技术方法

文章编号:1000-5404(2010)15-1684-03

细胞膜上稳定表达融合蛋白CRT/vGPCR A549细胞株的建立

秦 烨[1],韩 钰[1],任玉珊[1],王艳林[1,2] (443002 湖北 宜昌,三峡大学:分子生物学研究所[1],医学院生化教研室[2])

【摘要】 目的 将人钙网蛋白(calreticulin,CRT)基因与病毒G蛋白偶联受体(virus G-protein couple receptor,vGPCR)基因进行基因重组,用此重组基因建立细胞膜上稳定高表达CRT/vGPCR融合蛋白的人肺癌A549细胞株。方法 从pSG5-vGPCR质粒中获得全长vGPCR基因片段并与CRT全长编码序列的3′端连接形成融合基因,然后将融合基因克隆到真核表达载体pcDNA3.1(+)中。用此质粒转染人A549肺癌细胞,通过G418筛选建立稳定转染的A549细胞株,用RT-PCR检测重组融合基因的表达,用细胞免疫荧光分析鉴定融合蛋白的表达及其在细胞膜上的定位。结果 成功获得重组融合质粒pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR,经DNA序列测定证实融合基因两阅读框(ORF)对接无误。将上述质粒转染A549细胞后,建立了稳定转染CRT/vGPCR的A549细胞株,融合基因在A549细胞中表达并定位到细胞膜上。结论 通过与CRT基因融合重组,具有膜定位能力的vGPCR能将CRT蛋白高效包被到肿瘤细胞膜上。

【关键词】 CRT基因;vGPCR基因;A549细胞株

【中图法分类号】 R394-33 【文献标志码】 B

钙网蛋白(calreticulin,CRT)是主要存在于内质网的Ca^{2+}结合蛋白[1-3]。某些凋亡刺激在诱导特定肿瘤细胞发生凋亡时,会导致细胞内的CRT向细胞膜转移并发生簇集,这种表面有大量CRT包被的凋亡肿瘤细胞在机体内可被树突状细胞(DC细胞)识别和吞噬,进入DC细胞后,肿瘤抗原被加工和提呈,由此激发机体抗肿瘤的特异性免疫应答,提示CRT在介导肿瘤免疫预防与治疗中的潜在应用价值[4-7]。为研发一种在所有肿瘤细胞都能有效地进行CRT细胞膜包被的实验技术,本研究中我们将CRT基因与病毒G蛋白偶联受体(virus G-protein couple receptor,vGPCR)基因[8]进行基因重组融合,重组基因转染人肺癌A549细胞后,可望翻译出融合蛋白CRT/vGPCR,由于融合蛋白中的vGPCR具有强力的膜定位能力,可将CRT携带到肿瘤细胞膜表面,由此建立能在细胞膜上稳定高表达CRT/vGPCR融合蛋白的细胞株。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞株A549购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,菌株*E. coli* DH5α、质粒pcDNA3.1(+)、pET15b/CRT、pSG5/vGPCR由本研究所保存。限制性核酸内切酶、*Taq* DNA聚合酶、T_4 DNA连接酶、dNTP、RNase-Free DNase Ⅰ、RT-PCR及PCR试剂盒由Fermentas公司提供,DNA纯化试剂盒购自Omega公司,细胞转染试剂Lipofectamine2000™由Invitrogen公司提供。兔抗人CRT多克隆抗体购于Stressgen公司,罗丹明标记的山羊抗兔IgG购于武汉兴华基因生物科技有限公司,RPMI1640细胞培养基以及其他化学试剂由Sigma等公司提供。EPICS XL-4流式细胞仪为Beckman Coulte公司产品,ECLIPSE TE2000-S倒置荧光显微镜为日本尼康公司产品。PCR引物合成及DNA测序均由上海生工公司完成。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增人CRT基因 以质粒pET15b/CRT为模板,用PCR技术扩增出人CRT全长编码序列(不含有终止密码子),产物长度为1 254 bp。所用PCR引物的5′端和3′端分别引入*Hin*dⅢ和*Eco*RⅠ限制性酶切位点,以利于随后的克隆操作。引物的DNA序列为:上游5′-ATTCAAGCTTATGCTGCTATCCGTGCCGCTG-3′;下游5′-TTATGAATTCCAGCTCGTCCTTGGCCTGGCC-3′。PCR在50 μl的总体积中进行,以500倍稀释的质粒pET15b/CRT为模板,PCR扩增条件为:在94 ℃变性5 min后开始循环,然后94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸90 s,30个循环后,再于72 ℃延伸5 min结束扩增,4 ℃保存备用。

