

文章编号: 1001-6325(2003)04-0392-07

小鼠蛋白激酶 CK2 亚基的克隆、表达及活性测定

陈小文^{1#}, 郑克勤^{2#}, 梁景耀¹, 刘新光^{1*}, 梁念慈¹

(广东医学院 1. 生物化学和分子生物学研究所; 2. 医学遗传研究室, 湛江 524023)

摘要:通过反转录 PCR 从 NIH 3T3 小鼠成纤维细胞中获得小鼠蛋白激酶 CK2 亚基编码区 cDNA; 构建其表达质粒并经测序证明其编码小鼠蛋白激酶 CK2 亚基, 但与两种已报道的小鼠 CK2 亚基 cDNA 编码区序列分别存在一个碱基差异, 与大鼠、猪、兔和人 CK2 亚基 cDNA 的编码区相应碱基序列则一致。将其在表达菌 BL21 (DE3) 中诱导表达, 出现一 26kDa 分子量蛋白过度表达, 表达蛋白占菌体总蛋白的 31.7%, 但大多数以不溶形式存在。Western blot 鉴定表明: 过度表达产物能与抗人 CK2 亚基抗体发生特异性免疫反应。当 CK2 和 亚基以 1:1 摩尔比混合时, 构成性的 CK2 全酶显示出最大活性, 直接表明 CK2 亚基对 CK2 有激活作用。这些结果有力地证明了克隆表达的重组蛋白是小鼠蛋白激酶 CK2 亚基。

关键词: 调节亚基/蛋白激酶 CK2/小鼠; 分子克隆; DNA 测序; 表达; 免疫印迹

中图分类号: Q555⁺.7; Q78 **文献标识码:** A

蛋白激酶 CK2 是真核细胞中普遍存在的信使非依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 由两个催化亚基 (和/或) 和两个调节亚基 () 构成 (2_2 、 2_2 和 2_2), 在细胞的诸多方面起重要作用^[1,2]。脊椎动物 CK2 亚基均由 215 个氨基酸残基组成, 分子量约为 26ku。CK2 亚基与绝大多数已知蛋白没有同源性, 但其本身在种属间有高度保守性, 目前已克隆的所有哺乳类动物 CK2 亚基氨基酸序列则完全一致^[1]。CK2 亚基主要作用是提高催化亚基的活性、稳定 或 亚基不易受热变性或酶降解的破坏、决定底物的专一性^[1]。克隆表达蛋白激酶 CK2 的各亚基是深入研究的基础, 而小鼠是医学研究最常用的实验动物之一, 为此本文对小鼠 CK2 亚基 cDNA 进行了克隆、测序、表达及初步鉴定, 现将结果报道如下。

1 材料与方

1.1 材料

NIH 3T3 小鼠成纤维细胞购自上海细胞生物所, 大肠杆菌 DH5 和 BL21 (DE3) 由武汉生物制品研究所引进, 原核表达载体 pT7-7 由美国哈佛医学院的 Tabor 教授惠赠。RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品, 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所。反转录试剂盒, dNTP, 内切酶 Hind 为 Promega 公司产品, 内切酶 Nde 为 MBI 公司产品。Pyrobest DNA 聚合酶为宝生物(大连)有限公司产品。寡核苷酸引物由上海 Sangon 公司合成。RNase A、异硫氰酸胍、N-十二烷基肌氨酸钠、焦炭酸乙二酸 (DEPC)、普通琼脂糖、硝酸纤维膜 (NC 膜) 和 ATP 均购自 Sigma 公司。T4 DNA 连接酶, 牛小肠碱性磷酸酶 (CIP) 为 Roche 公司产品。Big Dye 终止底物循环测序试剂盒、模板抑制试剂 (TSR) 和最佳性能聚合物 6 (POP6) 为 PE 公司 ABI 产品。小量柱离心式回收试剂盒, 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG), 亮抑酶肽, 胃抑酶肽 A, 低分子量标准蛋白购自上海华舜生物工程有限

收稿日期: 2002-08-29 修回日期: 2002-10-15

基金项目: 广东省自然科学基金 (011766); 广东省科技计划项目 (2002C30109); 湛江市科委科技计划项目 (ZK0006); 广东医学院标志性成果扶持项目 (XK0002)

