维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0470-04

增强型绿色荧光蛋白与肝细胞生长因子共表达载体的构建及表达

李兴升,王志刚,苏 琳,任建丽,杨春江,郑元义,冉海涛,李 攀

(重庆医科大学超声影像学研究所,重庆医科大学附属第二医院超声科,重庆 400010)

【摘 要】目的:构建增强型绿色荧光蛋白与人肝细胞生长因子基因的真核共表达载体并鉴定其在真核细胞中的表达。方法:在HGF两端设计并合成分别带有Sac Ⅰ和*BamH* Ⅰ两酶切位点的一对引物,对pcDNA3.0-HGF载体进行PCR扩增,将扩增出的目的基因与pMD18-T载体相连,并转化大肠肝菌,进行菌落PCR、酶切分析和DNA测序鉴定重组克隆。用Sac Ⅰ和*BamH* Ⅰ将目的片段用双酶切切下后,纯化提取凝胶中的目的DNA片断,然后插入pIRES-EGFP相应的酶切位点,构建pIRES-EGFP/HGF真核表达载体并再进行酶切鉴定。将重组质粒用脂质体法转染至人脐带血管内皮细胞(HUVEC)中,荧光显微镜下观察EGFP在细胞内的表达及Western blotting检测HGF的表达情况。结果:重组克隆载体内的目的片段序列与GENE BANK上报道的HGF基因序列完全一致。pIRES-EGFP/HGF酶切鉴定结果与预期结果一致。荧光显微镜下观察可见转染后的细胞有荧光出现。Western blotting结果表明HGF基因得到了有效表达。结论:本实验成功构建EGFP和HGF真核共表达载体并可在真核细胞中有效表达。

【关键词】肝细胞生长因子;真核表达载体;血管内皮细胞

【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-25

Construction and expression of enhanced green fluorescent protein and HGF co-expression vector

LI Xingsheng, et al

(*the Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To construct EGFP and HGF co-expression vector and to detect its expression in cultured eukaryocyte. ***Methods***: A pair of primers of HGF with Sac Ⅰ and *BamH* Ⅰ were designed and constructed, then PCR was performed. The PCR products were inserted into cloning vector pMD18-T and transferred into JM109. The PCR of colony, restriction analysis, and DNA sequencing were performed to identify the correctness of the recombinant. The HGF gene fragment obtained from pMD18-T/HGF that was digested with Sac Ⅰ and *BamH* Ⅰ, and then inserted into pIRES2-EGFP that was cut with Sac Ⅰ and *BamH* Ⅰ. The recombinant pIRES2-EGFP/HGF was identified with restriction analysis. The expression plasmid pIRES2-EGFP/HGF was transfected into HUVEC mediated by liposome reagent, then the expression of EFGP in cell were observed by fluorescence microscopy and HGF protein was detected with Western blotting. ***Result***: The sequence of the cloned DNA fragment was identical to HGF that was reported on Gene bank, and the HGF gene was inserted into eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP correctly. The recombinant expression plasmid was successfully transferred into HUVEC observed by fluorescent microscope and effective expression of HGF was also testified by Western blotting. ***Conclusion***: The recombinant eukaryotic co-expression vector of EGFP and HGF was successfully constructed and effectively expressed in HUVEC.

【Key words】Hepatocyte growth factor; Eukaryotic expression vector; Vascular endothelial cell

肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)是间质细胞衍生的一种促细胞有丝分裂的多功能因子。HGF具有调节细胞生长和运动,促进多种细胞组织形态的发生,在胚胎生长、组织形成、肝肾脏再生、肿瘤转移及损伤修复中起着重要作用。近来研究发现,HGF还是一种很强的促血管生长因

