

大鼠Delta1基因真核表达载体的构建与鉴定*☆

郑凯, 谭建明, 吴卫真, 杨顺良

Construction and identification of eukaryotic expression vector of rat Delta1 gene

Zheng Kai, Tan Jian-ming, Wu Wei-zhen, Yang Shun-liang

Abstract

BACKGROUND: Recent data suggested that Notch signal pathway plays important regulatory effects in peripheral transplantation immunological response, promotes differentiation of regulatory T cells, induces antigen specific immune tolerance. We proposed that Notch/Notch ligand may play important roles in MHC/TCR interface.

OBJECTIVE: To construct the eukaryotic expression vector of rat Delta1 gene (Notch ligand), and to examine its expression in dendritic cells.

METHODS: The complete encoding cDNA of rat-Delta1 was isolated from bone marrow cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and this gene was recombined into pcDNA3.1(+) plasmid vector. pcDNA3.1/Delta1 plasmid was transfected into rat dendritic cells with lipofectamine gene transfection method.

RESULTS AND CONCLUSION: Double enzyme digestion detection demonstrated that Delta1 had been successfully constructed in *HindIII* and *XbaI* of pcDNA3.1. A positive clone pcDNA3.1/Delta1 was delivered to Shanghai Sangon Biological Engineering Technology & Services Co., Ltd. for sequencing. Sequencing results were identical to Delta1 gene sequence in Genebank, with correct reading frame. The Delta1 gene-transfected dendritic cells showed similar morphology as their parent cells. Western blotting assay detected that Delta1 expression was significantly increased in cells. The eukaryotic expression vector pcDNA3.1/Delta1 was constructed, and significant increase of Delta1 expression was detected after transfection.

Zheng K, Tan JM, Wu WZ, Yang SL. Construction and identification of eukaryotic expression vector of rat Delta1 gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(18): 3331-3334. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 最近有数据表明, Notch 信号通路在外周移植免疫应答反应中发挥重要的调节作用, 可以促进调节性 T 的分化, 诱导抗原特异性的免疫耐受。推测 Notch/Notch 配体可能在 MHC/TCR 界面发挥作用。

目的: 构建大鼠 Delta1 基因(Notch 配体)真核表达载体, 并观察其在树突状细胞中的表达。

方法: 应用 RT-PCR 方法从大鼠骨髓细胞中获得全长 Delta1 基因片段, 并将此基因片段构建在 pcDNA3.1(+)真核表达载体上。利用脂质体基因转染技术将含大鼠 Delta1 基因片段的真核表达载体 pcDNA3.1(+)/Delta1 转染入树突状细胞中, 观察 Delta1 基因在树突状细胞中的表达。

结果与结论: 双酶切鉴定结果显示, Delta1 已成功构建在 pcDNA3.1 的 *HindIII* 和 *XbaI* 双酶切位点之间, 任选一个酶切阳性克隆 pcDNA3.1/Delta1 送上海生工生物公司进行序列测定, 测序结果与 Genebank 中 Delta1 基因序列完全一致, 阅读框正确。转染 Delta1 基因的树突状细胞形态与其亲本细胞类似, 蛋白免疫印迹法检测到细胞内 Delta1 的表达显著增高。实验成功利用基因转染方法将 Delta1 基因导入树突状细胞, 构建了真核表达载体 pcDNA3.1(+)/Delta1, 并使之高效表达并分泌 Delta1 蛋白。

关键词: 树突状细胞; Notch 信号; Delta1; 免疫耐受; 移植; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.18.024

郑凯, 谭建明, 吴卫真, 杨顺良. 大鼠 Delta1 基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(18):3331-3334. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

Notch信号传导通路由Notch受体、Notch配体和CSL DNA结合蛋白三部分组成, 在脊椎动物中已鉴定出4个Notch受体(Notch1-4)和5个Notch配体(Delta-like1, 3, 4及Jagged1, 2)^[1-13]。Notch信号传导通路的特点是他介导细胞与细胞之间的信息传导, 不需要第二信号的协助, 也无信号放大作用, 但同时也保证了他所传导的信号的高度精确。哺乳类动物中Notch途径的功能复杂多样, 在许多组织分化方向的调控中起着决定作用, 参与造血、T细胞发育、

