

硫酸软骨素酶 ABC I 分泌型真核表达质粒的构建

高慧玲 王虔 于士柱 陈秀菊 孙翠云 安同岭

【摘要】 目的 建立硫酸软骨素酶 ABC I (ChABC I) 的分泌型真核表达载体,并在胶质瘤细胞系中对其表达情况进行观察。方法 以真核表达载体 pCDNA3.1/V5/HIS A 为载体,将基底膜 40 蛋白信号肽编码区和 ChABC I 成熟肽段编码区串联插入其多克隆位点,构建分泌型真核表达质粒 pCDNA-BMS-CABC I。采用该质粒转染人胶质瘤细胞系 TJ905,培养 3 d 后将培养液上清液行 SDS-PAGE 和免疫印迹分析。结果 考马斯亮蓝染色显示有新条带出现,条带的相对分子质量大小与理论值一致,免疫印迹检测显示有 V5 免疫反应性特异性条带出现。结论 该真核表达载体可介导硫酸软骨素酶 ABC I 在神经胶质细胞来源的细胞中以分泌蛋白形式表达。

【关键词】 软骨素硫酸酶类; 质粒; 转染; 神经胶质瘤; 免疫印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2010.04.018

The construction of a secretory eukaryotic expression plasmid of chondroitinase ABC I GAO Hui-ling, WANG Qian, YU Shi-zhu, CHEN Xiu-ju, SUN Cui-yun, AN Tong-ling. Department of Neuropathology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin Neurology Institute, Tianjin 300052, China
Corresponding author: YU Shi-zhu (Email: tjyushizhu@yahoo.com)

【Abstract】 Objective To construct a secretory eukaryotic expression plasmid for chondroitinase ABC I, and observe the expression of the target protein in a glioma cell line TJ905. **Methods** The DNA fragments encoding the signal peptide of basilar membrane 40 (BM40) as well as the mature fragment of chondroitinase ABC I were inserted into the eukaryotic expression vector pCDNA3.1/V5/HIS A in series to construct the secretory eukaryotic expression plasmid pCDNA-BMS-CABC I. Then the plasmid was used to transfect the glioma cell line TJ905, and after 3 d, the supernatant of the culture media was collected and analysed by sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) and Western blotting. **Results** On polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel, a new band corresponding to the theoretic molecular weight was spotted. Western blotting showed a specific band of V5 immunoreactivity. **Conclusion** The newly constructed plasmid can mediate the eukaryotic expression of chondroitinase ABC I in secretory manner.

【Key words】 Chondroitinsulfatases; Plasmids; Transfection; Glioma; Immunoblotting

胶质瘢痕中存在的细胞外抑制性基质 (IECM) 是成熟个体中枢神经系统损伤后断裂的轴突残端无法跨越瘢痕再生至其生理靶区的重要原因之一,而硫酸软骨素蛋白多糖 (CSPGs) 则是细胞外抑制性基质的重要成分^[1]。因此,如何原位消除

硫酸软骨素蛋白多糖的抑制性作用就成为神经创伤研究中亟待解决的问题。硫酸软骨素酶 ABC I (ChABC I) 可将硫酸软骨素 A、B、C 及透明质酸降解为不饱和二糖 (ADi) 及寡糖,解除其抑制轴突伸展的作用。近来研究发现,神经创伤后局部注射 ChABC I 降解硫酸软骨素蛋白多糖可协助受损轴突穿越瘢痕组织,恢复某些神经功能^[2-5]。但当前 ChABC I 主要由工程菌中提取,生产工艺复杂,价格昂贵;采用长时间鞘内灌注的给药方式亦可造成头痛、穿刺部位感染、损伤邻近部位神经根等严重不良反应。在本研究中,我们拟通过构建 ChABC I 分泌型真核表达质粒,改善其给药途径,为该酶在科研和临床中的应用创造更好的条件。

基金项目:天津市高等学校科技发展基金重点项目(项目编号:2004ZD06);天津市科技支撑计划重点项目(项目编号:07ZCKFSF00800);天津市高等学校科技发展基金计划项目(项目编号:20060202)