陈小文、郑克勤为并列第一作者; 陈小文现工作单位: 深圳市儿童医院儿科研究所

* 通讯联系人: E. mail: xgliu@gdmc.edu.cn

公司。丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺和 TEMED 为 Bio-Rad 产品,小鼠抗人 CK2 亚基的 McAb 由丹麦 Issinger 教授惠赠。ECL 试剂及相关二抗购自北京中山公司,胰蛋白胨和酵母提取物为英国 Oxoid 公司产品,[$^{-32}$ P]ATP 为北京亚辉生物医学工程公司生产,其余为国产分析纯产品。

1.2 细胞培养

NIH 3T3 小鼠成纤维细胞按贴壁细胞的常规培养方法进行,取对数生长期的细胞提取总 RNA。

1.3 引物的设计

根据已知的小鼠蛋白激酶 CK2 亚基 cDNA 编码区序列(648bp)^[2,3]自行设计。上游引物(P1):5 CCTCTAGACATATGATGATGCTCTGAGGAGGT 3',含小鼠 CK2 cDNA 编码区起始的 20 个核苷酸,其 5'端含 Nde 酶切位点;下游引物(P2):5 AAGGATCCAAAGCTTCAGCGAATAGICTTGAC 3',与小鼠 CK2 cDNA 编码区末端 18 个核苷酸互补,其 5'端含 Hind 酶切位点。

1.4 总 RNA 的提取

按 Chomczynski 等^[4]的异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法进行。

1.5 RT-PCR

取 5 μ g 总 RNA、下游引物 P2、RNase 抑制剂、dNTP 和 1 μ L 禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶(AMV-RT)(10U/ μ L),反应体系总体积为 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 60min 合成小鼠 CK2 亚基 cDNA 第一链。取 3 μ L 合成的 cDNA 为模板,加入适量的上、下游引物,dNTP 和 0.5 μ L Pyrobest 酶(高保真耐热 DNA 聚合酶,10U/ μ L),总体积为 100 μ L,反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 4min,接着 94 $^{\circ}$ C,30s;55 $^{\circ}$ C,30s;72 $^{\circ}$ C,1min,进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.6 PCR 产物和 pT7-7 载体的双酶切和定向重组^[5]

用柱离心式回收试剂盒回收纯化凝胶中的 PCR 产物。取纯化 PCR 产物和 pT7-7 载体各 5 μ g 进行 Nde 与 Hind 双酶切,回收所需片段,载体去磷酸化,连接。

1.7 重组子转化、重组质粒的筛选、酶切鉴定和纯化按文献报道方法^[5,6]进行。

1.8 DNA 测序

随机挑选 2 个阳性克隆的纯化产物,分别以 P1 和 P2 两个引物,加 PE ABI 的 Big Dye 荧光标记的终

止底物循环测序试剂混合物 1 μ L,200ng 质粒 DNA,3.2 μ mol 引物,总反应体积 5 μ L,在 PE 9600 型 PCR 仪进行单引物 PCR 循环,循环参数:96 $^{\circ}$ C,30s;50 $^{\circ}$ C,30s;60 $^{\circ}$ C,4min,循环数 25。经乙酸钠/乙醇法纯化 PCR 产物,加模板抑制试剂(TSR)95 $^{\circ}$ C,4min 变性后,将样品放入 PE PRISMTM 310 型 DNA 测序仪中进行自动测序(使用 POP 6 毛细管胶),通过正向测序,相互印证即可确定重组质粒中小鼠 CK2 亚基 cDNA 编码区的全序列。

1.9 细胞转化与原核表达

将 DNA 测序验证的 pTMCKB 转化 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落加 5mL 含 Amp 的 LB 培养基振荡培养过夜,加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 进行诱导表达。继续培养 4h 后收获细菌,4 000G,4 离心 10min,沉淀用含 0.2 mmol/L 的 PMSF 的生理盐水洗涤两次,加 400 μ L 缓冲液 A(20mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 1mmol/L EDTA, 0.5mmol/L EGTA, 7mmol/L β -巯基乙醇, 0.05mol/L NaCl, 0.2mmol/L 的 PMSF, 1mg/L 亮抑酶肽, 1 mg/L 胃抑酶肽 A)于冰浴中超声破碎(强度为 4,每次超声时间为 10s,50%的脉冲,共 4 次)。加 DNase I 于 4 $^{\circ}$ C 水解 DNA 60min。以 30 000G,4 离心 10min,弃上清(S-D),沉淀(P-D)再用含 100mmol/L NaCl 的缓冲液 A 适量,于 4 $^{\circ}$ C 搅拌抽提过夜,以 30 000G,4 离心 10min,弃沉淀(P-),获得的上清(S-)将作为层析分离纯化的样品。

