基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0270-03

特异性结合于 HBV X 基因启动子的人工锌指蛋白真核表达载体的构建及表达

李 鑫,吴忠均,陈 聪
(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建人工锌指蛋白(Putative zinc finger protein,ZFP)基因的真核表达载体,验证其在真核细胞内的表达情况,为进一步构建人工转录因子(Artificial transcription domain factor,ATF)所需的 DNA 结合结构域寻找合适的 ZFP。方法:合成 ZFP 的全基因核酸序列并载入 pEGFP-N1 真核表达载体中,构建重组质粒 pEGFP-N1/ZFP 及 pEGFP-N1/ZFP-Flag,通过菌液 PCR、酶切和测序来鉴定重组质粒的正确性。脂质体 Lipofectamine 2000 将重组质粒转染于 COS-7 细胞中,使用 RT-PCR、荧光显微镜、Western blot 方法鉴定 ZFP 在该细胞中的表达。结果:成功构建了 pEGFP-N1/ZFP 及 pEGFP-N1/ZFP-Flag 重组质粒,并且在 COS-7 细胞中进行了 ZFP 的表达。结论:通过生物信息学工具获取的 ZFP 氨基酸序列,经过密码子优化得到的基因序列能够在真核细胞内成功表达。

【关键词】人工锌指蛋白;真核表达载体;COS-7 细胞
【中国图书分类法分类号】Q782 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-16

Construction of eukaryotic expression vector of artificial zinc finger protein gene of specific binding to X gene promoter of HBV and its expression

LI Xin, et al
(*Department of Liver and Gall, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct eukaryotic expression vector of zinc finger protein (ZFP) gene, and to detect the eukaryotic expression vector of zinc ZFP gene expressed in eukaryotic cells and search the available ZFP as DNA binding domain of artificial transcription factor (ATF). *Methods*: Full length ZFP gene was synthesized and cloned into pEGFP-N1 plasmids to construct the recombinant plasmids pEGFP-N1/ZFP and pEGFP-N1/ZFP-flag that were identified by colony PCR and sequencing. Recombinant plasmids were transformed into COS-7 cells by liposome Lipofectamine 2000. The expressed EGFP was observed under fluorescent microscope and the ZFP expression was detected by RT-PCR and Western blot. *Results*: Recombinant plasmids pEGFP-N1/ZFP and pEGFP-N1/ZFP-flag were constructed correctly which could express ZFP well in the transformed COS-7 cells. *Conclusion*: It is feasible that engineered artificial zinc finger proteins obtained by bioinformatics technique and codon optimization can be successfully expressed in eukaryotic cells.

【Key words】artificial zinc finger protein; eukaryotic expression vector; COS-7 cells

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus,HBV)基因组有 4 个开放阅读框架(Open reading frame,ORF),分别为 C、S、P、X,其中 X-ORF 位于碱基(nt)1 374 ~ 1 837 之间,其表达产物 HBx 蛋白是一种具有反式作用的多功能调节蛋白,它既能活化HBV 自身的启动子,还可以活化一些异源病毒和细胞启动子,参与细胞的各种调控机制,包括细胞周期调节、转录调控、信号通路,细胞骨架和粘附分子的编码以及和癌基因与肿瘤抑制基因的作用[1,2]。并且近年来的研究也表明 HBx 蛋白在肝癌的致癌机制中起着关键作用[3,4]。由此看来,如果 X 区的表达受到干扰或抑制将会严重影响 HBV 子代病毒的生成和生物周期[5],从而降低甚至消除对 HBV 人体的伤害。

人工转录因子(Artificial transcription domain factor,ATF)分为结合结构域(Binding domain,BD)与效应结构域(Effector domain,ED)[6]。近年来,利用 ZFP 作为结合域来调控特定基因表达的研究已经较为成熟。研究方法是:设计一种 ZFP,使其能特异性结合某基因序列,通常为该基因的启动子序列,进而通过与 ZFP 融合设计的效应结构域对该基因的转录及表达进行抑制或激活的调控。所以能够成功设计出一种特异性结合于靶基因的 ZFP 是构建 ATF 的首要工作。

本实验依据经典的 C2H2[7]锌指模型,筛选出 HBV X 基因启动子区的一段 18 bp 的 DNA 序列作为靶序列,人工构建包含 6 个连续的 C2H2 锌指结构的 ZFP 序列的真核表达质粒,并检验其在真核细胞内的表达,为进一步设计能够调控 HBV X 基因的 ATF 奠定基础。