作者单位:300052 天津医科大学总医院,天津市神经病学研究所神经病理研究室,天津市神经损伤变异与再生重点实验室,教育部中枢创伤修复与再生重点实验室

通信作者:于士柱 (Email: tjyushizhu@yahoo.com)

材料与方法

一、重组质粒 pUC-57-BMS 的构建

基底膜 40 蛋白 (BM40) 信号肽编码区序列由美国 Invitrogen 公司直接合成^[6]。为方便后续的克隆工作,合成时在 BM40 信号肽编码区序列的 5' 末端引入 *Kpn* I 酶切位点,在其 3' 末端引入 *Bam*H I 酶切位点。而后将合成产物插入到载体 pUC-57(南京金斯瑞生物科技有限公司)的 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点间,构建重组质粒 pUC-57-BMS。

二、ChABC I 成熟肽段编码区 PCR 引物的合成

该引物由美国 Invitrogen 公司合成,引物设计按 Genbank 中 ChABC I (E08025) 的 cDNA 序列及文献报道进行^[7],在上游和下游引物中分别引入 *Bam*H I 和 *Sfu* I 酶切位点,具体序列为上游: 5'-GGATTCACCAGCA ATCCTGCATTTG-3',下游: 5'-TTCGAAAGGGAGTGGCGAGAGTTTGA-3'。

三、ChABC I 成熟肽段编码区的扩增

提取普通变形杆菌(美国 ATCC 公司,19181)基因组 DNA,PCR 直接扩增 ChABC I 成熟肽段编码区,扩增条件如下:预变性 95 °C 3 min,变性 92 °C 1.50 min,退火 47 °C 1 min,延伸 72 °C 3 min,共计 35 个循环,最后补充延伸 10 min。将 PCR 扩增产物插入载体 pGEM-T Easy(美国 Promega 公司),构建重组质粒 pGEM-T-CABC I。

四、分泌型真核表达质粒 pCDNA-BMS-CABC I 的构建

利用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切质粒 pUC-57-BMS,回收释放的 BM40 信号肽编码区;利用 *Bam*H I 和 *Sfu* I 酶切重组质粒 pGEM-T-CABC I,回收释放的 ChABC I 成熟肽段编码区。将上述 2 个片段依次插入真核表达载体 pCDNA3.1/V5/HIS A(美国 Invitrogen 公司)的相应酶切位点间,构建重组真核表达质粒 pCDNA-BMS-CABC I。经测序确定各插入片段位置的准确性和开放读码框的完整性。

五、用 pCDNA-BMS-CABC I 转染胶质瘤细胞系

以 Lipofectmine 2000(美国 Invitrogen 公司)为转染介质,用重组质粒 pCDNA-BMS-CABC I 转染 TJ905 细胞系,同时以未插入外源性片段的 pCDNA3.1/V5/HIS A 空载体作为对照,转染操作按照生产商提供的试剂说明书进行。转染后 72 h 取培养物上清,行 SDS-PAGE 和免疫印迹检测。

六、培养上清液中外源性蛋白质的检测

将空载体对照组和重组质粒转染组上清液标本进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝(CBB)染色。以小鼠抗 V5 单克隆抗体(稀释倍数 1:1000,美国 Invitrogen 公司)为 I 抗,以辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 抗体(稀释倍数 1:500,美国 Santa Cruz 公司)为 II 抗进行 Western blotting 检测,以 Chemi Genius 凝胶成像分析系统(美国 Syngene 公司)进行凝胶成像及化学发光检测。

