

小鼠 Bax 的基因克隆及其原核表达

唐晓莹¹, 浦雄勇² (1. 江苏省昆山市第三人民医院检验科 215316; 2. 江苏省昆山市第一人民医院检验科 215316)

【摘要】 目的 克隆小鼠 Bax 基因全长编码区, 并原核表达小鼠 Bax 基因全长序列, 为从转录水平探讨 Bax 基因与肿瘤的关系奠定基础。**方法** 取小鼠骨髓细胞, 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)从细胞中获得 Bax 基因, 构建重组表达质粒 pet28a/Bax; 酶切鉴定挑选阳性重组质粒转化大肠埃希菌 ROS, 测序鉴定后经 IPTG 25 °C 诱导 6 h, SDS-PAGE 电泳判断以包涵体形式存在的带有 His 标签的融合蛋白, Western blot 鉴定。**结果** 扩增获得的 Bax 基因 CDS 区全长 579 bp, 编码 192 个氨基酸残基, 与 GenBank 中发表的序列完全一致。成功构建了原核表达载体 pet28a/Bax, 并在工程菌 ROS 中获得大量表达。**结论** 获得了小鼠 Bax 基因, 并成功原核表达和制备出小鼠 Bax 融合蛋白, 为进一步研究其生物学功能奠定了基础, 并为寻找多种肿瘤性疾病的有效治疗途径提供新思路。

【关键词】 Bax 基因; DNA; 克隆; 聚合酶链反应; 原核表达

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 06. 009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)06-0662-02

Cloning and expression of mouse Bax gene TANG Xiao-ying¹, PU Xiong-yong² (1. Department of Clinical Laboratory, Kunshan Third People's Hospital, Kunshan, Jiangsu 215316, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Kunshan First Hospital, Kunshan, Jiangsu 215316, China)

【Abstract】 Objective To clone and express mouse Bax in order to study the relation between Bax tumors. **Methods** The Bax gene was amplified from mouse myeloid cells by RT-PCR. Bax gene was constructed into pet28a vector and expressed in E. coli ROS. The fusion protein was tested by Western blot. **Results** The gene of Bax had the length of 579 bp with a complete open reading frame, which encoded a product of 192 amino acid and shared 100% homology with the sequence of mRNA for mouse Bax in GeneBank. The prokaryotic expression plasmid pet28a/Bax was constructed successfully and the Bax protein was gained. **Conclusion** Mouse Bax gene is cloned and expressed in E. coli system successfully, which brings a foundation for further research on its biological function.

【Key words】 Bax gene; DNA; cloning; PCR; protein expression

1993 年, Oltvai 等^[1]发现了一种能与 Bcl-2 共沉淀的蛋白质, 命名为 Bax(Bcl-2 associated X protein), 属于 Bcl-2 家族, 是重要的促凋亡因子, 通过对凋亡的调节干预肿瘤的发生、发展及预后^[2]。本研究应用 RT-PCR 技术克隆小鼠 Bax 基因并原核表达, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 Trizol、逆转录试剂盒及质粒提取试剂盒为 Invitrogen 公司产品, LATaq DNA 聚合酶、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase、dNTP、BamH I 及 Xho I 核酸内切酶、T4 连接酶、DL2000、蛋白 marker 和 pMD19-T 载体均为 Takara Biotec 公司产品, 琼脂糖为上海意图公司产品, X-gal 和 IPTG 为默克公司产品, ECL 试剂购自 Amershan Biosciences 公司, anti-His 抗体、羊抗小鼠 IgG-HRP 购自北京中山生物技术有限公司。原核表达载体 pet28a、感受态细菌 E. coli DH5α 和 E. coli ROS 由昆山市第三人民医院检验科保存。实验用 Babc/L 小鼠购自扬州大学比较医学中心。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中小鼠 Bax 基因 CDS 序列, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列如下: 上游引物 P1 (BamH I) 5'-GAG GAT CCA TGG ACG GGT CCG GGG A-3'; 下游引物 P2 (Xho I) 5'-CGC CTC GAG TCA GCC CAT CTT TCT TCC AGA TGG TG-3'。