1.10 SDS-PAGE 与蛋白质密度扫描

按 Laemmli 方法,制备 0.75mm 厚的 12% 的分离胶进行,考马斯亮蓝 R-250 染色,拍摄照片。表达的小鼠 CK2 蛋白占菌体总蛋白的比例则用密度扫描仪扫描电泳凝胶后得出。

1.11 Western blot

SDS-PAGE 后的凝胶上的蛋白电转移至 NC 膜上。按抗人 CK2 的小鼠 McAb 说明书和 ECL 试剂盒说明书进行操作,即 NC 膜用含 BSA 的溶液封闭,然后依次与小鼠抗人 CK2 亚基的 McAb(一抗)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(二抗)和 ECL 试剂作用,曝光于 X 光片,定影,显影,拍照。

1.12 蛋白激酶 CK2 的活性测定

按我们以前报道的方法^[7]进行。每 min 催化 1pmol [$^{-32}$ P]ATP 上的 32 P 转移到酪蛋白上所需的酶量为 1 个酶单位。

2 结果

2.1 编码小鼠蛋白激酶 CK2 亚基 cDNA 的 PCR 扩增

从小鼠 NIH3T3 细胞中提取的总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。图 1 显示已成功地扩增出一条 DNA 带, 分子大小介于 564bp 与 831bp 之间, 与理论推测值 672bp 相符。

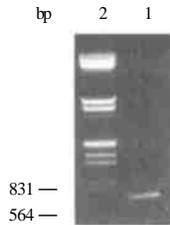


图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 RT-PCR amplification products from agarose gel
Lane 1. product of RT-PCR; Lane 2. DNA/ EcoR + Hind marker

2.2 重组小鼠 CK2 亚基 cDNA 的克隆

取 Nde I/Hind III 双酶切的 PCR 产物与相同双酶切的表达载体 pT7-7 在 T4 DNA 连接酶催化下进行定向 DNA 重组(图 2)。根据改良的酚/氯仿一步法快速抽提 12 个转化子质粒^[8], 通过电泳初步筛选, 12 个转化子全部含插入片段, 阳性筛选率为 100%。

2.3 重组质粒的限制性酶切鉴定

单酶切小鼠 CK2 亚基的重组质粒理论值为

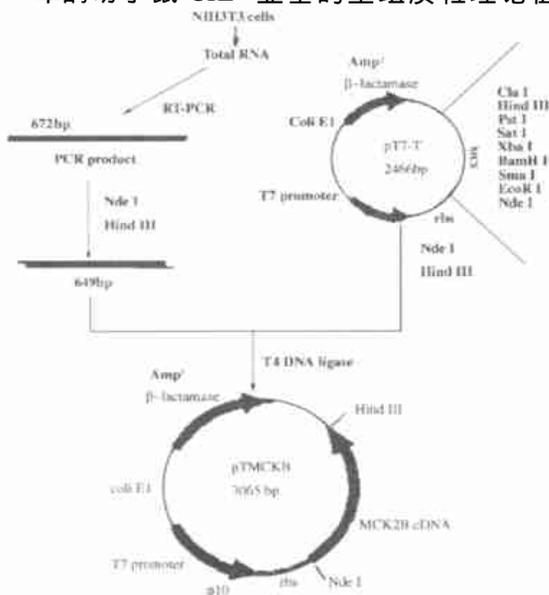


图 2 重组质粒 pTMCKB 的构建图

Fig 2 Construction of recombinant plasmid pTMCKB

3065bp, Nde I/Hind III 双酶切重组质粒理论上可分别得到 2416bp 和 649bp 两个片段。将含有插入片段的重组质粒分别用 Hind III 和 Nde I/Hind III 进行单和双酶切, 结果(图 3)与理论推测值一致, 说明重组获得成功。