结 果

一、ChABC I 成熟肽段编码区扩增产物的鉴定结果

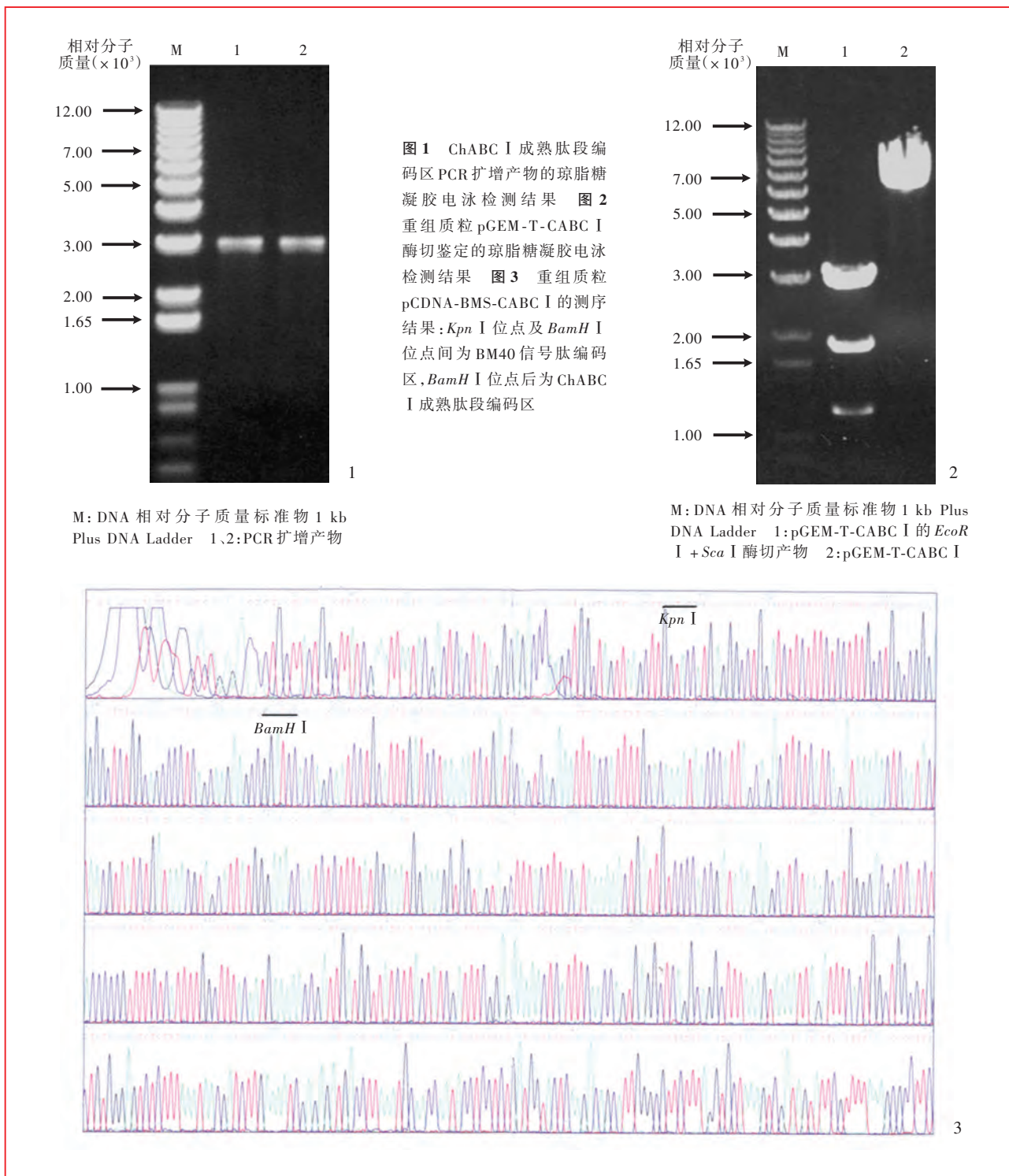
琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,PCR 扩增产物在 3000 bp 附近有特异性条带出现,其大小与 ChABC I 成熟肽段编码区的长度(2994 bp)相一致(图 1)。以上结果说明经 PCR 扩增成功地获得了 ChABC I 成熟肽段编码区 DNA 片段。