1.2.2 小鼠骨髓细胞总 RNA 的提取 取小鼠骨髓研碎, 置 EP 管内, 加入 1 mL Trizol, 室温放置 5 min, 加入 0.2 mL 氯

仿, 盖紧 EP 管用力振摇 15 s, 室温放置 10 min; 4 °C, 12 000×g 离心 15 min, 取上层水相至清洁 EP 管; 加 0.5 mL 异丙醇, 室温静置 10 min, 4 °C, 12 000×g 离心 10 min, 胶样 RNA 沉于管底部, 弃上清液, 加二乙基焦磷酸胺(DEPC)水配制的 75% 乙醇 1 mL 涡洗 RNA 两遍; 4 °C, 7 500×g 离心 5 min, 去乙醇, 空气干燥 3~5 min; 加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA。

1.2.3 RT-PCR 扩增 Bax cDNA 根据逆转录试剂盒操作说明, 将总 RNA 逆转录为 cDNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系包括 25 μL 2×GC buffer I、6 μL dNTP (2.5 mmol/L)、3 μL cDNA、0.5 μL LA Taq 酶(5 U/μL)、1 μL P1 及 P2 引物、13.5 μL H₂O。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共进行 30 次循环, 再 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖电泳, EB 染色分析鉴定。

1.2.4 Bax cDNA 克隆鉴定及序列分析 用胶回收试剂盒对 Bax 基因的 PCR 扩增产物进行回收, 并与 pMD19-T 载体连接, 转化 DH5α 感受态细菌, 接种含有氨苄西林、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板, 挑取白色菌落增菌, 用试剂盒抽提质粒并作 BamH I、Xho I 酶切和 PCR 鉴定。将经过鉴定的阳性重组质粒, 使用 M13F/R 通用引物进行双向反应测序, 将测定的核苷酸序列与 GenBank 中的序列进行同源性分析。

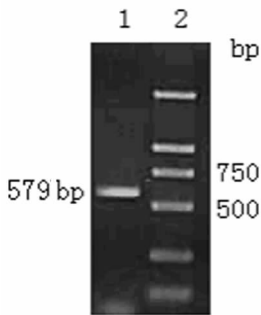
1.3 重组质粒的构建 将测序正确的 pMD19-T/Bax 质粒经 BamH I 和 Xho I 双酶切, 胶回收的产物经克隆到 pet28a 载体, 然后转化大肠杆菌 ROS, 挑取阳性克隆, 经酶切鉴定与预期结果相符, 送公司测序。

1.4 小鼠 Bax 重组蛋白的诱导表达 挑取单个菌落接种于 3 mL 氨苄西林 LB 培养基, 37 °C 振荡 12~16 h, 第 2 天将此菌液以 1/100 接种新鲜 LB 培养基中, 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时, 分别加入终浓度为 0.5、1、1.5、2 mmol/L 的 IPTG, 然后分别在 25、30 °C 和 37 °C 继续振荡培养, 诱导时间分别为 4、6、8 h, 在各个时间段分别 4 °C、5 000×g 离心 10 min 收集细菌弃上清液, 1/10 体积的冷 PBS 重悬细菌, 冰浴超声破菌。4 °C、12 000×g 离心 20 min, 各取上清液和沉淀行 SDS-PAGE 电泳, 确定合适的 IPTG 浓度、诱导的温度和时间。

1.5 Western blot 鉴定 通过 SDS-PAGE 电泳结果发现 Bax 蛋白的最佳诱导条件为 25 °C、1 mmol/L 的 IPTG、6 h。用 SDS-PAGE 胶分离蛋白后, 将分离胶中的蛋白经电转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜取下后用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, TBS/T 洗涤一次。按 1:1 000 的比例, 用 5% 的脱脂牛奶稀释抗 His 抗体, 4 °C 孵育过夜, TBS/T 洗涤 3 次, 每次 5 min。按 1:400 的比例, 用 5% 的脱脂牛奶稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体, 室温孵育 1 h 后, 再用 TBS/T 洗涤 3 次, 每次 5 min。最后加显色剂 ECL-plus 并曝光观察结果。

2 结 果

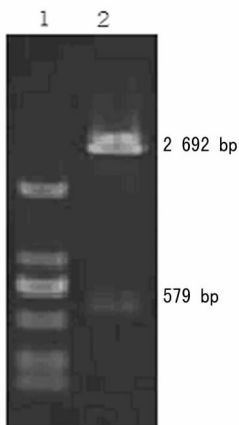
2.1 Bax 基因 RT-PCR 扩增结果 抽提小鼠骨髓细胞总 RNA, 以逆转录产物为模板, 采用特异性 Bax 引物, 通过 PCR 扩增得到目的基因, 长度为 579 bp, 与目的片段基本一致(图 1)。



