

人锰超氧化物歧化酶 cDNA 的克隆、测序及表达

骆训懿 周丽君 陈晓穗 王欲晓 谢邦铁 王晶翼 陈宇萍 何菱

(海军总医院中心实验科, 北京 100037)

摘要 用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 以人肝细胞总 RNA 为模板, 扩增了人锰超氧化物歧化酶 (hMnSOD) 的 cDNA 片段, 将此 cDNA 克隆到载体 pGEM-T 中. 对重组质粒进行限制酶切分析和序列测定, 确定为含 hMnSOD cDNA 的重组质粒. 将该 hMnSOD cDNA 重组到表达载体 pBV220 内, 重组质粒在大肠杆菌 DH5 α 中表达 hMnSOD, 表达产物占菌体总蛋白的 14%, 具有特异性 SOD 酶活性.

关键词 人锰超氧化物歧化酶, 逆转录-聚合酶链反应, 基因克隆, 序列测定, 表达

超氧化物歧化酶 (SOD) 是机体内超氧自由基的天然清除剂, 对炎症^[1]、缺血再灌注损伤^[2]、辐射损伤^[3]等均有临床疗效, 还可减少抗癌药物对细胞和心脏的毒副作用^[4]. 在 SOD 家族中 MnSOD 具有生物半衰期较长、抗炎抗辐射作用优于 Cu/ZnSOD^[5]等优点; 有报道, 外源性 MnSOD 可抑制某些肿瘤细胞生长^[6]. 这表明, SOD 作为新型酶制剂具有重要的医用价值和潜在的临床应用前景. 但是, 由于 MnSOD 主要分布于线粒体内, 分离纯化方法繁琐, 而且含量少, 造成来源困难, 不能够满足研究及临床的需要. 因此, 有必要开展重组人 MnSOD (rhMnSOD) 的研制. RT-PCR 是基因工程工作中获得外源基因的有效途径. 本实验以 RNA 为模板逆转录后再进行聚合酶链反应, 获得 hMnSOD cDNA, 将该 cDNA 在体外连接和克隆, 进行酶切分析、核苷酸序列测定, 并在 *E. coli* 细胞中得到成功表达.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

菌株 JM101、DH5 α , 质粒 pBV220 为本实验室保存. 质粒 pGEM-T 为 Promega 公司

产品.

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒, AMV 逆转录酶, Taq DNA 聚合酶, T4DNA 连接酶均购自 Promega 公司. 限制性内切酶购自华美生物工程公司. 其他试剂均为国产分析纯.

1.3 人肝细胞总 RNA 的提取

应用 Promega 公司的 RNAagentsTM 总 RNA 提取试剂盒, 参照试剂盒操作说明书进行.

1.4 引物设计与合成

按 Beck 等^[7]的资料设计并由本科用 ABI 公司 391 型 DNA 合成仪合成两个引物: 引物 1 为 5' CGAATTCATGAAGCACAGCCTCCCGAC3' 含 *Eco*R I 位点, 引物 2 为 5' GATCAGAATGTGACCGTGGTTTACTT 3' 含 *Sal* I 位点.

1.5 RT-PCR 法扩增人 MnSOD cDNA

RT 的反应参数为: 42 $^{\circ}$ C, 1 h. PCR 在 MJ. Research 公司扩增仪上的扩增参数为: 94 $^{\circ}$ C 1 min、65 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min 进行 30 循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min. 扩增产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收纯化.

1.6 hMnSOD cDNA 的克隆

PCR 产物与载体 pGEM-T 连接参照 Promega 公司的 pGEM-T 载体系统说明书进行. 表达质粒 (pBVMSOD) 的构建见图 1.

