论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0844-03

HSP27基因的克隆与表达

金欢胜[1],吴雄飞[1],金锡御[1],杨清浩[2],倪 兵[3] (第三军医大学:[1]西南医院全军泌尿外科中心肾科,重庆 400038,[2]新桥医院泌尿外科,重庆 400037,[3]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 构建热休克蛋白27(Heat shock protein 27, HSP27)真核表达质粒以用于肾脏缺血预适应(ischemia Preconditioning, IP)的作用及机制研究。**方法** 利用乳腺癌细胞系MCS-7,用RT-PCR方法扩增HSP27全长基因,将HSP27基因克隆到真核表达载体pAAV-MCS中。重组质粒转染NIH3T3细胞,Western blot法鉴定重组质粒HSP27/pAAV-MCS能在哺乳动物细胞中正确表达。**结果** RT-PCR方法正确地扩增出全长HSP27基因。限制性内切酶酶切和测序结果证实HSP27基因克隆完全正确。重组质粒转染哺乳动物细胞系NIH3T3后,ECL Western blot法证实了目的基因能在其中正确表达。**结论** 成功地克隆真核表达重组质粒HSP27/pAAV-MCS,为下一步研究HSP27对肾脏缺血预适应的作用及其机制打下了基础。

关键词: HSP27;缺血预适应;真核表达质粒;肾脏

中图法分类号: R341; R394-33; R459.9 **文献标识码:** A

Cloning and expression of HSP27 gene

JIN Huan-sheng[1], WU Xiong-fei[1], JIN Xi-yu[1], YANG Qing-hao[2], NI Bing[3] ([1]Department of Kidney, Southwest Hospital; [2]Renal Diseases Research Center, Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital; [3]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct HSP27 eukaryotic expression plasmids. **Methods** Full-length HSP27 gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from breast cancer cell line MCS-7 and cloned into eukaryotic expression vector pAAV-MCS. After the recombinant plasmids transfected into NIH3T3 cells, the expression of HSP27 protein in the host cells was characterized by ECL Western blotting. **Results** Full-length HSP27 gene was amplified by RT-PCR correctly. The correct cloning of HSP27 gene in pAAV-MCS was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. ECL Western blotting results indicated that the target gene could express in the mammalian cell line NIH3T3. **Conclusion** Recombinant plasmid HSP27/pAAV-MCS had been cloned successfully, which would provide the foundation for investigating the role and the mechanism of HSP27 in the ischemia precondition of kidney.

Key words: HSP27; ischemia precondition; eukaryotic expression plamids; kidney

预适应是给予某些刺激后机体器官产生的对再次有害刺激的耐受性或适应性。这在生物学上是普遍现象。器官短暂缺血/再灌注后能耐受更长时间缺血的现象称为缺血预适应(ischemia preconditioning, IP)。1986年Murry等[1]首次观察到心脏的IP现象。以后研究表明机体的很多器官存在预适应现象,如脑、视网膜、肺、胃、肝脏、小肠、肾脏、骨骼肌等器官[2],但缺血预处理对肾缺血再灌注损伤的保护作用机制,国内外少见报道。

许多研究报道大鼠肾经短暂性缺血再灌注后,很快出现HSP27 mRNA和HSP27蛋白表达增高,且增多的HSP27 mRNA和HSP27蛋白伴随肾脏对缺血及氧化损伤力的抵抗力增加,但HSP27的作用机制却不甚明了[3]。因此,本研究拟利用从组织中扩增并克隆HSP27基因到真核表达载体中,在体外鉴定其表达,为后续的将其转染到鼠肾内观察HSP27介导IP的作用及其机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pAAV-MCS真核表达质粒购自Stragagene公司;小鼠成纤维细胞系NIH3T3和乳腺癌细胞系MCS-7由本校全军免疫学研究所惠赠;脂质体转染试剂盒Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司;RNA抽提试剂Trizol购自Gibco公司;逆转录酶、*Taq*酶、

作者简介:金欢胜(1968-),男,浙江省诸暨市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤和肾移植方面的研究,现在新桥医院泌尿外科工作。电话:(023)68774624,E-mail:jhsjb0008@sina.com

