

人端粒酶反转录酶936-1132氨基真核表达载体的构建及在293T细胞中表达*

卢钧雄, 江慧贤, 曹莹, 庞建新

Construction of an eukaryotic expression vector carrying amino acids 936-1132 of human telomerase reverse transcriptase and its expression in 293T cells

Lu Jun-xiong, Jiang Hui-xian, Cao Ying, Pang Jian-xin

Abstract

BACKGROUND: Human telomerase reverse transcriptase is an important component of telomerase. The display on telomerase activity results in anti-telomere shortening or cell senescence.

OBJECTIVE: To construct an eukaryotic expressing vector containing the C-terminal amino acid 936-1132 of human telomerase reverse transcriptase; to express the constructed vector in human embryonic kidney 293T cells; to lay the foundation for the research of intracellular localization.

METHODS: The C-terminal fragment of human telomerase reverse transcriptase containing amino acids 936-1132 and enzyme sites was amplified by PCR using human telomerase reverse transcriptase as templates. The amplified fragments were inserted into the eukaryotic expressing vector pcDNA3.1-HisA to construct recombinant plasmid pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132. This recombinant plasmid was transfected into the human embryonic kidney 293T cells, and then the protein expression was examined by western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Double enzyme digestion and gene sequencing results showed that the recombinant plasmid pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132 containing the C-terminal amino acids 936-1132 of human telomerase reverse transcriptase was constructed successfully. The fusion protein was identified using western blot.

Lu JX, Jiang HX, Cao Y, Pang JX. Construction of an eukaryotic expression vector carrying amino acids 936-1132 of human telomerase reverse transcriptase and its expression in 293T cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(11): 1977-1980. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 人端粒酶反转录酶是端粒酶的重要组成部分之一, 可使端粒酶表现活性从而拮抗端粒缩短或细胞衰老。

目的: 构建人端粒酶反转录酶 C 端 936-1132 氨基真核表达载体, 并在人胚肾细胞 293T 表达, 为其在细胞内定位研究奠定基础。

方法: 以人端粒酶反转录酶 cDNA 为模板, PCR 扩增出带有酶切位点其 C 端 936-1132 氨基序列片段, 并与真核表达载体 pcDNA3.1-HisA 连接, 构建出重组质粒 pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132, 将重组质粒转染入人胚肾细胞 293T 中, 使蛋白表达, 并对蛋白进行免疫印迹鉴定。

结果与结论: 经双酶切和基因测序等方法证实, 人端粒酶反转录酶 C 端 936-1132 氨基重组质粒 pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132 构建成功, 经免疫印迹鉴定可检出融合蛋白。

关键词: 人端粒酶反转录酶 C 端; 重组质粒; 人胚肾细胞 293T; 蛋白表达; 免疫印迹

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.11.018

卢钧雄, 江慧贤, 曹莹, 庞建新. 人端粒酶反转录酶 936-1132 氨基真核表达载体的构建及在 293T 细胞中表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(11): 1977-1980. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

近年来众多研究发现, 在大部分的肿瘤组织中均检测到端粒酶活性, 端粒酶活性与恶性肿瘤有着密切关系^[1-4]。而人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)作为人端粒酶的重要组成部分之一, 对维持肿瘤细胞的生长非常重要。抑制端粒酶活性可以使细胞内的端粒正常地缩短长度^[5-6]。转染hTERT基因到端粒酶阴性的正常组织细胞和肿瘤组织细胞可使端粒酶活化^[7]。hTERT的C端是调节 hTERT 在细胞内定位的重要结构

