

血小板源生长因子受体结合域基因与乙型肝炎核心抗原基因融合克隆的构建

武湘兵 李 进 王彩平^①

(第一军医大学组织学与胚胎学教研室, 广州 510515)

Cloning of the Gene of a Fusion Protein-Platelet Derived Growth Factor Receptor Binding Domain with Hepatitis B Core Antigen

WU Xiang-Bing, LI Jing and WANG Cai-Ping^①
(Department of Embryohistology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515; ^① Shanghai Research Center of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT

Aim Platelet derived growth factor (PDGF) plays important roles in the development of atherosclerosis.

In order to block the effects of PDGF, PDGF receptor binding domain was fused with the hepatitis B core antigen (HBcAg) to form a fusion protein. This fusion protein can be used as a vaccine for the prevention of atherosclerosis in animal models. In this paper we report only the cloning of the fusion protein gene.

Methods The gene of PDGF receptor binding domain, a 13 mer peptide, ANFLVWEIVRKKP, with 2 linkers (for NdeI and EcoRI) was synthesized chemically and cloned into a vector pBS. The HBcAg gene was obtained with polymerase chain reaction (PCR) technique and fused with the 13 mer peptide gene-pBS at the EcoRI and BamHI sites.

Results A DNA fragment of about 600 bp in size was obtained. DNA sequencing analysis showed that the sequence of the 13mer peptide gene and the reading frame of the fused gene were both correct.

Conclusion The gene of the fusion protein of the 13 mer peptide with HBcAg was successfully cloned in the vector pBS.

KEY WORDS Platelet derived growth factor; Core antigen; Gene clone

摘要 血小板源生长因子在动脉粥样硬化发生中起着重要的作用。为了阻断血小板源生长因子致动脉粥样硬化的作用,我们利用基因工程技术试图制备血小板源生长因子受体结合域与乙型肝炎核心抗原的融合蛋白,并以此蛋白作为疫苗,探讨其防治动脉粥样硬化发生发展的可能性。本文报道血小板源生长因子受体结合域基因的化学合成以及与乙型肝炎核心抗原基因的融合克隆的构建,经双酶切、序列分析证实,这两种基因融合成功。

关键词 血小板源生长因子; 核心抗原; 基因克隆

血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是存在于血小板 α 颗粒中的30 kDa双亚基蛋白,由A、B两条肽链组成,是血清中主要的致细胞有丝分裂原。在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成的早期,PDGF不仅能促进内皮细胞、平滑肌细胞和纤维母细胞的增殖,还能促进单核细胞粘附于内皮、单核细胞与平滑肌细胞的吞饮、胆固醇的合成以及低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体的表达。因而在动脉粥样硬化的发生发展中起着极为重要的作用。现已查明PDGF与受体的结合部位主要是B链116~121位上的六个氨基酸(ANFLVW)和157~163位这七个氨基酸(EIVRKKP)^[1]经过折叠,其空间位置正好紧密相邻^[2]。Engstrom等^[1]将两部分的肽

本文为国家自然科学基金资助项目

^①中国科学院上海生命科学研究中心

段合成为一条十三肽,能强烈地抑制 PDGF 与受体的结合,证实此十三肽为小分子抗原,乙型肝炎核心抗原(hepatitis B core antigen, HBcAg)为抗原载体,利用基因工程技术将两抗原基因融合,以期获得能刺激机体产生十三肽抗体的融合蛋白,为防治动脉粥样硬化研究打下基础。本文报道化学合成的 PDGF 十三肽基因及十三肽与 HBcAg 融合基因的克隆构建。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种 pBS、HBadr₍₁₎和 DH_{5α}菌均由中国科学院上海生命科学研究中心刘建华博士提供。

1.1.2 化学试剂和酶类 限制性内切酶、T₄DNA 连接酶和序列分析试剂盒均为 Promega 产品。

1.1.3 单脱氧核苷三磷酸 脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)、脱氧胸腺嘧啶核苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)、脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)和脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)为 Backman 公司产品。

1.1.4 血小板源生长因子 十三肽基因片段和 HBcAg 的多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)上、下游引物均由上海生命科学研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 十三肽基因片段合成后加工 DNA 在自动合成仪上合成完成后,取下载体加浓氢氧化铵,室温 1 h,再加热至 70℃90 min,自然冷却至室温,最后蒸发干燥。

1.2.2 十三肽两基因片段退火与配对 将合成的两基因片段各 5 μL (1 500 pmol),加入一 Eppendorf 管中,水中煮沸 1 min,自然冷却 2 h。

1.2.3 十三肽基因克隆 具体操作步骤按文献[3]。以序列分析方法筛选十三肽-pBS 阳性株。

1.2.4 十三肽-HBcAg 融合基因克隆 PCR 上游引

物 P1 为:

5'-CCG A A T T CATGGACATTGACCCG-3'

EcoRI 识别位点

PCR 下游引物 P2 为:

5'-CCG G A T C CCTAACATTGAGATTC-3'