二、重组质粒 pGEM-T-CABC I 的酶切鉴定结果

由于 pGEM-T Easy 载体大小与 ChABC I 成熟肽段编码区相似(3015 bp),故在酶切鉴定 pGEM-T-CABC I 时,除选用在外源性片段插入位点上、下游均存在的识别位点 *Eco*R I 外,还选用了载体骨架上存在的单一识别位点 *Sca* I 进行联合限制性酶切。酶切产物的琼脂糖凝胶电泳检测显示,在 3000 bp、1900 bp 和 1100 bp 位置出现 3 条特异性条带,分别对应于 ChABC I 成熟肽段编码区及 pGEM-T Easy 载体被切割后产生的 1900 bp 和 1100 bp 2 个片段(图 2)。以上结果说明,重组质粒 pGEM-T-CABC I 构建成功,ChABC I 成熟肽段编码区 DNA 片段插入位点正确。

三、重组真核表达质粒 pCDNA-BMS-CABC I 的鉴定结果

经酶切和琼脂糖凝胶电泳检测证实,在重组分泌型真核表达质粒 pCDNA-BMS-CABC I 中,BM40 信号肽编码区和 ChABC I 成熟肽段编码区 2 个 DNA 片段的插入位点正确无误。pCDNA-BMS-CABC I 的测序分析结果显示,在载体 pCDNA3.1/V5/HIS A 的 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点间插入有 BM40 信号肽编码区,在 *Bam*H I 及 *Sfu* I 酶切位点之间插入有 ChABC I 成熟肽段编码区,各插入片段序列完整、方向正确,而且位于同一开放读码框中

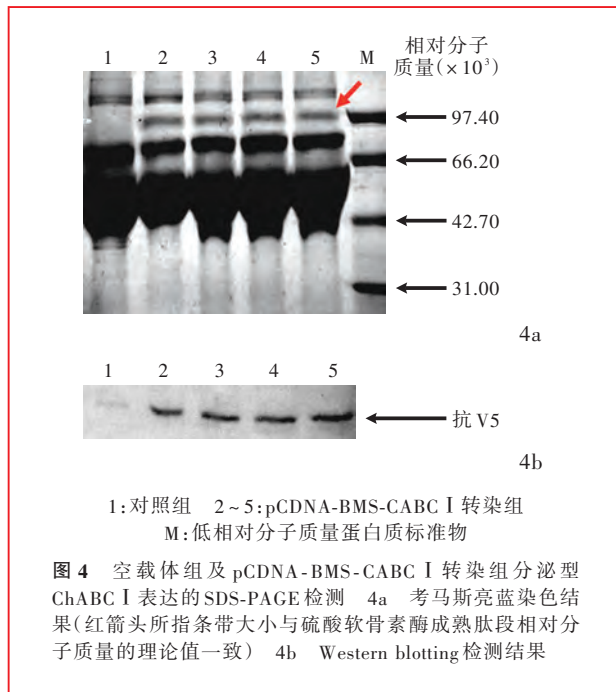


(图 3)。以上结果说明重组分泌型真核表达质粒 pCDNA-BMS-CABC I 构建成功。

四、分泌型 ChABC I 在胶质瘤细胞系中表达的检测结果

分别用空载体 pCDNA3.1/V5/HIS A 及重组分泌型真核表达质粒 pCDNA-BMS-CABC I 转染人 TJ905 胶质瘤细胞系。转染 72 h 后,收集两组 TJ905 细胞

的培养液上清蛋白行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色及 Western blotting 检测。考马斯亮蓝染色结果显示,在 pCDNA-BMS-CABC I 转染组培养液上清蛋白中分离出相对分子质量约 100×10^3 的特异性蛋白条带,其大小与硫酸软骨素酶成熟肽段相对分子质量的理论值一致(图 4a 红箭头所指条带)。Western blotting 检测结果显示,该条带能与抗 V5 单克隆抗



