文章编号: 1001-0580(2007)08-0976-02 中图分类号: R 329 文献标志码: A 【实验研究】

小鼠 Cdc25B 融合蛋白构建和表达*

赵鸿梅[1,2], 滕秋艳[2], 张哲[1], 于秉治[1]

摘 要: 目的 研究小鼠 N 末端缺失 286 氨基酸的野生型 Cdc25B 原核表达载体的构建和表达。方法 应用 Primer5.0 软件分析并设计小鼠 Cdc25B 5′及 3′端引物(N 末端缺失 286 氨基酶), 化学合成并用聚合酶链反就(PCR)方法扩增, 经限制性内切酶酶切后连接原核表达载体 PGEX4T-2, 构建成 PGEX4T-2-Cdc25B 融合表达载体, 转化大肠埃希菌 BL21 后, 通过异丙基硫代-β-D 半乳糖苷(IPTG)诱导进行目的蛋白表达。结果 通过双酶切、电泳分析及测序证明成功构建了 Cdc25B 融合表达载体, 融合蛋白产物经蛋白印迹(Western blot)显示, 相对分子量为 53KD 的蛋白谱带, 与预期一致。结论 成功构建并表达了 Cdc25B-N 末端缺失的基因, 并在原核细胞中获得较高水平的表达, 为近一步研究 Cdc25B 的功能提供基础依据。

关键词: Cdc25B; 基因表达; 谷胱甘肽转移酶(GST); 聚合酶链式反应

Consturction and expression of mouse Cdc25B protein *ZHAO Hong-mei, TENG Qiu-yan, ZHANG Zhe, et al. Medical Laboratory, Liaoning Province People's Hospital (Shengyang 110015, China)*

Abstract: Objective To study construction and expression of mouse cdc25B protein. **Methods** The Cdc25B gene was amplified by PCR, enzyme digest and linked behind PGEX4T-2. After inducing with IPTG, the target gene was primarily expressed. **Results** The Cdc25B gene consisted of about 900bp by DNA electrophoresis. The prokaryotic expression vector of PGEX4T-2/Cdc25B was constructed. After induction, a new anticipated Mr 53KD band appeared in Westen-Blot. **Conclusion** Fusion proteins of GST/Cdc25B are successfully expressed in BL21. This study is a basis for the role of Cdc25B during mouse oocyte maturatin.

Key words: Cdc25B; gene expression; GST; PCR

Cdc25B 蛋白家族是苏氨酸/酷氨酸(Thr/Tyr)双特异性蛋白磷酸酶, 能去除 14/Thr 和 Tyr 的抑制性磷酸化修饰, 推动细胞进行减数分裂。哺乳动物中存在 3 种形式的 Cdc25 蛋白, 即 Cdc25A, B 和 C。发挥磷酸酶活性的催化结构域均位于保守的羧基端, 三者在 N 末端区域存在差异, 在细胞周期调控中发挥不同作用[1,2]。根据生物信息学辅助分析提供的线索, 在小鼠卵母细胞减数分裂恢复过程中, Cdc25B 为蛋白激酶 A(PKA)的候选底物。本实验通过构建生物型 N 末端缺失 286 氨基酸的 Cdc25B 表达载体, 在原核细胞中表达及纯化, 以探讨 Cdc25B 是否为 PKA 的直接作用底物。

1 材料与方法

1.1 材料 PBSK-Cdc25B(Tony Hunter 教授, The Salk institute 惠赠); 克隆载体 PGEX4T-2(美国 Promega 公司); JM109(日本 TaKaRa 公司); BL21(北京天为时代公司)。限制性内切酶 BamH1, XhoI, TaqDNA 聚合酶, T4DNA 连接酶, DNA 快速纯化/回收试剂盒, 质粒 DNA 纯化试剂盒(日本 TaKaRa 公司); LURIA BROTH SASE(LB)培养基(美国 Gibco 公司); 谷胱甘肽转移酶(GST)抗体、辣根过氧化物酶偶连的羊抗兔 IgG(美国 Santa Cruz 公司); 基因扩增值(BIOER, 抗州博日科技有限公司); 紫外分光光度仪(美国 Pharmacia 公司); 电泳仪, 电泳槽(美国 BIO-RAD 公司); 超净工作台(苏州净化设备厂); 细菌培养箱, 空气浴振荡器(哈尔滨东明医疗仪器厂)。

