

大鼠热休克蛋白72基因真核表达载体构建及在COS7细胞中的表达***

晏春根, 黄丹文, 任光圆, 朱冬芳

Construction of eukaryotic expression vector carrying rat heat shock protein 72 gene and its expression in COS7 cells

Yan Chun-gen, Huang Dan-wen, Ren Guang-yuan, Zhu Dong-fang

Abstract

BACKGROUND: *In vitro* cloning and expression of heat shock proteins (HSP), especially HSP72, is important in the study of ischemia-reperfusion injuries.

OBJECTIVE: To construct eukaryotic expression vector carrying HSP72 and study its transient expression in COS7 cells, and to establish the foundation for further research of the immune function of HSP72.

METHODS: HSP72 cDNA was amplified from hepatocytes of BABL/C mice by RT-PCR, and correctly inserted into corresponding sites of eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+), after restriction endonuclease digestion, and the recombinant plasmid was transfected into COS7 cells and gene expression was determined by RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The gene fragment inserted into the vector pcDNA3.1(+) was confirmed by nucleotide sequencing, and the recombinant plasmid mRNA was successfully expressed in COS7 cells.

Yan CG, Huang DW, Ren GY, Zhu DF. Construction of eukaryotic expression vector carrying rat heat shock protein 72 gene and its expression in COS7 cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(18): 3357-3360. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Internal Medicine, the Affiliated Hospital of Shaoxing University, Shaoxing 312000, Zhejiang Province, China

Yan Chun-gen★, Master, Professor, Department of Internal Medicine, the Affiliated Hospital of Shaoxing University, Shaoxing 312000, Zhejiang Province, China ycg28@163.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, No. Y2100961*; Science and Technology Plan of Zhejiang Province, No. 2009C33129*

Received: 2010-10-22 Accepted: 2011-03-21

摘要

背景: 体外克隆、表达热休克蛋白, 尤其正常时少量或不表达, 而应激时大量表达的热休克蛋白72对研究其缺血再灌注损伤中的作用尤为重要。

目的: 构建热休克蛋白72基因真核表达载体并于COS7细胞内表达, 为HSP72蛋白免疫调节功能的研究奠定基础。

方法: 采用RT-PCR技术从BABL/C大鼠肝细胞中扩增出热休克蛋白72 cDNA, 经限制性核酸内切酶消化后, 插入真核表达载体pcDNA3.1(+), 并将重组质粒转染COS7细胞, 进行基因表达鉴定。

结果与结论: 重组质粒插入基因序列检测证实为热休克蛋白72 cDNA, 并能在COS7细胞稳定表达。成功构建热休克蛋白72真核表达载体, 并于COS7细胞中成功转录与表达。

关键词: 热休克蛋白72; 基因表达; COS7细胞; 转录; 鉴定

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.18.031

晏春根, 黄丹文, 任光圆, 朱冬芳. 大鼠热休克蛋白72基因真核表达载体构建及在COS7细胞中的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(18):3357-3360. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

缺血再灌注损伤是导致急性肝功能衰竭及影响移植肝存活的重要因素, 其发生机制非常复杂^[1-2]。

近来认识到, Toll样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 识别内质网应激蛋白等内源性配体而启动的炎性应答可能是缺血再灌注等非感染性炎性损伤发生的重要机制^[3-10]; 热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 作为主要的内质网应激蛋白, 特别是正常细胞很少甚至不表达、应激时明显增加的HSP72越来越受到关注^[11-18]。

实验构建大鼠HSP72基因表达载体, 并观察其在COS7细胞中的表达, 为进一步探讨HSP72的免疫调节作用, 尤其作为内源性配体在TLRs启动的炎性应答中的作用奠定基础。

1 材料和方法

设计: 基因载体构建。

时间及地点: 于2009-08/2010-06在完成。

材料:

主要试剂:

主要试剂、引物	来源
Trizol	Invitrogen 公司(美国)
RT-PCR 试剂盒	Promega 公司(美国)
Triton X-100 蛋白裂解液	Sigma 公司(美国)
山羊抗大鼠 HSP72 单克隆抗体及过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 抗体	Santa Cruz Biotechnology 公司(美国)
限制性内切酶 <i>Hind</i> III、 <i>Xba</i> I 以及 <i>T₄</i> DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶	大连宝生物工程 有限公司
DNA 片段回收试剂盒、质粒回收试剂盒	Omega Biotek 公司(美国)
COS7 细胞株	中科院上海细胞研究所

