维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0808-04

pcDNA3.1(+)/hFasL 真核表达载体的构建及在 COS-7 细胞中的表达

李秀娟[1],刘 纯[1],张 徽[2],随 华[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院内分泌科;2.重庆医科大学病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建 pcDNA3.1(+)/hFasL 真核表达载体并在 COS-7 细胞中进行瞬时表达。方法:经 *Xba* Ⅰ 酶切 pBluescript II KS(+)/hFasL 得到 hFasL cDNA 全长序列,将该片段亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+)。重组质粒 pcDNA3.1(+)/hFasL 经过酶切和测序鉴定;阳离子脂质体法转染 COS-7 细胞并经免疫细胞化学染色检测重组体的表达。结果:重构质粒经限制性核酸内切酶 *Xba* Ⅰ、*Dra* Ⅱ、*Hind* Ⅲ酶切以及序列分析鉴定,表明真核表达载体构建正确;以脂质体法转染 COS-7 细胞后,免疫细胞化学染色检测表明转染细胞能够表达 FasL。结论:成功构建了 pcDNA3.1(+)/hFasL 真核表达载体并能在真核细胞中进行表达。

【关键词】FasL;真核表达;COS-7 细胞;质粒

【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-23

Construction of pcDNA3.1(+)/hFasL and its expression in COS-7 cells

LI Xiujuan, et al

(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To construct the recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (+)/hFasL and investigate its transfection and transient expression in COS-7 cells. *Methods:* The full-length cDNA of hFasL was obtained from the plasmid vector pBluescript II KS(+)/hFasL cut with Xba I and then subcloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (+). The recombinant plasmid pcDNA3.1(+)/hFasL was identified with restriction enzyme digestion and sequence analysis. It was then transfected into the COS-7 cells by Lipofectin Reagent and its expression was determined by immunocytochemical staining. *Results:* Restriction enzyme digestion analysis with *Xba* Ⅰ、*Dra* Ⅱ、*Hind* Ⅲ and DNA sequencing indicated the correct construction of the recombinant plasmid; Immunocytochemical staining showed the expession of hFasL on COS-7 cells. *Conclusion:* The construction and expression of the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)/hFasL have been achieved successfully.

【Key words】FasL; Eukaryotic expression; COS-7 cell; Plasmid

人 Fas 配体(hFasL)是由 281 个氨基酸残基组成、分子量约 40ku 的Ⅱ型膜蛋白,基因定位于人类染色体 1q23,长度约 8kb,主要表达于细胞毒性 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞以及活化的脾细胞。Fas 是 hFasL 的天然受体,表达于肝、子宫、肺、肿瘤等多种细胞表面,FasL 与 Fas 分别属于肿瘤坏死因子家族及肿瘤坏死因子受体家族[1]。生物体内环境稳定的实现,不仅靠细胞增殖、分化,也要有细胞死亡。组织内的细胞死亡是由基因控制的细胞主动参与的自杀过程,称为细胞凋亡。例如绝大多数前 T 细胞在胸腺发育过程中以凋亡形式死亡;衰老细胞或已完成功能的活化淋巴细胞、巨噬细胞通过凋亡得以清除;细胞毒性 T 淋巴细胞和 NK 细胞的细胞毒性作用可由凋亡介导;肿瘤坏死因子、淋巴细胞毒素等能引发靶细胞发生细胞凋亡。而 Fas-FasL 结合介导的凋亡是细胞凋亡的重要机制之一[2,3]。本研究通过构建 hFasL cDNA 全长的真核表达载体,为研究 FasL 功能及其相关疾病奠定了一定的基础。

作者介绍:李秀娟(1977-),女,硕士研究生,主要研究方向:甲状腺疾病及甲状腺眼病。

基金项目:重庆市卫生局重点科研项目(01-1-104);2004 年重庆医科大学附属第一医院回国人员院内课题启动基金。

1 材料与方法

1.1 材 料

原核表达质粒 pBluescript II KS (+)/hFasL 由日本 Kanazawa 大学 Takashi Suda 教授提供,真核表达载体 pcDNA3.1(+)、大肠杆菌 DH5α 和 COS-7 细胞均由本实验室保存。质粒小量抽提试剂盒及胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。限制性核酸内切酶 *Xba* Ⅰ、*Dra* Ⅱ、*Hind* Ⅲ、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准(λ DNA/*Hind* Ⅲ digest)购自大