BamHI 识别位点

取一定量的引物 P1、P2 和模板 HBadr₍₁₎质粒,按 PCR 试剂盒说明书操作(华美生物工程公司产品)。基因克隆按文献[3]操作。双酶切鉴定并筛选十三肽-HBcAg-pBS 阳性株。

1.2.5 序列分析 抽提十三肽-HBcAg-pBS 双链,以 T₃ 为引物,双脱氧链终止法测序,步骤按试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 血小板源生长因子十三肽基因片段合成

利用 DNA 自动合成仪,合成 PDGF 受体结合部位十三肽基因及两粘性末端,具体序列如图 1(Figure 1)。

2.2 血小板源生长因子 13 肽基因克隆

如图 2(Figure 2)所示,13 肽基因插入 pBS NdeI、EcoRI 相应位点,所合成的基因序列与设计完全相符,且阅读框架正确。

2.3 血小板源生长因子十三肽-乙型肝炎核心抗原融合基因克隆的构建

HBadr₍₁₎型病毒的核心抗原是一个 184 个氨基酸的蛋白质,其 DNA 为 552 bp,其 PCR 产物见图 3(Figure 3)。十三肽-pBS 质粒以 EcoRI 和 BamHI 双酶切。将已经 EcoRI 和 BamHI 双酶切过的 PCR 产物与十三肽-pBS 连接,即 HBcAg 基因连接到十三肽基因 3' 末端。双酶切鉴定结果如图 3(Figure 3),可见一条 600 bp 左右的基因片段。序列分析证实十三肽基因与 HBcAg 基因融合成功,且阅读框架正确。

5'-TATG GCT AAC TTC CTG GTT TGG GAA ATC GTT CGT AAA AAA CCG G-3'
3'-AC CGA TTG AAG GAC CAA ACC CTT TAG CAA GCA TTT TTT GGC CTAA-5'

Figure 1. Amino acids sequence of the 13 mer peptide gene.

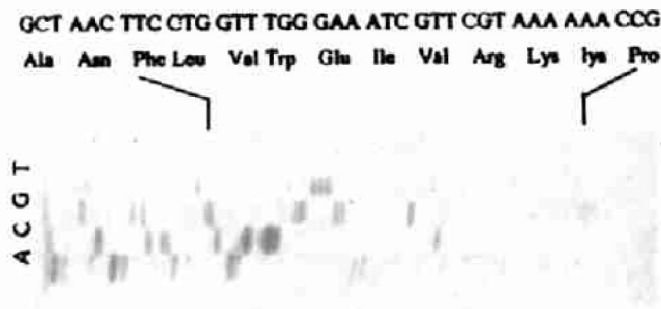


Figure 2. DNA sequence of the 13mer peptide PDGF receptor binding domain gene in pBS vector.



Figure 3. PCR product of HBcAg and restriction endonuclease cleavage analysis of the recombinant plasmids pBS. 1; PCR product of HBcAg, 2; 13mer peptide-HBcAg-pBS digested with Nde I+BamHI, M; λ DNA/Hind III, marker.

3 讨论

血小板源生长因子受体结合部位是十三肽,其分子量小,进入机体不具有免疫原性,但与大分子偶联则能使机体产生抗体。本研究选用了免疫原性很强的 HBcAg,它具有能以 T 细胞依赖和非依赖方式产生的特点,并具有能在大肠杆菌中表达、自行装配成颗粒的优点。目前国内外已有许多成功地以 HBcAg 为载体融合小分子抗原,使机体产生小分子抗原抗体的报道^[4,5]。根据文献[4]报道,我们将十三肽插入 HBcAg 5'末端,以期获得能产生 13 肽抗体的

融合蛋白。

本研究中,为了便于十三肽基因插入与切割,在 5'端和 3'端分别加入 NdeI 和 EcoRI 位点,而且在化学合成时,就合成好此两位点的粘性末端,可直接用于连接。在 HBcAg 的 PCR 引物中,在 EcoRI 和 BamHI 位点前分别加有两个保护碱基,HBcAg 基因 3'端含有终止密码子。实验结果表明,十三肽基因与乙型肝炎核心抗原基因已按设计要求连接,且阅读框架正确,基因融合成功,为进一步表达和纯化打下基础。

参考文献

- 1 Engstrom V, Engstrom A, Ernlund A, et al. Identification of a peptide antagonist for platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, 1992, 267: 16 581~587.
- 2 Oefner C, D'Arcy A, Winkler FK, et al. Crystal structure of human platelet derived growth factor BB. *EMBO*, 1992, 11: 3 921~926.
- 3 萨姆布鲁克,等(金冬雁等译). 分子克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1992.
- 4 Moriarty AM, McGee JS, Winslow BJ, et al. Expression of HIV gag and env B-cell epitopes on the surface of HBV core particles and analysis of the immune responses generated to those epitopes. In: Fred Browned. *Vaccine 90*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1990: 225~229.
- 5 李光地, 汪滨, 陈作义, 等. HCG 抗原决定簇与乙肝病毒核心抗原的融合表达. *生物化学与生物物理学报*, 1996, 28: 177~186.

(1997-01-07 收到, 1997-09-10 修回)