

人溶酶体酸性 β -葡萄糖脑苷脂酶基因的克隆及其在 COS7 细胞中的表达

张艳丽, 许丹, 王子玉, 孟立, 王锋

南京农业大学动物胚胎工程技术中心, 南京 210095

摘要: 从人胎盘组织提取总 RNA, 采用 RT-PCR 扩增人溶酶体酸性 β -葡萄糖脑苷脂酶(Lysosomal acid β -glucosidase, GlcCerase)基因编码区的全部序列, 并克隆到 pMD-19T 载体上, 构建克隆载体 pMD-GlcCerase。经测序验证后, 将 GlcCerase 亚克隆至表达载体 pEGFP-C1 上, 构建了人 GlcCerase 绿色荧光蛋白真核表达载体 pEGFP-GlcCerase。采用脂质体法将其瞬时转染至 COS7 细胞系后, 在细胞中检测到了 GlcCerase 基因, 并在细胞裂解产物中检测到了 GlcCerase 生物活性的表达。GlcCerase 基因的克隆及其表达, 为进一步了解 GlcCerase 基因的功能以及利用转基因动物乳腺生物反应器高效生产 GlcCerase 奠定了基础。

关键词: 人溶酶体酸性 β -葡萄糖脑苷脂酶基因, 克隆, 真核表达载体, COS7 细胞, 转染

Cloning of human lysosomal acid β -glucosidase gene and its expression in COS7 cells

Yanli Zhang, Dan Xu, Ziyu Wang, Li Meng, and Feng Wang

Center of Animal Embryo Engineering and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In this study, we amplified human lysosomal acid β -glucosidase (GlcCerase) gene by RT-PCR from human placenta, and analyzed the sequence of the PCR product cloned in pMD-19T. The gene identity was 99% comparable to that of the reported human GlcCerase cDNA sequence in GenBank. The GlcCerase gene digested with *Xho* I was subcloned into eukaryotic express vector pEGFP-C1 to generate recombinant expression vector pEGFP-GlcCerase. After identified the recombinant plasmid by restriction enzyme digestion, we transfected pEGFP-GlcCerase into COS7 cells by liposome. GlcCerase mRNA was expressed and the activity of GlcCerase was also detected in COS7 cells. This study would lay a foundation for the function of GlcCerase and its production by transgenic bioreactor.

Keywords: GlcCerase gene, cloning, eukaryotic expression vector, COS7 cells, transfection

人溶酶体酸性 β -葡萄糖脑苷脂酶(GlcCerase)是糖蛋白降解途径的主要外糖苷酶, 参与糖蛋白的回

收利用。该酶的减少或缺失会导致葡萄糖脑苷脂不能正常分解成神经酰胺和葡萄糖, 造成葡萄糖脑苷

Received: September 3, 2008; **Accepted:** November 13, 2008

Supported by: the National Major Special Project on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms (No. 2008ZX08008-004), the International Cooperation Project of Jiangsu Province (No. BZ2007065).

Corresponding author: Feng Wang. Tel: +86-25-84395381; Fax: +86-25-84395314; E-mail: caeet@njau.edu.cn
国家转基因生物新品种培育重大专项(No. 2008ZX08008-004), 江苏省国际合作项目(No. BZ2007065)资助。

脂在各器官中大量沉积,从而引起组织细胞大量增殖。临床上称为葡萄糖脑苷脂沉积病,又称戈谢病(Gaucher's disease, GD),是一种常见的溶酶体沉积性疾病^[1-3]。酶替代法是目前戈谢病的主要疗法,基因疗法还处于试验阶段^[4]。然而, GlcCerase 是一种较难获得的酶,人体内细胞仅能合成少量这种蛋白^[5]。目前的来源有从人体胎盘中直接提取,或利用 CHO 细胞系作为表达载体在体外合成重组^[6],但其生产成本和治疗费用过于昂贵,且产量远不能满足临床的需要。如果应用动物乳腺生物反应器生产重组 GlcCerase,在得到大量天然活性较高的产品同时,将极大地降低生产成本,具有其他表达系统所不能代替的优势。

