

人泛素-核糖体蛋白 27a 原核表达载体构建及表达*

曾 涛,何 德(广东医学院医学检验学院,广东东莞 523808)

【摘要】 目的 构建并表达携带谷胱甘肽 S 转移酶(GST)标签的人泛素-核糖体蛋白 S27a(UBRPS27a)原核表达载体。方法 利用反转录聚合酶链反应从 HL-60 细胞中扩增 RPS27A 基因全长,克隆至 pMD-19T 载体中,酶切回收后插入原核表达载体 pGEX4T-1,构建重组表达载体 pGEX4T1-RPS27A,转化大肠埃希菌 BL21,以异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导表达 GST-UBRPS27a 融合蛋白。结果 经测序与酶切鉴定,重组质粒 pGEX4T1-RPS27A 构建正确;经重组质粒转化的 BL21 细菌诱导 4 h 后可高效表达 UBRPS27a 融合蛋白。结论 成功构建 UBRPS27a 原核表达载体,为进一步研究其结构、功能及其在肿瘤发生发展中的作用奠定了基础。

【关键词】 泛素-核糖体蛋白 S27a; 原核表达载体; 构建; 表达

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.12.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)12-1489-02

Construction and prokaryotic expression of human ubiquitin-ribosomal protein S27a recombinant plasmid* ZENG Tao, HE De (School of Laboratory Science, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

【Abstract】 Objective To construct and express human ubiquitin-ribosomal protein S27a(UBRPS27a) with glutathione S-transferase(GST) tag. Methods RPS27A cDNA, obtained by reverse transcript-polymerase chain reaction from HL-60 cells, was inserted into pMD-19T vector, which then was digested by restriction endonuclease and cloned into pGEX4T-1 vector to construct recombinant plasmid pGEX4T1-RPS27A. BL21 E. coli was then transformed with pGEX4T1-RPS27A recombinant plasmid and induced to express GST-UBRPS27a protein. Results The recombinant plasmid pGEX4T1-RPS27A was successfully constructed according to double digestion and DNA sequencing. The soluble GST-UBRPS27a fusion protein was induced with high expression efficiency. Conclusion The construction of RPS27A recombinant vector and prokaryotic expression of the UBRPS27a protein would lay the foundation for further study of its molecular structure and function and its roles in cancer development.

【Key words】 ubiquitin-ribosome protein S27a; prokaryotic vector; construction; expression

泛素-核糖体蛋白 S27a(UBRPS27a)是泛素和核糖体蛋白的融合蛋白,由 RPS27A 基因编码^[1]。核糖体蛋白 S27a(RPS27a)为核糖体 40S 亚基组成蛋白之一,除参与蛋白质合成外,还具有其他重要功能。RPS27A 基因在多种活性增殖细胞中高度表达,其过表达是肝癌、胃癌、结肠癌等多种恶性肿瘤的典型特征,很可能是恶性转化细胞或肿瘤组织的标志物,但其在肿瘤细胞中的功能作用及其分子机制尚未清楚^[2-5]。本研究以原核系统表达人 UBRPS27a,旨在为进一步研究其结构与功能奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料 原核表达载体 pGEX4T-1、人急性早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞株、大肠埃希菌 JM109 及 BL21(DE3)由广东医学院生物化学与分子生物学研究所保存。Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 BamH I 和 Sma I、DNA T4 连接酶、DL2000 DNA 分子标记物、λHind III 标记物、载体 PMD18-T 购自 TaKaRa 公司。质粒抽提试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司。TRIzol 试剂和反转录(RT)聚合酶链反应(PCR, RT-PCR)试剂盒购自 Invitrogen 公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RPS27A 基因 cDNA 全长克隆 根据人 RPS27A 基因 cDNA 序列(GenBank NM_002954)以及 pGEX4T-1 载体上的多克隆位点设计上游引物 P1(5'-CGC GGA TCC ATG CAG