绍兴文理学院附属医院内科, 浙江省绍兴市 312000

晏春根★, 男, 1970年生, 江西省丰城市人, 汉族, 2003年上海第二医科大学毕业, 硕士, 教授, 主要从事消化内科(肝脏疾病)方面的研究。ycg28@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2011)18-03357-04

收稿日期:2010-10-22
修回日期:2011-03-21
(20101022013/D-W)

真核表达载体pcDNA3.1 (+)、质粒扩增大肠杆菌JM109由绍兴文理学院医学院医学实验中心分子生物实验室保存。

实验方法:

大鼠HSP72的引物设计与cDNA合成: 根据Genbank中大鼠HSP72 mRNA序列, 用分子生物学软件Oligo5.0设计引物。依据选用的真核表达载体pcDNA3.1(+)的酶切位点图谱及HSP72 mRNA序列酶切位点分析图谱, 在上下游引物5' 端分别加入Hind III及Xba I酶切位点。设计的上游引物为: 5' -GCC ATG GCC AAG AAC ACG GCG ATC GGC ATC-3'; 下游引物为: 5' -CTAATC CAC CTC CTC GAT GGT GGG TCC TGA GC-3'。引物由上海生工生物工程公司合成并经PAGE纯化定量。大鼠肝组织匀浆、Trizol抽提RNA, 禽类髓纤维病毒反转录酶(A-MV酶)42 °C反转录, RT-PCR扩增HSP72 cDNA (1 932 bp), 扩增参数: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 56 °C 40 s, 72 °C 90 s, 共36循环; 72 °C 延伸5 min。

重组pcDNA3.1(+)/HSP72表达质粒构建及鉴定^[19-21]: 用玻璃DNA回收试剂盒按说明回收纯化PCR产物。回收的HSP72 cDNA及用碱裂解法提取的真核表达载体pcDNA3.1(+)的DNA用Hind III及Xba I双酶切后, 进行1.2%琼脂糖凝胶电泳, 玻璃回收试剂盒回收酶切产物。取双酶切后的HSP72 cDNA和pcDNA3.1(+)质粒, 按3: 1的分子比例混合, 用T₄ DNA连接酶连接, 然后转化于低温大肠杆菌JM109感受态细菌中。将转化的感受态细菌涂布于含氨苄青霉素50 mg/L的LB平板, 次日随机挑选12个生长菌落, 分别接种于5 mL含氨苄青霉素的LB培养液中37 °C振荡培养过夜。用碱裂解法提取质粒DNA, 将提取的质粒DNA用Hind III及Xba I双酶切, 1.2 %琼脂糖凝胶电泳, 检测阳性克隆。将筛选出的阳性克隆送上海生工生物工程公司测序鉴定。

pcDNA3.1(+)/HSP72质粒转染入Cos7细胞株及HSP72表达的鉴定:

细胞和质粒的准备: 将复苏成功并进入对数生长期的COS7细胞以(1.0~2.0)×10⁵/孔的密度接种于6孔板后置于37 °C孵箱18~24 h, 待细胞生长融合达60%~80%时进行转染。将用质粒DNA大抽试剂盒抽得的质粒pcDNA3.1(+)/HSP72, 重新沉淀并用双蒸水溶解使其浓度达到1 g/L。

脂质体介导的质粒转染: 按6孔板每孔加入(1.0~2.0) μg质粒且质粒与脂质体1: 3 (g: L) 的比例将质粒与脂质体加入无血清、蛋白及抗生素的1640培养基中, 使其总体积达到100 μL, 混合数秒钟, 加5 μL SuperFect-Transfection-Reagen到DNA溶液中混合。室温孵育10 min, 形成转染复合物, 同时以PBS洗培养板中细胞一遍。将350 μL细胞培养液(含血清、蛋白或抗生素)加到含转染复合物的管中, 吹吸两次即转移到24孔板中的