注: 1 为 Bax 基因片段; 2 为 DNA 分子量标准(DL2 000)。

图 1 RT-PCR 扩增 Bax 基因的琼脂糖凝胶电泳分析图谱

2.2 重组质粒的筛选与鉴定 将 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接, 连接产物转化 DH5 α 菌株, 进行蓝白斑筛选随机挑取白色菌落, 抽提其质粒, 经单、双酶切, 电泳后, 阳性克隆条带分别为 2 692 bp 和 579 bp 左右, 结果见图 2。



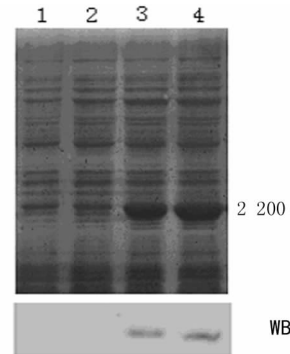
注: 1 为 DNA 分子量标准(DL2 000); 2 为重组子 pMD19-T/Bax 的 BamH I、Xho I 双酶切片段。

图 2 pMD19-T/Bax 双酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图谱

2.3 测序结果及分析 克隆出的目的基因测序显示, 其编码区为 579 bp, 编码 192 个氨基酸残基, 部分测序结果与 GenBank 已收录的序列(NM_007527)比较, 同源性达 100%。

2.4 重组质粒 pet28a/Bax 的构建及鉴定 将 Bax 亚克隆到原核表达载体 pet28a 多克隆位点中(BamH I 和 Xho I), 重组克隆经酶切及 PCR 鉴定, 目的片段大小与预期相符, 证实表达载体构建成功。

2.5 Bax 融合蛋白的诱导表达及 Western blot 鉴定 pet28a/Bax 阳性菌株经 IPTG 诱导后 SDS-PAGE 电泳显示: 在 25 °C、1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 条件下, 融合蛋白表达达到高峰, 蛋白条带位于约 22×10³ 处(与预期相符), 用抗-His 进行 Western blot 鉴定, 证实该蛋白条带为 Bax 融合蛋白(图 3)。该重组蛋白主要以包涵体形式存在。



注: 1 为未诱导表达 Bax 蛋白; 2 为 IPTG 诱导表达 6 h 的 Bax 上清蛋白; 3 为 IPTG 诱导 6 h 的 Bax 沉淀蛋白; 4 为 IPTG 诱导表达 6 h 的融合蛋白; WB 为利用带 His 标签的单克隆抗体经免疫印迹法鉴定 bax 融合蛋白。

图 3 小鼠 Bax 融合蛋白在 E. coli ROS 中的表达及鉴定

3 讨 论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是由一系列基因控制的细胞自主性死亡, 它在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着重要作用^[3]。在凋亡程序的启动及执行过程中, Bcl-2 家族蛋白扮演着关键性的角色^[4]。Bcl-2 家族蛋白被分为两类, 即抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白, Bax 是重要的促凋亡因子, 在促进细胞凋亡、抑制肿瘤发生中起到了重要作用。

Bax 通过与 Bcl-2 家族蛋白成员及其他相关蛋白相互作用, 发挥其抗凋亡功能^[5-8]。Bax 通过对线粒体外膜的破坏, 促进死亡诱导信号复合体 DISC(death-inducing signing complex)的组装, 促进 Caspase-3 和 Caspase-8 的活性, 从而起到促凋亡作用。

凋亡是多种恶性肿瘤、自身免疫病和退行性疾病发生的重要辅助性因素, 而 Bax 是重要的促凋亡因子, 因此, Bax 的表达与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[9]。有学者发现 Bax 基因突变是结肠癌和胃癌预后不良的重要指示^[10-11]。另外, Bax 可介导乳腺丝抑蛋白的凋亡敏化效应, 为乳腺癌和前列腺癌的治疗提供了新思路^[12]。通过对 Bax 的研究, 探讨其在凋亡过程中的作用, 及与其他 Bcl-2 家族成员的相互关系, 有利于进一步了解其与肿瘤的发生及耐药性的关系, 为肿瘤的临床治疗提供了重要的理论依据。