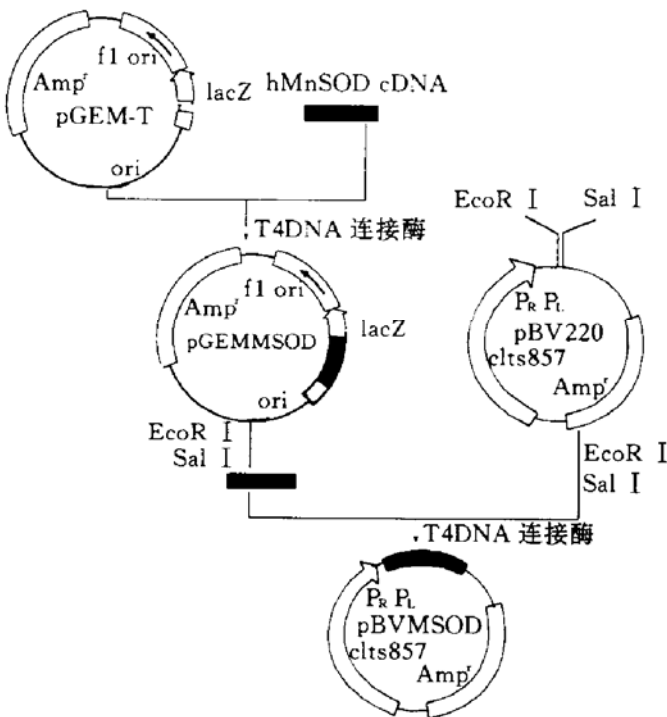


图 1 pBVMSOD 质粒的构建

2 结果与讨论

2.1 总 RNA 的制备

每个哺乳动物细胞含 10^{-5} μg 的 RNA, 其中 mRNA 含量仅占 1%~5%. mRNA 极易受细胞内外环境存在的 RNase 的降解, 本实验采用已商品化的 Promega 公司 RNA 提取系统制备出 RNA, 经甲醛变性凝胶电泳可见 18 S RNA 及 28 S RNA 的清晰条带, 表明 mRNA 的分子完整未降解, 为 RT-PCR 的成功创造了条件.

2.2 hMnSOD cDNA 的 RT-PCR

经 RT-PCR 扩增得到 DNA 片段, 大小约为 600 bp, 与预期大小 594 bp 一致.

2.3 RT-PCR 产物的克隆

通常, PCR 产物的克隆需将 PCR 产物和相应载体用同种限制酶处理. 由于整个过程经过回收、抽提等步骤, 不仅方法繁琐费时, 还导致目的产物大量损失. 鉴于 Taq 聚合酶具有将一个不依赖模板的碱基 A 加到 PCR 产物 3' 端的活性, 因此有人^[10]设计了一种 T 型载体, 载体带上单碱基 T, 从而使带有 3' A 突出的 PCR 产物都可利用 AT 配对直接克隆到载体上, 效率大大提高. 本实验采用了 Promega 公司的 pGEM-T 载体系统, 一次就得到重组子.

2.4 hMnSOD 重组子的酶切鉴定与测序

重组质粒酶切电泳鉴定结果见图 2. 由图 2 可见重组子质粒经 EcoRI 和 SalI 双酶切后除了切下 3.0 kb 的载体片段外, 还有一 600 bp 左右的插入片段, 它与 PCR 扩增产物以及所拟克隆的 hMnSOD cDNA 长度一致. 重组子质粒经 BamHI 单酶切后仅切出一条 3.6 kb 的片段, 而对照质粒未切开.

上述结果一方面提示所克隆的 hMnSOD cDNA 序列完整, 另一方面表明插入片段内有 BamHI 酶切位点, 与文献 [7] 中 hMnSOD cDNA 序列一致. 重组片段用 ABI 测序仪测出序列结果, 所读序列与文献报道一致.

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

pBVMSOD 质粒转化至 *E. coli* DH5 α , 利

1.7 hMnSOD 重组子的酶切鉴定与测序

碱裂解法^[8]提取质粒 DNA, 分别以 EcoRI、SalI 和 BamHI 不同组合双酶切以及 BamHI 单酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定重组片段大小. 用 ABI 公司的 373A 型 DNA 测序仪进行重组质粒的 DNA 序列测定.

1.8 诱导表达及细胞抽提液的制备

含 pBV220 的大肠杆菌 DH5 α 和转化子在 50 ml LB 培养基 (含氨苄青霉素 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 中 32 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 $A_{600} > 0.5$, 离心收集细胞, 以 1 ml 蒸馏水悬浮细胞, 超声破碎细胞后 10 000 r/min 离心 10 min, 取细胞抽提液备用.

1.9 SOD 酶活力测定

采用光化学扩增法^[9]. 蛋白质浓度测定采用 Lowry 法.

