

牛 pcDNA₃-bFGF 真核表达重组体的构建与鉴定

徐霖¹, 曹开源¹, 崔蕴霞⁴, 郭琳洁², 张胜², 宁波¹, 郑振声³
 (中山大学 1. 免疫学教研室, 2. 中山眼科中心, 3. 辅助循环实验室, 广东广州 510089;
 4. 暨南大学生命科学院, 广东广州 510632)

摘要:【目的】构建并鉴定牛碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)基因真核表达质粒。【方法】设计含 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点的 bFGF cDNA 引物, 采用 PCR 法从原核 pET3c-bFGF 中扩增 bFGF cDNA 片段, 纯化 PCR 产物, *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切并连接至 pcDNA₃, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 酶切鉴定阳性重组子, 并进行序列测定。【结果】经 PCR 能扩增出 483 bp 的片段, 与预期片段大小相符, 构建的重组体经酶切鉴定能切出插入片段, 测序结果与预期序列完全一致。【结论】成功构建了牛 bFGF 真核表达重组体 bFGF-pcDNA₃。

关键词: 成纤维细胞生长因子, 碱性; 遗传载体; 基因扩增

中图分类号: R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)05-0336-03

Construction and Identification of Bovine pcDNA₃-bFGF Eukaryotic Expression Recombinant XU Lin¹, CAO Kai-yuan¹, CUI Yun-xia⁴, GUO Lin-jie², ZHANG Sheng², NING Bo¹, ZHENG Zhen-sheng³. (1. Department of Immunology, 2. Zhongshan Ophthalmic Center, 3. Key Laboratory of Assisted Circulation, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 4. College of Life Science, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract 【Objective】To construct eukaryotic expression recombinant of bovine basic fibroblast growth factor. 【Methods】Designed a pair of primers which contain two restriction sites *EcoRI* and *XhoI*, and bFGF cDNA fragments were amplified from prokaryotic expression recombinant pET3c-bFGF by polymerase chain reaction. The purified PCR products and empty plasmid pcDNA₃ were digested by *EcoRI* and *XhoI*, ligated, and transformed competence *E. coli* DH5 α . Positive recombinants were identified by restriction endonuclease digestion. Sequence analysis of positive recombinant was carried out by automatic DNA sequencer. 【Results】A 483 base pair single DNA fragment was found in the products by 10 g/L agarose electrophoresis, the same size as expected for bFGF cDNA. The insertion fragment could be seen after restriction digestion as expected. Sequence analysis showed the same sequence as expected. 【Conclusion】pcDNA₃-bFGF eukaryotic recombinant has been constructed successfully.

Key words: fibroblast growth factor, basic; genetic vector; gene amplification

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)可从垂体细胞、血管内皮细胞等多种组织细胞中分离得到,能广泛作用于中胚层及神经外胚层来源的细胞,刺激分裂增殖,具有创伤修复、促新生血管形成,诱导胚胎发育等广泛的生物学活性^[1]。bFGF 转基因重组体及转基因血管内皮细胞局部应用治疗创伤及缺血性疾病是目前的研究热点。因此,构建 bFGF 真核表达重组体,无疑对研究 bFGF 在缺血性疾病及创伤中所发挥的分子机制及生物学效应的基础研究,以及缺血性疾病的基因治疗的临床应用研究提供了重要的物质基础。

1 材料和方法

1.1 材料

EcoRI, *XhoI* (MBI FERMENTAS); *Taq* DNA 聚合酶(Boehringer Mannheim); 蛋白酶 K (GIBCOL BRL); T4 DNA Ligase 及 DNA Marker (New England Biolab); QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN); 引物(上海 Sangon 合成); 牛 bFGF-pET3c 原核表达质粒(暨南大学崔蕴霞副研究员惠赠); 真核表达质粒 pcDNA₃ (Invitrogen); 大肠杆菌 DH5 α (中山大学北校区分子医学中心银巍博士惠赠)

1.2 方法

引物设计: 参考 pET3c-bFGF 插入片段序列测定的结果及真核质粒 pcDNA₃ 酶切图谱, 设计上下游引物, 引物 5' 端分别加入 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点。引物 1: 5'-ATC GAA TTC ATG GCC GCC GGG AGC ATC-3'; 引物 2: 5'-TGC CTC GAG

收稿日期: 2002-05-12

作者简介: 徐霖(1976-), 女, 湖南邵阳人, 硕士, 助教。

TCA GCT CTT AGC AGA CAT-3'.