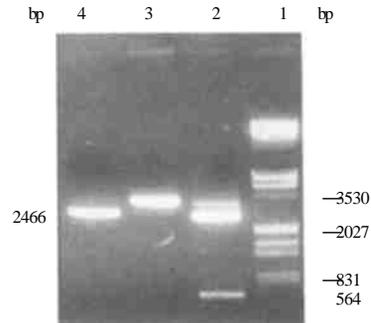


图 3 重组质粒的酶切鉴定图

Fig 3 Restriction analysis of recombinant plasmid
Lane 1. DNA/EcoR + Hind marker; Lane 2. recombinant plasmid/Nde I + Hind III; Lane 3. recombinant plasmid / Hind III; Lane 4. pT7-7/ Hind III

2.4 重组质粒中小鼠 CK2 亚基 cDNA 编码区的序列测定与分析

正反向 DNA 测序结果(图 4) 表明: 随机挑选的两个阳性克隆都含有一致的小鼠 CK2 cDNA 编码区序列, 未发现 PCR 过程中出现的突变。与两家报道^[2,3]的小鼠 CK2 cDNA 编码区序列(两者存在 2 个碱基差异)比较, 我们克隆并测序的小鼠 CK2 cDNA 编码区序列其第 131 个密码子为 GCC, 第 159 个密码子为 TTC, 分别与其中一实验室报道相同(表 1)。目前已报道的所有哺乳动物 CK2 亚基 cDNA 编码区的密码子 131 与 159 的序列结果(表 1)。根据此表和 CK2 亚基的生物进化上的高度保守性, 笔者认为我们克隆的小鼠 CK2 亚基 cDNA 序列更为准确, 并将构建成功的重组质粒命名为 pTMCKB。

2.5 小鼠蛋白激酶 CK2 亚基在大肠杆菌中的表达

小鼠蛋白激酶 CK2 的重组质粒 pTMCKB 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后经 IPTG 诱导后可大量表达出一 26ku 的蛋白分子(图 5, 泳道 2), 扫描结果(图 6)表明表达的 CK2 蛋白则细菌总蛋白的 31.7%, 说明重组质粒在大肠杆菌中得到了特异高效表达。图 5 还显示了细菌的超声匀浆离心的沉淀(P-I)与上清(S-I)以及抽提 P-I 再离心得到的上清(S-II)中 CK2 的含量情况, 说明表达的重组蛋白主要以不溶形成存在。

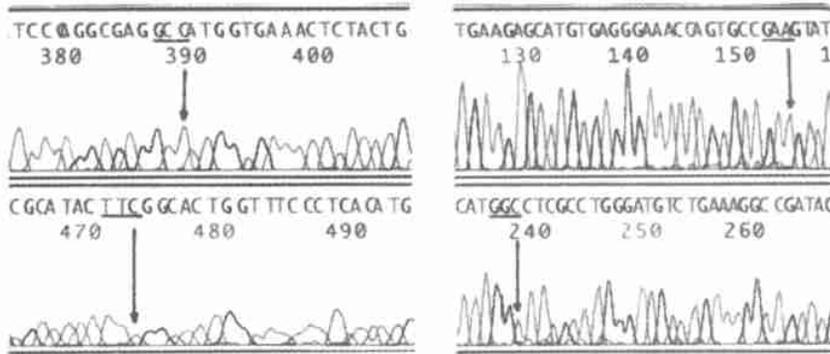


图 4 重组质粒的测序图谱(部分)

Fig 4 Sequencing chart of recombinant plasmid(partial)

A. partial result of positive sequencing of clone 1 ;B.partial result of reverse sequencing of clone 2

表 1 目前已报道的哺乳动物 CK2 cDNA 编码区密码子 131 与 159 序列的比较

Table 1 The comparison of Code 131 and Code 159 of the cDNA encoding CK2 beta subunit of mammals reported to date

species	accession number of GenBank	sequence of Code 131	sequence of Code 159	resource of literatruue
Mouse	X52959	CCT	TTC	[2]
Mouse	X56502	GCC	TTT	[3]
Mouse	- -	GCC	TTC	This paper
Rat	L15619	GCC	TTC	[8]
Rabbit	S56242	GCC	TTC	[9]
Porcine	X56503	GCC	TTC	[3]
Human	X16312	GCC	TTC	[10]
Human	- -	GCC	TTC	[5]