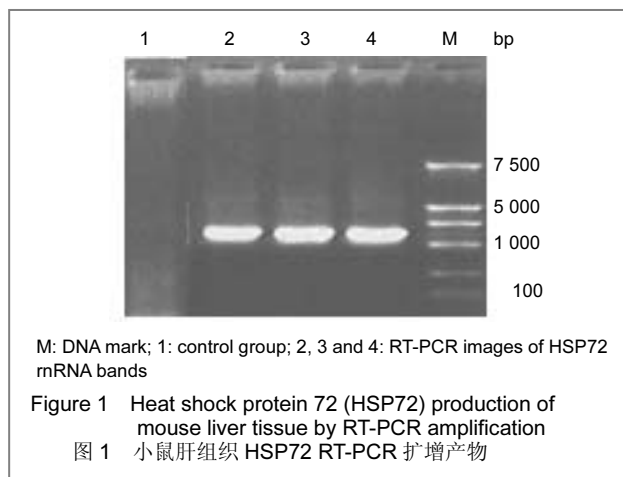
细胞液中。常规孵育4 h后, 以PBS液洗细胞1遍, 加新鲜培养液(含血清、蛋白或抗生素)孵育。48 h后转染的基因开始表达。同时设空质粒pcDNA3.1(+)转染作为对照。每孔无血清的1640培养基的总体积为2 mL。置于37 °C孵箱4 h, 按体积分数10%的比例加入小牛血清继续培养。于第72小时收获细胞, 用PBS洗沉淀, 弃上清备用。

RT-PCR检测HSP72 mRNA的表达: 收集转染pcDNA3.1(+)或pcDNA3.1(+)/HSP72的COS7细胞各(5~10)×10⁶个, 按Invitrogen公司操作说明提取总RNA, RT-PCR检测HSP72 mRNA的表达情况。

Western blot检测HSP72蛋白的表达: 各细胞沉淀加入20 μLPBS混匀, 按1: 1比例各自加入等体积2×SDS上样缓冲液混匀, 沸水中煮10 min裂解、离心, 行10% SDS-PAGE电泳后, 在转移槽中将蛋白从凝胶转移至PVDF膜上, TBS缓冲液洗膜、封闭、4 °C过夜。加入TBS缓冲液稀释的山羊抗大鼠HSP72的多克隆抗体(1: 1 000)作为一抗, 37 °C孵育1.5 h, TBS洗膜后加入生物素化的IgG作为二抗, 37 °C孵育1.5 h、TBS缓冲液洗膜后, 将膜浸入DAB显色液中, 室温闭光显色 20 min, 蒸馏水终止反应。上述反应均以COS7细胞作为对照。

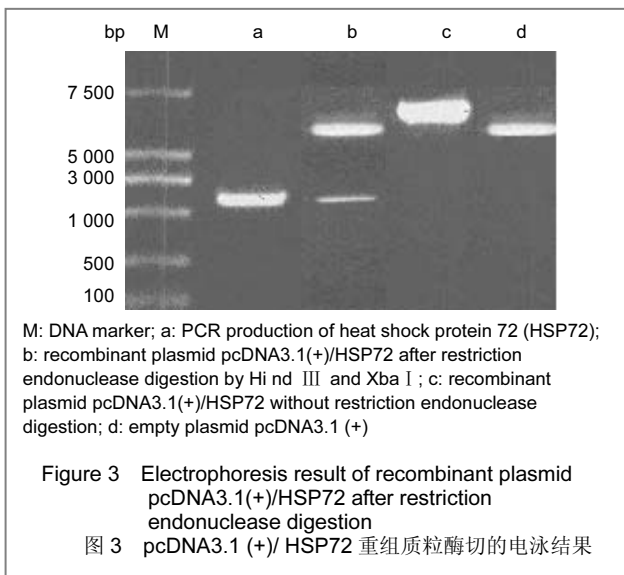
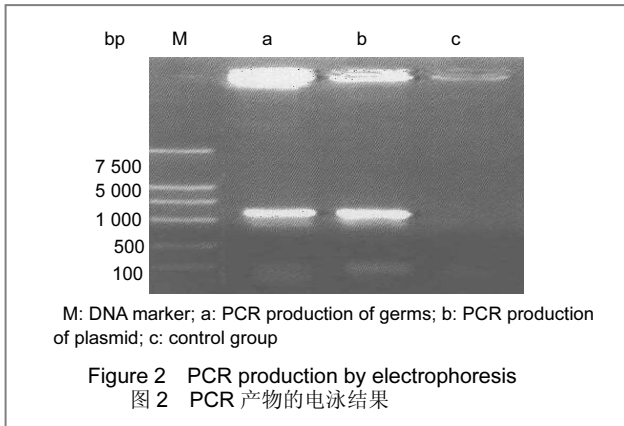
2 结果