ATT TTC GTG AA-3',下划线部分为 BamH I 酶切位点)及下游引物 P2(5'-TCC CCC GGG TTA CTT GTC TTC TGG TTT G-3',下划线部分为 Sma I 酶切位点),由上海生工公司合成。收集对数生长期 HL-60 细胞,TRIzol 试剂抽提总 RNA, Oligo dT18 引物反转录合成 RPS27A cDNA 第 1 链;以 P1 和 P2 为引物,RT-PCR 扩增 RPS27A 编码区 cDNA 片段全长,扩增反应条件为 95 ℃ 5 min, 94 ℃ 45 s, 52 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min 循环 35 次, 72 ℃ 10 min, 取扩增产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外分析仪上观察扩增结果并拍照;将胶回收法纯化的目的片段与 PMD18-T 载体进行 T/A 克隆重组,挑选单克隆菌落,PCR 鉴定阳性克隆送上海生工公司测序;用质粒提取试剂盒抽提经测序验证克隆正确的质粒 DNA(T-RPS27A)。

1.2.2 pGEX4T-1-RPS27A 重组质粒构建 以 BamH I 和 Sma I 对 T-RPS27A 质粒和 pGEX4T-1 载体进行双酶切,酶切产物用琼脂糖凝胶电泳分离;胶回收法纯化的目的基因 DNA 片段与线性载体 DNA 片段在 T4 连接酶作用下连接过夜,转化感受态 JM109 细菌;挑取单克隆菌落接种于含氨苄西林(Amp⁺)LB 培养基中,37 ℃ 振荡培养过夜,提取质粒 DNA,PCR 与双酶切法鉴定后将阳性候选克隆送上海生工公司测序。

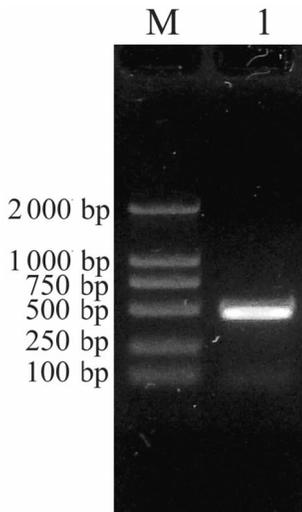
1.2.3 重组质粒诱导表达 以测序验证正确的 pGEX4T1-RPS27A 重组质粒转化感受态 BL21 细菌,挑选单克隆菌落,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(项目编号:81201831),广东省自然科学基金项目(项目编号:S2012040006310),广东省医学科学技术研究基金项目(项目编号:B2012266),广东医学院科研基金项目(项目编号:B2011021)。

PCR 与双酶切法鉴定;将含重组质粒的 BL21 细菌接种于 Amp⁺ LB 培养基,振荡培养过夜;将过夜培养菌按体积比 1:30 接种于新鲜 LB 培养基,37 °C 剧烈振荡培养至 A600 约为 0.5,加 1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)培养 4 h;以冰预冷磷酸盐缓冲液悬浮菌体,超声破碎,离心取上清进行 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),考马斯亮蓝 R250 染色后观察结果。

2 结 果

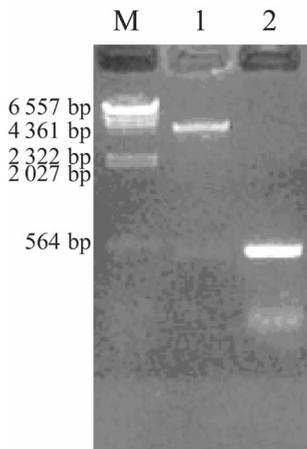
2.1 RPS27A 基因 cDNA 全长克隆 RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,在 200 bp 与 500 bp 之间发现 1 条清晰 DNA 条带,大小与目的基因预期片段 480 bp 相符(见图 1)。