1.2 野生型 Cdc25B 融合载体构建 (1)目的基因的扩增: 根据小鼠 Cdc25B 的 cDNA 序列, 引入计算机 Primer5.0 软件优化设计出上下游引物(A, B), 同时在 5′端引入 BamHI 酶切位点, 3′端引入 XhoI 酶切位点。引物序列如下: 上游引物 A: 5′TCGGATCCGGTAATGGAGAACCTCATTAGTGC3′; 下游引物 B: 5′TCTCGAGCCTCATCACTGGTCTTGCAGCCTG3′; 所用引物为日本 TaKaRa 公司合成, 以质粒 PBSK-Cdc25B 为模板进行 PCR 扩增, 预计扩赠的片段为 888 bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳, 凝胶回收试剂盒回收, -20℃保存备用。(2)目的基因与 T 载体的连接: 参照试剂盒说明书。应用质粒提取试剂盒提取 PGEM-T-Cdc25B 质粒并用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切鉴定, 1% 琼脂糖电泳溴化乙锭(EB)染色, 紫外透射仪上观察结果, 筛选出阳性克隆用于表达载体的构建。(3)表达载体 PGEX4T-2-Cdc25B 的构建及鉴定: 经鉴定与 T 载体连接的阳性克隆和 PGEX 载体经 BamHI 和 XhoI 双酶切后进行连接反应[3]。将连续反应液转化感受态 BL21, 进行质粒提纯, 双酶切电泳及 DNA 测序鉴定得到正确的 PGEX4T-2-Cdc25B 融合表达载体。

1.3 PGEX4T-2-Cdc25B 融合载体的诱导表达 将转化有 PGEX4T-2 和 PGEX4T-2-cdc26B 的 NL21(DE3)菌株于 LB 培养基中(含氨苄 100mg/ml) 30℃, 220 Rpm 摇床培养 2 h 左右, 当菌浓度 A_{550}为 0.5~1.0 之间时, 加入异丙基硫代-β-D 半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1.0 mmol/L 继续培养 7 h, 10000 r/min 4℃离心 10 min, 收集菌沉淀, -20℃保存。

1.4 免疫印迹 在样品中加入 2 倍蛋白上样缓冲液, 混匀, 煮沸10 min, 用 1% 分离胶, 4% 浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 再将聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 抗兔 GST 抗体为一抗(稀释比 1∶1 000), 羊抗兔 IgG 为二抗(稀释比 1∶2 000), 加强化学发光法曝光成像。

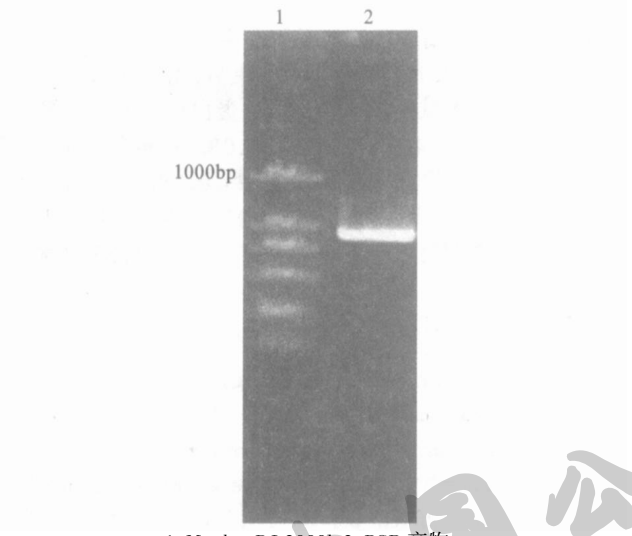
* 基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助(20050159019)

作者单位: 1. 辽宁省人民医院检验科, 沈阳 110016; 2. 中国医科大学生化与分子生物学教研室

作者简介: 赵鸿梅(1973-), 女, 辽宁沈阳人, 副主任检验师, 博士在读, 研究方向: 肿瘤免疫学、内分泌检验、病毒检验。

2 结　果

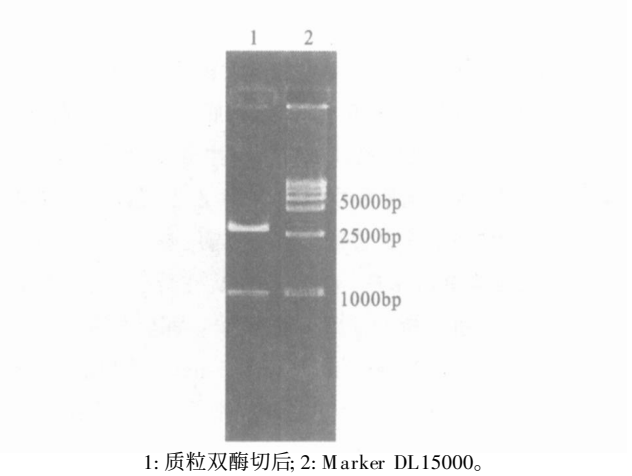
2.1 PCR 扩增(图 1)　Cdc25B DNA 片段以 PBSK-Cdc25B 质粒为模板,扩增出预计长度约为 900 bp 的 Cdc25B DNA 片段,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,在约 900 bp 区域可见 1 条强荧光带,证明 PCR 成功。



