文章编号:1000-5404(2007)13-1273-03

论著

人HNF1α真核表达载体的构建及表达

娄桂予,陈 敏,陈 彬,陈 健,李渝萍,周度金 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建人肝细胞核因子-1α(hepatocyte nuclear factor 1α,HNF1α)真核表达载体,在体外表达并检测。**方法** 提取HepG2总RNA,用RT-PCR方法制备HNF1α cDNA,进行T-A克隆。*Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ双酶切测序正确的重组质粒,回收HNF1α cDNA片段,将其亚克隆于pcDNA3.1(+)载体的多克隆位点内。将构建好的真核表达质粒用脂质体法转染HepG2细胞,RT-PCR和免疫印迹法检测HNF1α的表达。**结果** 正确构建了pcDNA3.1(+)-HNF1α重组载体,并且在转染该质粒的HepG2细胞中检测出了HNF1α的高表达。**结论** 成功地构建了人HNF1α真核表达载体,其可以在体外表达。

关键词:HNF1α基因;真核细胞;表达载体;转染
中图法分类号:Q503;Q782 **文献标识码**:A

Construction and expression of human HNF1α eukaryotic expression vector

LOU Gui-yu, CHEN Min, CHEN Bin, CHEN Jian, LI Yu-ping, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression vector of human HNF1α gene and to observe its expression *in vitro*. **Methods** Total RNA from HepG2 cell was used to acquire human HNF1α cDNA by RT-PCR. Then HNF1α cDNA was cloned into T-A vector. The recombined vector confirmed by sequencing was digested by *Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ to obtain HNF1α cDNA fragment, then the fragment was subcloned into multiple sites of pcDNA3.1(+) vector. The identified recombinant plasmid was transfected into HepG2 cell with liposome. The expressions of HNF1α in the cell were determined with RT-PCR and Western blot. **Results** The recombinant pcDNA3.1(+)-HNF1α plasmid was constructed successfully and the overexpression of HNF1α gene could be detected in the transfected HepG2 cell. **Conclusion** The recombinant expression pcDNA3.1(+)-HNF1α vector is successfully constructed and can be expressed *in vitro*.

Key words: HNF1α gene; eukaryotic cell; expression vector; transfection

HNF1α(又被称为LF-1、TCF1)属于同源域蛋白家族成员,是肝脏富含的重要转录因子之一。除肝脏外,也表达于胰腺、小肠、胃、肾组织。起着调控该组织基因表达的重要作用。通过对靶基因的调控,HNF1α在糖、脂、固醇、蛋白质代谢平衡中发挥着重要作用,是胆汁酸与胆固醇代谢的重要调节因子。为了深入了解该转录因子的作用,需要进一步鉴定HNF1α的靶基因及和其他调节因子的相互作用。我们构建了HNF1α的真核表达质粒,为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pCR2.1、pcDNA3.1(+)质粒、Superscript逆转录酶、Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司;菌株DH5α为本室保存;限制性内切酶*Hind* Ⅲ、*Eco*R Ⅰ,T_4DNA连接酶均购自于NEB公司;Hotstar *Taq* DNA聚合酶、dNTPs为Qiagen公司产品;Tripure购于Roche公司。抗人HNF1多抗(sc-8986)购于Santa Cruz公司。辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗及抗人GAPDH、DAB显色试剂为北京中山产品。引物合成和序列测定由上海生工公司完成。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR扩增人HNF1α全长cDNA PCR常规方法提取HepG2细胞RNA,并进行逆转录。以逆转录产物为模板,

基金项目:国家自然科学基金(30671056,30600299);第三军医大学科研创新基金(2006XG);全军医学科研"十一五"计划课题(06Q055)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30671056, 30600299), the Scientific Research Fundation of Third Military Medical University (2006XG) and the Medical Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06Q055)