1.10 SDS-PAGE

浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 蛋白质分子量标准为上海东风试剂厂产品.

用温度敏感的特点于 42℃ 诱导表达 hMnSOD, 表达出约相对分子质量为 25×10^3 的蛋白 (图 3), 其表达量占菌体总蛋白的 9% 左右.

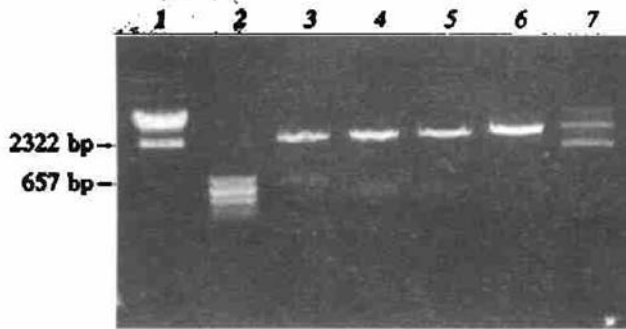


图 2 重组质粒酶切分析结果

1: λ /Hind III DNA 长度标志; 2: pGEM-7Zf (+) /Hae III DNA 长度标志; 3: 重组质粒/EcoRI + Sal I; 4: 重组质粒/EcoRI + BamHI; 5: 重组质粒/Sal I + BamHI; 6: 重组质粒/BamHI; 7: 对照 (pGEM/BamHI).

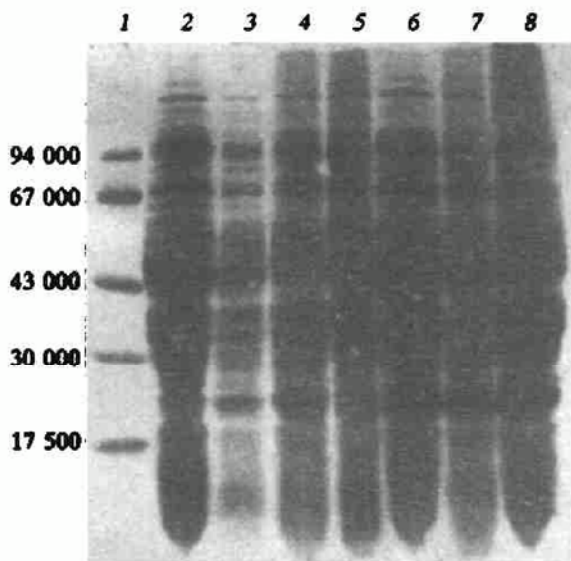


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

1: 蛋白质相对分子质量标准; 2: 未诱导; 3、4、5: 42℃ 温度诱导; 6、7、8: 温度和 Mn^{2+} 诱导; 3、6: 菌体破碎混合液; 4、7: 菌体破碎抽提液; 5、8: 菌体破碎沉淀.

2.6 Mn^{2+} 对 rhMnSOD 表达的影响

实验中观察了添加不同浓度的 Mn^{2+} 对诱导表达 hMnSOD 的影响, 结果见表 1. 由表 1 可见, 在温度诱导的同时添加 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 Mn^{2+} , 可提高表达率 3 倍, 该样品的 SDS-

PAGE 电泳结果显示, 表达量占菌体总蛋白的 14%.

表 1 不同 Mn^{2+} 浓度对诱导表达的影响

Mn^{2+} 浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MnSOD 酶活性 / $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$	比活 / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
0	1249	195
50	3178	594
100	4466	451
200	2804	384
300	2022	481

本实验经 RT-PCR 从人肝细胞总 RNA 中获得 hMnSOD cDNA, 将该 cDNA 克隆到质粒载体 pGEM-T 中, 构建了重组质粒. 经酶切分析和序列测定确定为 hMnSOD cDNA 克隆. 同时还构建了表达质粒 pBVMSOD, 获得了 14% 表达率的重组人锰超氧化物歧化酶. 进一步提高表达率以及制品的纯化工作正在进行.