血管生成等重要生理过程, 并与肿瘤形成和某些神经系统疾病有密切关系^[14-15]。在免疫系统中, Notch信号与T细胞与B细胞系分化、胸腺细胞分化成熟和骨髓造血祖细胞更新和分化等有关^[16]。

许多研究提示, Notch信号在外周免疫系统的分化和调节中发挥作用。在成熟的淋巴细胞和抗原呈递细胞的表面上都有Notch受体和他们的配体表达, 不同的Notch配体对T细胞具不同的生物学效应^[17-20]。Jagged1-Notch信号途径可提高T细胞的存活力, 而Delta-Notch信号途径使T细胞失去生存能力。抗原呈递细胞表面表达的Notch配体与T细胞表达的Notch受体相

Organ Transplant
Institute, Fuzhou
General Hospital of
Nanjing Military Area
Command of Chinese
PLA, Fuzhou
350025, Fujian
Province, China

Zheng Kai☆, Doctor,
Attending physician,
Organ Transplant
Institute, Fuzhou
General Hospital of
Nanjing Military Area
Command of Chinese
PLA, Fuzhou
350025, Fujian
Province, China
IZHK@sina.com

Supported by: the
Natural Science
Foundation of Fujian
Province*

Received:2009-10-13
Accepted:2009-12-13

解放军南京军区
福州总医院全军
器官移植中心, 福
建省福州市
350025

郑凯☆, 男,
1971年生, 辽宁
沈阳市人, 汉族,
2004年第四军医
大学毕业, 博士,
主治医师, 主要从
事移植免疫方面
的研究。
IZHK@sina.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)18-03331-04

收稿日期: 2009-10-13
修回日期: 2009-12-13
(20091016007/
GW·Q)

互作用可使成熟的T细胞免受激活诱导的细胞死亡^[17]。Wong等^[20]研究发现, 脾脏CD8⁺细胞上Notch信号的激活可以导致干扰素 γ 分泌性的减少, 同时伴随白细胞介素10的增多, 提示Notch信号可以改变CD8⁺细胞的分化潜能。最近的研究显示在淋巴细胞分化的过程中, Delta样蛋白传递的信号可以抑制B细胞的分化。这些结果提示Notch信号可能影响细胞增殖、分化和死亡来控制淋巴细胞命运的选择。

Notch信号通路在免疫系统中作用机制的研究目前只处于起步阶段; 许多研究证实Notch信号通路在移植排斥反应发生中起重要作用, 但对其中的信号传导机制知之甚少。实验应用树突状细胞作为抗原呈递细胞, 通过脂质体转染方法将Notch配体Delta1基因转入树突状细胞, 初步探讨Notch配体在移植免疫应答反应起始阶段的作用。

1 材料和方法

设计: 基因转染细胞学体外观察实验。

时间及地点: 于2005-05/2008-05在解放军福州总医院完成。

材料: 健康雄性Wistar大鼠购于上海斯莱克公司, 体质量250~350 g, 置于无特定病原体环境中饲养。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。大肠杆菌DH5 α 为本室保存菌株。

质粒及试剂:

质粒及试剂	来源
真核表达载体pcDNA3.1 (+)	Invitrogen 公司
脂质体(lipofectamine)	Sigma 公司
反转录-多聚酶链反应酶混合物	Promega 公司
Trizol TM-Reagent	Life Technologies 公司
小鼠抗大鼠Delta1单克隆抗体	eBioscience 公司
链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组 织化学染色试剂盒	福州迈新公司

引物设计: 根据大鼠Delta1编码区(290A-2434A)基因序列设计引物, 并在其两端分别设计了HindIII 和Xba I 限制内切酶的酶切位点及保护碱基, 采用OLIGO核酸分析软件进行分析。引物序列: 5'-AGC AAG CTT CGG TAC CAT GGG CCG TCG GA-3'; 5'-AGC TCT AGAACA TCA CTT CCA CCT TAG GT-3', 由上海生工生物公司合成。

实验方法:

大鼠Delta1编码 cDNA的获取: 无菌条件下收集大鼠骨髓细胞, 采用异硫氰酸胍一步法提取细胞总RNA。以大鼠骨髓细胞总RNA为模板, 利用上述引物进行RT-PCR扩增。反应条件: 94 °C 60 s, 56 °C 60 s, 72 °C 90 s,