PCR扩增:每管总体积为50 μL;灭菌双蒸水41 μL, dNTP 1 μL, 10× Buffer 5 μL, 上游引物1 μL, 下游引物1 μL, 模板1 μL. 加入双蒸水1 μL代替模板者为阴性对照, 95 °C预变性5 min, 加入Taq DNA聚合酶0.5 μL. 以如下参数扩增: 94 °C 30 s→55 °C 45 s→72 °C 60 s, 35 cycles→72 °C 7 min→4 °C pause. 产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定. PCR产物纯化: 200 μL PCR产物经电泳鉴定后, 加入1 μL 20 g/L的蛋白酶K, 37 °C水浴3 h. 酚/氯仿抽提1次, 乙醇沉淀.

建立PCR产物及空质粒的酶切反应体系: 将适量DNA与双蒸水混合, 使其总体积为每管18 μL, 加入2 μL 10×限制性内切酶缓冲液, 1~2 U *Eco*RI 和 *Xho*I, 37 °C反应1.5 h, 65 °C水浴20 min, 酶切产物经7g/L琼脂糖凝胶电泳, QIA quick Gel Extraction Kit回收目的片段. 按PCR产物: 载体分子比=3:1建立连接反应体系: PCR回收产物10 μL, pcDNA₃ 3 μL, 5×连接缓冲液4 μL, T4 DNA ligase 1 μL, 无菌双蒸水2 μL. 16 °C连接16 h. 连接产物转化氯化钙法制备的感受态大肠杆菌DH5α, 从转化平板上随机挑取12个单菌落, 小量提取质粒酶切鉴定, 能切出插入片段者为阳性克隆.

重组质粒的序列测定: 以质粒提取试剂盒提取高纯度质粒为模板, 双脱氧核苷酸终止法测序: 以SP6 promoter primer为测序引物, 采用ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit在ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer序列分析仪上对插入片段进行序列测定.

2 结果

2.1 PCR扩增bFGF cDNA片段

产物以10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可见大小约为500 bp的单一特异性条带, 与预期片段483 bp基本一致(图1), 而阴性对照未见任何特异性条带.

2.2 表达重组体的构建

PCR产物和空质粒分别经*Eco*RI和*Xho*I双酶切, 转化新制感受态大肠杆菌DH5α, 在氨苄西林(100 mg/L)筛选平板上长出约125个单菌落, 空质粒转化的阳性对照菌落密布难以计数, 而阴性对照平板无任何菌落生长.

2.3 阳性重组子的筛选鉴定及序列测定

随机挑取12个菌落, 提取质粒, *Eco*RI、*Xho*I双酶切, 能切出预计大小片段者为阳性重组子. 7 g/L琼脂糖凝胶电泳可见小片段迁移率与PCR产物一致, 大片段迁移率与空质粒双酶切片段一致, 与预期大小符合(图2). 测序结果与原核重组体pET3c-bFGF序列分析结果完全一致(图3), 从其所推导出的氨基酸序列与GenBank登载之牛bFGF氨基酸序列完全一致.