作者介绍:李 鑫(1985-),男,硕士,
研究方向:乙型肝炎病毒和肝癌。
通信作者:吴忠均,男,教授,Email: wzjjq21@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金项目资助(编号:30772055)。

1 材料与方法

1.1 主要材料

基因合成:ZFP 的全基因序列、PCR 反应所需引物由上海生工合成。

菌株、细胞株及载体:大肠杆菌 DH5α 购自上海生工;COS-7 细胞、pEGFP-N1 真核表达载体由重庆医科大学眼科实验室王川硕士惠赠。

试剂:胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 OMEGA 公司;RT-PCR 试剂盒、RNAiso Plus 购自 TaKaRa 公司;RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 HyClone 公司;Lipofectamine 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司;抗 Flag 抗体、HRP标记的二抗购自碧云天公司;$ZnCl_2$ 购自 Sigma 公司。

1.2 pEGFP-N1/ZFP 及 pEGFP-N1/ZFP-Flag 重组真核表达质粒的构建

使用 Primer Premier5.0 软件设计 2 对引物,第一对引物,F1:5'-ccgctcgagatgctggagcctggtgaaaagccgta-3'(矩形框内为 *Xho* Ⅰ酶切位点);R1:5'-ccgggatccgctggtcttttta-cccg tatgg-3'(矩形框内为 *BamH* Ⅰ酶切位点)。第二对引物,F2:5'-ccgctcgagatggactacaaggacgacgatgacaagctggagcc-tggtgaaaagccgta-3'(矩形框内为 *Xho* Ⅰ酶切位点,下划线部分为编码 flag tag 的核苷酸序列);R2:5'-ccgggatccgctggt-ctttttacccgtatgg-3'(矩形框内为 *BamH* Ⅰ酶切位点)。以生工合成 ZFP 全基因序列并载入 pUC57 的质粒 pUC57-ZFP 为模板,采用上述引物扩增 ZFP 基因片段。用 1%琼脂糖凝胶电泳,胶回收纯化 2 组的 PCR 产物。

使用限制性内切酶 *Xho* Ⅰ、*BamH* Ⅰ双酶切 2 组胶回收的 PCR 产物及表达载体 pEGFP-N1;用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物,胶回收纯化所需的目的片段。用 T4 DNA 连接酶将 2 个 PCR 产物的小片段分别与大片段连接,连接产物分别转化 DH5α 感受态大肠杆菌,用卡那霉素平板筛选。挑选单个阳性菌落接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 震荡过夜,提取质粒。采用菌液 PCR(PCR 引物使用先前的各自引物)及限制性内切酶对重组质粒进行鉴定,将初步鉴定正确的重组质粒送上海生工公司进行测序。测序正确的重组质粒分别命名为 pEGFP-N1/ZFP 及 pEGFP-N1/ZFP-flag。

1.3 重组质粒转染 COS-7 细胞

使用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基(含终浓度为 0.1 mmo/L ZnC12)在 5%CO_2 饱和湿度、37℃下培养 COS-7 细胞,选取传至第 3 代的细胞进行转染。细胞于 6 孔板生长到 70% 汇合时,按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染。实验组分别转染重组质粒 pEGFP-N1/ZFP、pEGFP-N1/ZFP-flag,阳性对照组转染空 pEGFP-N1 质粒,空白对照组只加等量的脂质体,按前述方法方法培养细胞。选取不同时相点,在荧光显微镜下观察转染细胞的生长情况。

1.4 RT-PCR

转染 48 h 后,收集各组细胞,分别加入 500 RNAiso Plus,抽提细胞总 RNA,根据试剂盒说明进行 RT-PCR。PCR 扩增所用引物(F3:5'-gtggtaaatccttctcccaatcc-3',R3:5'-ggtgc- tcagtcagggtgtcgt-3'),扩增片段大小为 378 bp,1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

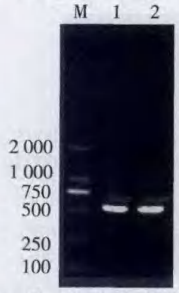
1.5 Western blot

转染 pEGFP-N1/ZFP-flag 重组表达质粒 48 h 后,裂解细胞,收获细胞总蛋白。取 30 μl 蛋白样品,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿转将蛋白转移至 PVDF 上,5%脱脂奶粉封闭 3 h;稀释 1:1 000 的鼠源抗 Flag 单克隆抗体(4℃过夜);1:1 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,37℃、2 h。于暗室显影,扫描胶片。使用空 pEGFP-N1 质粒转染组作为对照组。