35个循环, 72 °C 延伸10 min。取PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳(5 V/cm), 凝胶上大小约为2.2 kb的条带为所需片段, 即为大鼠Delta1 cDNA片段, 回收并纯化目的片段。

pcDNA3.1(+)/Delta1重组质粒的构建: 用XbaI和HindIII分别对回收的Delta1和pcDNA3.1(+)质粒进行双酶切, Delta1 cDNA片段与线性化的载体pcDNA3.1按5:1(摩尔比)连接, 连接产物转化DH5 α 感受态细菌, 筛选出阳性克隆。取样进行酶切鉴定并将带有插入片段的重组质粒进行序列测定。

骨髓来源树突状细胞的提取与鉴定: 参照文后文献[23]的方法, 取大鼠(供体)股骨, 冲洗出骨髓细胞, 以1:10的体积比加入37 °C预温的Tris-NH₄Cl去除红细胞; 加GNK缓冲液终止反应, 离心洗涤2次; 用RPM I1640调细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 37 °C, 体积分数5%CO₂条件下培养2 h; 轻轻洗去非黏附细胞; 在贴壁细胞中加入含10 $\mu\text{g/L}$ rrlL-4 和10 $\mu\text{g/L}$ rrGM-CSF的RPM I1640完全培养基, 37 °C, 体积分数5%CO₂条件下培养六七天, 收集生长状态良好的树突状细胞备用。

pcDNA3.1/Delta1转染树突状细胞: 取培养7 d的细胞, 转染方法按Lipofectamine说明书进行。以空载体作阴性对照, G418 筛选2周后即可见抗性克隆出现, 在显微镜下标记生长良好的细胞克隆, 用浸有消化液的小滤纸片粘取克隆, 移至培养瓶中扩大培养。

转染树突状细胞的Delta1蛋白表达检测:

免疫组织化学: 常规制备细胞爬片, 免疫组织化学采用SP法, DAB 显色, 苏木精复染。

Western-blot检测: 取对数生长期细胞, 无血清培养液培养5 d, 收集上清。三氯醋酸沉淀蛋白, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(15 V/cm), 电转移至硝酸纤维素滤膜。将滤膜装于可热封的塑料袋中, 依次加入小鼠抗大鼠Delta1单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、卵白亲和素-生物素辣根过氧化物酶复合物, DAB 显色。