为此,本研究在国内首次从人胎盘组织中克隆了人 GlcCerase cDNA 序列,构建其真核表达载体转染到 COS7 细胞中,并在细胞中成功表达出具有生物活性的重组人 GlcCerase,从而为下一步通过转基因动物乳腺生物反应器生产 GlcCerase 奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织来源、质粒和细胞

健康人的胎盘组织取自江苏省人民医院; pEGFP-C1 真核表达载体为 Invitrogen 公司产品; 克隆载体 pMD19-T 购自大连宝生物公司; DH5 α 菌株感受态细胞购自南京天为时代生物公司; COS7 细胞系由本实验室保存,在 10% FBS 的 DMEM 中培养,条件为 5% CO₂, 37°C。

1.1.2 工具酶及试剂

LA Taq DNA 聚合酶、10 \times PCR Buffer 和 dNTP Mixture 以及限制性内切酶(大连宝生物公司); RT-PCR 反转录试剂盒(Promega 公司); DNA 胶回收试剂盒(Invitex 公司); 质粒抽提试剂盒(Omega 公司); LipofectamineTM2000、Trizol 试剂(Invitrogen 公司); Western 及 IP 细胞裂解液(碧云天); 4-甲基伞形酮- β -D 葡萄糖苷(Sigma); 4-甲基伞形酮(Sigma); PCR 引物由南京生兴生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成

根据人 β -葡萄糖脑苷脂酶的 mRNA 序列(GenBank Accession No. M16328),利用引物设计软

件 Oligo6 设计了一对特异性引物,并在上下游引物中分别引入了 *Xho* I 酶切位点,预期扩增 cDNA 基因片段长度为 1569 bp。上游引物 Ff 序列为: 5'-CCGCTCGAGATGGCTGGCAGCCTCACAGGT-3'; 下游引物 Fr 序列为: 5'-CCGCTCGAGTCACTGGCGATGCCACAGGTAGGTGTGAATGGA-3'; 其中下划线部分为 *Xho* I 酶切位点。

1.2.2 GlcCerase cDNA 的扩增与克隆

利用 Trizol 试剂,通过氯仿抽提、异丙醇沉淀法制备人胎盘组织总 RNA,反转录为人胎盘组织总 cDNA,以 5 μ L 反转录产物为模板,PCR 法扩增 GlcCerase cDNA,PCR 反应体系中依次加入如下组分: 10 \times PCR Buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTP Mixture 8 μ L, 上、下游引物各 20 pmol, LA Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 4 μ L, 无菌三蒸水至 50 μ L; PCR 反应程序为: 94°C 10 min; 94°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 8 min。RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的片段,并将纯化回收的 DNA 片段克隆在 pMD19-T 载体的 T 位点,转化感受态大肠杆菌 JM109,经蓝白斑筛选,随机挑取白色克隆,小量制备质粒 DNA,分别进行 PCR 和 *Xho* I、*Sal* I 酶切鉴定。鉴定正确的重组质粒送上海生工进行测序分析,并命名 pMD-GlcCerase。

1.2.3 pEGFP-GlcCerase 真核表达载体的构建

基因测序后,将含 EGFP 的 pEGFP-C1 用内切酶 *Xho* I 切开,再以 CIAP 去磷酸化,用 DNA 片段纯化试剂盒回收酶切片段;用 *Xho* I 单酶切 pMD-GlcCerase,经 1% 的琼脂糖电泳后用胶回收试剂盒回收 1569 bp 的目的片段。两者用 T4 连接酶于 16°C 连接过夜,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,获得转化克隆后,快速提取质粒后用酶切和 PCR 方法鉴定正确连接的克隆,构成含有 GlcCerase 的重组真核表达载体 pEGFP-GlcCerase。

1.2.4 COS7 细胞转染

将培养的 COS7 细胞按 2 \times 10⁵ 接种 6 孔板,培养 24 h,待细胞生长至 80%~90% 汇合后,按照转染试剂 LipofectamineTM2000(Invitrogen)说明书转染重组质粒 pEGFP-GlcCerase 及空载体 pEGFP-C1。转染后培养 24 h,荧光显微镜下观察 COS7 细胞的绿色荧光表达。

