文章编号:1000-5404(2009)14-1413-02

技术方法

人脂联素真核表达载体的构建及其表达

周 静[1],姜 政[1],孙 伟[2],陶小红[1],黄爱龙[3],王丕龙[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院消化内科,[3]肝炎研究所,重庆400016;[2]第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆400038)

摘 要:目的 构建人脂联素的真核表达载体,并检测其融合蛋白在真核细胞COS-7中的表达。**方法** 从人脂肪组织中提取总RNA,通过RT-PCR方法获得人脂联素基因,将其克隆到真核荧光表达载体pEGFP-N1上,构建重组质粒pEGFP-N1-AdipoQ,转染至真核表达细胞COS-7中,并通过SDS-PAGE和Western blot检测融合蛋白在真核细胞中的表达。**结果** 通过RT-PCR方法克隆人脂联素基因744 bp,测序结果显示,1个碱基发生突变,654位:A→T,突变率为0.1%,氨基酸Glu→Asp。通过SDS-PAGE和Western blot检测融合蛋白分子质量约为55×10^3(绿色荧光蛋白分子质量约为27×10^3),说明脂联素基因在真核细胞中表达并与绿色荧光蛋白融合。**结论** 成功的构建了真核表达载体,并在真核细胞中表达。

脂联素(adiponectin, AdipoQ)是脂肪细胞特异性分泌的多种细胞因子之一,其生理作用机制尚未阐述清楚,但越来越多的证据显示体内脂联素水平的异常在非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发展过程中起着重要的作用,可能参与了胰岛素抵抗、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和肝硬化的发生与发展,对NAFLD的有效防止可阻止慢性肝病进展并改善预后[1]。本研究从人脂肪组织中提取mRNA,通过RT-PCR获取脂联素基因,将其亚克隆到真核表达载体pEGFP-N1上,并转染到真核表达细胞COS-7中,通过RT-PCR、Western blot以及绿色荧光检测融合蛋白的表达,旨在为进一步研究其信号转导通路及在NAFLD中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织和载体 脂肪组织取自本院胃肠外科手术患者腹部皮下脂肪组织,大肠杆菌菌株JM109及真核表达载体pEGFP-N1由重庆医科大学附属第一医院向廷秀博士惠赠,细胞株COS-7由重庆医科大学肝炎研究所郭辉老师惠赠。

1.1.2 主要试剂及工具酶 Trizol购自Tiangen公司,RT-PCR试剂盒,限制性内切酶*Hind*Ⅲ、*Sal*Ⅰ和T_4 DNA Ligase购自TaKaRa公司,胶回收纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,质粒提取试剂盒购自Omega公司,Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒和兔抗GFP抗体购自碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 根据GenBank中人脂联素基因序列设计其引物,上游引物:5′-CCAAGCTTATGCTGTTGCTGGGAGCT-3′,其前加入*Hind*Ⅲ酶切位点及其保护性碱基CC,下游引物:5′-GCGTCGACTAGTGGTGATCAGTTGGTG -3′,其前加入*Sal*Ⅰ酶切位点及其保护性碱基GC,扩增长度为744 bp。同时设计内参β-actin引物,上游引物:5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,下游引物:5′-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3′,扩增长度为272 bp,引物由上海生工合成。

1.2.2 脂肪组织总RNA的提取 取约50 mg脂肪组织放入液氮预冷的碾钵中,边加液氮边碾磨,直到碾成粉末,将其转移到预先加有1 ml Trizol的EP管中,按Trizol说明书操作获取脂肪组织的总RNA。取少部分RNA测其纯度和浓度并电泳。