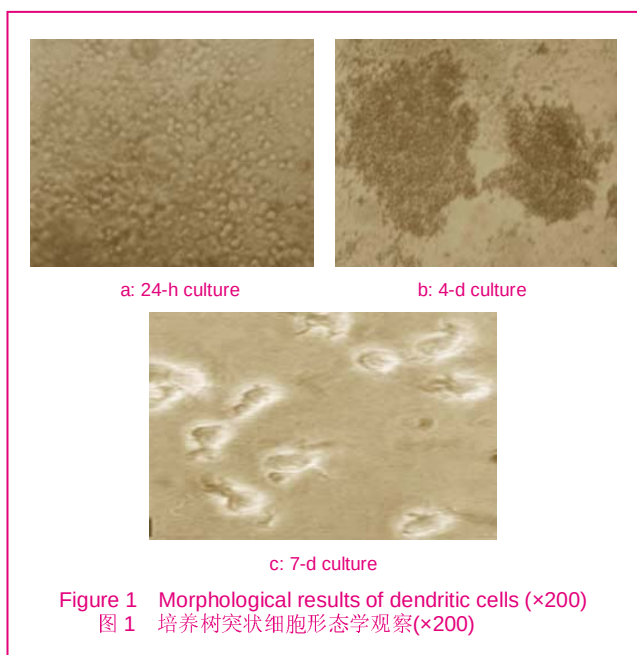
主要观察指标: 转染树突状细胞的Delta1蛋白表达。

设计、实施、评估者: 设计、评估由第一、二作者完成, 实施由第一作者完成。

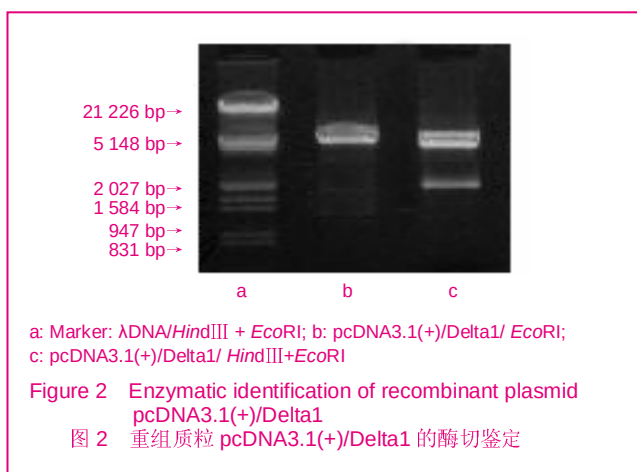
2 结果

2.1 树突状细胞形态学观察 每只大鼠能分离出骨髓细胞 $(5.0 \sim 7.0) \times 10^7$ 个, 包括造血干细胞、内皮细胞及成纤维细胞等。经24 h培养后, 在贴壁细胞表面有许多集落出现, 其中小部分半贴壁半悬浮的集落为树突状细胞, 见图1a; 到第4天, 此类半贴壁集落数量剧增, 并有部分细胞悬浮, 细胞的表面可见长短不一的突起, 见图1b; 继续培养至6~8 d, 集落丰富, 并开始有大量细胞从集落中释放出来, 细胞突起明显, 此阶段细胞有一明显的增殖高峰, 苏木精-伊红染色可见细胞核偏位,

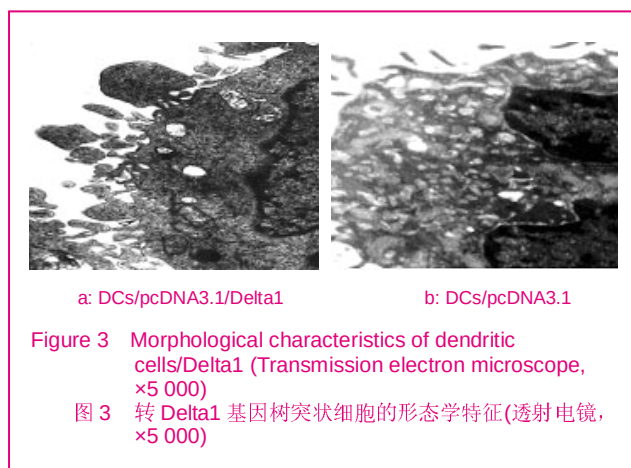
胞质内有大量的囊泡结构, 细胞表面突起较多, 见图1c。



2.2 重组质粒pcDNA3.1(+)/Delta1的酶切鉴定与序列分析 从转化成功的克隆提取的质粒用 *Hind*III 和 *Xba*I 双酶切, 2%琼脂糖凝胶电泳, 可见大小约为2.2 kb的 *Delta1* 片段和大小约为5.4 kb的 *pcDNA3.1(+)* 片段, 此结果说明 *Delta1* 已成功构建在 *pcDNA3.1* 的 *Hind*III 和 *Xba*I 双酶切位点之间, 见图2。任选一个酶切阳性克隆 *pcDNA3.1/Delta1* 送上海生工生物公司进行序列测定, 测序结果与 *Genebank* 中 *Delta1* 基因序列完全一致, 阅读框正确。

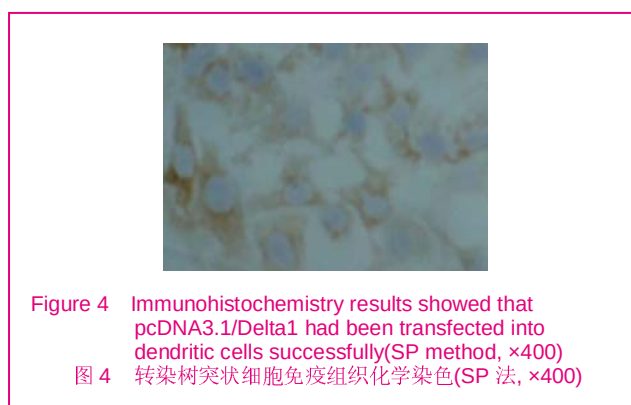


2.3 转染Delta1基因树突状细胞的形态学观察 倒置显微镜观察, 转染 *Delta1* 基因的树突状细胞形态与其亲本细胞类似。培养7 d的树突状细胞进行电镜观察, 细胞表面具有大量的皱折和不规则突起, 无论是转染细胞还是未转染细胞电镜均表现为巨噬细胞特点, 但转染细胞可见较为粗大的内质网、肿大的线粒体及分泌颗粒, 核糖体丰富, 细胞微绒毛及突起增多, 未转染细胞无此特征。见图3。