维普资讯 http://www.cqvip.com

连宝生物工程有限公司。阳离子脂质体 Lipofectin Reagent 购自 Invitrogen 公司。兔抗人 FasL 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。S-P 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 pcDNA3.1(+)质粒和 FasL cDNA 片段的获取及真核表达载体的构建 限制性内切酶 *Xba* Ⅰ酶切 pBluescript Ⅱ KS(+)/hFasL 和 pcDNA3.1(+)分别获得 hFasL cDNA 全长片段(约 0.97kb)和打开双链闭合环的 pcDNA3.1(+)(约 5.4kb)。将酶切反应产物行琼脂糖凝胶电泳、Quantity One 分析软件测算质粒浓度、胶回收纯化目的条带。然后经 T4 DNA 连接酶、16℃连接反应过夜。反应产物转化以氯化钙法制备的新鲜感受态大肠杆菌 DH5α,用含氨苄青霉素(Amp 100μg/ml)的 LB 培养平板筛选转化菌落并行扩增,小量抽提质粒,于 -70℃超低温冰箱存储备用。

1.2.2 重组质粒的鉴定 电泳初步筛选:将提取的质粒进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪观察电泳情况,通过条带的泳动速度初步判断可能的重组体。

酶切鉴定:利用限制性核酸内切酶 *Xba*I、*Dra* Ⅱ、*Hind* Ⅲ对重组质粒进行酶切鉴定。电泳观察酶切反应结果。

DNA 序列分析:将经过前述鉴定后认为是目的重组质粒者,送往华大基因上海鼎安生物科技有限公司进行序列分析测定。

1.2.3 pcDNA3.1(+)/hFasL 转染 COS-7 细胞及表达检测

COS-7 细胞的准备:用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,常规培养、传代。正常 COS-7 细胞为三角形或梭形贴壁细胞。将生长状态良好的 COS-7 细胞按(1~2)×10⁵/孔接种于装有盖玻片的六孔细胞培养板中。无抗生素的 RPMI1640 培养液 2ml、37℃、5%CO_2 常规培养。次日细胞贴于盖玻片生长,布满约 60%时即可进行转染。

阳离子脂质体法转染 COS-7 细胞:A 液:混匀 6μl 阳离子脂质体和 94μl 无血清无抗生素的 RPMI1640,室温静置 30~45min;B 液:pcDNA3.1(+)/hFasL 和 pcDNA3.1(+)(阴性对照)各取 2μg,分别加入无血清无抗生素的 RPMI1640,总体积 100μl(空白对照为 100μl RPMI1640);C 液:混匀 A、B,室温静置 15min。吸净各孔培养液,2ml 无血清无抗生素的 RPMI1640 轻洗 1 次。将 C 液轻柔混匀于 800μl 无血清无抗生素的 RPMI1640 后加入到六孔板,37℃、5% CO_2 培养 8h,弃转染液,含 10%胎牛血清的 RPMI1640 2ml/孔继续培养 48h 后,收获细胞检测表达。

免疫细胞化学染色法检测表达:取出六孔板底的盖玻片,PBS 轻洗 3 次,95%乙醇固定 15min,漂洗(PBS 3min×3 次);3% H_2O_2 去离子水、室温湿盒孵育 10min,以消除内源性过氧化物酶活性,漂洗;正常山羊血清工作液封闭 15min,倾去,勿洗;滴加兔抗人 FasL 多克隆抗体(1∶200 稀释),4℃湿盒孵育过夜,漂洗;滴加生物素标记山羊抗兔 IgG 15min,漂洗;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 15min,漂洗;DAB-H_2O_2 显色、自来水冲洗终止发色反应、脱水、透明、封片,显微镜下观察结果。