1.2.2 PCR扩增vGPCR基因 以质粒pSG5/vGPCR为模板,用PCR技术扩增vGPCR全长编码序列,长度为1 029 bp,含胞外区、七次跨膜区和胞内功能区。在PCR引物的5′端和3′端分别引入*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ限制性酶切位点,以利于随后的克隆操作。引物DNA序列为:上游5′-GAGTGAATTCATGGCGGCCGAGGATTTCCTA-3′;下游5′-AATACTCGAGCTACGTGGTGGCGCCGGACAT-3′。PCR在50 μl的总体积中进行,以500倍稀释的质粒pSG5/vGPCR为模板,PCR扩增条件为:在94 ℃变性5 min后开始循环,然后94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸90 s,30个循环后,再于72 ℃延伸5 min结束扩增,4 ℃保存备用。

1.2.3 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR真核表达质粒的构建 PCR获得的CRT DNA片段用限制性核酸内切酶*Hin*dⅢ+*Eco*RⅠ双酶切消化,经PCR纯化试剂盒纯化回收。PCR获得的vGPCR

【基金项目】 国家自然科学基金(30973445);三峡大学研究生创新基金(200934)

【通信作者】 王艳林,电话:(0717)6397179,E-mail:zswangyl@ctgu.edu.cn

DNA 片段用限制性核酸内切酶 *Eco*R Ⅰ + *Xho* Ⅰ双酶切消化后，用 T_4 连接酶将它与纯化的 CRT 酶切片段连接，所得的融合基因再克隆入经 *Hind* Ⅲ + *Xho* Ⅰ双酶切消化的质粒 pcDNA3.1(+)中。将连接产物转化 DH5α 感受态细胞，以碱裂解法从阳性克隆中提取质粒，双酶切及测序鉴定。

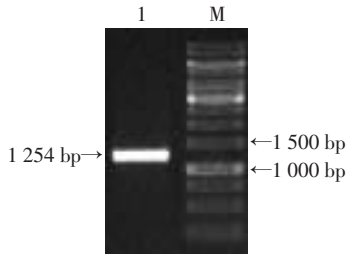
1.2.4　CRT/vGPCR 基因稳定转染 A549 细胞系的建立　A549 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液常规培养(37 ℃，5% CO_2)，至 80% 左右的融合度时转染重组质粒 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR，另取细胞转染空载质粒 pcDNA3.1(+)作为对照。转染 48 h 后向培养基中加入 G418 至终浓度为 400 μg/ml，待形成单克隆后，挑取单克隆放大培养。收获稳定转染的单克隆，用 Trizol 试剂法从转染细胞和对照细胞中提取细胞总 RNA，以此总 RNA 为模板，Oligo(dT)为引物，MMLV 催化将 mRNA 反转录为 cDNA 第 1 链，以 1 μl 反转录产物为模板，PCR 鉴定 CRT-vGPCR 融合基因在细胞内的转录。PCR 上游引物位于 CRT 编码序列的 817 bp 处，下游引物位于 vGPCR 编码序列的 235 bp 处，引物序列为：上游 CRT 5′-AGAGATGGACGGAGAGT-GGGA-3′，下游 vGPCR 5′-CCGCGATCGGTGCTTGCAAAA-3′，产物长度为 680 bp。β-actin 引物序列为：上游 5′-TGGCACCCAGCA-CAATGAA-3′，下游 5′-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3′，产物长度为 186 bp。PCR 在 50 μl 的总体积中进行，PCR 扩增条件为：在 94 ℃变性 5 min 后开始循环，然后 94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 60 s，30 个循环后，再于 72 ℃延伸 5 min 结束扩增。

1.2.5　细胞免疫荧光法检测 CRT/vGPCR 融合蛋白在细胞膜上的表达　弃去 RPMI1640 细胞培养基，40 g/L 多聚甲醛置冰上固定细胞 10 min，0.1 mol/L PBS 洗 3 次，加入 1∶200 稀释的一抗(兔抗人 CRT 多克隆抗体)4 ℃过夜，0.1 mol/L PBS 洗 3 次，加入 1∶200 稀释的二抗(罗丹明标记的羊抗兔 IgG)置 37 ℃ 避光进行抗原抗体反应 1 h。0.1 mol/L PBS 洗后加入 Hoechst333258(终浓度为 0.2 g/L)置室温 15 min 染细胞核。用倒置荧光显微镜观察，在红色激发光下可见罗丹明标记的红色光，即 CRT 所在位置，在蓝色激发光下可见蓝色光，为细胞核所在位置。实验中设 A549 空白对照和 pcDNA3.1(+)空载质粒对照，并在处理过程中设无一抗组，以排除二抗的非特异性吸附。