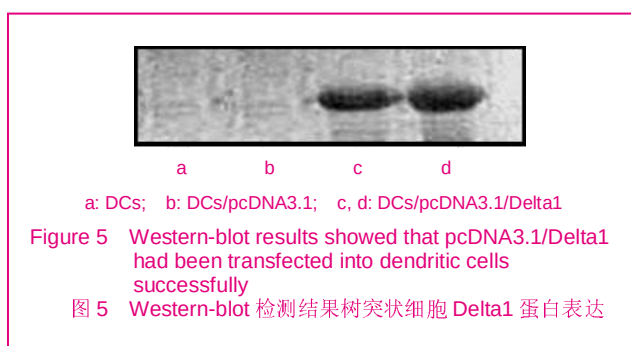


2.4 转染树突状细胞的Delta1蛋白表达检测结果

免疫组织化学结果: 染色结果显示, 转染了空载体的树突状细胞中未见染成棕褐色的阳性结果出现, 细胞核被苏木精染成蓝紫色; 转染了 *Delta1* 基因的树突状细胞中可见染成棕褐色的阳性结果出现, 阳性结果主要出现在细胞浆及细胞膜上, 细胞核被苏木精染成蓝紫色, 提示树突状细胞中 *Delta1* 蛋白表达阳性, 即 *Delta1* 基因已成功转染入树突状细胞并在细胞中稳定高表达。见图4。



Western-blot 检测结果: 在 NC 膜上可见转染 *pcDNA3.1(+)/Delta1* 的树突状细胞培养上清组泳道上有与阳性对照组相对分子质量大小77 000相当的阳性条带, 而转染了空载体的细胞培养上清的泳道中未见染成棕褐色的阳性条带出现, 提示: *Delta1* 基因已转染入树突状细胞并且稳定高表达 *Delta1*, 见图5。



3 讨论

树突状细胞是目前发现功能最强的抗原呈递细胞,也是唯一能够激活初始型T细胞启动初次免疫应答的抗原呈递细胞。抗原呈递细胞与T细胞之间TCR信号与共刺激信号的相互作用及下游的信号通路提供了一个关于免疫应答的基本的调节机制,为临床提供了一系列治疗靶点。Notch信号通路是一个新发现的参与外周免疫反应调控的重要的信号途径。Notch通路作为免疫信号的调节因子,或促进或抑制特异性信号因子的启动,推测Notch/Notch配体可能在MHC:TCR界面发挥重要的调节作用。因此,作者尝试通过增强树突状细胞表面Notch配体的表达,来观察Notch受体和配体在移植免疫应答反应启动阶段的作用。

pcDNA3.1(+)是美国INVITROGENE公司推出的高效真核表达载体,由真核表达载体pRc/CMV改进而来。与pRc/CMV相比较,pcDNA3.1具有更多的多克隆位点,使插入基因的克隆更容易。扩增后从大肠杆菌中提取和纯化质粒DNA,再经HindIII和XbaI双酶切鉴定。采用T7序列作为正向引物进行碱基分析,测出的基因序列与已报道的目的基因序列完全相同,证明已成功构建了真核表达载体pcDNA3.1(+)/Delta1。

利用大鼠骨髓的造血干细胞成功地诱导出DCs,光学显微镜下观察Delta1基因的表达对树突状细胞的形态学无明显影响。电镜下发现Delta1基因转染树突状细胞富含线粒体、内质网等细胞器,表面微绒毛明显增多,提示转染细胞具有高分泌活性,有大量蛋白产生。利用免疫组织化学和Western印迹等方法从蛋白水平检测到转染细胞内Delta1的高表达,证实了质粒DNA已稳定地整合进细胞基因组中。先前的研究已经显示Notch通路的激活可以抑制针对模型或移植抗原的免疫反应,提示激活Notch通路可以导致抗原特异性的免疫耐受。Delta1/notch信号表达的增加可以打破Th1/Th2平衡和控制CD4⁺T细胞效应因子的分泌。虽然Delta1/Notch信号在外周免疫应答的功能研究还存在相互矛盾的结果,但有一点可以明确,即Notch信号在外周免疫反应的调控过程中发挥重要作用。完全理解Notch信号通路在免疫细胞的功能依旧有很长的路要走,探讨notch对抗原呈递细胞、特别是树突状细胞的作用,必将加深和完善对免疫机制的理解,Notch信号表现出的诱导免疫耐受的作用也为免疫耐受的诱导研究提供一个全新的切入点。

4 参考文献

- [1] Zheng K, Tan JM. Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi. 2007; 23(9): 880-881.
郑凯,谭建明. Notch信号通路对外周免疫[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23 (9):880-881.