作者介绍:李兴升(1975-),男,博士,主要研究方向:超声微泡介导的基因治疗。

基金项目:国家自然科学基金重点(No.30430230)及面上项目(No.30370402),重庆自然科学基金重点项目,渝科发计字[2005]34号。

维普资讯 http://www.cqvip.com

子,能促进缺血组织内的血管再生[1]。

为了能有效表达目的基因的蛋白并利于转基因细胞的筛选,我们选择了 pIRES-EGFP 作为真核表达载体,作为构建 EGFP 和 HGF 基因的共表达载体,并观察它能否在人脐带血管内皮细胞(Human umbilical vascular endothelial cell,HUVEC)内表达,为肝纤维化及缺血性疾病的基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

pcDNA3.0-HGF 质粒由军事医学科学院吴祖泽院士惠赠,含 EGFP 的真核表达质粒 pIRES2-EGFP (Invitrogen 公司)、HUVEC 细胞株 (南京凯基生物科技公司)、JM109 菌株为本实验室保存。*BamH* Ⅰ、Sac Ⅰ等限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Agarose Gel DNA Purification Kit、DNA Ligation Kit、T 载体通用引物 RV-M/M13-47、DL-2000 Marker、λ-*Hind* Ⅲ digest DNA Marker、100bp Ladder Marker(TaKaRa 公司)。阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)。HGF 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 引物设计及合成

根据 Gene bank 所公布的 HGF α 全长序列,利用 premier5.0 软件辅助设计上游引物 P1:5'-TCTCGAGCTCAAATGTGGGTGACCAAACTCCTG-3' 及下游引物 P2:5'-TCGAGGATCCGCCTATGACTGTGGTACCTTATATG-3',下划线部分分别为所设计的酶切位点(Sac Ⅰ和 *BamH* Ⅰ),引物由 TaKaRa 公司合成。

1.3 PCR 扩增及质粒构建

以合成的引物 P1 与 P2 对 pcDNA3.0-HGF 质粒进行 PCR 扩增,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析并用 DNA Purification Kit 切胶回收;使用 DNA Ligation Kit 中的 Solution Ⅰ,将回收的 PCR 产物连接至 pMD18-T simple 载体上,然后热转化至 JM109 细菌中,涂布平板过夜培养菌体;从转化平板上挑选单菌落使用 RV-M/M13-47 引物对进行 PCR 扩增,检测菌落中插入片段的长度;将菌落扩增提取质粒 DNA 后,送 TaKaRa 公司进行测序鉴定;将阳性克隆质粒使用 Sac Ⅰ/*BamH* Ⅰ进行双酶切,切胶回收约 2.2ku 的 DNA 片段(Insert DNA);将 pIRES2-EGFP 质粒转化扩增提取质粒 DNA 后,使用 Sac Ⅰ/*BamH* Ⅰ双酶切;切胶回收载体部分 DNA 片段(Vector DNA)。使用 DNA Ligation Kit 中的 Solution Ⅰ,将 Insert DNA 连接后热转化至 JM109 的细菌中,涂布平板过夜培养菌体;从转化平板上挑选单菌落提取质粒 DNA 后,使用 Sac Ⅰ/*BamH* Ⅰ进行酶切鉴定。

1.3 脂质体介导 pIRES-EGFP/HGF 转染血管内皮细胞

1.3.1 质粒转染 转染前 24h 将人脐血管内皮细胞(HUVEC)以 6×10^4 个/ 孔接种到 24 孔板上,培养液为无双抗 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。待细胞生长 70%~80%,按照转染试剂盒说明书,加入适量重组质粒进行转染,以空质粒 pIRES2-EGFP 和未转染的细胞作对照。

1.3.2 转染细胞中 EGFP 和 HGF 蛋白表达的检测 转染后 48h,在暗室中用荧光显微镜观察细胞中绿色荧光蛋白(EGFP)的表达情况。收集各组的细胞,使用细胞及组织总蛋白抽提试剂盒,按说明书进行操作:洗涤沉淀的细胞,弃去上清液;加入预冷的蛋白质抽提试剂 (10^7 个细胞中加入 1ml 抽提试剂,内含 5μl 蛋白酶抑制剂,5μl PMSF 和 5μl 磷酸酶抑制剂);裂解离心后弃去沉淀,上清液立刻转移入新的离心管中,-80℃冰箱保存用于 Western blotting 检测。在蛋白提取上清液中加入等体积的 SDS 上样缓冲液,行 SDS-PAGE 后电转硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭,与羊抗人 HGF 单克隆抗体和酶标二抗反应后,ECL 化学发光试剂盒检测 HGF 蛋白的表达。