2　结果

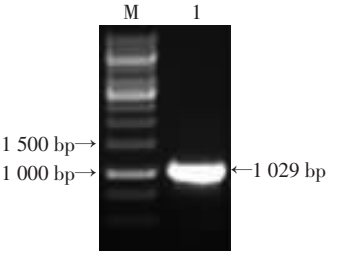
2.1　融合基因 CRT/vGPCR 真核表达质粒构建和鉴定

以质粒 pET15b/CRT 为模板，通过 PCR 得到人 CRT 基因全长片段，经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见一大小约为 1 254 bp 的特异性条带(图 1)。以 pSG5/vGPCR 为模板经 PCR 扩增得到全长 vGPCR 基因片段(vGPCR)，所得的 PCR 产物分别经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见大小约为 1 029 bp 的特异性条带(图 2)。将得到的 CRT 产物与 vGPCR 产物连接并克隆到 pcDNA3.1(+)真核表达质粒中，获得的 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR 重组质粒经多种酶切后，所得限制性片段与预期结果一致(图 3)。DNA 测序证实融合基因两阅读框架(ORF)对接无误。



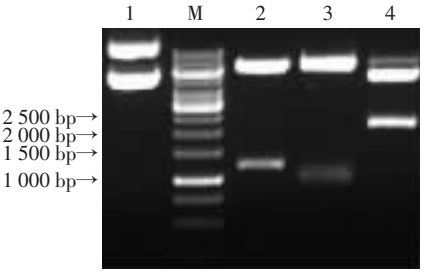
M：1 kb DNA 标准；1：CRT 的 PCR 产物

图 1　从 pET-28a/CRT 获得编码 CRT 的 PCR 产物



M：1 kb DNA 标准；1：vGPCR 的 PCR 产物

图 2　从 pSG5/vGPCR 获得编码 vGPCR 的 PCR 产物

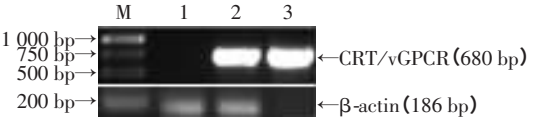


M：1 kb DNA 标准；1：质粒 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR；2：质粒 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR 用 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ消化；3：质粒 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR 用 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ消化；4：质粒 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR 用 *Hind* Ⅲ用 *Xho* Ⅰ消化

图 3　重组质粒 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR 的酶切鉴定

2.2　RT-PCR 检测 CRT/vGPCR 在 mRNA 水平的表达

用 Trizol 试剂法从转染 pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR 的 A549 细胞株中提取细胞总 RNA，以此为模板，Oligo(dT)为引物，经反转录酶 MMLV 催化将 mRNA 反转录为 cDNA 第 1 链。再以此 cDNA 第 1 链为模板，以 CRT-U 和 vGPCR-D 为引物进行 PCR 扩增，结果发现转染细胞中重组基因高效表达(图 4)。



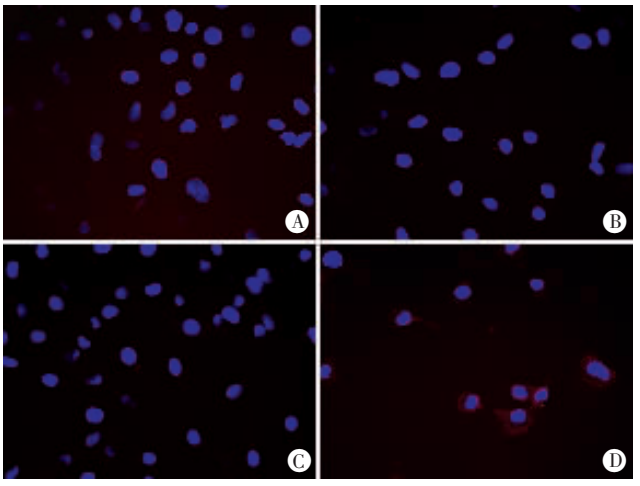
M：1 kb DNA 标准；1：阴性对照(未转染重组质粒的 A549 细胞株)；2：表达 CRT/vGPCR 的 A549 细胞株；3：阳性对照(模板为 500 × 稀释的重组质粒)

图 4　RT-PCR 鉴定融合基因在 mRNA 水平的表达

2.3　免疫荧光细胞化学技术法检测 CRT/vGPCR 融合蛋白在细胞膜上的表达

取 CRT/vGPCR 融合基因 mRNA 高表达的细胞株，用细胞

免疫荧光的方法检测融合蛋白在细胞膜上的表达。结果显示细胞对二抗没有非特异性吸附,空白对照和阴性对照细胞内可见弥散分布于细胞质中的红色荧光,即CRT的正常分布。pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR质粒转染后,可见A549细胞膜上出现大量红色荧光且均匀分布(图5),说明通过与CRT基因融合重组,具有膜定位能力的vGPCR可将CRT蛋白高效包被到细胞膜上。