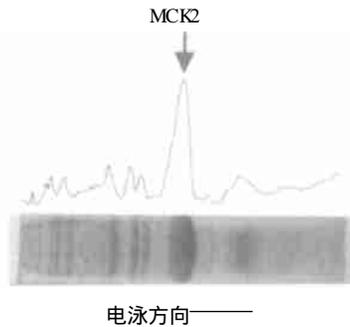


图 6 pTMCKB 转化的 IPTG 诱导的细胞粗提物 SDS-PAGE(图 5 中的泳道 2)的扫描图

Fig 6 The scanning graph of SDS PAGE (Lane 2 in Fig 5) of crude extract of IPTG induced bacteria transformed by pTMCKB

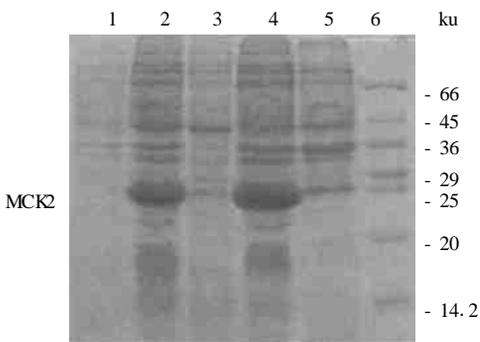


图 5 重组小鼠 CK2 亚基在转化菌中的表达

Fig 5 Expression of recombinant mouse CK2 subunit in the transformed bacteria

Lane 1. crude extract of bacteria transformed by pTMCKB that wasn't induced by IPTG; Lane 2. crude extract of IPTG induced bacteria transformed by pTMCKB; Lane 3. S-I fraction of B; Lane 4. P-I fraction of A; Lane 5. S fraction of A; Lane 6. protein molecular weight standard

2.6 Western blot 结果

表达产物的 Western blot 结果显示: 该表达产物可与小鼠抗人 CK2 的 McAb 特异性反应, 在 NC 膜上呈现一条分子量为 26ku 的显色带(图 7), 从而说明表达的产物确实具有蛋白激酶 CK2 的免疫性质。

2.7 CK2 亚基在构成 CK2 全酶中的作用

固定纯化的重组小鼠 CK2 亚基(另文发表)的含量(14pmol), 比较在加不同摩尔纯化的重组人 CK2 亚基混合情况下蛋白激酶 CK2 的活性。结果(表 2)显示加入纯化的重组 CK2 亚基后 CK2 的活性明显增加, 在与亚基等摩尔混合后其 CK2 活性是单独 CK 亚基活性的 5.4 倍, 但再增加 CK2 的量并不能导致 CK2 全酶活性的进一步增加。本结果为 CK2 亚基激活 CK2 亚基活性提供了直接

证据,而且和亚基等摩尔混合可构成有最大活性的全酶。

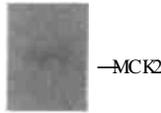


图7 重组小鼠CK2亚基的Western blot结果

Fig 7 Western blot of recombinant mouse CK2 subunit

Anti-human protein kinase CK2 monoclonal antibody was used as primary antibody in this experiment; The blotting was detected by using Luminol Reagent for enhanced chemiluminescence (ECL)

表2 CK2亚基对CK2亚基的激活作用

Table 2 Activation of the CK2 subunit by CK2 subunit

Ratio / (mol/mol)	CK2 activity (mU, $\bar{x} \pm s$)	of CK2 activity (%)
1 0	1738.4 \pm 79.5	100
1 0.2	2307.3 \pm 32.7	133 *
1 0.4	2774.5 \pm 120.1	160 *
1 0.6	5468.0 \pm 98.3	315 *
1 1.0	9440.7 \pm 100.7	543 *
1 1.4	9508.3 \pm 108.3	547 *
1 2.0	9546.2 \pm 118.8	549 *