体呈现特异性免疫反应,说明该条带为 ChABC I 与 V5 形成的特异性融合蛋白(图 4b)。

讨 论

在成熟中枢神经系统组织中,硫酸软骨素蛋白多糖起到电绝缘和防止异常突触形成的重要作用。但在中枢神经系统损伤后,以星形细胞为主的神经胶质细胞可大量分泌硫酸软骨素蛋白多糖至细胞外基质,构成胶质瘢痕中抑制受损轴突伸展的重要成分,影响神经系统的再生和功能恢复^[8]。因此,通过构建 ChABC I 的分泌型真核表达质粒,使其在损伤局部呈分泌型表达,则可达到原位消化细胞外抑制性基质及易化受损轴突延伸的作用。

选择合适的信号肽是成功构建分泌型表达载体的关键。ChABC I 是普通变形杆菌的胞外裂解酶,其原始编码产物 N 端有一长 24 个氨基酸残基的原核细胞信号肽,该信号肽可介导成熟的 ChABC I 分泌至细菌周质中^[7],但由于原核细胞和真核细胞蛋白分泌的机制不同,二者的信号肽结构亦有较大的差异。我们先前的研究已经证实,利用 ChABC I 固有的野生型原核信号肽不能有效介导目的蛋白在真核细胞中的分泌型表达(尚未发表)。因此,选择适宜的真核细胞信号肽对能否成功构建真核细胞分泌型表达重组质粒至关重要。BM40 亦称骨连接素(osteonectin)或富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC),其信号肽具有极强的介导同源性和异源

性蛋白呈分泌型表达的能力^[6];同时 BM40 是细胞外基质的重要成分,与本蛋白的预期分泌部位相似,故我们选用 BM40 的信号肽介导 ChABC I 的分泌型表达。本研究结果说明, BM40 信号肽能有效地介导 ChABC I 分泌至细胞培养上清液中。

由于目前尚无商品化的 ChABC I 抗体,因此不能直接利用免疫印迹法或免疫细胞化学方法检测 ChABC I 的表达产物,而只能通过 V5 蛋白标签间接确定表达蛋白的免疫原性,这也是本研究采用真核融合蛋白表达质粒的根本原因。此外,由于在 V5 下游加入了蛋白纯化标签 6×His,可极大地方便后续工作中对 ChABC I 的纯化。本研究显示, V5 和 6×His 标签的加入并未干扰 ChABC I 的分泌型表达。

以上结果说明,经本研究成功建立了 ChABC I 分泌型真核表达质粒的构建和表达技术;证实了用 pCDNA-BMS-CABC I 转染 TJ905 细胞后,该质粒表达的外源性重组融合蛋白(BM40 信号肽-ChABC I - V5-6×His)的 BM40 信号肽可有效引导其下游的 ChABC I 分泌至细胞外。该项技术的建立为 ChABC I 在神经创伤修复中的应用开辟了新途径,而干细胞基因工程修饰技术的迅猛发展为该技术的实际应用提供了新的投递工具。可以预见,如能把分泌型真核表达载体与干细胞基因工程修饰技术相结合,将可极大地优化 ChABC I 的给药途径。

参 考 文 献

- [1] Cafferty WB, Yang SH, Duffy PJ, et al. Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci*, 2007, 27: 2176-2185.
- [2] Tsai EC, Tator CH. Neuroprotection and regeneration strategies for spinal cord repair. *Curr Pharm Des*, 2005, 11:1211-1222.
- [3] Barritt AW, Davies M, Marchand F, et al. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2006, 26:10856-10867.
- [4] Huang WC, Kuo WC, Cherng JH, et al. Chondroitinase ABC promotes axonal re-growth and behavior recovery in spinal cord injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349:963-968.
- [5] Li HP, Homma A, Sango K, et al. Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site. *J Neurosci Res*, 2007, 85:536-547.
- [6] Holden P, Keene DR, Lunstrum GP, et al. Secretion of cartilage oligomeric matrix protein is affected by the signal peptide. *J Biol Chem*, 2005, 280:17172-17179.
- [7] Prabhakar V, Capila I, Bosques CJ, et al. Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochem J*, 2005, 386(Pt 1):103-112.
- [8] Carulli D, Laabs T, Geller HM, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 2005, 15:116-120.

(收稿日期:2010-06-11)