域, 也是其在细胞内进行端粒末端复制所必需的结构域^[8-10], 所以研究hTERT的C端蛋白有助于了解hTERT在细胞内的定位情况。据报道, 在hTERT C端中有几个不连续的短肽存在蛋白活性^[11], 预示着这几个短肽可能与hTERT在组织细胞内的定位有关。本研究依据这几个短肽序列, 拟在hTERT截取936-1132氨基基因序列, 与含抗原表位Xpree的真核载体质粒pcDNA3.1-HisA构建重组质粒, 转染人胚肾细胞293T, 并表达融合蛋白。为研究hTERT C端在肿瘤组织细胞内定位、结合的情况与应用奠定了实验基础, 为提肿瘤组织工程研究提供了的实验材料。

School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Lu Jun-xiong*, Studying for master's degree, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
future5@163.com

Corresponding author: Pang Jian-xin, Professor, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Received: 2011-10-24
Accepted: 2011-12-15

南方医科大学药学院, 广东省广州市 510515

卢钧雄*, 男, 1986年生, 广东省中山市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事抗肿瘤药理和评价方面研究。
future5@163.com

通讯作者: 庞建新, 教授, 南方医科大学药学院, 广东省广州市 510515

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)11-01977-04

收稿日期: 2011-10-24
修回日期: 2011-12-15
(20111024002/D · LX)

1 材料和方法

设计: 重组真核表达载体构建与表达。

时间及地点: 于2011-06在南方医科大学药学院完成。

材料: hTERT cDNA由南方医科大学基因工程研究所惠赠^[12], 真核表达载体pcDNA3.1-HisA、大肠杆菌DH5α和人胚肾细胞293T由本科室保存。

主要试剂:

试剂	来源
PCR 引物	南京金斯瑞生物有限公司合成
<i>Kpn</i> I 与 <i>Xba</i> I 限制性内切酶	大连宝生物工程有限公司
Ex Taq DNA 聚合酶、T ₄ DNA 连接酶、DNA Marker、小量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、	
脂质体转染试剂	天津伊美昂商务有限公司
细胞蛋白提取试剂盒	北京艾德莱生物技术有限公司
抗 Xpress 抗体	Invitrogen 公司
羊抗鼠 IgG 抗体	康为世纪公司

方法:

目的基因片段引物设计与PCR扩增: 根据真核表达载体pcDNA3.1-HisA图谱和Genbank中hTERT 936-1132氨基序列设计引物, 上引物游为5'-AAC GGT ACC A GAT ACC CGG ACC CTG GA-3'; 下游 5'-CGC TCT AGA C GTC CAG GAT GGT CTT GAA-3', 上下游引物分别加入*Kpn* I 及*Xba* I 酶切位点(下划线部分)。PCR体系如下: hTERT cDNA模板1 μL, 10×Ex Taq buffer 2.5 μL, 上下游引物各1 μL, Ex Taq聚合酶0.125 μL, 去核酸水19 μL, 总反应体系为25 μL。PCR反应条件为94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共 30个循环; 72 °C延伸5 min, 4 °C稳定5 min。将PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定(90 V, 40 min), 凝胶成像系统拍照后, 紫外灯下切割含有目的条带的凝胶块, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒对扩增片段进行回收。

重组pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132质粒构建及鉴定: 回收的扩增片段和真核表达载体pcDNA3.1-HisA质粒用*Kpn* I 及*Xba* I 双酶切后, 进行1%琼脂糖凝胶电泳, DNA回收试剂盒回收酶切产物。取双酶切后的目的基因片段和pcDNA3.1-HisA质粒, 按3:1的分子比例混合, 用T₄ DNA连接酶连接, 然后转化大肠杆菌DH5α感受态细菌中。将转化的感受态细菌涂布于含氨苄青霉素的LB平板, 次日随机挑取2个菌落, 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。用小量

质粒提取试剂盒提取质粒DNA, 将提取的质粒DNA用*Kpn* I 及*Xba* I 双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳, 检测阳性克隆并送上海生工生物工程有限公司测序鉴定。