2.1 RT-PCR扩增产物HSP72 cDNA的鉴定 大鼠肝组织经RT-PCR扩增见一长约1 932 bp的特异性扩增条带, 见图1, 符合实验设计的目的片段长度。

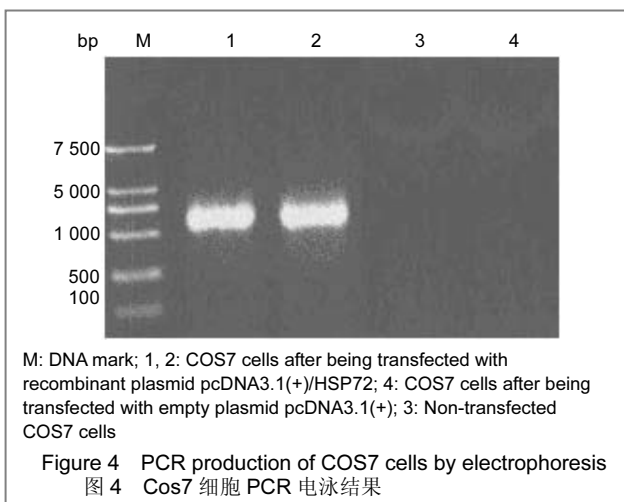


2.2 重组HSP72真核表达载体的构建及鉴定 将扩增的大鼠HSP72基因PCR产物和pcDNA3.1(+)分别用Hind III、Xba I双酶切后, T₄ DNA连接酶作用下连接构建重组表达质粒pcDNA3.1 (+)/HSP72。转化JM109后挑选白色菌落, 直接以菌液为模板, 进行PCR反应, 获得了1条约1 932 bp的条带, 见图2a。抽提质粒再进行PCR反应, 同样获得1条1 932 bp的特异条带, 见图2b。用Hind III、Xba I双酶切, 电泳得到了大小二条片段, 大片段5.4 Kb与pcDNA3.1(+)碱基片段相符, 小

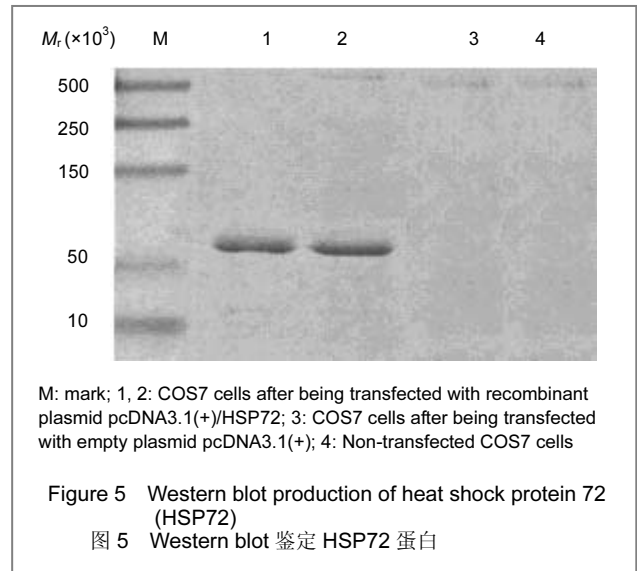
片段1 932 bp与HSP72碱基片段相符, 见图3。对经PCR和酶切鉴定正确的重组质粒进行两端测序, 结果与扩增的HSP72基因cDNA相符。上述结果表明, HSP72基因已正确插入表达质粒pcDNA3.1(+)中。



2.3 重组 pcDNA3.1(+)/HSP72 在 COS7 细胞中表达
pcDNA3.1(+)/HSP72在阳离子脂质体的介导下转染COS7细胞, 培养72 h后回收细胞进行RT-PCR, 获得一约1 932 bp的特异条带, 见图4。



而转染空质粒及未转染质粒的COS7细胞则未检测到HSP72基因表达。Western blot检测结果发现, 细胞中有针对HSP72抗体的特异性条带(相对分子质量约为70 000), 见图5。说明pcDNA3.1 (+)/HSP72转染COS7细胞后可表达HSP72蛋白。



3 讨论

为了最大程度地保证产物与模板的一致性, 实验利用了真核表达载体pcDNA3.1(+)上的多克隆位点和pcDNA3.1(+)/HSP72质粒酶切位点图谱, 选定*Hind* III和*Xba* I做双酶切, 将HSP72 cDNA定向连接pcDNA 3.1(+)两酶切点中, 成功地构建了pcDNA3.1(+)/HSP72真核表达载体, 然后将pcDNA3.1(+)/HSP72转化于JM109大肠杆菌中, 抽提后用于酶切鉴定, 可见HSP72 cDNA定向插入pcDNA3.1(+)的*Hind* III和*Xba* I两酶切点中。由于利用DNA分子两个末端的不同内切酶位点, 使外源DNA片段定向插入到载体分子中, 进行定向重组, 同时对连接载体进行磷酸化处理, 从而有效地限制了载体DNA分子的自身环化, 降低非重组子的背景, 减少筛选的繁琐, 提高重组的正确性。