2 结 果

2.1 pEGFP-N1/ZFP 及 pEGFP-N1/ZFP-flag 重组质粒的构建结果

使用 2 对特异性引物进行 PCR,以 pUC57-ZFP 克隆载体为模板扩增得到 2 条分别为 549、573 bp 的目的基因片段(图 1)。构建的重组质粒 pEGFP-N1/ZFP 经限制性内切酶 *Xho* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切;*Xho* Ⅰ单酶切,琼脂糖凝胶电泳显示,在 5 249、4 700 bp 及 549 bp 处有明显的目的条带(图2)。构建的重组质粒 pEGFP-N1/ZFP-flag 经限制性内切酶 *Xho* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切;*Xho* Ⅰ单酶切,琼脂糖凝胶电泳显示,在 5 273、4 700 bp 及 573 bp 处有明显的目的条带(图 3)。pEGFP-N1/ZFP 和 pEGFP-N1/ZFP-flag 菌液 PCR 鉴定结果分别在 549 bp 和 573 bp 处有明显的条带(图 4)。



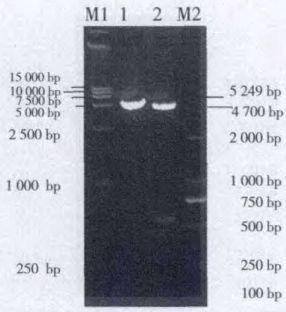
M. DNA 标准(DL 2000);1. 第 1 对引物的 PCR 产物(573 bp);2. 第 2 对引物的 PCR 产物(549 bp)

图 1 ZFP PCR 扩增结果

2.2 重组质粒转染 COS-7 细胞后绿色荧光蛋白的表达

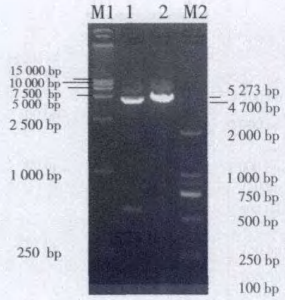
2.2.1 pEGFP-N1/ZFP 和 pEGFP-N1/ZFP-flag 实验组 重组质粒转染细胞 12 h 镜下可见到绿色荧光。24 h 阳性细胞数量增多,每视野可见细胞数个至数十个,细胞核和细胞浆中均有明亮的绿色荧光,但细胞核内荧光强度要高于胞浆。转染48 h 时细胞的荧光强度最强(图 5)。但是随着细胞培养时间延长,阳性细胞逐渐减少,荧光强度减弱。培养中 2 个实验组的荧光亮度未见明显差别。转染效率的测定:转染 36 h 2 实验组分别在荧光显微镜下计数 10 个视野,pEGFP—N1/ZFP 组计数 502 个细胞,其中 67 个细胞有绿色荧光表达,阳性细胞比例 13.3%;pEGFP-N1/ZFP-flag 组计数 490 个细胞,其中 61 个细胞有绿色荧光表达,阳性细胞比例 12.4%。

2.2.2 pEGFP-N1 空质粒对照组 转染 8 h 即可见到绿色荧光表达的阳性细胞,并且在不同的观察时间亮度均高于实验组。空白对照组无荧光表达。



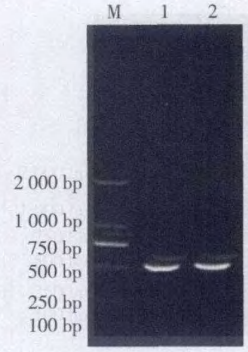
M1.DNA 标准(DL 15 000);M2.DNA 标准(DL 2 000);1.pEGFP-N1/ZFP 单酶切;2. pEGFP-N1/ZFP 双酶切

图 2　pEGFP-N1/ZFP-flag 单酶切和双酶切结果



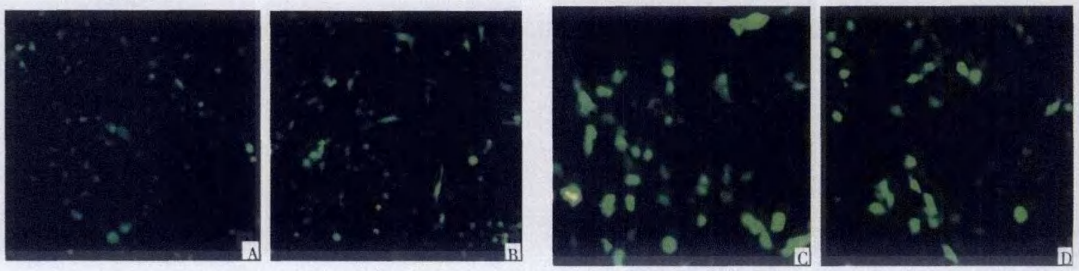
M1. DNA 标准(DL 15 000);M2. DNA 标准(DL 2 000);1. pEGFP-N1/ZFP-flag 双酶切;2. pEGFP-N1/ZFP-flag 单酶切