* $P < 0.01$ vs 1 0 group

3 讨论

目前文献报道的小鼠蛋白激酶CK2亚基编码的cDNA序列有两种:一为Kopatz等报道的序列^[2],其GenBank登记号为X52959;另一为Boldyreff等报道的序列^[3],其GenBank登记号为X56502。两种序列仅在第131和159号密码子存在差异(表1)。本文测序的两个克隆中插入片段的序列相同,与上述两实验室结果比较,在第131个密码子处为GCC与Boldyreff等报道的序列相同,而与Kopatz等报道的则相差一个碱基。在第159个密码子处为TTC与Kopatz等报道的序列相同,而与Boldyreff等报道的则相差一个碱基。

以前报道的两种小鼠CK2亚基cDNA序列和本实验室此次克隆出的cDNA究竟哪一个更准确?由于CK2亚基在进化过程中有高度保守性,根据cDNA编码区推导的氨基酸序列在目前已报道的所有哺乳类动物中都是一致的(其cDNA序列则存在一定的差异)。因此我们对目前已报道的大鼠^[9]、

兔^[10]、猪^[3]、人^[6,11]等哺乳类动物的CK2亚基cDNA全编码区序列进行分析比较,发现上述生物在第131个密码子处均为GCC,第159个密码子处均为TTC,与我们此次克隆出的小鼠CK2亚基cDNA序列一致。由此推论,我们克隆的小鼠CK2亚基cDNA序列更为准确。而已报道的两种小鼠CK2亚基cDNA序列可能均存在一个碱基突变,这种碱基突变是在克隆过程中造成的,而不是小鼠机体内所固有的。

本实验中,我们对分子克隆常规方法的某些环节进行了改进。一是在本次实验中采用两种提高阳性克隆筛选率的措施:保证载体与目的基因双酶切的完全彻底性:对于PCR产物和pT7-7载体的双酶切反应,我们先进行第一个酶切反应,经过酚/氯仿抽提纯化再重新建立第二个酶切反应体系;在连接反应前用CIP将pT7-7载体的5'端去磷酸化,从而达到抑制载体的自身连接和环化,以保证连接反应的顺利进行。结果本实验中转化子的阳性筛选率高达100%,较之我们以前克隆人CK2亚基的阳性筛选率72%要高得多^[6]。

二是采用高保真的耐热DNA聚合酶——Pyrobest酶,以减少PCR过程的突变。由于Taq DNA聚合酶没有3'→5'外切酶活性,一旦PCR过程出现错配就不能进行校读,以致于必须通过DNA测序从阳性克隆中筛选出与已报道的序列一致的克隆,增加了测序成本。本次实验中由于在反转录后使用了Pyrobest酶。它具有3'→5'外切酶活性,能对PCR过程出现的错配进行及时校正,从而使错配率减少。因此两个阳性克隆中插入的序列未出现突变,从而降低了测序成本。

将克隆成功的pTMCKB转化大肠杆菌表达菌BL21(DE3)后,破碎细胞,SDS-PAGE电泳表明有一蛋白获得高表达,其含量高达细菌总蛋白的31.7%,但主要以不溶形成存在。因目前已克隆的所有哺乳类动物CK2亚基氨基酸序列则完全一致^[1],且抗小鼠CK2亚基的抗体目前无商品出售,故本实验用小鼠抗人CK2亚基抗体进行Western blot实验,结果得到一特异条带,说明表达的产物确实具有蛋白激酶CK2的免疫性质。

CK2亚基是CK2全酶的调节亚基,它可激活CK2的催化活性^[1,2]。本实验中纯化的CK2亚基与不同摩尔CK2混合实验证明了CK2亚基对

CK2 亚基有激活作用,等摩尔在体外简单混合就可构成有最大活性的全酶,直接证明了纯化出来的 CK2 是有功能的蛋白,表明小鼠 CK2 亚基的克隆表达获得了成功。

本实验中克隆成功的 pTMCKB 有许多用途:一是转化大肠杆菌表达菌 BL21(DE3)用于表达纯化,得到的小鼠 CK2 蛋白可作为分子靶点,进行筛选其特异性抑制剂的研究;二是以 CK2 基因作为探