M:DL2000 DNA 标记物;1:RPS27A cDNA 扩增产物。

图 1 RPS27A cDNA 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

2.2 pGEX4T1-RPS27A 重组质粒酶切鉴定 PCR 鉴定阳性重组质粒双酶切产物琼脂糖凝胶电泳显示,酶切获得的 2 个片段分别与 pGEX4T-1 载体(4 950 bp)及 RPS27A 目的片段(480 bp)预期大小相符(见图 2)。测序结果显示重组质粒中插入 DNA 片段序列与 RPS27A 基因 cDNA 全长完全一致(见图 3)。



M:λHindIII 标记物;1:pGEX4T1-RPS27A 重组质粒酶切产物;2:RPS27A 基因扩增产物。

图 2 pGEX4T1-RPS27A 重组质粒酶切鉴定

2.3 GST-UBRPS27a 融合蛋白诱导表达 pGEX4T-1-RPS27A 重组质粒诱导表达产物电泳图出现了 2 个过表达蛋白条带,1 条与 GST-UBRPS27a 融合蛋白相对分子质量(RMM)44×10³ (GST、UBRPS27a 的 RMM 分别为 26×10³ 和 18×10³)相符,表

达效率很高,另出现 1 条 RMM 稍小的蛋白条带(见图 4)。

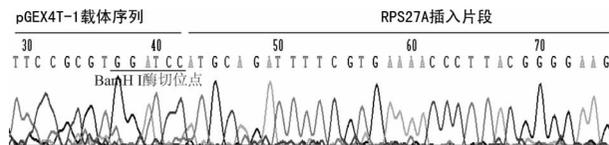
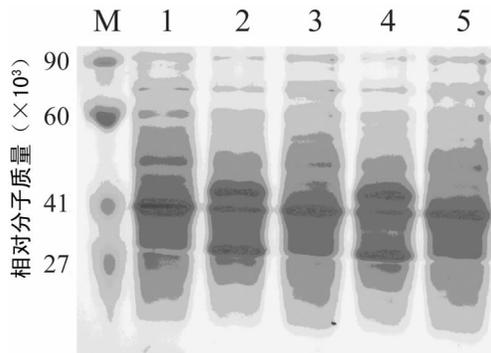


图 3 pGEX4T1-RPS27A 重组质粒中插入 DNA 片段部分测序图谱



M:蛋白分子标记物;1、3:未经诱导的 pGEX4T-1-RPS27A 质粒转化菌裂解上清;2、4:经 IPTG 诱导的 pGEX4T-1-RPS27A 质粒转化菌裂解上清;5:经 IPTG 诱导的 pGEX4T-1 空载体转化菌裂解上清。

图 4 SDS-PAGE 分析大肠杆菌 GST-UBRPS27a 重组蛋白的表达

3 讨 论

人 UBRPS27a 蛋白 N 端是泛素,C 端是 RPS27a,两端结构域在不同物种中均高度保守。RPS27a 通过 C4 型锌指结构域与 DNA 结合,组成核糖体结构,参与蛋白合成。RPS27a 通常与泛素融合,主要存在于细胞质中。泛素在核糖体合成过程中作为分子伴侣,在 RPS27a 进入核糖体之前对其有保护和稳定作用。本研究扩增了 RPS27A 基因编码区全长 cDNA,成功构建了 pGEX4T-1-RPS27A 重组质粒,并在大肠埃希菌中诱导表达了 GST-UBRPS27a 融合蛋白,为进一步利用 GST 标签进行 UBRPS27a 蛋白纯化、制备其单克隆抗体及研究其结构奠定了基础。蛋白诱导表达产物电泳图显示除 GST-UBRPS27a 融合蛋白高效表达外,另有 1 条 RMM 相对较小的条带(约 30×10³ 左右)过表达。为排除其他混杂克隆的干扰,本研究将 pGEX4T-1-RPS27A 重组克隆在 Amp⁺ LB 培养基上进行划线培养,挑取单克隆菌落重新诱导表达后,依然出现该条带。由此可见该蛋白条带是特异的,考虑可能为 GST-UBRPS27a 融合蛋白部分降解产物,有待后续实验进一步验证。