作者简介:娄桂予(1974-),女,河南省郑州市人,博士研究生,讲师,主要从事核受体基因调控方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752940,E-mail: louguiyu3@hotmail.com
通讯作者:周度金,电话:(023)68752940,E-mail:dujingzhou@yahoo.com

收稿日期:2006-04-24;**修回日期**:2007-01-19

PCR 扩增 HNF1α 全长。上游引物：5′-CCCAAGCTTATGGTTTCTAAACTGAGCCAGC-3′，下游引物：5′-CGGAATTCTTACTGGGAGGAAGAGGCCATCT-3′。下划线部分序列分别为 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ的酶切位点。产物大小为 1 903 bp。

1.2.2 构建 pCR2.1HNF1α 胶回收 HNF1α PCR 产物，与 pCR2.1 连接。连接产物转化 DH5α 感受态细胞。挑取克隆进行 *Eco*R Ⅰ酶切鉴定和 DNA 序列分析。

1.2.3 pcDNA3.1(+)-HNF1α 真核表达载体的构建 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切质粒 pCR2.1HNF1α，同时双酶切的 pcDNA3.1(+)真核表达质粒。连接目的片段和载体，转化 DH5α 感受态细胞。挑取克隆进行 *Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ酶切鉴定。将重组质粒送至上海生工生物工程公司进行测序。

1.2.4 重组质粒转染 HepG2 细胞 具体方法参见 Lipofectamine 2000 产品说明书。操作步骤是：转染前 1 d，消化细胞，以 4×10^5 的密度接种于 6 孔。当细胞生长至 90% ~95% 融合时，准备转染。置备 Lipofectamine 2000/质粒混合液：A 反应管：分别加入 pcDNA3.1(+)4 μg(对照组)和 pcDNA3.1(+)-HNF1α 4 μg(转染组)用 200 μl OPTIM 稀释。B 反应管：每 8 微升 Lipofectamine 2000，用 200 μl OPTIM 进行稀释，室温放置 10 min。混合两管，室温放置 20 min。吸尽孔中细胞培养液，用 PBS 冲洗 2 遍，用 OPTIM 洗 1 遍。加入 Lipofectamine 2000/质粒混合液，并补加 500 μl OPTIM。转染 5 h 后，弃去转染液，加入正常细胞培养液，24 h 后，收集细胞。

1.2.5 转染细胞中 HNF1α 基因表达的鉴定 采用半定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 HNF1α 基因表达。分别提取正常组和对照组细胞 RNA，进行 RT-PCR，操作过程同前所述。扩增 HNF1α 引物：上游：5′-TCTACAACTGGTTTGCCAACC-3′；下游：5′-GGCTTCTGTACTCAGCAGGC-3′。对照 β-actin 引物：上游：5′-ATGGGTCAGAAGGATTCCTAT-3′；下游：5′-AGGCGTACAGGGATAGCACA-3′。扩增条件为 94 ℃，15 min；94 ℃，30 s；58 ℃，30 s；72 ℃，30 s；35 次循环；72 ℃，10 min。PCR 产物长度分别为 311 bp 及 295 bp。

Western blot：提取正常组和对照组细胞总蛋白，Bio-Rad 公司蛋白检测试剂进行蛋白定量。12% SDS-PAGE 电泳，上样量为 50 μg 蛋白。电泳完毕后，半干转膜 12 V，1 h。PVDF 膜室温封闭 1 h，和抗人 HNF1α(1∶200)4 ℃孵育过夜，PBST 洗膜，室温下和二抗孵育 1 h，DAB 显色。内参为 GAPDH(1∶1 000)。

图像分析系统分析条带的灰度值。

1.3 统计学处理

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件，组间比较行方差分析和 t 检验。

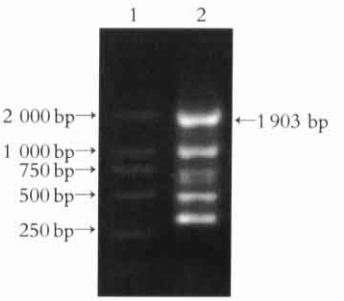
2 结果

2.1 HNF1α 基因的 RT-PCR 结果

RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，可见 1 条约 1 900 bp 的扩增区带，与预期的结果一致。见图 1。