A:未加一抗处理的未转染的A549细胞株;B:用一抗处理的未转染的A549细胞株;C:转染空载质粒pcDNA3.1(+)的A549细胞株;D:转染pcDNA3.1(+)-CRT/vGPCR的A549细胞株

图5 细胞免疫荧光分析CRT/vGPCR融合蛋白在A549细胞株中的表达 (倒置荧光显微镜 ×200)

3 讨论

在特定凋亡诱导因子的作用下,部分细胞在发生凋亡时,部分CRT蛋白分子从细胞内快速转移到细胞膜上,这些出现在膜上的CRT是介导凋亡细胞被识别和吞噬的重要信号分子[9-12]。新近的研究发现,凋亡肿瘤细胞膜上出现的CRT还可激发机体产生特异性抗肿瘤免疫应答,提示CRT在肿瘤免疫防治中的潜在应用价值[4,13]。由于CRT的膜转移并非所有凋亡肿瘤细胞的固有特征[14],因而建立一种能方便有效地将CRT蛋白包被到肿瘤细胞膜表面的实验方法,将有助于CRT介导的肿瘤免疫治疗的研究。本研究中,我们利用基因融合重组技术,将CRT与具有膜定位能力的vGPCR基因融合并克隆至真核表达质粒pcDNA3.1(+)中。vGPCR是N端在膜外、C端在膜内、含七次跨膜结构域的膜蛋白。融合蛋白中CRT位于vGPCR的N端,即融合蛋白结合到细胞膜后,CRT部分将面向细胞膜外侧。RT-PCR分析证实,稳定转染A549细胞后,重组融合基因在细胞内能高效表达。用免疫荧光细胞化学技术分析进一步发现,正常细胞中CRT较均匀分布于细胞质中,但细胞内表达的CRT/vGPCR融合蛋白能大量定位到细胞膜上。综上所述,本研究中我们通过构建CRT-vGPCR融合基因,成功建立了能将CRT高效包被到肿瘤细胞膜上的新技术,并为下一步研究CRT介导的肿瘤免疫预防和治疗奠定了技术基础。

参考文献:

[1] Opas M, Dziak E, Fliegel L, *et al*. Regulation of expression and intracellular distribution of calreticulin, a major calcium binding protein of nonmuscle cells[J]. J Cell Physiol, 1991, 149(1):160-171.

[2] Williams D B. Beyond lectins:the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 4):615-623.

[3] Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, *et al*. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum[J]. Biochem J, 2009, 417(3):651-666.

[4] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, *et al*. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death[J]. Nat Med, 2007, 13(1):54-61.

[5] Gardai S J, McPhillips K A, Frasch S C, *et al*. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte[J]. Cell, 2005, 123(2):321-334.

[6] Lauber K, Blumenthal S G, Waibel M, *et al*. Clearance of apoptotic cells:getting rid of the corpses[J]. Mol Cell, 2004, 14(3):277-287.

[7] Henson P M, Hume D A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis[J]. Trends Immunol, 2006, 27(5):244-250.

[8] Liu C, Sandford G, Fei G, *et al*. Galpha protein selectivity determinant specified by a viral chemokine receptor-conserved region in the C tail of the human herpesvirus 8 g protein-coupled receptor[J]. J Virol, 2004, 78(5):2460-2471.

[9] Obeid M, Panaretakis T, Joza N, *et al*. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(10):1848-1850.

[10] Waterhouse N J, Pinkoski M J. Calreticulin:raising awareness of apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(4):631-634.

[11] Zhu N, Wang Z. Calreticulin expression is associated with androgen regulation of the sensitivity to calcium ionophore-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(8):1896-1902.

[12] Lim S, Chang W, Lee B K, *et al*. Enhanced calreticulin expression promotes calcium-dependent apoptosis in postnatal cardiomyocytes[J]. Mol Cells, 2008, 25(3):390-396.

[13] Gomez-Gutierrez J G, Elpek K G, Montes-de-Oca-Luna R, *et al*. Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice[J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(7):997-1007.

[14] Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, *et al*. Immunogenicity of anthracyclines:moving towards more personalized medicine[J]. Trends Mol Med, 14(4):141-151.

(收稿:2010-01-12 修回:2010-04-10)

(编辑 栗 嘉)