针确定肿瘤组织或细胞中的表达水平;三是作为 PCR 模板扩增出全长 CK2 cDNA,后者作为诱饵蛋白基因亚克隆至双杂交系统中的 DNA 结合结构域载体,为寻找与 CK2 亚基相互作用的蛋白做进一步研究。这些研究对于寻找 CK2 的底物、阐明酶的结构与功能关系、酶的作用机制和 CK2 的应用和开发研究具有重要意义,目前上述研究工作正在进行中。

参考文献:

- [1] Pinna LA. Protein kinase CK2: a challenge to canons[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 20):3873 - 3878.
- [2] Kopatz I, Naiman T, Eli D, *et al.* The nucleotide sequence of the mouse cDNA encoding the beta subunit of casein kinase II [J]. Nucleic Acid Res, 1990, 18(2): 3639.
- [3] Boldyreff B, Piontek K, Schmidt - Spaniol I, *et al.* The beta subunit of casein kinase II: cloning of cDNAs from murine and porcine origin and expression of the porcine sequence as a fusion protein [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1088(3):439 - 441.
- [4] Chomczynski P, Sacchi N. Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162(1):156 - 159.
- [5] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third eds[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1.1 - 1.132.
- [6] 刘新光,梁念慈,马润泉,等. 重组人蛋白激酶 CK2 亚基 cDNA 的克隆与测序 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(2):228 - 231.
- [7] 刘新光, 梁念慈, 马润泉. 重组人 CK2 亚基的原核表达、纯化与鉴定 [J]. 生物化学与生物物理学进展, 2000, 27(2):201 - 205.
- [8] 刘新光, 刘文, 梁念慈. 一种快速可靠的小量制备质粒 DNA 的方法 [J]. 基础医学与临床, 1998, 18(5):396.
- [9] Ahmed K, Davis A, Hanten J, *et al.* Cloning of cDNAs encoding the alpha and beta subunits of rat casein kinase 2 (CK2): investigation of molecular regulation of CK2 by androgens in rat ventral prostate [J]. Cell Mol Biol Res, 1993, 39(5): 451 - 462.
- [10] Gupta SK, Singh JP. PCR cloning and sequence of two cDNAs encoding the alpha and beta subunits of rabbit casein kinase II [J]. Gene 1993, 124(2):287 - 290.
- [11] Jakobi R, Voss H, Pyerin W. Human phosphotyrosine kinase type II. Molecular cloning and sequencing of full-length cDNA encoding subunit beta [J]. Eur J Biochem, 1989, 183(1): 227 - 233.

Cloning, expression and activity of recombinant mouse protein kinase CK2 subunit

CHEN Xiao-wen, ZHEN Ke-qin, LIANG Jing-yao, *et al.*

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: The cDNA encoding murine protein kinase CK2 subunit was extracted from NIH 3T3 murine fibroblast cells by RT-PCR. The expression plasmid was constructed, then confirmed to encode mouse protein kinase CK2 subunit by DNA sequencing. The sequencing results showed that the sequence of the inserted fragment of two recombinant mouse CK2 clones were differed in the reported two cDNA sequences encoding mouse protein kinase CK2 subunit for one discrepant base respectively, but the difference bases were consistent with the corresponding position of cDNA sequences encoding protein kinase CK2 subunit in rat, rabbit, porcine and human. When the plasmid was induced to express in *E. coli* BL21 (DE3), one protein with molecular mass of 26ku was overexpressed, comprising about 31.7% the total of bac-

terium protein indicated by scanning. However most of the expressed CK2 proteins were insoluble. Western blot results confirmed that the overexpressed product could specially react with antibody against human CK2 subunit. When recombinant CK2 and subunits were mixed at an 1:1 molar ratio, the constituted CK2 holoenzyme displayed the maximum activity, which directly illustrated the activation effect of on subunit. These results strongly demonstrated that the cloned, expressed recombinant protein was murine protein kinase CK2 subunit.

Key words: regulatory subunit/protein kinase CK2/mouse; expression; molecular cloning; DNA sequence; western blot

corresponding author: LIU Xin-guang

(上接第 378 页)

SARS 病毒是突变而来的么?