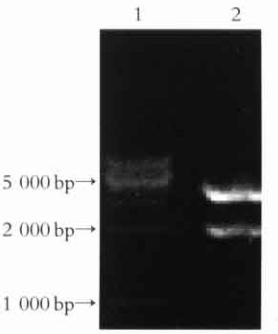
2.2 重组 pCR2.1HNF1α 的鉴定

选择白色菌落扩增后提取质粒，经 *Eco*R Ⅰ酶切鉴定(在插入片段的两侧存在 *Eco*R Ⅰ酶切位点)可切出约 1 900 bp 的片段，表明 cDNA 已克隆于载体中，命名 pCR2.1HNF1α(图 2)。直接以 pCR2.1HNF1α 为模板进行测序，得到克隆片段的 DNA 序列经计算机分析，与已知的人 HNF1α cDNA 序列相符，测序结果图略。



1：标准(DL2000)；2：HNF1α cDNA

图 1 RT-PCR 扩增 HNF1α 全长 cDNA 电泳图

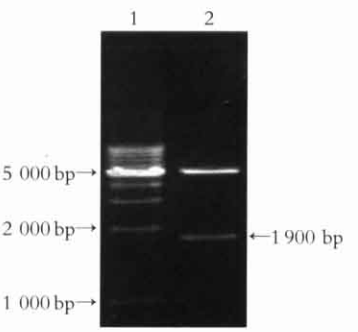


1：1 kb 标准；2：阳性克隆

图 2 重组质粒 pCR2.1HNF1α 的酶切鉴定

2.3 pcDNA3.1(+)-HNF1α 真核表达载体鉴定

pcDNA3.1(+)-HNF1α 用 *Hind* Ⅲ、*Eco*R Ⅰ双酶切后，可切出 1 900 bp 左右的目的基因带，表明载体构建正确。pcDNA3.1(+)-HNF1α 酶切鉴定见图 3。

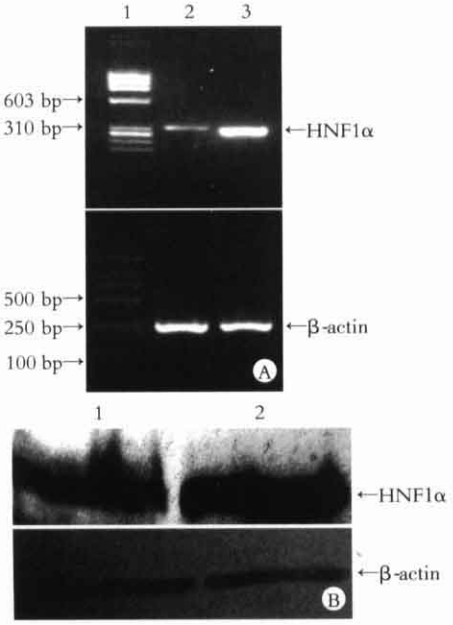


1：1 kb 标准；2：阳性克隆

图 3 重组质粒 pcDNA3.1(+)-HNF1α 的酶切鉴定

2.4 pcDNA3.1(+)-HNF1α 在 HepG2 细胞中的表达

重复实验 3 次，统计对照组与转染组 HNF1α 条带与内参条带的灰度比值的差别。结果显示：正常 HepG2 细胞中有 HNF1α 的表达，转染 pcDNA3.1(+)-HNF1α 真核表达载体后，HNF1α 有过量表达($P<0.01$)。表明 pcDNA3.1(+)-HNF1α 在 HepG2 细胞中得到表达。见图 4。