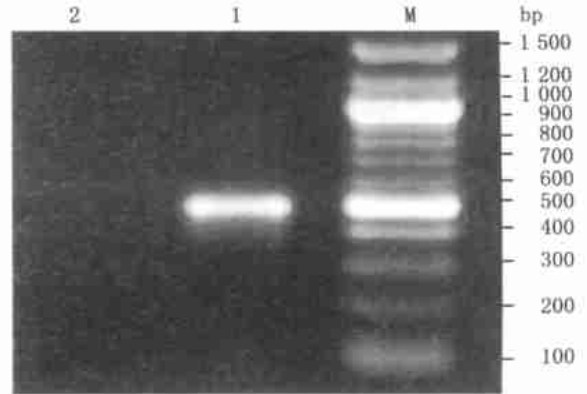


图1 PCR产物电泳

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR products

1: PCR products; 2: negative control; M: 100 bp DNA marker

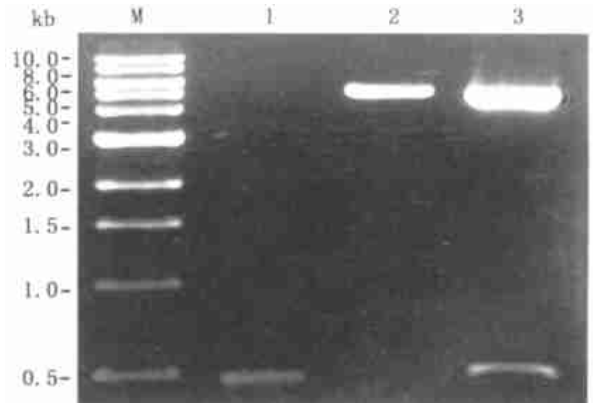


图2 重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 Endonuclease identification of recombinant plasmid

1: PCR product; 2: pcDNA₃ *Eco*RI and *Xho*I digested; 3: pcDNA₃-bFGF *Eco*RI and *Xho*I digested; M: 1 kb DNA marker

3 讨论

近年来bFGF促创伤愈合及新生血管形成的作用引起了许多学者的重视, 在创伤修复及缺血性心血管疾病方面显示出良好的应用前景. 随着分子生物学技术的不断发展, 基因治疗作为一种新的手段正被试用于临床. 将VEGF、bFGF转基因重组体及转基因血管内皮细胞直接用于局部血管或

局部组织做为一种新的治疗缺血性疾病及创伤的手段^[3,4],具有操作方便,创伤小,作用缓慢持续,副作用少等许多优点,是目前的研究热点,国外已进行了不少动物实验研究,其临床应用也正在探索之中^[3,4]。研究表明,bFGF转基因重组体直接局部注射能使局部组织bFGF表达增加,并通过自分泌与旁分泌效应发挥作用,促进新生血管的形成及创伤愈合^[5,6],如Garcia-Martinez等^[4]发现将bFGF转染的内皮细胞局部应用可明显促进小鼠肌肉中新血管的形成和生长。目前国内已有研究将bFGF基因转染角肌细胞应用于创伤修复的报道^[7],但未见将bFGF基因转染血管内皮细胞以便应用于创伤及缺血性疾病的治疗方面的报道。

欲研究bFGF的生物活性及其与内皮细胞功能的相互关系,研究利用bFGF进行转基因治疗的可能,则首先必须得到能在真核细胞中表达的重组体,因此本研究利用原核表达重组体bFGF-pET3c,用分子克隆的方法构建带有牛bFGF基因编码片段的真核表达重组体,为研究bFGF作用的分子机制及转基因治疗缺血性疾病和创伤奠定物质基础^[8,9]。用于外源性基因真核表达的载体分为病毒和非病毒载体两大类。病毒载体具有转染率高、表达稳定等特点,但因其易整合到靶细胞染色体,安全性较差,尚需慎用。非病毒载体质粒素有稳妥可靠、容量大、不整合和操作简便的优点。当所克隆的DNA片段小(小于10 kb)而结构简单时,质粒比其它载体更胜一筹^[8]。我们选用的真核质粒pcDNA3为高拷贝质粒,其多克隆位点两端带有来源于T7和SP6噬菌体的强启动子,能保证插入的外源DNA可以得到有效转录并有利于插入片段的序列测定;而下游的牛生长激素的加尾序列能给转录产物加上多聚腺苷酸尾,从而保证转录产物能得到加工。它含有SV40ori复制元件,有可能随宿主细胞分裂,跟随胞浆遗传给子代细胞,可在一定程度上保证目的基因稳定传给新增殖的细胞。此外,该载体具有neo基因,可用G418来筛选。