图 3　pEGFP-N1/ZFP-flag 单酶切和双酶切结果



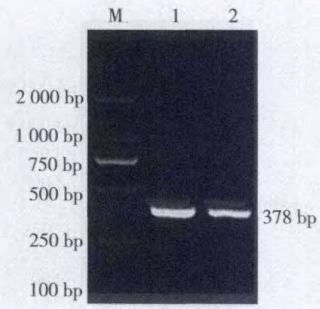
M. DNA 标准(DL 2 000);1. pEGFP-N1/ZFP (549 bp);2. pEGFP-N1/ZFP-flag(573 bp)

图 4　菌液 PCR 对重组质粒内 ZFP 的鉴定



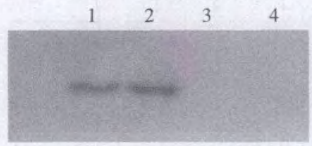
A. pEGFP-N1/ZFP 转染 24 h(×100);B. pEGFP-N1/ZFP-flag 转染 24 h(×100);C. pEGFP-N1/ZFP 转染 48 h(×400);D. pEGFP-N1/ZFP-flag 转染 48 h(×400)

图 5　荧光显微镜观察转染 COS-7 细胞后荧光蛋白表达



M. DNA 标准(DL 2 000);1. pEGFP-N1/ZFP 转染组;2. pEGFP-N1/ZFP-flag 转染组

图 6　RT-PCR 鉴定 ZFP mRNA 的表达



1、2. pEGFP-N1/ZFP-flag 转染组;3、4.空 pEGFP-N1 转染组

图 7　Western blot 鉴定 ZFP-flag 融合蛋白的表

2.3　pEGFP-N1/ZFP 和 pEGFP-N1/ZFP-flag 重组质粒中 ZFP mRNA 的表达水平

RT-PCR 结果表明,分别转染 pEGFP-N1/ZFP 和 pEGFP-N1/ZFP-flag 2 种重组质粒 24 h 后,均可见 ZFP mRNA 的表达,琼脂糖电泳后,可在 378 bp 处见到明显条带(图 6),且 2 个未见明显差别,对照组无 ZFP mRNA 表达。

2.4　带 Flag tag 的 ZFP 蛋白在 COS-7 细胞内的表达

Western blot 检测结果显示,转染 pEGFP-N1/ZFP-flag 重组质粒 48 h,COS-7 细胞内 ZFP 有明显表达(图 7)。

3　讨　论

生物信息学的快速发展,使得各种数据库的生物学信息已达海量。许多之前只能通过实验室操作才能获得的信息,现在通过信息学的有效交叉整合,完全可以获得理论上理想的结果。

在 ATF 的研究中,锌指结构是最丰富的结合结构域。锌指多成串联排列,很多转录因子含有 3 个或更多的锌指来特异性的识别特定序列,并通过与锌指蛋白融合设计的效应结构域对靶基因的转录及表达进行抑制或激活的调控[8]。通过信息学的工具我们确定了 HBV X 基因启动子上一段 18 bp 的靶序列,通过在线工具获得了能特异性结合于该靶序列的含有 6 个连续锌指结构的 ZFP 氨基酸序列,并利用生物学软件及数据库资料对 ZFP 的基因序列进行人工优化。在序列优化过程中,我们兼顾了在真核及原核细胞内均可有效表达的密码子,使其在真核及原核细胞内均能表达。并且利用密码子的兼并性,尽量减少整个序列中局部的重复序列,以利于全基因合成及后期基因克隆操作。

实验中使用能表达增强型绿色荧光蛋白的 pEGFP-N1 质粒作为真核表达载体,将目的基因和 EGFP 形成融合蛋白可直接观察目标蛋白能否表达,以及其在细胞内的分布与定