1.2.5 GlcCerase mRNA 检测

分别提取转染 pEGFP-GlcCerase 和 pEGFP-C1

后 48 h 的 COS7 细胞总 RNA, 以人 β -actin 为内参, 进行 GlcCerase 的 RT-PCR 分析, 利用 GlcCerase 特异性扩增引物 Ff/Fr 从转录水平检测 GlcCerase mRNA 的表达。

1.2.6 荧光酶学法分析 GlcCerase 生物学活性

转染后 24~48 h, 收集并裂解细胞, 离心, 取上清液 10 μ L, 加入 20 μ L 荧光标记的底物液 (6 mmol/L 4-甲基伞形酮- β -D 葡萄糖苷, 4-MUG), 在 37°C 水浴中温浴 60 min, 然后加入 0.2 mol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH 10.7) 终止反应, 荧光分光光度计检测荧光强度 (Ex360 nm, Em460 nm), 以 4-甲基伞形酮 (4-MU) 为标准, 计算酶的比活性, 其单位为 μ mol/h/g。

2 结果与分析

2.1 人 β -葡萄糖脑苷脂酶基因 cDNA 的扩增

以人胎盘组织 cDNA 为模板, 用 Ff 和 Fr 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 显示为单一条带, 大小约为 1.6 kb, 与预期大小基本一致 (图 1)。将 PCR 产物克隆到 pMD-19T 载体上, 由于特异性扩增引物 Ff 和 Fr 两端设计了 *Xho* I 酶切位点, 故采用 *Xho* I、*Sal* I 分别作酶切鉴定其插入大小和方向。*Xho* I 酶切后片段大小分别为 2692 bp 和 1569 bp, *Sal* I 酶切后片段大小分别为 3011 bp 和 1250 bp, 均与预期结果相符 (图 2)。

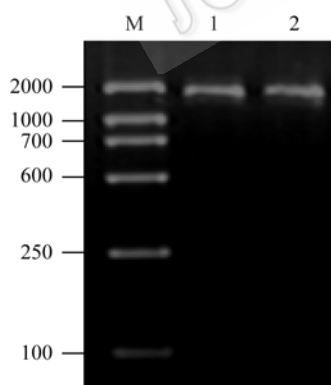


图 1 RT-PCR 扩增 GlcCerase 基因

Fig. 1 GlcCerase gene amplified by RT-PCR. M: DNA marker; 1, 2: GlcCerase gene.

2.2 GlcCerase 序列分析结果

扩增片段测序后, 经 BLAST 进行序列比对, 所克隆的 GlcCerase cDNA 序列与 GenBank 上已发表的 GlcCerase cDNA 序列的序列一致性为 99%, 由

1569 bp 组成, 包括完整的编码框序列, 其中前 19 个氨基酸为潜在信号肽序列。该 cDNA 序列有一个碱基发生了突变, 由 A \rightarrow G, 对应的氨基酸由 Asp \rightarrow Gly。

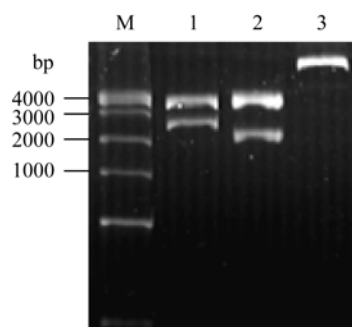


图 2 pMD-GlcCerase 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids using restriction endonuclease digestion. M: DNA marker; 1: pMD-GlcCerase digested with *Xho* I; 2: pMD-GlcCerase digested with *Sal* I; 3: pMD-GlcCerase.

2.3 pEGFP-GlcCerase 重组质粒的构建与鉴定

重组质粒 pEGFP-GlcCerase (图 3) 分别经 *Xho* I、*Sal* I 酶切和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 所插入的基因大小和方向均正确无误。*Xho* I 酶切后可得到 4.7 kb 和 1.569 kb 的条带, *Sal* I 酶切后可得到 5949 bp 和 320 bp 的条带 (图 4)。说明本研究构建的 pEGFP-GlcCerase 重组质粒是成功的。

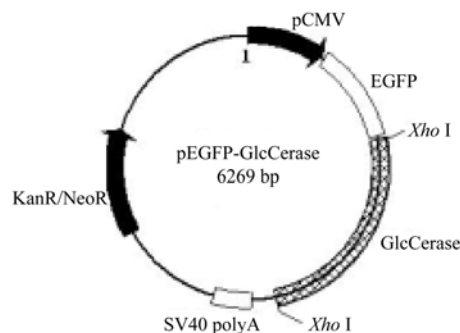


图 3 pEGFP-GlcCerase 载体结构图

Fig. 3 Schematic structure of expression vector pEGFP-GlcCerase.