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。实验将pcDNA3.1(+)/HSP72转染COS7细胞后, 以RT-PCR、Western blot 分别从基因转录及蛋白表达水平对HSP72基因的表达进行了检测, 结果证实HSP72 cDNA可于真核细胞中成功表达, 且未转染重组质粒pcDNA3.1(+)/HSP72的COS7细胞未发现HSP72的表达。实验证实了扩增的HSP72 cDNA序列的准确性, 同时掌握了其在真核细胞中表达的规律, 从而为进一步研究细胞外HSP72的免疫功能, 并为从内源性配体介导的炎性应答通路来干预非感染性炎症性疾病的研究提供可

能。

4 参考文献

[1] Yan CG, Zhu DF, Wang F. Zhongguo Weizhong Jijiu Yixue. 2006; 18(9):531-534.
晏春根,朱冬芳,王锋.热休克蛋白72和Toll样受体4在肝肾综合征大鼠肾组织中的表达及作用研究[J].中国危重病急救医学,2006,18(9):531-534.

[2] Guan XH, Chen J, Chen GS, et al.Zhongguo Zonghe Linchuang. 2007;23(5):453-455.
关晓海,陈晶,陈国生,等.热休克蛋白72的表达对肾移植缺血再灌注损伤的保护及评价意义[J].中国综合临床,2007,23(5):453-455.

[3] Yan CG, Huang DW, Zhou DF, et al. Shiyong Yixue Zazhi. 2010; 26(16):2906-2910.
晏春根,黄丹文,朱冬芳,等.热应激对肝硬化内毒素血症大鼠HSP72表达及致炎细胞因子分泌的影响[J].实用医学杂志,2010,26(16):2906-2910.

[4] Zhu DF, Yan CG, Xie Q, et al. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2008; 24(9):1859-1860.
朱冬芳,晏春根,谢青,等.肝硬化患者外周血单个核细胞TLR4表达及其基因多态性的研究[J].中国病理生理杂志,2008,24(9):1859-1860.

[5] Huang DW, Yan CG, Zhu DF. Zhonghua Xiaohua Zazhi. 2010;30(4): 268-271.
黄丹文,晏春根,朱冬芳.热休克蛋白72在非酒精性脂肪性肝病中的表达及作用[J].中华消化杂志,2010,30(4):268-271.

[6] Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science. 2004;306(5695): 457-461.

[7] Sakrak O, Kerem M, Bedirli A, et al. Ergothioneine modulates proinflammatory cytokines and heat shock protein 70 in mesenteric ischemia and reperfusion injury. J Surg Res. 2008;144(1):36-42.

[8] Jansen JH. Porcine membranoproliferative glomerulonephritis with intramembranous dense deposits (porcine dense deposit disease). APMIS. 1993;101(4):281-289.

[9] Flohé SB, Bangen JM, Flohé S, et al. Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins. Shock. 2007;27(5):494-502.

[10] Reuter S, Bangen P, Edemir B, et al. The HSP72 stress response of monocytes from patients on haemodialysis is impaired. Nephrol Dial Transplant. 2009;24(9):2838-2846.

[11] Wang B, Hu D. Zhongguo Wuzhenxue Zazhi. 2009;6(12): 2814-2815.
王波,胡丹.糖尿病与非糖尿病急性创伤患者热休克蛋白72不同表达对预后的影响[J].中国误诊学杂志,2009,6(12):2814-2815.

[12] Lu WB. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(20):3744-3747.
卢文彪.骨髓肌细胞中热休克蛋白72表达与运动及肌肉损伤[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(20):3744-3747.

[13] Wang AJ, Qu Y, Li JH. Chongqing Yixue. 2007;36(14):1430-1432.
王爱军,曲彦,李敬华.急性创伤患者早期热休克蛋白72的检测及临床意义[J].重庆医学,2007,36(14):1430-1432.

[14] Giraldo E, Martin-Cordero L, Garcia JJ, et al. Exercise-induced extracellular 72 kDa heat shock protein (Hsp72) stimulates neutrophil phagocytic and fungicidal capacities via TLR-2. Eur J Appl Physiol. 2010;108(2):217-225.

[15] Dasu MR, Devaraj S, Park S, et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. Diabetes Care. 2010;33(4):861-868.