本试验通过 RT-PCR 从小鼠骨髓细胞中获得 Bax 基因, 通过与 GenBank 中发表的 Bax 基因序列比较, 同源性完全一致, 长度为 579 bp, 编码 193 个氨基酸残基; 构建了原核表达载体 pet28a/Bax, 并在大肠埃希菌 ROS 中成功表达, 获得了 Bax 融合蛋白。小鼠 Bax 基因的成功克隆和表达, (下转第 668 页)

件明显增多。多重耐药鲍曼不动杆菌基因分型显示 AmpC 酶基因为主,同时携带有广谱 β -内酰胺酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因,基因类型模式相似。通过肠冲肠凝胶电泳发现 20 株多重耐药鲍曼不动杆菌酶切后染色体基因条带完全相同,占 90.9%(20/22),说明确实存在克隆株流行,表现出除亚胺培南和头孢哌酮/舒巴坦敏感或中介外的多重耐药性。出现同时携带 OXA-23 型碳青霉烯酶基因和 PER-1 型质粒基因多重耐药菌株,并表现出对亚胺培南的耐药和对头孢哌酮/舒巴坦中介、对其他抗菌药均耐受的特点。加强环境检测和消毒有重要意义。

参考文献

[1] 张凤林,李春辉,黄昕,等. ICU 多药耐药鲍曼不动杆菌医院感染暴发的危险因素分析[J]. 中国现代医学杂志, 2009,19(9):1355-1358.

[2] 李蓉,李文林,石小玉,等. ICU 常见病原菌及鲍曼不动杆菌质粒上耐药基因的研究[J]. 中国抗生素杂志,2008,33(6):375-378.

[3] Coudron PE, Moland ES, Thomason KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veteran's medical center [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 1791-1996.

[4] 陈东科,张志敏,张秀珍. 三维法检测内酰胺酶的影响因素探讨及方法的改进[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(10):600-604.

[5] Lee K, Lim YS, Yong D, et al. Evaluation of the hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of

Pseudomonas spp. and *Acinetobacter* spp. [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 4623-4629.

[6] Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamase associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45: 583-588.

[7] Tenover FC, Arbeit RO, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.

[8] 钟瑞雪,叶惠芬,陈惠玲,等. 产 β -内酰胺酶鲍曼不动杆菌基因型研究[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(7): 626-628.

[9] Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, et al. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58: 178-182.

[10] Naas T, Kernbaum S, Allali S, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13: 669-671.

[11] Mugnier PD, Poirel L, Naas T, et al. Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii* [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(1): 35-40.

[12] 李松. 152 株鲍曼不动杆菌的耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(3): 195.

(收稿日期:2010-10-06)

(上接第 663 页)

为进一步研究 Bax 的生物学功能,揭示细胞凋亡的分子机制, Bax 在多种疾病致病过程中的作用,以及为研究肿瘤的临床治疗奠定了重要的基础。

参考文献

[1] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ, et al. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.

[2] Boumela I, Guillemin Y, Guérin JF, et al. The Bcl-2 family pathway in gametes and preimplantation embryos [J]. Gynecol Obstet Fertil, 2009, 37(9): 720-732.

[3] Pećina-Slaus N. Genetic and molecular insights into apoptosis [J]. Acta Med Croatica, 2009, 2: 13-19.

[4] Kastelan M, Massari LP, Brajac I. The role of bcl-2 family proteins in psoriasis [J]. Lijec Vjesn, 2010, 132(1-2): 31-33.

[5] Jonas E. Bcl-xL regulates synaptic plasticity [J]. Mol Interv, 2006, 6(4): 208-222.

[6] Rautureau GJ, Day CL, Hinds MG. Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(4): 1808-1824.

[7] Autret A, Martin SJ. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis [J]. Mol Cell, 2009, 36(3): 355-363.

[8] Ray S, Bucur O, Almasan A, et al. Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor [J]. Apoptosis, 2005, 10(6): 1411-1418.

[9] Bougras G, Cartron PF, Gautier F, et al. Opposite role of Bax and BCL-2 in the anti-tumoral responses of the immune system [J]. BMC Cancer, 2004, 4: 54.

[10] Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, et al. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(20): 10872-10877.

[11] Krajewska M, Fenoglio-Preiser CM, Krajewski S, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach [J]. Am J Pathol, 1996, 149(5): 1449-1457.

[12] Liu J, Yin S, Reddy N, Spencer C, et al. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin [J]. Cancer Res, 2004, 64(5): 1703-1711.

(收稿日期:2010-10-15)