RPS27A 基因的表达在多种肿瘤组织中异常升高,可能在肿瘤发生、发展中具有重要作用。该基因是一种早期生长反应基因,在结肠癌及胃癌组织中的表达明显高于周边正常黏膜组织^[4]。而且 RPS27A 基因在低分化肝癌中的表达较正常水平升高 20 倍以上,用 RNA 干扰方法沉默 RPS27A 基因可导致肿瘤细胞周期停滞及细胞萎缩,说明该基因与肝癌发生有关^[6]。RPS27A 基因在胰腺癌的癌前病变组织表达水平升高,可用于胰腺癌早期鉴别诊断。深入分析 RPS27A 基因与肿瘤的关系有利于发现新的肿瘤标志物及临床治疗靶标。但目前对该分子在肿瘤细胞中的具体功能及分子作用机制所知尚少。蛋白激酶 CK2 与多种肿瘤密切相关,是目前肿瘤治疗研究中的靶点之一^[7]。黄功华等^[8]采用酵母双杂交技术筛选 HL-60 细胞 cDNA 文库时发现,人 UBRPS27a 是 CK2α'亚基的候选结合蛋白。但酵母双杂交系统有可能存在假阳(下转第 1492 页)

2 结 果

不稳定斑块组 2G/2G 基因型频率和 2G 等位基因频率显著高于稳定斑块组 ($P < 0.05$)；不稳定斑块组和稳定斑块组 2G/2G 基因型频率与 2G 等位基因频率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)，见表 1。不稳定斑块组和稳定斑块组外周血 MMP-1 浓度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；不稳定斑块组和稳定斑块组各时间点外周血 MMP-1 浓度均高于对照组 ($P < 0.05$)，见表 2。

表 1 MMP-1 基因型频率分布 [% (n)]

组别	n	基因型频率		
		2G/2G	2G/1G	1G/1G
不稳定斑块组	51	60.78(31)	31.37(16)	7.84(4)
稳定斑块组	44	38.64(17)	31.82(14)	29.55(13)
对照组	58	20.69(12)	37.93(22)	41.38(24)

表 2 外周血 MMP-1 水平比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 天	第 3 天	第 7 天
不稳定斑块组	51	1.321 \pm 0.225	1.613 \pm 0.372	1.816 \pm 0.485
稳定斑块组	44	1.301 \pm 0.236	1.594 \pm 0.364	1.828 \pm 0.501
对照组	58	0.842 \pm 0.053*	—	—

注：* 表示健康者体检当日检测结果；— 表示无数据。

3 讨 论

颈动脉粥样硬化斑块内覆盖的纤维帽将斑块内的成血栓性物质与血液隔开，是决定斑块是否稳定的关键，如果纤维帽受损或破裂，可导致斑块内物质进入血液，促使血栓形成，引发动脉阻塞诱发 ACI^[6]。MMP-1 是基质金属蛋白酶家族中表达量最高的胶原酶，能够降解血管内膜和粥样斑块纤维帽的主要组成蛋白，即 I 型和 III 型胶原蛋白。有研究证实，颈动脉粥样硬化斑块边缘和泡沫细胞积聚处 MMP-1 浓度较高，说明 MMP-1 通过降解 I 型和 III 型胶原蛋白使纤维帽变薄，促进粥样斑块进入不稳定状态^[7]。MMP-1 基因位于染色体 11q22-q23，有 10 个外显子和 9 个含子，1 607 bp 位点为转录因子结合位点，该位点出现单个 G 核苷酸插入或缺失，可导致单核苷酸多态性的出现，影响 MMP-1 基因的表达^[8]。

本研究通过检测 ACI 患者 MMP-1 基因多态性和外周血 MMP-1 水平，并结合超声检查，从斑块形态学上探讨了 MMP-

1 基因多态性、外周血 MMP-1 水平、颈动脉粥样硬化斑块稳定性和 ACI 的关系，结果证实 MMP-1 基因多态性影响外周血 MMP-1 水平，而颈动脉斑块的不稳定能够预示发生 ACI 的可能。