[16] Catalani E, Amadori M, Vitali A, et al. The Hsp72 response in peri-parturient dairy cows: relationships with metabolic and immunological parameters. Cell Stress Chaperones. 2010;15(6): 781-790.

[17] Wheeler DS, Chase MA, Senft AP, et al. Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. Respir Res. 2009 Apr 30;10:31.

[18] Galloway E, Shin T, Huber N, et al. Activation of hepatocytes by extracellular heat shock protein 72. Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 295(2):C514-C520.

[19] Lu MX, Zhu CL, Song H, et al. Zhongguo Dongmai Yinghua Zazhi. 2009;16(4):273-276.
鲁敏翔,祝成亮,宋惠,等.热休克蛋白72重组腺病毒包装及其对细胞凋亡的影响.中国动脉硬化杂志,2009,16(4):273-276.

[20] Jiang FF, Tian WR, Gao SS, et al. Shanghai Xumu Souyi Tongxun. 2010;54(3):4-5.
姜斐斐,田文儒,高善颂,等.牛诱导型热休克蛋白72多克隆抗体的制备.上海畜牧兽医通讯,2010,54(3):4-5.

[21] Liu XH, Zhu CL, Song H, et al. Yunyang Yixueyuan Xuebao. 2009; 28(3):222-225.
刘兴晖,祝成亮,宋惠,等.热休克蛋白72的克隆表达及其对人脐静脉内皮细胞ECV304凋亡的影响.郧阳医学院学报,2009,28(3):222-225.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 基金项目: 浙江省自然科学基金(Y2100961); 浙江省科技计划项目(2009C33129)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第三、四、五作者进行实施, 第二作者进行实验评估, 资料收集为第一、四、五作者, 第一作者成文, 第二作者审核, 第一、二作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文特点: 实验利用 DNA 分子两个末端的不同内切酶位点, 使外源 DNA 片段定向插入到载体分子中, 进行定向重组, 同时对连接载体进行磷酸化处理, 从而有效地限制了载体 DNA 分子的自身环化, 降低非重组子的背景, 减少筛选的繁琐, 提高重组的正确性。证实了扩增的热休克蛋白 72 cDNA 序列的准确性, 同时掌握了其在真核细胞中表达的规律, 从而为进一步研究细胞外热休克蛋白 72 的免疫功能, 并为从内源性配体介导的炎症应答通路来干预非感染性炎症性疾病的研究提供可能。

2011-2013 年国家自然科学基金资助移植免疫研究项目: 本刊学术部

调节 T 细胞及亚群在肾移植联合供者造血干细胞移植诱导免疫耐受中作用的研究
朱同玉 复旦大学 2011-01 至 2013-12

抗 CD40/CD45RB 单克隆抗体和带血管骨髓干细胞移植协同诱导猴肾脏移植免疫耐受机理的研究
杨洪吉 四川省医学科学院(四川省人民医院) 2011-01 至 2013-12

原发性胆汁性肝硬化中自身抗原特异性 DC 的 microRNA 调控机制及其在重建免疫耐受中的应用研究
仲人前 中国人民解放军第二军医大学 2011-01 至 2013-12

转移 CTLA4Ig 和 CD40Llg 双基因修饰骨髓间充质干细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受
张剑 中山大学 2011-01 至 2013-12

间充质干细胞介导 TGF-β 诱导小移植肝局部免疫耐受的研究
俞悦 南京医科大学 2011-01 至 2013-12

抗原负载的 PD-1highCD11c+ DC 经由 PD-1/PD-L1 通路调控诱导大鼠肝移植免疫耐受的实验研究
肖江卫 川北医学院 2011-01 至 2013-12

microRNA 调控未成熟树突状细胞活化的机制研究及其在小肠移植免疫耐受中的作用
吴文溪 南京医科大学 2011-01 至 2013-12

抑制 Kupffer 细胞 miR-155 活性诱导肝移植免疫耐受
梁绍勇 重庆医科大学 2011-01 至 2013-12

阻断 Blimp1/Axl 信号序贯调控 DC 前体细胞分化及后继抗原提呈诱导同种移植耐受
宫念樵 华中科技大学 2011-01 至 2013-12

调节性 T 细胞在促进混合嵌合体形成, 诱导小肠移植耐受过程中作用机制的研究
杜峻峰 中国人民解放军北京军区总医院 2011-01/2013-12

咪喹啉 2, 3 双加氧酶抑制移植排斥反应的作用机制研究
戴向晨 天津医科大学 2011-01/2013-12