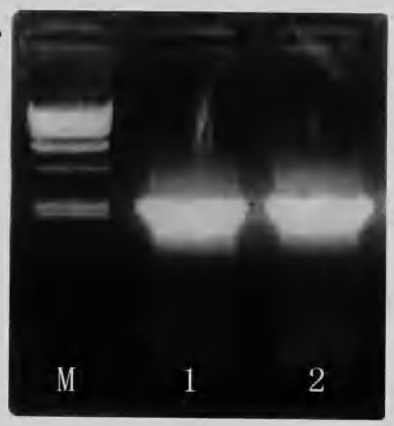
2 结 果

2.1 pIRES2-EGFP/HGF 质粒构建及鉴定结果

pcDNA3.0-HGF 质粒 PCR 扩增后,1%琼脂糖凝胶电泳可见一约 2.2ku 左右的条带 (目的基因 HGF 条带),与预期条带相仿(图 1),且基因测序结果与 Gene bank 所公布 HGF 的 DNA 完全符合。经过一系列的酶切,连接反应过程,HGF 基因全编码序列的 DNA 片断被定向克隆入质粒载体 pIRES-EGFP 的 Sac Ⅰ和 *BamH* Ⅰ两酶切位点之间(图 2)。

2.2 哺乳动物细胞中 EGFP 及 HGF 蛋白的表达检测

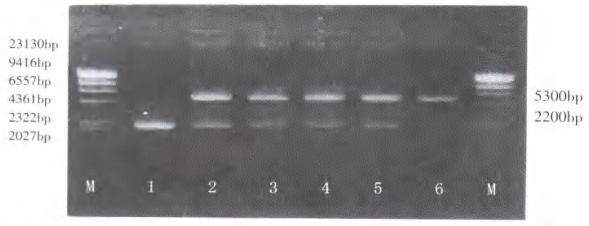
转染 pIRES2-EGFP 和 pIRES-EGFP/HGF 质粒后 48h,在荧光显微镜下 HUVEC 胞质中可观察到



M:λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker;1、2:PCR 产物

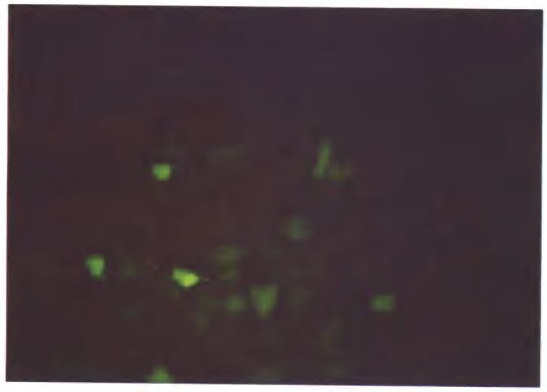
图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析

维普资讯 http://www.cqvip.com

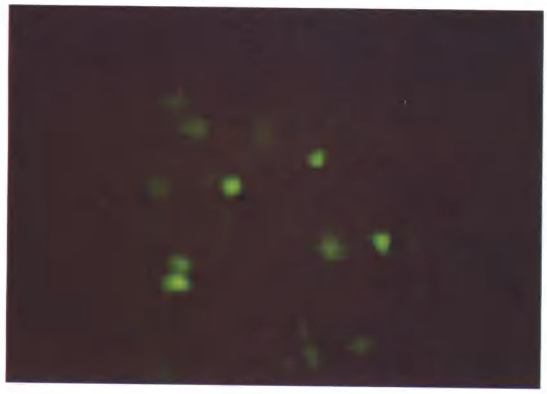


M: λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker;1:插入的目的 DNA 序列;2、3、4、5:pIRES-EGFP/HGF 阳性克隆的 Sac I/BamH I 双酶切产物;6:pIRES-EGFP 的 Sac I/BamH I 双酶切产物