2.4 荧光显微镜观察 COS7 细胞中 EGFP 基因的表达

转染后 24 h, 在荧光显微镜下可观察到转染 pEGFP-GlcCerase 的 COS7 细胞表达绿色荧光蛋白, 该蛋白在细胞核和细胞质内均有表达, 呈高丰度的绿色荧光, 这也进一步验证了所构建的表达载体的

正确性(图 5)。

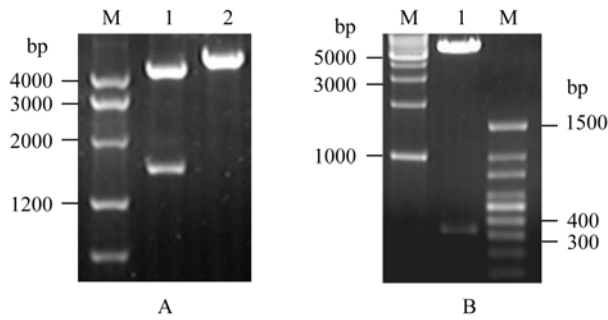


图 4 pEGFP-GlcCerase 重组质粒的鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant pEGFP-GlcCerase plasmid by endonuclease. (A) M: DNA marker; 1: pEGFP-GlcCerase digested with *Xho* I; 2: pEGFP-GlcCerase plasmid; (B) M: DNA marker; 1: pEGFP-GlcCerase digested with *Sal* I.

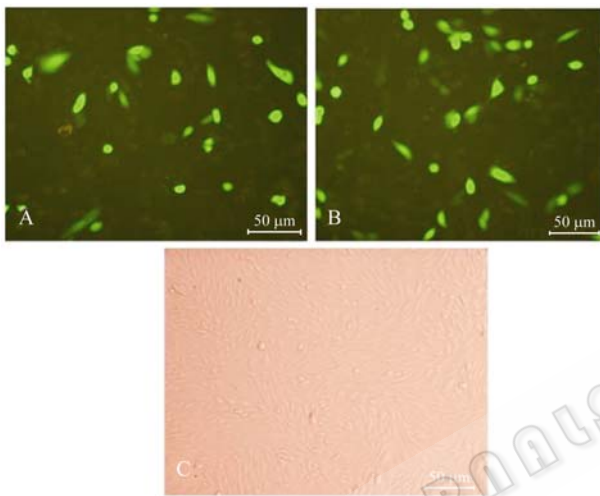


图 5 GlcCerase 在 COS7 细胞中表达的荧光检测(100×)

Fig. 5 Detection of expression of GlcCerase in the COS7 cells under fluorescent microscope(100×). (A) COS7 cells transfected with pEGFP-GlcCerase; (B) COS7 cells transfected with pEGFP-C1; (C) COS7 cells.

2.5 转染 COS7 细胞中 GlcCerase 基因的表达

转染 48 h 后, 采用 RT-PCR 方法对外源 GlcCerase 基因表达情况的检测结果显示, 转染 pEGFP-GlcCerase 后的 COS7 细胞中, 能扩增出 1569 bp 的特异性片段, 而转染空载体 pEGFP-C1 的对照组未扩增出目的片段, 说明转染 pEGFP-GlcCerase 之后外源 GlcCerase 可以获得良好的转录(图 6)。

2.6 COS7 细胞中 GlcCerase 的活性

分别于转染后 24、48 h 收集并裂解细胞, 采用荧光酶学法检测细胞中 GlcCerase 活性的表达, 同时用 4-甲基伞形酮作标准曲线, 公式为: $y=341.7x+345.9$, $r=0.99883$, 以计算转染后 GlcCerase 的表达浓度(图 7)。pEGFP-GlcCerase 转染后 48 h 的 COS7 细