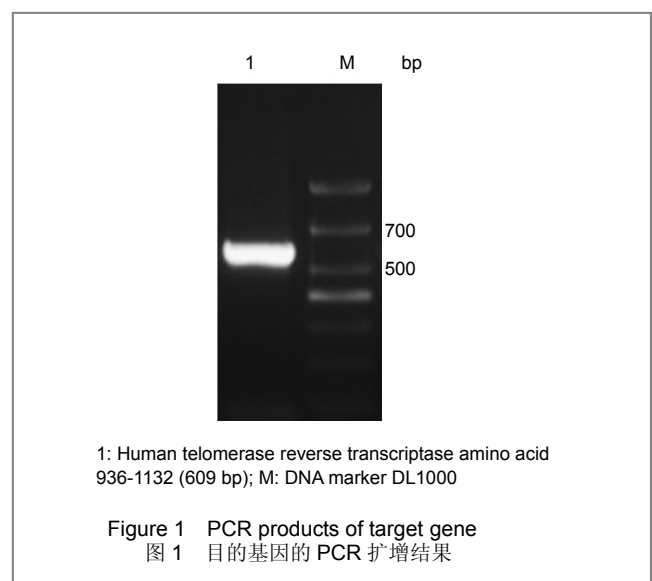
脂质体介导质粒转染: 按6孔板每孔加入3 μg质粒和2 μL脂质体的量, 分别将质粒与脂质体加入无血清、蛋白及抗生素的高糖DMEM培养基中, 在室温孵育5 min, 再将两者混合, 室温孵育20 min, 形成转染复合体。将转染复合体加入到各孔中, 体积分数5% CO₂、37 °C培养6 h后, 换完全培养基继续培养48 h。

免疫印迹检测蛋白的表达: 把转染后培养48 h的细胞轻轻刮下, PBS洗一遍后离心, 得到的细胞沉淀用细胞蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白。得到的蛋白行SDS-PAGE电泳后, 在转移槽中将蛋白从凝胶转移至PVDF膜上, 脱脂奶粉室温封闭2 h, 加入脱脂奶粉稀释的鼠抗Xpress抗体(1:2 000)作为一抗, 4 °C孵育过夜。TBST洗膜后加入山羊抗鼠IgG作为二抗, 室温孵育2 h。TBST洗膜后, ECL显色3 min, 压片曝光20 min, 胶片浸入显影液3 min后, 再浸入定影液3 min。上述反应均以空白293T细胞作为对照。

主要观察指标: 目的基因PCR扩增产物的鉴定、重组质粒pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132的构建与鉴定以及免疫印迹鉴定。