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0273-04

利用超声造影示踪兔 VX2 乳腺癌前哨淋巴结的实验研究

丁 炎,夏纪筑,丁雅明,贺雪梅,白 晋

(重庆医科大学生物医学工程系、重庆医科大学生物医学工程学重点实验室、重庆市超声医学工程重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过与亚甲蓝(Methylene blue,MB)示踪法比较,探讨超声造影检测乳腺癌前哨淋巴结(Sentinel lymph node,SLN)的前景。方法:建立兔 VX2 乳腺癌模型 24 只,皮下注射 SonoVue,超声造影显像 SLN,观察其造影增强情况;再经皮下注射 MB 示踪;行腋窝淋巴结清扫术切除 SLN 并行 AE1/AE3 免疫组化染色。结果:24 只瘤兔超声造影检出回声均匀性增强的 SLN 12 个,回声不均匀性增强和部分充盈缺损的 SLN 22 个;MB 示踪法检出 SLN 32 个;术中腋窝淋巴结清扫 SLN 38 个。以手术切除为标准,超声造影的检出率(89.47%)与 MB 示踪法检出率(84.21%)比较无显著差异($P>0.05$);以免疫组化结果为标准,超声造影的敏感性(95.24%)与 MB 示踪法敏感性(91.30%)比较无显著差异($P>0.05$),但其特异性(84.62%)和准确性(91.18%)均明显高于 MB 示踪法特异性(26.67%)和准确性(65.79%)($P<0.05$)。结论:经皮下注射超声造影剂显像乳腺癌 SLN 有较高的检出率、特异性、准确性和敏感性,与 MB 示踪法比较有一定优势,有望成为检测 SLN 的常用方法。

【关键词】超声造影;乳腺癌;前哨淋巴结;亚甲蓝示踪;AE1/AE3

【中国图书分类法分类号】R445.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2009-07-06

A study of using ultrasound contrast tracer on the sentinel lymph node in rabbit VX2 breast cancer

DING Yan, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the prospects of contrast-enhanced ultrasound and methylene blue (MB) detection of breast cancer sentinel lymph node (SLN). *Methods*: Twenty-four rabbit models of VX2 breast cancer was set up with, subcutaneous injection of SonoVue, to get contrast-enhanced ultrasound imaging of SLN. The situation of contrast-enhanced SLN was observed. Then

作者介绍:丁 炎(1984-),男,硕士,研究方向:超声治疗肿瘤。

通信作者:白 晋,女,教授,Email:sajinbai@haifu.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(编号:10774198)。

位。通常认为目标蛋白与 EGFP 融合后,并不影响前者的正确折叠、运输和胞内定位[9]。通过荧光显微镜观察及 RT-PCR 结果,我们认为目标蛋白 ZFP 在细胞可以正常表达。为了能进行 Western blot 印迹反应实验,将 flag tag 加载在目的基因 5'端构成 pEGFP-N1/ZFP-flag 重组质粒,结果显示重组质粒成功进行了 ZFP 的表达。

实验通过对 pEGFP-N1/ZFP、pEGFP-N1/ZFP-flag 重组表达载体的成功构建及表达,证明了利用生物信息学手段、人工设计特异性的锌指蛋白并进行体外真核细胞表达是可行的,为进一步设计完整的 ATF,进而干预 HBV X 基因的表达奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Sung W K.Deregulated direct targets of the hepatitis B virus (HBV) protein, HBx, identified through chromatin immu-unoprecipitation and expression microarray profiling[J].Biol Chem, 2009, 284(33): 21941-21954.

[2] 邵 清,成 军,白雪帆,等.乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究[J].世界华人消化杂志,2003,11(8): 1240-1242.

[3] Dewantoro O, Gani R A, Akbar, et al.Hepatocarcinogenesis in viral Hepatitis B infection: the role of HBx and p53[J].Acta Med Indones, 2006, 38(3): 154-159.

[4] Fernandez A F. The dynamic DNA methylomes of double- stranded DNA viruses associated with human cancer[J].Genome Res, 2009, 19(3): 438-451.

[5] Kramvis A, Kew M C.The core promoter of hepatitis B virus[J].J Viral Hepat, 1999, 6(6): 415-427.

[6] Quon D V, Delgadillo M G, Khachi A, et al.Similarity between a u-biquitous promoter element in an an cient eukaryote and mam- malian initiator elements[J].Proc Nail Acad Sci USA, 1994, 91(10): 4579-4583.

[7] Miller J, Mclachlan A D, Klug A, et al. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus cocytes[J].EMBO J, 1985, 4(6): 1609-1614.

[8] Sachs A B.Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail[J].Cell, 2000, 101(3): 243-245.

[9] Kain S R, Adams M, Kondepudi A, et al.Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization[J].J Biotech-niques, 1995, 19(4): 650-655.

(责任编辑:张学颖)