本研究利用PCR扩增出目的片段,为确保片段以单一方向插入,设计引物时在上游与下游引物5'端分别加入不同的位点EcoRI和XhoI。引物3'端18个碱基与模板严格互补,其上游引物含有AUG起始密码子,下游引物含TGA与终止密码TGA相匹配。此外,设计的克隆方法为粘端连接,

两粘端不匹配,可确保片段单向插入。插入片段的序列测定表明插入片段序列与原核质粒pET3c-bFGF全长cDNA序列完全符合;其编码的155个氨基酸残基与GenBank上显示之牛bFGF氨基酸序列完全吻合,插入方向正确,说明牛pcDNA3-bFGF真核重组体构建成功。在本部分实验中,我们利用分子克隆的方法成功构建了牛pcDNA3-bFGF真核表达质粒,并用其转染到体外培养的人脐静脉内皮细胞中,已获得可稳定表达bFGF的阳性细胞克隆,为今后对bFGF的生物活性的基础研究及bFGF在创伤及缺血性疾病中应用的临床研究打下了基础。

(本文图3见插页1。 Fig. 3 Shown in back coloured page 1)

(本项研究利用中山大学分子医学研究中心的实验条件完成,在此向中山大学分子医学中心朱振宇教授、银巍博士、杨琨副研究员,及其他全体老师表示衷心的感谢)

参考文献:

- [1] Abe K, Saito H. Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions[J]. *Pharmacol Res*, 2001, 43(4): 307.
- [2] Yli-Herttua K, Martin J F. Cardiovascular gene therapy[J]. *Lancet*, 2000, 355(9199): 213.
- [3] Bastaki M, Nelli E E, Delf Era N, *et al*. Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium: a study of aortic and microvascular endothelial cell lines[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(3): 454.
- [4] Garcia-Martinez C, Opolon P, Trochon V, *et al*. Angiogenesis induced in muscle by a recombinant adenovirus expressing functional isoforms of basic fibroblast growth factor[J]. *Gene Ther*, 1999, 6(7): 1210.
- [5] Ribatti D, Gualandris A, Belleri M. *et al*. Alterations of blood vessel development by endothelial cells overexpressing fibroblast growth factor-2[J]. *J Pathol*, 1999, 189(4): 590.
- [6] Gualandris A, Rusnati M, Belleri M. *et al*. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases[J]. *Cell Growth Differ*, 1996, 7(2): 147.
- [7] 胡大海, 陈璧, 汤朝武, 等. pcDNA3-hbFGF转染角肌细胞对真皮成纤维细胞增殖的生物学效应[J]. *第四军医大学学报*, 1999, 20(5): 395.
- [8] 张海红, 姚集鲁, 杨林, 等. 丙型肝炎病毒C, E2, NS3区基因嵌合重组载体的构建[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(2): 103.
- [9] 梁小玲, 高汝龙, 李绍珍, 等. 生长因子在视网膜增殖膜的表达[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(4): 273.

(编辑 张敏瑞)

实验性骨不连模型的制作 (正文见第 331 页)

Establishment of an Animal Model for Experimental Study of Bone Nonunion (Text in page 331)