1.2.3 RT-PCR扩增目的基因 严格按照说明书进行操作,所获PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,同时进行凝胶回收。

1.2.4 重组载体的构建 分别将目的基因和质粒pEGFP-N1进行*Hind*Ⅲ和*Sal*Ⅰ双酶切,并经PCR纯化试剂盒纯化;将纯化的目的基因和pEGFP-N1按4∶1(物质的量)比例,在4 ℃条件下连接过夜并转化感受态细菌JM109[2],通过卡那霉素(25 μg/ml)抗性筛选重组载体,重组质粒命名为pEGFP-N1-AdipoQ。

1.2.5 重组载体的鉴定 取1.5 ml过夜菌液提取重组质粒,与空质粒pEGFP-N1一起分别进行单酶切(*Hind*Ⅲ)、双酶切(*Hind*Ⅲ和*Sal*Ⅰ)。而后进行1%琼脂糖凝胶电泳,重组质粒经过双酶切是否能够切出目的基因条带。为了进一步从序列的准确性上得到验证,将*Sal*Ⅰ和*Hind*Ⅲ酶切后电泳出现约744 bp的阳性克隆菌株送到上海生物工程有限公司测序,使用T7通用引物,并将测序结果与GenBank中发表的脂联素cDNA序列进行比对。

1.2.6 绿色荧光及Western blot检测重组质粒在真核细胞中的表达 将重组质粒pEGFP-N1-AdipoQ以脂质体介导的方法转染COS-7细胞,并以pEGFP-N1和灭菌ddH_2O为对照,每组转染2孔。24 h后在荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达情况。同时收集转染48 h后的细胞分别提取总RNA,行RT-PCR

基金项目:重庆市卫生局科研项目(06-2-101)
Supported by the Scientific Research Program of Chongqing Municipal Health Bureau (06-2-101)
作者简介:周 静,女,四川省宜宾市人,硕士研究生,主要从事非酒精性脂肪肝病方面的研究。E-mail:zji4321228@sina.com
通信作者:姜 政,E-mail:jianggoooddoctor@mail.china.com
收稿日期:2008-09-09;修回日期:2009-03-01

反应,所获 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。将上述 3 组转染细胞分别用 PBS 洗涤 3 次后,加入裂解液 400 μl 和 PMSF 4 μl 提取蛋白。分别取 50 μl 蛋白溶液加入 5 × SDS 上样缓冲液,混匀,沸水浴 5 min,离心取上清液上样进行聚丙烯凝胶电泳(SDS-PAGE),然后电转将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上,以兔抗 GFP 抗体及鼠抗 β-actin 为一抗,以抗兔 IgG 和抗鼠 IgG 为二抗,DAB 显色,至显色清晰后,立即置于蒸馏水中终止显色,扫描保存。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增目的基因

提取脂肪总 RNA,经过琼脂糖凝胶电泳可见 28S、18S 和 5S 3 个条带,分光光度计结果:$D(260)/D(280)$ 为 1.88,$D(260)/D(230)$ 为 1.57,浓度约为 1 μg/μl,符合实验的需求。同时进行 RT-PCR 扩增并 1% 琼脂糖凝胶上电泳,在 744 bp 附近有特异性扩增条带,此条带电泳位置与实验设计一致,提示扩增产物为脂联素片段。

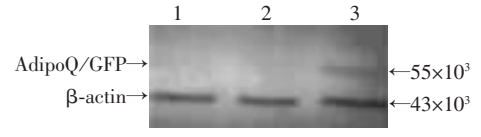
2.2 重组质粒 pEGFP-N1-AdipoQ 鉴定

将重组质粒与空质粒一起分别进行单酶切(*Hind*Ⅲ)、双酶切(*Hind*Ⅲ和 *Sal*Ⅰ),同时进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,重组质粒双酶切可见 2 个条带,大片段与载体 pEGFP-N1 大小(4 700 bp)一致,而小片段与目的基因大小(744 bp)一致,而空质粒中无目的基因,证明重组质粒构建成功。通过测序分析,发现目的基因片段有 1 个碱基突变,654 位:A→T,突变率为 0.1%,氨基酸 Glu→Asp,因同为酸性氨基酸,不影响其编码及功能。