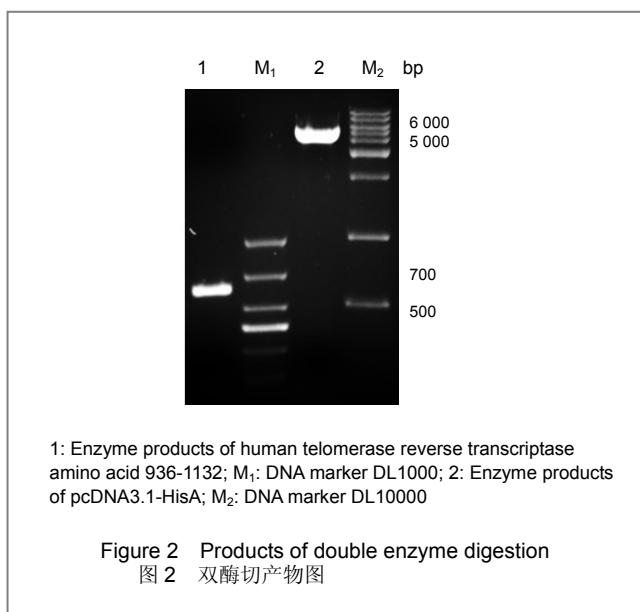
2 结果

2.1 PCR扩增产物的鉴定 以hTERT cDNA为模板, 加入上下游引物, PCR扩增得到目的片段(609 bp), 见图1。

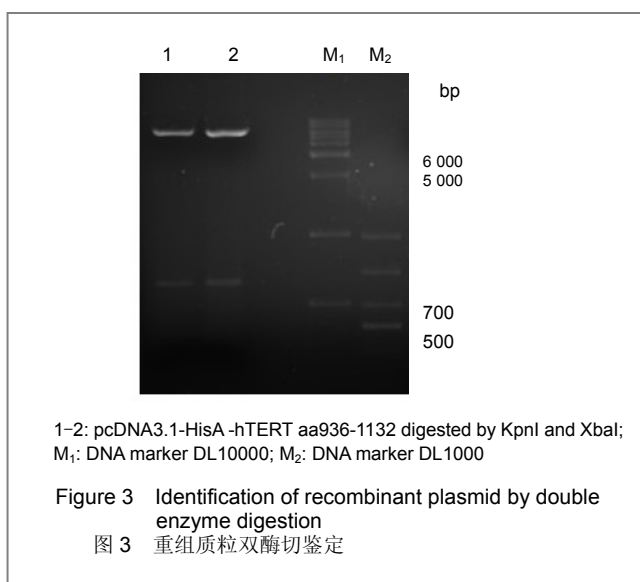


2.2 重组质粒pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132的构建与鉴定 将扩增的目的基因产物和pcDNA3.1-HisA分别用*Kpn* I 及*Xba* I 双酶切后得到两酶切产物,

见图2。

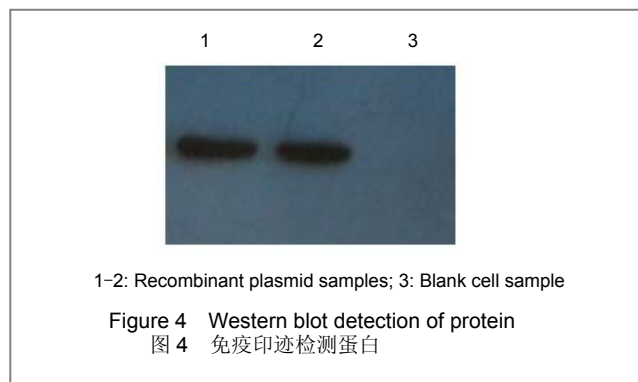


T₄ DNA连接酶作用下连接构建重组表达质粒 pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132。转化大肠杆菌抽 DH5α后, 次日挑选2个菌落, 振荡培养菌液过夜。次日提质粒后用 KpnI 及 XbaI 双酶切鉴定, 电泳结果显示, 1、2号转化子各自能跑出两片段, 与 pcDNA3.1-HisA 片段 (5.5 kb) 和目的基因片段大小相符, 可判断为阳性转化子, 见图3。



基因测序结果显示, 重组质粒基因序列测序结果与 NCBI 公布的基因序列 (GenBank: AF018167.1) 完全相同, 重组质粒构建成功。

2.3 免疫印迹鉴定 Western blot 检测结果发现, 蛋白中有针对 Xpress 抗体的特异性条带 (相对分子质量约为 26 000), 见图 4, 说明 pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132 转染 293T 细胞后可成功表达蛋白。



3 讨论

近年来随着分子生物学、细胞生物学、免疫学、组织工程学等相关学科的发展使肿瘤治疗取得了突破性进展。研究表明, 大多数人类正常组织中端粒酶为阴性, 而 85% 以上的肿瘤组织细胞表达端粒酶活性, 由此认为端粒酶活性对于肿瘤组织生长至关重要, 因此, 以端粒酶为靶点筛选端粒酶特异抑制剂是近年来寻找新抗肿瘤药物的热点^[13-15]。抑制剂模型可以从 hTERT 与端粒酶 RNA 相互作用原理方面构建^[16-19], 也可以从抑制 hTERT 在细胞内定位、结合方面构建。后者需首先研究 hTERT 的 C 端在细胞核仁内定位、结合的具体情况。