1: Marker DL2000l; 2: PCR 产物。

图 1　**PCR** 扩增 **N** 末端缺失 **286** 年氨基酸的 **Cdc25B**

2.2 融合载体的构建与序列测定(图 2)　PCR 扩增出的 Cdc25B 基因经 T-载体连接后,经 BamHiv和 Xhoiv双酶切后克隆到经相同酶切处理的 PGEX 载体后,连接产物转化 BL21 感受态菌,涂板培养挑取阳性克隆进行双酶切鉴定。图 2 可见,给 4000 bp 的载体带及 900 bp 区域的目的带,符合预期大小,证明亚克隆成功。获得 PGEX4T-2-Cdc25B 用于原核表达。



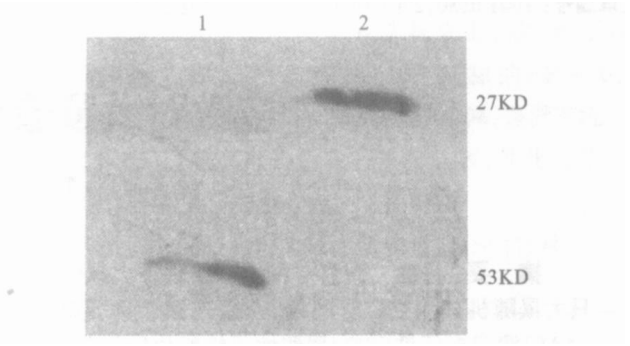
1: 质粒双酶切后; 2: Marker DL15000。

图 2　**PGEX4T-2-Cdc25B** 经 **BamH** iv和 **Hho** iv双酶切后的电泳图谱

2.3 重组基因在大肠杆菌中的表达　诱导表达的蛋白产物经 Western blot 分别显示相对分子量为 53KD(融合蛋白)和 27DK(空载体)的蛋白谱带,与预期一致。

3 讨　论

脊椎动物卵母细胞的成熟机制一直深受关注。近来发现,PKA 通过抑制减数分裂早期信号事件阻断卵母细胞成熟,但 PKA 的激酶活性是抑制 Cdc25B 活性所必需的[4]。尽管已有研究显示,卵母细胞自发性减数分裂受多种信号系统调节,但 PKA 的直接作用底物及其维持减数分裂的机制尚不清楚。



1: PGEX4T-2-Cdc25B; 2: PXGE4T-2。

图 3　重组 **PGEX4T-2-Cdc25B** 与 **PXGE4T-2** 经 **IPTG** 诱导后 **Western blot** 结果

体内实验已经证实,Cdc25B 能促进卵母细胞成熟,其突变体 Cdc25Bs321A 能完全解除 PKA 的抑制,完成减数分裂。PKA 可能通过磷酸化 Cdc25B 的 321 位丝氨酸抑制 Cdc25B 的活性进而发生 G2 期阻滞[5]。但该作用是直接还是间接尚待证实。为此,我们进行 PGEX4T2-Cdc25B 融合蛋白的原核表达。由于原核表达系统常受目的基本本身的结构特点,转录水平的调节和蛋白水平等多因素影响[6],使得目的基因在原核表达系统的表达成为基因工程技术的重要环节和难点之一。

本实验中,采用商品化的 GST 融合表达载体 PGEX4T-2,PGEX4T-2 是一种较为高效的蛋白表达载体,同时表达产品可通过亲和层析法纯化,操作简单,用凝血酶即可进行酶切除去 GST,进而获得所需要的蛋白产品。在蛋白大量表达前我们优化了表达条件、包括温度、诱导物浓度、诱导时间等。结果通过 Wentern Blot 证实获得了分子量约为 53KD 的融合蛋白,同时分子量约为 27KD 的 GST 载体蛋白也成功表达。下一步,准备大量表达重组蛋白,而后纯化、酶切除去载体蛋白,获得目的蛋白。在体外通过体外磷酸化实验验证 Cdc25B 是否为 PKA 的直接作用底物。

参考文献

〔1〕 Craig B, Orchard, Ilario Siciliano, et al. Tabacco BY-2 cells expressing fission yeast Cdc25 bypass a G2/M block on the cell cycle [J]. The Plant Journal, 2005, 44: 290-299.

〔2〕 Arne Lindqvist, Helena Kallstrom, Yalerie Jerome, et al. Cdc25b cooperates with Cdc25A to innduce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome[J]. JCB, 2005, 171: 35-45.

〔3〕 J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南[J]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2003: 68-71.

〔4〕 Schmitt A, Nebreda AR. Inhibition of Xenopus oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(7): 4361-4366.

〔5〕 张阳, 张杰, 于爱鸣, 等. 蛋白激酶 A/Cdc25B 通路在小鼠卵母细胞 G2 期阻滞中作用的研究[J]. 生殖与避孕, 2005, 4(25): 195-200.

〔6〕 Wels W, Beerli R, Hellmann P. EGF receptor and P185erBb-2 specific single chain antibody toxin differ in their cell killing activity on tumor cells expression both receptor proteins[J]. Int J Cancer, 1995, 60: 137-144.

收稿日期: 2006-11-13　　(文涛编辑　刘铁校对)