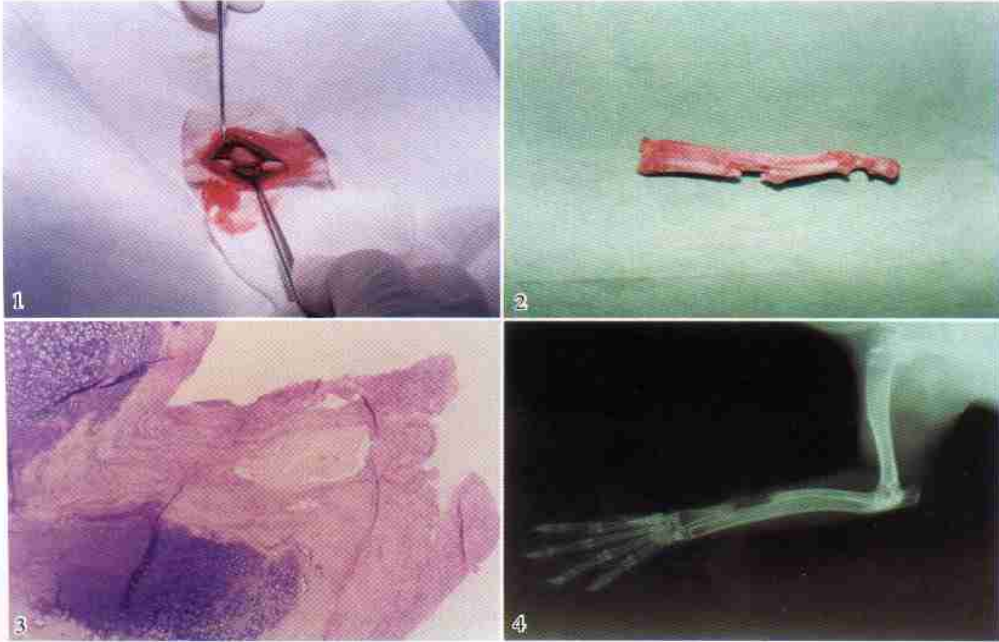


图 1 造模方法

图 2 大体标本观察: 骨缺损区为纤维瘢痕组织填充, 无骨性连接, 骨端硬化, 髓腔闭塞, 两侧断端有少量骨痂形成

图 3 病理组织学检查: 光镜下骨断端存在无序排列的软骨细胞及骨细胞, 缺损区为纤维瘢痕组织充填。HE 40

图 4 放射学检查: 骨缺损区无骨性连接, 断端硬化, 髓腔封闭, 两侧断端有少量不规则骨痂形成

Fig. 1 The methods of manufacture model

Fig. 2 Gross observation: the bone defect was filled by fiber scar tissue, no bone tissue, the bone end was sclerosis, and the bone marrow cavity was sealed. There were very few callus at the bone end

Fig. 3 histological examination: the bone end had cartilage and bone cells, the cells were disorder; the bone defect was filled by fiber scar tissue. HE 40

Fig. 4 X-ray examination: the bone defect had not bone tissue: the bone end was sclerosis, and the bone marrow cavity was sealed

牛 pcDNA₃-bFGF 真核表达重组体的构建与鉴定 (正文见第 336 页)

Construction and Identification of Bovine pcDNA₃-bFGF Eukaryotic Expression Recombinant (Text in page 336)

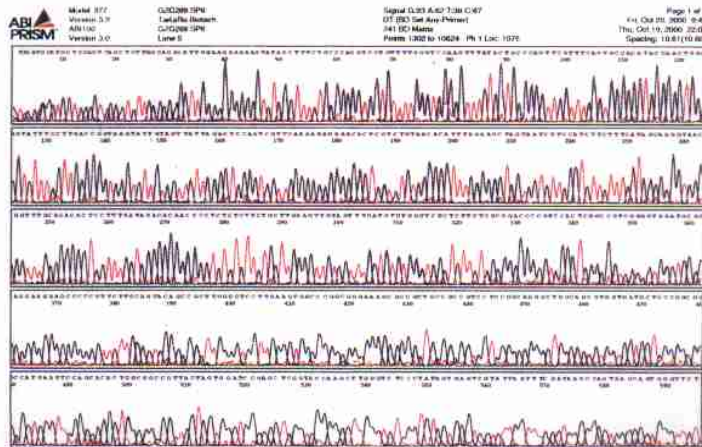


图 3 pcDNA₃-bFGF 插入片段序列测定

Fig. 3 Sequence analysis of pc DNA₃-bFGF insertion fragment