图 2 酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析



A:pIRES-EGFP 组



B:pIRES-EGFP/HGF 组

图 3 EGFP 在 HUVEC 中的表达



A:空白对照组,B:pIRES-EGFP 组, C:pIRES-EGFP/HGF 组 A 组和 B 组中无 HGF 的表达; C 组有 HGF 的表达

图 4 Western blotting 检测 HUVEC 中 HGF 的表达

特异性的绿色荧光(图 3),两组绿色荧光的强度无明显差异。这说明目的基因的表达对 EGFP 表达无明显影响。Western blotting 结果显示转 pIRES-EGFP/HGF 组在 69ku 处有单一条带(图 4),而空载体及空白对照组未出现,说明导入的基因在蛋白水平得到表达。

3 讨 论

肝细胞生长因子(HGF)是一种间充质合成和分泌的多效性的细胞因子。分子量为 103ku。成熟的 HGF 由分子量 69ku 的 α 链和 34ku 的 β 链通过二硫键连接形成的异二聚体。α 链有一个 N 端和 4 个 Kringle 结构域,β 链包含一个丝氨酸蛋白酶样结构,α 链为其主要功能活性单位[2]。HGF 是肝脏胚胎发生、发育和肝再生过程最基本的的细胞因子。研究发现 HGF 能够促进肝脏细胞再生,抗肝纤维化及促进干细胞向肝脏细胞分化,在肝脏细胞再生和修复中具有重要的作用[3]。而促进肝脏细胞再生和抗纤维化是治疗慢性肝脏疾病的基础。目前对于肝维化的治疗策略是刺激肝细胞的有丝分裂,使肝结构重建。而基因治疗无疑是在这一治疗策略中最有希望的方法。由于 HGF 具有显著的抗纤维化作用而成为这一领域研究的热点,Iimuro[4]等用 HGF 基因治疗肝纤维化取得了很好的效果。

在外源基因转录活性的研究中,报告基因发挥着很重要的作用。绿色荧光蛋白基因是目前惟一的能在细胞内表达且不需要其它外源底物参与的报告基因[5]。本实验采用的 pIRES2-EGFP 真核表达载体含有 EGFP 的编码序列, 其荧光强度比普通绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)高约 35 倍[6]。增强型荧光蛋白无种属特异性且无须抗体、辅助因子或酶底物等其它介质的辅助即可在活细胞及已固定的细胞样品中直接在荧光显微镜下进行检测。故 EGFP 越来越多被用于基因转染的相关研究中。本研究中转染后 24h 观察到荧光的出现即证明真核表达载体已成功导入靶细胞并开始转录和表达。

pIRES2-EGFP 真核表达载体 EGFP 标签并且在多克隆位点 (Multiple cloning sites,MCS) 与 EGFP 编码区域之间有内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site,IRES)[7],它们相连并处于巨细胞病毒(Cytomegalovirus,CMV)启动子调控之下,

维普资讯 http://www.cqvip.com

因此克隆入 MCS 的基因和 EGFP 能分别同时表达，而产生非融合蛋白，而彼此不影响各自的蛋白功能的表达[8]。根据荧光显微镜下绿色荧光的存在可确定目的基因得到表达。另外，在 EGFP 基因的下游存在 SV 多聚腺苷酸加尾信号指导双顺反子 mRNA3' 端的加工，能有效提高目的基因的表达。

本实验利用基因克隆技术构建了含增强型绿色荧光蛋白与 HGF 的真核表达质粒 pIRES2-EGFP/HGF，然后利用脂质体法导入真核细胞后蛋白水平获得高效表达，证明 HGF 真核表达载体构建成功，可为肝纤维化等疾病的基因治疗的相关研究奠定了很好的实验基础。

（致谢：感谢军事医学科学院吴祖泽院士提供 pcDNA3.0-HGF 质粒，才使本实验得以顺利完成。）

（通讯作者：王志刚，重庆医科大学超声影像学研究所，教授，博士生导师。E-mail:wzg62942443@163.com）

参 考 文 献

[1] Dixon IM.Help from within:cardioprotective properties of hepatocyte growth factor[J].Cardiovasc Res,2001;51(1):4-6.