胞中 GlcCerase 的生物活性相比转染 pEGFP-C1 的对照组差异极显著($P<0.01$), 与 pEGFP-GlcCerase 转染后 24 h 组差异不显著($P>0.05$)。

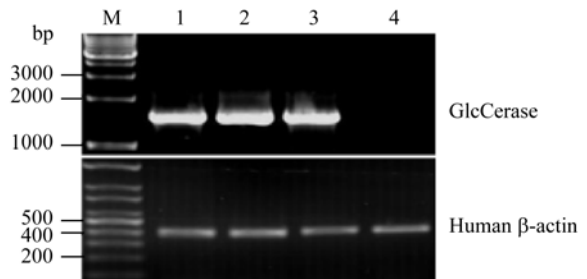


图 6 COS7 细胞中 GlcCerase 基因 mRNA 的检测

Fig. 6 RT-PCR analysis of GlcCerase mRNA in transfected COS7 cells. M: DNA marker; 1-3: COS7 cells transfected with pEGFP-GlcCerase; 4: COS7 cells transfected with pEGFP-C1 (control).

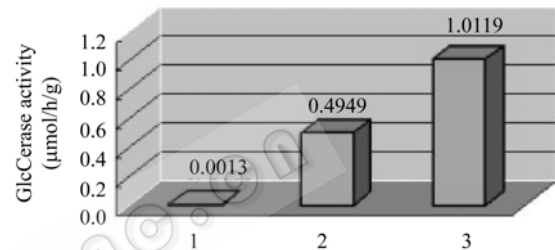


图 7 COS7 细胞中 GlcCerase 活性的检测

Fig. 7 Expression of GlcCerase activity in COS7 cells. 1: pEGFP-C1; 2: pEGFP-GlcCerase/24 h; 3: pEGFP-GlcCerase/48 h.

3 讨论

人溶酶体酸性β-葡萄糖脑苷脂酶是由 497 个氨基酸组成的糖蛋白, 从人胎盘中可以纯化得到其天然活性形式^[5]。GlcCerase 在人类糖(神经)鞘脂代谢中有着重要作用, 正常情况下, GlcCerase 催化溶酶体内葡萄糖脑苷脂成为神经酰胺和葡萄糖^[8]。GlcCerase 的编码基因位于 1q21, 长约 7 kb, 含有 11 个外显子, 已知该基因突变种类繁多, 现已发现该基因有 200 多种突变存在, 包括点突变、插入和缺乏等^[8,9]。由于编码 GlcCerase 的基因发生突变, 导致该酶缺乏, 使底物葡萄糖脑苷脂堆积在肝、脾、骨骼和中枢神经系统的单核-巨噬细胞内, 而造成肝脾肿大、骨骼受累和神经系统症状^[10]。葡萄糖脑苷脂酶基因突变还可以增加对早发性帕金森病的易感性, 具体作用机制还有待进一步研究^[11]。

目前, 已经在哺乳动物细胞^[12]、植物^[5,13]等表达系统中表达了重组的 GlcCerase 用于戈谢病酶替代

法的治疗, 美国 Genzyme 转基因公司应用真核细胞表达系统 CHO 细胞生产重组 GlcCerase(伊米昔酶, imiglucerase)^[14], 该药物的销售额每年达到了 10 亿美元。动物乳腺被认为是生产基因工程药物的最佳场所之一, 但目前国内外尚未见乳腺生物反应器生产 GlcCerase 的报道。

为制备转 GlcCerase 基因的动物乳腺生物反应器, 进一步了解 GlcCerase 基因以及高效生产 GlcCerase。本研究优化了 PCR 反应体系, Mg^{2+} 浓度提高至 2.0 mmol/L, 退火温度提高至 63°C, 并对引物进行了层层筛选, 选用 T_m 值相接近, GC 含量较高, 引物间二聚体较少的 1 对引物, 从健康人胎盘组织中高效率地扩增出了人 GlcCerase cDNA 序列, 片段全长 1569 bp, 包含完整的编码框序列。