收稿日期:2004-11-05;修回日期:2005-04-12

T4 DNA 连接酶、各种内切酶、dNTP、RNA 酶抑制剂、Oligo(dT)$_{15}$ 等均为 Takara 公司产品；质粒小量抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均购自 Roche 公司。引物合成和 DNA 测序均由上海申友生物技术公司完成。

1.2　人 HSP27 基因的扩增

1.2.1　逆转录　　由于热休克蛋白广泛表达于肿瘤细胞中，而 HSP27 在乳腺癌细胞株 MCS-7 中高表达，故利用本校全军免疫学研究所赠送的该细胞进行 HSP27 基因的制备。MCS-7 细胞在完全 DMEM 培养基中按常规方法培养至 90% 满底后，再在 42 ℃热休克 3 h 以促进 HSP27 mRNA 表达，提高 RT-PCR 及随后克隆的效率。用 0.25% 的胰蛋白酶 PBS 溶液消化贴壁生长并已经热休克的 MCS-7 细胞，收集细胞。按 Trizol 试剂说明书从热休克处理的 MCS-7 细胞中抽提细胞总 RNA。制备的总 RNA 进行定量和琼脂糖凝胶鉴定。再用逆转录酶 AMV 对总 RNA 进行反转录，所用引物为 Oligo(dT)$_{15}$。产物冻存于 − 20 ℃备用。

1.2.2　PCR 扩增　　根据 HSP27 的序列，利用计算机软件 DNAstar 进行 PCR 引物设计，得到上游引物 5′-**GCGAATTC**CCTGCTAAAAATACCCGACT-3′ 和下游引物 5′-**GCAGCTG**GATGCCCACCCCTGC-3′。该对引物跨越 HSP27 全长 ORF。其中上下游引物中黑体部分序列分别为游离的 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切位点序列，带下划线部分为保护碱基。以制备的总 MCS-7 细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 反应参数为：95 ℃ 5 min，95 ℃ 55 s，59.7 ℃ 55 s，72 ℃ 1.5 min，30 个循环，− 72 ℃ 10 min。反应结束后，取 5 μl 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定。用 DNA 胶回收试剂盒回收鉴定正确的 PCR 产物片段。

1.3　重组真核表达的构建和鉴定

1.3.1　定向克隆　　回收的 PCR 产物 DNA 片段和用 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切的真核表达载体 pAAV-MCS 在 T4 连接酶作用下，于 16 ℃反应过夜。氨苄平板筛选后，对来自阳性克隆的质粒用 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ进行双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.2　测序鉴定　　用载体 pAAV-MCS 自带的上游测序引物 5′-ATTCTGAGTCCAAGCTAGGC-3′ 和下游测序引物 5′-TAGAAGGACACCTAGTCAGA-3′，将重组质粒送到上海申友生物技术公司进行通测。HSP27 中间序列测序引物由该公司根据已经测定序列，用步移法进行测定。

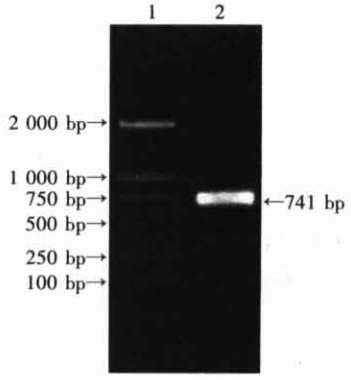
1.4　重组质粒的表达鉴定

NIH3T3 细胞在完全 DMEM 培养基中生长到 80% 满底时，按产品说明书，用转染试剂 Lipofectamine™ 2000 将重组质粒 HSP27/pAAV-MCS 转染该细胞。24 h 后取出细胞培养皿，PBS 洗涤后，向培养皿中加入 200 μl 1 × SDS-PAGE 上样缓冲液和 20 μl 完全蛋白酶抑制剂，轻轻吹打下细胞，收于 0.5 ml EP 管中，置沸水浴中 10 min，再用超声处理 2 次。4 ℃，12 000 × *g* 离心 10 min。取上清于 12% SDS-PAGE 胶中电泳。电转印于硝酸纤维素膜上，4 ℃于封闭液中封闭过夜。次日按试剂盒说明书进行抗原抗体反应和发光实验，最后于暗盒中对 X 线片曝光 10 s，并进行后续处理。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增 HSP27 基因