2 结 果

2.1 pcDNA3.1(+)和 FasL cDNA 片段的获取

限制性内切酶 *Xba* Ⅰ在 hFasL cDNA 两端及 pcDNA3.1 (+) 上具有识别位点。用 *Xba* Ⅰ酶切 pBluescript Ⅱ KS (+)/hFasL 将得到两条片段:2.96kb 的原核质粒载体 pBluescript Ⅱ KS (+) 和 0.97kb 的 hFasL cDNA;*Xba* Ⅰ酶切 pcDNA3.1(+)将打开其双链闭合环得到 5.4kb 的片段[1]。将条带所在凝胶块切下,胶回收后即得到目的载体和插入片段。酶切反应的电泳结果,如图 1。

2.2 重组真核表达载体 pcDNA3.1(+)/hFasL 的鉴定

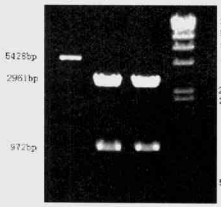


图 1 pBluescript Ⅱ KS(+)/hFasL 和 pcDNA3.1(+)的酶切鉴定
1:pcDNA3.1 (+) 经 *Xba* Ⅰ酶切后 2,3:pBluescript Ⅱ Ks(+)/hFasl 经 *Xba* Ⅰ酶切后 M:DNA Marker(λ DNA/*Hind* Ⅲ)

2.2.1 电泳初步筛选 由于实验采用的是单酶切,因此在连接反应中可能出现自身环化等情况,但重组体分子量更大,相同条件下电泳过程中泳动速度更慢,据此可初步筛选出可能的重组体。从转化培养平板上任意挑取 6 个单菌落,小量扩增、提取质粒并与空载体 pcDNA3.1(+)一同电泳。图中可见,第 4 泳道的质粒较空载体及其他质粒泳动速度更慢,可能是插入了目的片段的重组体;而其他泳道质粒的泳动速度与空载体相同,考虑为载体的自身环化,见图 2。

2.2.2 酶切鉴定 如果是正确的目的重构质粒,*Xba*I 在重组体上将有两个酶切位点,能得到 0.97kb 及 5.4kb 两个片段;*Dra* Ⅱ也有两个酶切位点,能得到约 5.5kb 及 0.84kb 两个片段;*Hind* Ⅲ有一个酶切位点,能打开重组质粒的双链闭合环,得到约 6.4kb 的一个条带,见图 3。

2.2.3 DNA 序列分析 把经前述鉴定后认为是目的

维普资讯 http://www.cqvip.com

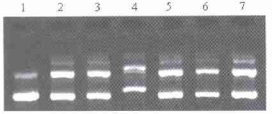


图 2 重组质粒的电泳初步鉴定

1:空质粒载体 pcDNA3.1(+) 2~7:连接反应后任意抽提的 6 个质粒



图 3 pcDNA3.1(+)/hFasL 的酶切鉴定

1:pcDNA3.1(+)/hFasl 经 *Dra*Ⅱ 酶切后

1:pcDNA3.1(+)/hFasl 经 *Xba*Ⅰ酶切后

1:pcDNA3.1(+)/hFasl 经 *Hind*Ⅲ酶切后

M:DNA Marker(λDNA/*Hind*Ⅲ)

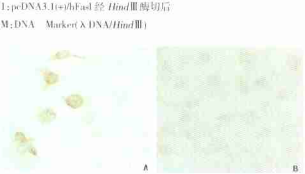


图 4 hFasL 基因在 COS-7 细胞中表达的免疫细胞化学染色检测

A:经重组质粒 pcDNA3.1(+)/hFasl 转染的 COS-7 细胞(×200)

B:经空质粒载体 pcDNA3.1(+)转染的 COS-7 细胞(×200)

重组质粒者用自动测序仪进行序列测定,结果表明插入序列与在 GenBank 中检索到的 hFasL cDNA 序列(GenBank accession No.U11821)完全一致[11],插入方向正确,无密码子突变,缺失。

2.3 免疫细胞化学染色检测重组真核表达载体在 COS-7 细胞中的表达

hFasL 是一种膜蛋白,经免疫细胞化学染色及 DAB 显色后,重组质粒 pcDNA3.1(+)/hFasL 成功转染 COS-7 细胞并在其中表达者,可见细胞膜及细胞浆着染呈浅棕色。阴性对照和空白对照组的 COS-7 细胞均没有着染,见图 4。