将所扩增得到的目的序列克隆到 pMD-19T 的 T 位点, 对测序结果进行序列比对分析表明, 所获得的 GlcCerase cDNA 与 GenBank 中收录的 GlcCerase cDNA 序列的序列一致性为 99%, 仅发现 1 个碱基差异, 导致天冬氨酸到甘氨酸的改变。因此, 为了检测该处编码氨基酸的改变是否会对蛋白质功能产生影响, 本研究将所克隆的 GlcCerase cDNA 在哺乳动物细胞中进行了进一步的表达分析。

COS7 细胞源于复制起点缺陷的 SV40 基因转化非洲绿猴肾细胞, 是进行外源基因表达时应用最广的宿主细胞之一。本研究将 GlcCerase cDNA 序列克隆到 pEGFP-C1 真核表达载体中, 通过观察绿色荧光蛋白可对目标基因的表达进行实时观测, 从侧面反映出 GlcCerase 蛋白的表达。将 pEGFP-GlcCerase 转染到 COS7 细胞中, 可以看到载体上带有的绿色荧光蛋白顺利表达, 随后从基因转录及 GlcCerase 的生物活性对 GlcCerase 基因的表达进行了检测, RT-PCR 证实了转染细胞中 GlcCerase 基因的转录, 荧光酶学法表明转染后 24 h GlcCerase 活性就有表达, 48 h 后表达更高, 显著高于转染 pEGFP-C1 的对照组。结果证实所克隆的 GlcCerase cDNA 能够在真核细胞中成功转录翻译合成 GlcCerase, 表达生物活性。这对于进一步研究戈谢病中 GlcCerase 的生物学行为及酶替代法和基因治疗具有重要的现实意义。下一步研究的重点是将该基因用来制作转基因动物, 利用动物乳腺作为生物反应器, 以高效生产人溶酶体酸性 β -葡萄糖脑苷脂酶。

REFERENCES

- [1] Grabowski GA. Gaucher disease. Enzymology, genetics, and treatment. *Adv Hum Genet*, 1993, **21**: 377-441.
- [2] Sawkar AR, D'Haese W, Kelly JW. Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders—a focus on Gaucher disease. *Cell Mol Life Sci*, 2006, **63**(10): 1179-1192.
- [3] Steet RA, Chung S, Wustman B, *et al*. The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid beta-glucosidase in Gaucher fibroblasts fibroblasts by several mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(37): 13813-13818.
- [4] Harmanci O, Bayraktar Y. Gaucher disease: new developments in treatment and etiology. *World J Gastroenterol*, 2008, **14**(25): 3968-3973.
- [5] Reggi S, Marchetti S, Patti T, *et al*. Recombinant human acid beta-glucosidase stored in tobacco seed is stable, active and taken up by human fibroblasts. *Plant Mol Biol*, 2005, **57**(1): 101-113.
- [6] Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, *et al*. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: Comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med*, 1995, **122**(1): 33-39.
- [7] Wang J, Ling YC. Advance in the gene therapy of Gauchers disease. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2002, **7**(2): 181-183.
王洁, 殷彩玲, 戈谢氏病基因治疗的新进展. 中国临床药理学与治疗学, 2002, **7**(2): 181-183.
- [8] Guggenbuhl P, Grosbois B, Chales G, *et al*. Gaucher disease. *Joint Bone Spine*, 2008, **75**(2): 116-124.
- [9] Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a 'simple' disorder. *Mol Genet Metab*, 2004, **83**(1-2): 6-15.
- [10] Grace ME, Newman KM, Scheinker V, *et al*. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem*, 1994, **269**(3): 2283-2291.
- [11] Rogaeva E, Hardy J. Gaucher and Parkinson diseases: unexpectedly related. *Neurology*, 2008, **70**(24): 2272-2273.
- [12] Leonova T, Grabowski GA. Fate and sorting of acid β -Glucosidase in transgenic mammalian cells. *Mol Genet Metab*, 2000, **70**(4): 281-294.
- [13] Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J*, 2007, **5**(5): 579-590.
- [14] Hoppe H. Cerezyme--recombinant protein treatment for Gaucher's disease. *J Biotechnol*, 2000, **76**(2/3): 259-261.