Trizol 试剂抽提的总 RNA 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 为 1.92，浓度为 0.775 μg/ml。总 RNA 产物在 1% 变性琼脂糖凝胶电泳中显示出 3 条完整的带型，说明总 RNA 有着非常好的完整性。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，可见清楚的约 741 bp 的条带，大小和 HSP27 预期大小一致(图 1)。



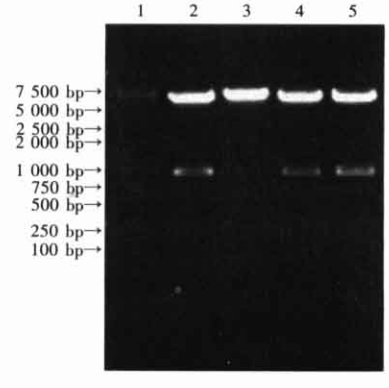
1：DL-2000 marker；2：HSP27

图 1　PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶的电泳结果

Fig 1　Electrophoresis of HSP27 PCR product on 1% agarose

2.2　重组质粒的酶切鉴定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，回收 741 bp 大小的 DNA 片段，并用 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切，再回收酶切片段。将真核表达质粒 pAAV-MCS 用同样的两种内切酶消化后，回收大片段。将这两种回收片段用 T4 连接酶连接后，转化大肠杆菌 DH5α。经氨苄平板筛选后，扩增阳性克隆，抽提质粒，再用 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ进行双酶切并于含 EB 的 1% 琼脂糖凝胶中电泳。结果显示(图 2)，来自 4 个阳性克隆的质粒均可以被切开，电泳后分别出现在 5 000 bp 和 740 bp 的位置，它们和目的片段 HSP27(741 bp) 和载体 pAAV-MCS(4 270 bp) 的理论值大致相符。



1：DL-2000 marker；2 − 5：*Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ double-digested recombinant plasmids from the ampicillin-resistance bacteria clones

图 2　HSP27/pAAV-MCS 重组质粒 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切鉴定

Fig 2　*Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ double digestion of recombinant plasmid HSP27/pAAV-MCS

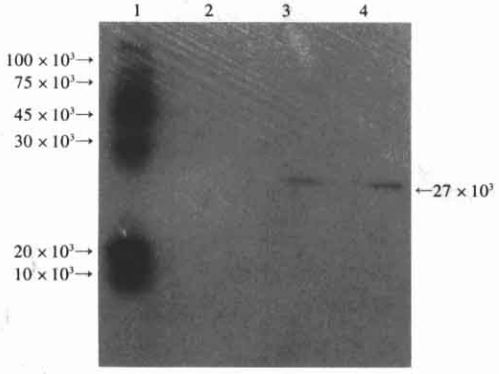
2.3　重组质粒的测序鉴定

重组质粒提取后寄送上海申友生物技术有限公司进行测

序，采用前述的上游测序引物和下游测序引物，以及该公司自行设计的基于步移法的引物，对重组质粒进行通测。测序结果证实插入片段序列与理论值完全一致。

2.4 重组质粒 HSP27 蛋白的表达鉴定

ECL Western blotting 法结果（图 3）显示，所表达的目的蛋白条带的位置在 Mr 27 000 左右。从图 3 可以看出，抗体同抗原的结合非常特异，未见任何其它杂带。在阴性对照泳道（空 3T3 细胞），未见任何特异条带。面孔加 30 μl 上样，其浓度为 1 μg/μl。



1: Protein markers for ECL Western blotting; 2: Lysate supernatant of 3T3 cells, used as control; 3, 4: Lysate supernatant from recombinant plasmid HSP27/pAAV-MCS transformed 3T3 cells