3 讨 论

细胞凋亡/程序化死亡是由基因控制的细胞主动性死亡过程,在维持机体的生长发育、正常代谢、免疫调节、自身耐受、内环境稳态等方面有着重要作用,其异常与自身免疫性疾病、肿瘤、退行性疾病、神经变性疾病等多种疾病的发生发展密切相关。

Fas-FasL 结合介导的凋亡是细胞凋亡的重要机制之一,其可以诱导表达 Fas 的细胞通过一种依赖于称为"死亡域"的细胞质基序的细胞内信号途径,经一系列级联反应,最终活化蛋白水解酶 caspase(cysteinyl aspartate specific protease 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶),触发核酶导致胞核和胞质细胞基本结构的解聚以及线粒体功能障碍,并最终导致细胞死亡[2,3]。在 Fas 介导的肿瘤细胞杀伤作用中,FasL 在细胞毒性 T 淋巴细胞和 NK 细胞的表达有着重要作用。同时,研究表明在多种肿瘤发生发展的过程中,肿瘤细胞 FasL 水平上调,参与了对 Fas 表达阳性的浸润淋巴细胞的杀伤;实体瘤中可溶性 FasL 水平升高,它能与 Fas 分子结合并使后者形成三聚体,从而减少 FasL 与 Fas 的结合,这进一步阻抑了细胞毒性 T 淋巴细胞和 NK 细胞的清除瘤细胞作用;癌细胞 FasL 表达上还调伴随着 Fas 表达降低,这些均有利于肿瘤细胞逃避免疫监视、易于发展和转移[4]。在一些自身免疫性内分泌疾病(例如慢性淋巴细胞性甲状腺炎、1 型糖尿病)中,Fas-FasL 介导的凋亡也是腺体细胞破坏并导致功能减退的主要机制之一[2,3,5]。

重组质粒构建过程中,由于目的片段 hFasL cDNA 的获取和对 pcDNA3.1(+)多克隆插入位点的酶切消化均采用 *Xba*Ⅰ作单酶切、产生全同源黏性末端,使得连接反应中就可能存在载体自身环化、多片段串联、目的片段双向插入等情况[6]。因此首先用选择性培养基筛选含 Amp 抗性基因(存在于 pcDNA3.1(+)上)的质粒并将其与空载体 pcDNA3.1(+)一同电泳,在相同条件下,泳动速度与空载体相同的考虑是载体片段自身环化,泳动较慢的则可能是重组体。应用 Primer Premier 电子酶切分析,我们选择了三个内切酶对重组体进行初步鉴定:*Xba*Ⅰ将重组体在连接处重新断开,从而了解其组成,实验中得到了 5.4kb 及 0.97kb 两个条带,表明重组体确

维普资讯 http://www.cqvip.com

由载体和目的插入片段构成；*Hind*Ⅲ在重组体上有一个酶切位点，能打开其双链闭合环，与线性 DNA Marker 一同电泳可了解重组体的分子大小，也即实验中得到的 6.4kb 的片段；*Dra*Ⅱ在 pcDNA3.1 (+)和 hFasL cDNA 上分别有一个识别位点，在连接方向正确的目的重组体，酶切将得到 5.55kb 及 0.84kb 两个片段，而反向插入者经酶切反应后得到的是 6.26 及 0.14 两个片段，根据电泳结果即可初步判断 hFasL cDNA 的插入方向。

为明确重组质粒是否正确构建，尤其是需要对外源基因进行表达时，最后须通过 DNA 序列分析加以验证。测序常用的方法有双脱氧终止法、化学法、杂交测序法等，其中双脱氧终止法是自动测序的原理基础[6]。实验中，我们将经过初步鉴定后认为是目的重构质粒者经全自动测序仪进行序列分析，证实了插入基因片段完整、无密码子突变或缺失、重组体连接方向正确。