2.3 重组质粒在真核细胞中的表达

2.3.1 绿色荧光检测 转染 24 h 后在荧光显微镜下观察,pEGFP-N1 转染组和重组质粒转染组可见到绿色荧光,灭菌 ddH_2O 转染的细胞未见到荧光。

2.3.2 Western blot 检测 在线软件预测该绿色荧光蛋白相对分子质量约为 27×10^3,融合蛋白分子质量约为 55×10^3。Western blot 检测经 DAB 显色,发现重组质粒转染组在 55×10^3 左右见一特异性条带,空质粒转染组在 27×10^3 见一特异性条带,在 55×10^3 位置没有条带,灭菌 ddH_2O 在 27×10^3 和 55×10^3 均未见条带,三者在 43×10^3 位置均见内参条带(图 1)。说明脂联素 cDNA 在真核细胞中表达蛋白并与绿色荧光蛋白融合。



1:ddH_2O 转染组;2:空质粒转染组;3:重组质粒转染组

图 1 Western blot 检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

3 讨论

脂联素是由一种由 APM1 基因编码的脂肪细胞分泌特异性的血浆蛋白[3]。近年来发现脂肪组织不仅贮藏能量,还能分泌多种影响胰岛素敏感性的细胞因子,据研究脂联素是目前已知的唯一与肥胖呈负性相关的脂肪分泌蛋白[4]。

研究表明,血清脂联素与 NAFLD 的发生存在着密切的关系,其作为一个保护性因子可预防或延缓 NAFLD 的发生与发展[5]。Aygun 等[6]对 29 例证实伴有肝功能异常的 NAFLD 患者、20 例临床诊断不伴有肝功能异常的 NAFLD 患者以及 20 例对照者进行研究,通过对脂联素、血脂和体质量指数检测,结果表明血清脂联素具有抗炎、抗糖尿病以及抗肥胖的作用;同时具有保护肝脏的作用,随着脂联素水平的下降,肝脏的炎症、坏死随之加重。因此将脂联素 cDNA 导入表达载体中进行表达,补充机体脂联素的不足,是目前预防和治疗 NAFLD 的一个发展方向。

为了进一步研究脂联素在 NAFLD 的作用机制及基因治疗途径,本课题构建脂联素重组载体并在真核细胞中表达,结果显示:我们成功地构建了人脂联素重组载体,通过测序分析目的基因有 1 个碱基突变,654 位:A→T,突变率为 0.1%,氨基酸 Glu→Asp。通过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测融合蛋白相对分子质量约为 55×10^3(绿色荧光蛋白相对分子质量约为 27×10^3),而且能够被抗荧光蛋白抗体识别,说明脂联素 cDNA 能够在真核细胞中表达,为下一步治疗 NALFD 奠定了基础。

关键词:脂联素;基因克隆;基因治疗;转染

中图法分类号:R394-33 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Berner H S, Lyngstadaas S P, Spahr A, *et al*. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells[J]. Bone, 2004, 35(4): 842 – 849.

[2] Jiang Z, Hang A L, Tao X H, *et al*. Construction and characterization of bivalent vaccine condidate HspA and M(r)18000 OMP from Helicobacter pylori[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(8):1756 – 1761.

[3] Vasseur F, Helbecque N, Dina C, *et al*. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(21): 2607 – 2614.

[4] Baranova A, Gowder S J, Schlauch K, *et al*. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance[J]. Obes Sur, 2006, 16(9): 1118 – 1125.

[5] 孟凡萍, 杨刚毅, 李 钶,等. 腺病毒载体介导的 siRNA 对 3T3-L1 细胞脂联素表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(14): 1312 – 1315.

[6] Aygun C, Senturk O, Hulagu S, *et al*. Serum levels of hepatoprotective peptide adiponectin in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18(2): 175 – 180.

(编辑 王小寒)