图 3 重组质粒转染 3T3 细胞后的 Western blot 分析

Fig 3 Western-blot analysis of recombinant plasmid transformed 3T3 cells

3 讨论

缺血预处理对心缺血再灌注损伤有保护作用的机制已基本明确。但缺血预处理对肾缺血再灌注损伤的保护作用机制，国内外少见报道。本研究利用乳腺癌细胞系 MCS-7，用 RT-PCR 技术成功地扩增并克隆了全长 HSP27 基因，并在转染了重组真核表达质粒 HSP27/pAAV-MCS 的 NIH3T3 细胞中检测到其特异的表达，为下一步在细胞水平和动物体内水平研究 HSP27 对缺血预适应的作用及其机制打下了坚实的基础。

在 IP 对心脏的作用研究中，缺血预处理的机制极为复杂，有大量假说在各种动物模型上证实。如心肌细胞 cAMP 生成减少、蛋白激酶 C 激活、热休克蛋白合成增多、丝裂素活化蛋白激酶激活等[4]。在不同的实验方法、动物种属中，缺血预处理的机制也不同，对于同一种动物不同的脏器，其机制也不同，在缺血预处理对肾的保护作用中，可能只有上述的某些因素参与。热休克蛋白是一组在进化上高度保守的蛋白质，除高热外，缺血、组织损伤、病毒或细菌感染等也会产生，它在许多领域证实能发挥各种重要功能[5]。近年来，文献[6]报道，热休克预处理中产生的 HSP27 能抑制核转录因子 κB（NFκB）的活化，进而阻断促炎因子的表达。NFκB 广泛存在于真核细胞内，是将信息从细胞浆传到细胞核，引起相应基因表达的主要转录因子。静息情况下，NFκB 位于细胞浆内与 κB 抑制蛋白（inhibitory κB，IκB）结合成复合物处于失活状态，IκB 有多种构成形式，IκB/MAD3 是最能表现其分子生物学功能的形式，细胞受到刺激后，IκBa 磷酸化，并被降解，从 NFκB/IκBa 复合物上解离下来，NFκB 随即通过核膜上的受体进入细胞核与靶基因 κB 位点结合，迅速诱导靶基因的转录。NFκB 调控着诸多参与免疫、炎症反应因子（如细胞粘附分子、细胞因子和 iNOS 等）的表达，因此通过 NFκB 与受体结合，进而阻断促炎因子的表达。文献[7]报道，HSP27 可与 NFκB 结合，阻断 NFκB 向细胞核的移位；同时 HSP27 可诱导 IκBa 的合成，也可能是通过阻止 IκBa 的磷酸化而阻止 IκBa 的降解，从而增加 IκBa 的含量。缺血预处理后可诱导 HSP27 的表达增多，从而阻断促炎因子的表达而对肾缺血再灌注损伤起保护作用。因此，如果在缺血再灌注之前，用 HSP27 真核表达质粒转化或用表达 HSP27 的重组病毒感染宿主细胞，将应该起到缺血预适应的功效，使其具有重要的理论和实际价值。如吴雄飞等[8]利用缺血预适应手段在大鼠体内证实了该方法能有效地减少移植肾的排斥反应。如果能证实 HSP27 可以起着 IP 的功效，则将大大降低缺血预适应操作所带来的风险和副作用，提高临床治疗效率。

参考文献：

[1] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124 - 1136.

[2] 王曙逢，李国威. 缺血预适应对大鼠移植小肠的早期保护作用[J]. 西安交通大学学报（医学版），2003，24(4)：368 - 371.

[3] Dhodda V K, Sailor K A, Bowen K K, *et al*. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis[J]. J Neurochem, 2004, 89(1): 73 - 89.

[4] Parratt J R. Possibilities for the pharmacological exploitation of ischemic preconditioning[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(4): 991 - 1000.

[5] 赵永亮，余佩武，蔡志民. 热休克蛋白与肿瘤的免疫治疗[J]. 免疫学杂志，2003，19(3)：S72 - S75.

[6] Wang H R, Ryan M, Wispe J R. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking Ic-B degradation and NFκB nuclear translocation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231(4): 257 - 263.

[7] Feinstein D L, Galea E, Aquino D A, *et al*. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric oxide synthase expression by decreasing NFκB activation[J]. J Biol Chem, 1996, 271(30): 17724 - 17735.

[8] 吴雄飞，范连慧，余荣杰，等. 缺血预适应预防大鼠移植肾排斥反应的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(21)：1909 - 1911.

（编辑 刘洪娥）