- [2] Yu HL, Xiao XR. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(31):6109-6112.
郁华亮,肖序仁. 移植免疫耐受的研究现状及进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(31):6109-6112.
- [3] Pan H, Guo SZ. Zhongguo Meirong Yixue. 2008;17(8): 1236-1239.
潘华,郭树忠. 建立嵌合体诱导移植免疫耐受的研究进展[J]. 中国美容医学, 2008, 17(8): 1236-1239.
- [4] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol Rev. 2001; 182:18-32.
- [5] Xu H, Chilton PM, Huang Y, et al. Addition of cyclophosphamide to T-cell depletion-based nonmyeloablative conditioning allows donor T-cell engraftment and clonal deletion of alloreactive host T-cells after bone marrow transplantation. Transplantation. 2007;83 (7):954-963.
- [6] Wesche-Soldato DE, Chung CS, Gregory SH, et al. CD8+ T cells promote inflammation and apoptosis in the liver after sepsis: role of Fas-FasL. Am J Pathol. 2007;171(1):87-96.
- [7] Aruna BV, Ben-David H, Sela M, et al. A dual altered peptide ligand down-regulates myasthenogenic T cell responses and reverses experimental autoimmune myasthenia gravis via up-regulation of Fas-FasL-mediated apoptosis. Immunology. 2006; 118(3):413-424.
- [8] Silver PB, Hathcock KS, Chan CC, et al. Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance. J Immunol. 2000;165(9):5041-5047.
- [9] Hewitson JP, Jenkins GR, Hamblin PA, et al. CD40/CD154 interactions are required for the optimal maturation of skin-derived APCs and the induction of helminth-specific IFN-gamma but not IL-4. J Immunol. 2006;177(5):3209-3217.
- [10] Aoki-Ota M, Kinoshita M, Ota T, et al. Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. J Invest Dermatol. 2006;126(1):105-113.
- [11] Gu X, Tang XD, Gu SY, et al. Nanjing Yike Daxue Xuebao: Ziran Kexueban. 2003; 23(5): 434-436.
顾晓,唐孝达,顾沈阳,等. CD28通路共刺激对淋巴细胞产生趋化因子RANTES的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2003, 23(5): 434-436.
- [12] Ascano JM, Beverly LJ, Capobianco AJ. The C-terminal PDZ-ligand of JAGGED1 is essential for cellular transformation. J Biol Chem. 2003 ;278(10):8771-8779.
- [13] Kong FY, Li ZK, Li YL. Guowai Yixue: Fenzi Shengwuxue Fence. 2002; 24(5): 23-25.
孔风云,李中奎,李云龙.T、B淋巴细胞的凋亡及其与疾病的关系[J]. 国外医学:分子生物学分册, 2002, 24 (5):23-25.
- [14] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake, RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science. 1999; 284:770-776.
- [15] Kiyota T, Kinoshita T. The intracellular domain of X-Serrate-1 is cleaved and suppresses primary neurogenesis in Xenopus laevis. Mech Dev. 2004;121(6):573-585.
- [16] Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Positive selection of thymocytes. Annu Rev Immunol. 1995;13:93.
- [17] Samon JB, Champhekar A, Minter LM, et al. Notch1 and TGFbeta1 cooperatively regulate Foxp3 expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells. Blood. 2008;112(5): 1813-1821.
- [18] Hoyne GF, Le Roux I, Corsin-Jimenez M, et al. Serrate-1 induced Notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4+T cells. Int Immunol. 2000; 12(2): 177-179.
- [19] Ohishi K, Varnum-Finney B, Serda RE, et al. The Notch ligand, Delta-1, inhibits the differentiation of monocytes into macrophages but permits their differentiation into dendritic cells. Blood. 2001;98(5):1402-1407.
- [20] Wong KK, Carpenter MJ, Young LL, et al. Notch ligation by Delta1 inhibits peripheral immune responses to transplantation antigens by a CD8+ cell-dependent mechanism. Clin Invest. 2003;112(11): 1741-1750.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 福建省自然科学基金资助项目。

利益冲突: 无利益冲突。