A：RT-PCR 结果　1：标准；2：对照组；3：转染组

B：Western blot 结果　1：对照组；2：转染组

图 4　HNF1α 在 HepG2 细胞中的过表达

3　讨论

HepG2 细胞是人肝癌细胞系，可表达 HNF1α。所以我们以 HepG2 细胞为材料，扩增了 HNF1α cDNA。PCR 尽管有非特异性条带的出现，但相应位置上出现了目的条带，后也被证实正确。pcDNA3.1(+)-HNF1α 重组质粒经双酶切并经再次测序后，证明克隆成功。将该质粒转染 HepG2 细胞发现：转染组中 HNF1α mRNA 较对照组高 6 倍以上($P<0.01$)，且蛋白表达量也明显升高($P<0.01$)。这表明 pcDNA3.1(+)-HNF1α 在细胞内得到了表达，可作为下一步研究的工具。

HNF1α 位于 2 号染色体 q24，其 mRNA 由 3 249 bp 碱基组成，编码 628 个氨基酸。HNF1 包括 HNF1α 和 HNF1β 两种同源蛋白。这些同源蛋白具有相同的 DNA 结合域，但有不同的转录激活特征。两者以异源或同源二聚体形式组成转录调节因子，可与位于启动子或增强子上的 GTTAATNATTAAC 回文序列结合，起着正/负调节作用[1]。HNF1α 主要在肝中表达，调控多种肝脏表达的基因的表达，如人 CYP1A2、CYP2E1、L-FABP、SI[2]、GSTs[3] 等。所以最初 HNF1α 被认为是肝脏特异性转录因子，后来的实验证明，小肠、肾脏、肾上腺的基因也受其调控如 CFTR[4]。通过对基因的表达调控或与其他转录因子相互作用，HNF1α 在糖脂代谢中发挥重要作用。也有研究报道 HNF1α 调控胆汁酸代谢的相关酶的表达，参与了胆汁酸平衡的调节[5]。

通过生物信息学的预测结果提示：我们要研究的基因启动子中可能含有 HNF1α 的结合位点。为了验证这一预测，需要构建真核表达载体，使其在细胞中过表达，观察目的基因的表达变化；并将该质粒与目的基因启动子的报告质粒共转染细胞，观察 HNF1α 对该启动子活性影响，以鉴定受 HNF1α 调控的靶基因。目前，这一工作正在开展中。

参考文献：

[1] Green J, Naot D, Cooper G. Hepatocyte nuclear factor 1 negatively regulates amylin gene expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(2): 464-469.

[2] Boudreau F, Zhu Y, Traber P G. Sucrase-isomaltase gene transcription requires the hepatocyte nuclear factor-1 (HNF1) regulatory element and is regulated by the ratio of HNF1 alpha to HNF1 beta[J]. J Biol Chem, 2001, 276(34): 32122-32128.

[3] Whalen R, Voss S H, Boyer T D. Decreased expression levels of rat liver glutathione S-transferase A2 and albumin during the acute phase response are mediated by HNF1 (hepatic nuclear factor 1) and IL6DEX-NP[J]. Biochem J, 2004, 377(Pt 3): 763-768.

[4] Mouchel N, Henstra S A, McCarthy V A, *et al*. HNF1alpha is involved in tissue-specific regulation of CFTR gene expression[J]. Biochem J, 2004, 378(Pt 3): 909-918.

[5] Shih D Q, Bussen M, Sehayek E, *et al*. Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism[J]. Nat Genet, 2001, 27(4): 375-382.

（编辑　龙　亮）

《军医大学学报(英文版)》征稿启示

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊，是中国英文版科技论文统计源期刊，并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。国内统一刊号：31-1002/R，国际标准刊号：ISSN 1000-1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图，无需缴纳版面费；亦不收取审稿费；无稿酬。投稿要求：中(或大摘要)、英文稿各 1 份，照片提供 3 份。电子投稿 E-mail：kimliu@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。联系地址：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038)，电话：(023)68752782。