真核表达载体 pcDNA3.1-HisA 是可在真核动物中表达的高拷贝质粒, 其多克隆位点位于抗原表位 Xpress 与 EK 切割位点的后面, 目的基因插入到多克隆位点后, 所表达的蛋白带有抗原表位, 可以进行免疫印迹鉴定。因其含有 EK 切割位点, 可经肠激酶切割, 得到纯的目的蛋白, 且目的蛋白的生物学活性通常不受影响^[20-21]。293T 细胞源于人胚肾细胞系 293, 是进行外源基因表达时应用最广的宿主细胞之一。本文通过目的基因的 PCR 扩增, 双酶切后与真核表达载体 pcDNA3.1-HisA 连接, 构建重组质粒 pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132, 并经双酶切检验和基因测序方法证实成功构建重组质粒^[22-23]。通过脂质体转染入人胚肾细胞 293T。蛋白表达后, 经免疫印迹方法鉴定结果证实了重组真核载体 pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132 可在 293T 细胞中成功表达。从而为进一步研究 hTERT C 端在肿瘤组织细胞内定位、结合的情况与应用奠定了实验基础和提供了肿瘤组织工程的实验材料。

4 参考文献

- [1] Bollmann FM. The many faces of telomerase emerging extratelomeric effects. *Bioessays*. 2008;30(8):728-732.
- [2] Figura G, Hartmann D, Song Z, et al. Role of telomere dysfunction in aging and its detection by biomarkers. *J Mol Med*. 2009;87(12):1165-1171.
- [3] Daniels DJ, Clothier C, Swan DC, et al. Immediate and gradual gene expression changes in telomerase over-expressing fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(1):7-13.

[4] Hao FJ, Wu CJ, Xie XR, et al. Zhongguo Yike Daxue Xuebao. 2008; 37(3):369-370. 郝凤进, 吴成举, 谢鑫人, 等. 乳腺癌中端粒酶结构表达的研究[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(3):369-370.

[5] Bilsland AE, Cairney CJ, Nicol Keith W. Targeting the telomere and shelterin complex for cancer therapy: current views and future perspectives. J Cell Mol Med. 2011;15(2):179-186.

[6] Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. Nature. 2011;469(7328):102-106.

[7] Pang JX, Wu SG. Diyi Junyi Daxue Xuebao. 2001;21(2):156-157. 庞建新, 吴曙光. 端粒酶反转录酶的分子调节机制[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(2):156-157.

[8] Zhang P, Chan SL, Fu W, et al. TERT suppresses apoptosis at a premitochondrial step by a mechanism requiring reverse transcriptase activity and 14-3-3 protein binding ability. FASEB J. 2003;17(6):767-769.

[9] Shabbir Hossain, Sunitha Singh, and Neal F. Functional analysis of the C-terminal extension of telomerase reverse transcriptase. J Biol Chem. 2002;277(39):36174-36180.

[10] Corey DR. Telomeres and Telomerase From Discovery to Clinical Trials. Chem Biol. 2009;16(12):1219-1223.

[11] Huard S, Moriarty TJ, Autexier C. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity. Nucleic Acids Res. 2003;31(14):4059-4070.

[12] 石嵘, 马文丽, 高洋, 等. 干扰hTERT降低人乳腺癌MCF-7细胞对γ射线引起的DNA损伤反应[J]. 基础医学与临床. 2010;30(8):847-851.

[13] Fletcher TM. Telomerase: a potential therapeutic target for cancer. Expert Opin Ther Targets. 2005;9(3):457-469.

[14] Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, et al. Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from Immortal Cells. Science. 2007;315(5820):1850-1853.

[15] Folini M, Gandellini P, Zaffaroni N. Targeting the telosome: therapeutic implications. Biochim Biophys Acta. 2009;1792(4):309-316.