总之，MMP-1 基因多态性及外周血 MMP-1 水平均与 ACI 具有相关性，MMP-1 基因型检测联合颈动脉斑块超声影像学检查，有利于及早发现不稳定斑块，及早采取干预措施，降低 ACI 发病率。

参考文献

- [1] 谢明剑, 薛伟新, 邱楚雄, 等. 脑梗死病人梗死面积与 MMP1, MMP9, TIMP1 的关系探讨[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(2): 173-174.
- [2] 姜红菊, 张梅, 李大庆, 等. 冠心病患者基质金属蛋白酶-1 基因多态性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 13(5): 589-592.
- [3] 侯旭敏, 刘华, 关韶峰, 等. 基质金属蛋白酶-1 与冠状动脉粥样硬化斑块稳定性的相关研究[J]. 中国心血管病研究, 2007, 5(12): 889-891.
- [4] 张志毅, 梅轶芳, 赵彦萍. 益气活血化痰法中药对泡沫细胞基质金属蛋白酶 1/2mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 12(4): 238-241.
- [5] 谢明剑, 邱楚雄, 薛伟新, 等. 脑梗死患者基质金属蛋白酶 1, 9 及其组织抑制因子 1 与血脂关系的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(10): 1168-1169.
- [6] 杨世杰. 基质金属蛋白酶在心血管疾病中的作用[J]. 辽宁医学院学报, 2007, 28(2): 49-50.
- [7] 王浩坤, 赵洛沙, 周帅, 等. 河南省汉族人群基质金属蛋白酶-1 基因-519A/G 多态性及其血浆水平与急性冠状动脉综合征的相关性分析[J]. 临床心血管病杂志, 2010, 26(5): 371-374.
- [8] 方勤, 王启贤. 基质金属蛋白酶-1 与冠心病[J]. 长江大学学报, 2011, 3(2): 319-321.

(收稿日期: 2012-12-21 修回日期: 2013-02-12)

(上接第 1490 页)

性结果。故本研究诱导表达的 GST-UBRPS27a 融合蛋白为采用 GST pull down 试验验证 UBRPS27a 与 CK2 α' 亚基的相互作用准备了条件，也为后续研究 UBRPS27a 结构与功能及其在肿瘤发生发展过程的分子调控机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Kirschner LS, Stratakis CA. Structure of the human ubiquitin fusion gene Uba80(RPS27a) and one of its pseudo-genes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(3): 1106-1110.
- [2] Ganger DR, Hamilton PD, Klos DJ, et al. Differential expression of metalloproteinase/S27 ribosomal protein in hepatic regeneration and neoplasia [J]. Cancer Detect Prev, 2001, 25(3): 231-236.
- [3] Mafune K, Wong JM, Staniunas RJ, et al. Ubiquitin hybrid protein gene expression during human colon cancer progression[J]. Arch Surg, 1991, 126(4): 462-466.
- [4] Wong JM, Mafune K, Yow H, et al. Ubiquitin-ribosomal

protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an early growth response gene[J]. Cancer Res, 1993, 53(8): 1916-1920.

- [5] Revenkova E, Masson J, Koncz C, et al. Involvement of Arabidopsis thaliana ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress[J]. EMBO J, 1999, 18(2): 490-499.
- [6] Fatima G, Mathan G, Kumar V. The HBx protein of hepatitis B virus regulates the expression, intracellular distribution and functions of ribosomal protein S27a[J]. J Gen Virol, 2012, 93(4): 706-715.
- [7] Trembley JH, Chen Z, Unger G, et al. Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy[J]. Biofactors, 2010, 36(3): 187-195.
- [8] 黄功华, 梁景耀, 陈碧, 等. 用酵母双杂交系统筛选泛素/核糖体蛋白 S27a[J]. 癌症, 2005, 24(1): 40-46.

(收稿日期: 2012-12-01 修回日期: 2013-01-26)