参 考 文 献

- Huber W. Eur J Rheumatol Inflamm, 1981; 4: 173
- McCord J M. New England Journal of Medicine, 1985; 312: 159
- 杜德林, 施秉仪, 刘东平等. 中华放射医学与防护杂志, 1982; 2 (4): 26
- Oberle L W, Buettner G R. Cancer Research, 1979; 39: 1141
- Gorecki M, Beck Y, HRTMn J R *et al.* Free Rad Res Comms, 1991; 12~13: 401
- Church S L, Grant J W, Ridnour L A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 3113
- Beck Y, Oren R, Amit B *et al.* Nucleic Acids Res, 1987; 15 (21): 9076
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼可 T, 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1992: 19~21
- Misra H P, Fridovich I. Arch Biochem Biophys, 1977; 181: 308
- David A M. Bio/technology, 1991; 9: 637

Cloning, Sequencing and Expression of Human Manganese Superoxide Dismutase Gene cDNA.
Luo Xunyi, Zhou Lijun, Chen Xiaosui, Wang

Yuxiao, Xie Bangtie, Wang Jingyi, Chen Yuping (Naval General Hospital, Beijing 100037, China).

Abstract The cDNA encoding human manganese superoxide dismutase was amplified from the human liver total RNA by RT-PCR, ligated into pBV220. The cloned gene was analyzed by restriction enzymes EcoR I, Sal I, and BamH I. The sequence of the cloned gene was deter-

mined. hMnSOD was induced and expressed upon temperature shift from 32°C to 42°C. Mn²⁺ supplementation in the bacterial growth media resulted in about 3-fold increasing of SOD activity. The special protein expressed accounts for 14% of the total protein of the bacteria.

Key words manganese superoxide dismutase, RT-PCR, gene cloning

锌₇与镉₇-金属硫蛋白清除羟自由基的比较*

岳新萍 周杰昊 程 时

(北京医科大学生物物理系, 北京 100083)

摘要 分离及纯化兔肝金属硫蛋白, 制备去金属金属硫蛋白、锌₇与镉₇-金属硫蛋白, 在不同 pH 条件下, 比较后二者清除羟自由基能力; 在 pH 6 条件下, 比较锌₇-金属硫蛋白与有关蛋白和无机锌盐清除羟自由基效果。结论是在近生理 pH 条件下锌₇-金属硫蛋白清除羟自由基能力远强于镉₇-金属硫蛋白。金属硫蛋白清除羟自由基的能力主要来源于蛋白中处于还原态的巯基。

关键词 金属硫蛋白, 锌₇-金属硫蛋白, ESR 顺磁捕集, 羟自由基, 还原态巯基

金属硫蛋白 (metallothionein, MT)^[1-3] 是一类富含巯基与金属的低分子量非酶蛋白, 遍存于生物界。该蛋白中占分子质量 30% 的半胱氨酸残基均处于还原态, 通过其上的巯基, MT 与二价金属离子结合。哺乳类 MT 可结合 7 个二价金属离子, 形成两个金属硫簇。MT 为诱导性蛋白, 它可被金属、糖皮质激素、一些化学毒物、细胞因子及某些物理、化学应激因素诱导合成。虽然人们认为 MT 参与机体某些重要元素 (如 Zn、Cu) 的储存、运输与代谢、对抗金属中毒, 但 MT 的生理功能仍在探讨中。近年来, 我们对 MT 的清除自由基、生物膜保护功能进行了研究, 结果表明 MT 有明显的细胞保护作用^[4-8], 因此 MT 在医学领域有应用前景。该蛋白中的巯基显然与清除自由基有关, 它所结合的二价金属特别是 Zn 也有稳定生物膜功能。为进一步研

究 MT 的生物膜保护功能, 以及 MT 与不同金属结合时清除自由基、保护膜功能的变化, 我们又进行了一系列实验。本研究报道 Zn₇-MT 与 Cd₇-MT 在不同 pH 下清除羟自由基能力的比较及 Zn-MT 与无机 Zn 盐、有关蛋白清除羟自由基能力的比较。

1 材料与方法

1.1 试剂

Sephadex G-50、G-25 购自 Pharmacia 公司, 二硫苏糖醇, 二硫双吡啶, Tris 购自 Sigma 公司。含锌胰岛素由刘树森教授赠。其他试剂系国产分析纯。

1.2 动物

大耳白兔, 雌雄不限, 2.5~3 kg, 本校

* 国家自然科学基金资助 29270356。

收稿日期: 1995-10-19, 修回日期: 1996-02-11