[2] Chirgadze DY,Hepple J,Byrd RA,et al.Insights into the structure of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF)and implications for receptor activation[J]. FEBS Lett,1998;430(1-2):126-129.

[3] Hirano S,Bless DM,Rousseau B, et al. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model[J].Laryngoscope,2004;114(3):548-556.

[4] Iimuro Y,Fujimoto J.Strategy of gene therapy for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J].J Hepatobiliary Pancreat Surg,2003;10(1):45-47.

[5] 谢 娜，王晓燕，张 琼，等. 乙型肝炎病毒启动子调控的增强型绿色荧光蛋白真核表达载体的构建与表达 [J]. 中华肝脏病杂志，2006;14(4):268-271.

[6] Heim R,Tsien RY.Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer[J].Curr Biol,1996;6(2):178-182.

[7] Ryu KJ,Lee SW.Identification of the most accessible sites to ribozymes on the hepatitis C virus internal ribosome entry site[J].J Biochem Mol Biol,2003;36(6):538-544.

[8] 邹海波，安 洪，蒋电明，等.携带 IRES 的 BMP2 绿色荧光蛋白表达载体的构建和表达[J].重庆医科大学学报，2004;29(4):455-458.

（上接第 466 页）

支持 XhoI-loss LMP1 的 EBV 选择性地感染鼻咽癌病人。本研究发现，我国重庆地区鼻咽癌患者及非鼻咽癌人群外周血携带的 EB 病毒为 wt-XhoI LMP1，与我国广东地区健康携带者外周血携带的 EB 病毒 LMP1 基因相似[8]。因此，我们初步推测 XhoI-loss LMP1 的 EB 病毒并没有选择性地感染鼻咽癌病人，LMP1 基因 N 端区 Xho I 酶切位点的缺失突变，可能是在鼻咽癌的发生发展过程中产生的，而不是先有缺失突变，再选择性地感染鼻咽癌病人。至于重庆地区人群 EBV-LMPl 基因的缺失变异情况有待于扩大样本进一步研究，同时鼻咽癌组织中 LMP1-LMPl 基因 N 端 XhoI 酶切位点缺失变异情况及其与鼻咽癌发病的确切关系还需进一步研究。

（致谢：本研究在重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室完成，感谢各位老师无私的指导和帮助！）

参 考 文 献

[1] 陈鸿雁，陈佩君.聚合酶链反应检测 EB 病毒 DNA 在鼻咽癌诊断中的应用[J].重庆医科大学学报，2000;25(1):23-25.

[2] Chang ET,Adami HO.The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma [J].Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2006;15(10):1765-1777.

[3] 章晓鹏，贺智教，陈主初.EB 病毒及其癌基因 LMP1 对上皮细胞的转化作用[J].生命的化学，2003;23(2):143-145.

[4] 张晓实，宋坤华，麦海强，等.EB 病毒潜伏膜蛋白 1 多态性与鼻咽癌的关系[J].病毒学报，2001;17(2):103-107.

[5] Abdel-Hamid M,Chen JJ,Constantine N,et al.EBV strain variation:geographical distribution and relation to disease state[J].Virology,1992;190(1):168-175.

[6] Shu CH,Tu TY.Prevalence of the Taiwan variant of the Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma patients and normal individuals[J].Zhonghua Yi Xue Za Zhi(Taipei),2000;63(4):288-293.

[7] 杨玉成，洪苏玲.EB 病毒潜伏膜蛋白 1 与鼻咽癌[J].国际耳鼻咽喉头颈外科杂志，2007;31(1):19-22.

[8] 林素暇，宗永生，吴秋良，等.鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1 基因 N 端 Xho I 酶切位点的丢失[J].癌症，2003;22(11):1147-1151.

[9] 林素暇，宗永生，张 敏，等.鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1 基因的序列变异[J].中华病理学杂志，2005;34(12):791-795.