像 HIV、流感病毒这样,突变频率较高的病毒经常被称为“老手”。因为这种特性可以帮助它们逃过药物的杀伤及人类的免疫系统的监视。但是迄今为止,似乎并没有发现 SARS 病毒并有这种特性。对新加坡、多伦多、中国和香港的 14 例 SARS 患者的病毒分离株进行基因测序显示:没有任何变异现象。

这并不是因为 SARS 病毒不具备变异的能力,而是因为变异对病毒没有什么明显的益处。病毒在其新宿主——人类体内几乎没有遇到任何阻抗,所以没有选择压力迫使其产生新的突变。

冠状病毒复制的错误率很高,平均每拷贝 10 000 个核苷酸就出现一次错配,错配率和 HIV 相似。但是,冠状病毒有一个特点,就是自我去除突变的能力。病毒不只依赖单一模板进行复制,其复制酶可以在病毒基因组的多个拷贝中来回跳跃。所以每一个新的基因组实际上都是依据多个模板拷贝而来的,这就大大减少了突变参入病毒基因组的机会。

但是一旦这些跳跃出现错误,就会造成大段基因被漏读,很可能导致重要基因的缺失。缺失的结果很可能是戏剧性的,特别是如果基因的改变影响了与宿主细胞表面结合的病毒棘状蛋白的表达。例如:1984 年,欧洲的猪出现了一种新的呼吸道疾病,后来证明:引起这种疾病的病原体是一种发生缺失突变的冠状病毒,该病毒原本感染乳猪的胃,棘状蛋白的改变导致了病毒感染的细胞类型的改变。虽然这种新的疾病不是致死性的,但是它引起了世界范围内的流行,并且使消化系统疾病的诊断复杂化。

基因的缺失也可以使 SARS 病毒的宿主从原来的动物转变为人类。但即是如此,也与上述突变类型不同,因为 SARS 病毒的棘状蛋白没有任何改变。

SARS 病毒可能再次袭击人类,但它可能不会像以前那么稳定,特别是它与抗病毒药物接触过之后。而且,我们的免疫系统也会不断的完善。正像洛杉矶南加利福尼亚大学的分子病毒学家 Michael Lai 所说的那样:“一旦足够多的人建立了对抗 SARS 病毒的免疫力,病毒的突变将会不具威胁,就象对付流感病毒一样。”

抗 SARS 的药物有希望吗?

从揭开 SARS 幕后病毒的那一刻起,药物开发者就投入到了紧张的研究工作中。目前,最主要的方法是在成百上千的化合物中筛选可以对抗实验室培养的病毒的化合物。

美国国家过敏性和传染性疾病预防协会正在进行一项大规模的随机筛选试验,筛选范围包括已经认证的药物和正在开发的药物。他们与美国军事医学传染病研究院合作,已经对 300 000 多种药物进行了筛选,观察其对猴肾细胞系中培养的病毒有无杀伤作用。“我们发现很多有效的药物”,病毒学家 Robert Baker 说。

一个相似的实验在德国的法兰克福大学进行,他们已经筛选出了一种化合物——甘草甜素(从甘草根中提炼出来)可以清除猴肾细胞中的 SARS 病毒。他们已经证明:甘草甜素在人类细胞系中的有效性。虽然这种药物相对无毒而且已经通过认证,并且用于治疗 C 型肝炎,但是只在大剂量应用时才起作用。于是由 Prakash Chandra 领导的法兰克福研究小组正在与俄罗斯科学院有机化学学会合作,希望能从这个学会合成的一系列有关的化合物中找到对 SARS 病毒有特效的药物。

其他研究者正试图使用一些更直接的方法,例如:比利时 Catholic 大学的 Erik De Clercq 正在对大量的抗病毒药物进行筛选,这些抗病毒药物的机理大多是干扰病毒的复制。这位研究者称:“我相信根据推理进行筛选会比随机筛选更有效。”

与此同时,德国 I übeck 大学的结构生物学家 Rolf Hilgenfeld 发现了 SARS 病毒的一种关键酶——蛋白酶的结构,这种蛋白酶可以激活病毒复制所需的各种蛋白。他的研究组用计算机模拟该酶的结构,并开始预测究竟何种因素可能抑制这种酶的活性。Hilgenfeld 目前正与一个中国研究小组合作(由上海药品学会的梁江华领导),该小组具有巨型计算机来扩展这项工作。

(下转第 410 页)