 并以此为模板成功克隆得编码 hBMP4m 的 cDNA, 测序结果与预期的完全一致. 为方便以后将基因导入载体, 我们在引物的 5' 端引入 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切位点, 在此基础上, 将编码 hBMP4m 的基因插入本课题组构建的温控原核表达载体 pDH2 中, 经酶切鉴定正确, 成功构建了原核表达载体 pDH2-hBMP4m, 将其转化大肠杆菌 DH5 α 中, 经 42 $^{\circ}$ C 诱导表达, 有两个克隆表达了目的蛋白. 选取表达量高的克隆作为菌种, 至此我们通过分子克隆的方法成功地构建了工程菌株 DH5 α /pDH2-hBMP4m. 与此同时我们还研究了不同诱导时间对蛋白表达量的影响, 发现诱导 4 h 蛋白表达达到最高, 并不再随时间变化, 为以后的中试发酵生产摸清了条件.

【参考文献】

- [1] Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV. Recombinant human osteogenic protein 1 (HOP1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulate osteoblast proliferation and differentiation *in vitro* [J]. *Biol Chem*, 1992; 267: 203-209.
- [2] Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors [J]. *Cytokine*, 2002; 17(1): 36-42.
- [3] Chadwick K, Wang L, Li L, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Blood*, 2003; 102(3): 906-915.
- [4] Li F, Lu S, Vida L, et al. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells *in vitro* [J]. *Blood*, 2001; 98(2): 335-342.
- [5] Knochel S, Dillinger K, Koster M, et al. Structure and expression of *Xenopus tropicalis* BMP-2 and BMP-4 genes [J]. *Mech Dev*, 2001; 109(1): 79-82.
- [6] Kawabata M. Signal transduction by bone morphogenetic proteins [J]. *Cytokines Growth Factor Rev*, 1998; 9: 49-61.
- [7] Bhatia M, Bonnet D, Wu DM, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the development program of human hematopoietic stem cells [J]. *Exp Med*, 1999; 189(7): 1139-1147.