COS-7 细胞是表达 SV40 大 T 抗原的非洲绿猴肾细胞株，能支持具有 SV40 复制起点和部分突变型 SV40 病毒的质粒载体的复制，大 T 抗原介导的复制能使每个细胞中含有 SV40 复制起始点的质粒拷贝数扩增至 10^5，是效率较高的瞬时表达系统[7,8]。质粒载体中，真核表达质粒载体能在真核细胞中转录、翻译、表达具有功能活性的蛋白质。本研究中所采用的真核表达载体 pcDNA3.1(+)具有 SV40 复制起始点和其他真核表达所必须的重要元件，因此能够在 COS-7 细胞中大量扩增，促使 hFasL 基因的大量表达，再经免疫细胞化学染色检测 hFasL 的表达，同时表明表达产物具有抗原性。

用表达 FasL 的真核载体依据 Fas-FasL 结合介导凋亡的机制治疗或阻断相关疾病，已有学者进行了一些研究。例如 Batteux 等[9]用表达大鼠 FasL 的真核质粒载体治疗实验性自身免疫性甲状腺炎小鼠，结果显示表达 FasL 的甲状腺滤泡细胞可通过诱导表达 Fas 的淋巴细胞发生凋亡而显著减少甲状腺淋巴细胞浸润、消除了抗甲状腺球蛋白的细胞毒性 T 淋巴细胞反应；Jin Y 等[10]用含有 FasL- CTLA4 基因的腺病毒载体，经 Fas 介导的凋亡途径，阻抑链脲霉素引起的小鼠自身免疫性糖尿病的发生。

实验中我们应用分子生物学方法构建了真核表达载体 pcDNA3.1(+)/ hFasL，经 DNA 序列分析，结果与 GenBank 中检索到的 FasL cDNA 序列完全一致[1]，转染入 COS-7 细胞后经免疫细胞化学染色证实重组质粒能够在动物细胞中进行表达，表明重组质粒 pcDNA3.1(+)/hFasL 的构建是成功的，为进一步研究 FasL 和 Fas-FasL 系统与凋亡相关疾病的关系及其应用奠定了一定的基础。

(致谢：感谢日本 Kanazawa 大学 Takashi Suda 教授提供 pBluescript II KS(+)/hFasL 质粒，而使试验得以顺利完成。)

(通讯作者：刘　纯，重庆医科大学附属第一医院内分泌科，主任医师。E-mail: liuchun200156@hotmail.com)

参 考 文 献

[1] Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, et al. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity[J]. Int Immunol, 1994; 6(10): 1567-1574.

[2] Lin Jen-Der. The role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders and thyroid cancer[J]. BMJ, 2001; 23; 322(7301): 1525-1527.

[3] Palazzo FF, Hammond LJ, Goode AW, et al. Death of the autoimmune thyrocyte: is it pushed or does it jump[J]. Thyroid, 2000; 10(7): 561-572.

[4] Kim R, Emi M, Tanabe K, et al. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy[J]. Cancer, 2004; 1; 100(11): 2281-2291.

[5] Signore A, nnovazzi A, Gradini R, et al. Fas and Fas ligand-mediated apoptosis and its role in autoimmune diabetes [J]. Diabetes Metab Rev, 1998; 14(3): 197-206.

[6] 张维铭. 现代分子生物学实验手册 [M] 北京：科学出版社，1998.677-682.2003:204-213.362-404.

[7] Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants[J]. Cell, 1981; 23(1): 175-182.

[8] F.奥斯伯，R.布伦特，R.E.金斯顿，等.精编分子物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1998.677-682.

[9] Fre′ de′ ric Batteux, Le′ a Tourneur, He′ le`ne Trebeden, et al. Gene Therapy of Experimental Autoimmune Thyroiditis by In Vivo Administration of Plasmid DNA Coding for Fas Ligand [J]. J Immunol, 1999; 162: 603-608.

[10] Jin Y, Qu A, Wang GM, et al. Simultaneous stimulation of Fas-mediated apoptosis and blockade of costimulation prevent autoimmune diabetes in mice induced by multiple low-dose streptozotocin [J]. Gene Ther, 2004, 11(12): 982-991.