[16] Armbruster BN, Banik SS, Guo C, et al. N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo. Mol Cell Biol. 2001;21(22):7775-7786.

[17] Rouda S, Skordalakes E. Structure of the RNA-binding domain of telomerase implications for RNA recognition and binding. Structure. 2007;15(11):1403-1412.

[18] Sealey DC, Zheng L, Taboski MA, et al. The N-terminus of hTERT contains a DNA-binding domain and is required for telomerase activity and cellular immortalization. Nucleic Acids Res. 2010; 38(6): 2019-2035.

[19] Cao Y, Wang WG, Pang JX, et al. Nanfang Yike Daxue Xuebao. 2009;29(4):652-655. 曹莹, 王卫国, 庞建新, 等. 人端粒酶RNA突变体酵母三杂交诱饵质粒的构建[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(4):652-655.

[20] Gasparian ME, Ostapchenko VG, Dolgikh DA, et al. Biochemical Characterization of Human Enteropeptidase Light Chain. Biochemistry. 2006;45(2):113-119.

[21] Shahravan SH, Qu X, Chan IS, et al. Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. Protein Expr Purif. 2008;59(2):314-319.

[22] Sambrook J. Beijing: Science Press. 2002. 萨姆布鲁克 (黄培堂等译). 分子克隆实验指南(精编版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[23] Wang TH, Dong J, Qi JG. Beijing: Science Press. 2009. 王廷华, 董坚, 齐建国. 基因克隆与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计和实施, 第三作者和通讯作者进行实验评估, 资料收集为所有作者, 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

伦理要求: 文章未涉及相关伦理学内容。

本文创新性: 本实验选择在人胚肾细胞系 293T 细胞中表达人源的端粒酶反转录酶, 使表达出来的蛋白结构与活性更接近实际, 使实验结果更可靠。而且使用了真核表达质粒 pcDNA3.1-HisA, 其重组质粒所表达的蛋白含有抗原表位, 只需通过 Western blot, 便能鉴定目的蛋白是否表达, 并且带有纯化与切割位点, 能为下一部实验提供有利条件。虽然成功构建重组真核载体 pcDNA3.1-HisA-hTERT aa936-1132, 并在 293T 细胞中能表达, 但是对其转染后提高细胞表达量仍需进一步研究。

Mesh 词表词汇实用例句: 胚胎培养技术-Embryo Culture Techniques

例句: This study used teratogenic model *in vitro* which explored the effects of zinc antagonism on developmental toxicity of alcohol in whole embryo culture technique.
译文: 该文应用已建立的体外酒精致畸模型, 以全胚胎培养技术探讨了锌对酒精发育毒性的拮抗作用。
例句: Using the mouse whole embryo culture technique, the teratogenicity of cyclophosphamide (5, 10, 15, 20 mg/kg) was investigated *via* intraperitoneal administration to Kunming mice on day 8 of gestation, and the mechanism of its teratogenicity was also studied.
译文: 应用小鼠全胚胎培养技术, 通过妊娠第 8 天分别腹腔注射 5, 10, 15 和 20 mg/kg 环磷酰胺, 研究了该药对器官原基形成期胚胎的致畸

作用, 并对其致畸机理作了初步探索。
例句: Use of whole embryo culture technique *in vitro* for studying developmental toxicity of fluoride

译文: 应用全胚胎培养技术研究氟的发育毒性

英文主题词	Embryo Culture Techniques
英文注释	The technique of maintaining or growing mammalian EMBRYOS <i>in vitro</i> . This method offers an opportunity to observe embryonic development (GROWTH AND EMBRYONIC DEVELOPMENT), METABOLISM, and susceptibility to TERATOGENS.
中文主题词	胚胎培养技术
中文注释	体外维持和培养哺乳动物胚胎的技术。该方法为观察胚胎发育(生长和胚胎发育)、代谢和致畸剂易感性提供可能。