

以 β -淀粉样蛋白为靶的单价及二价真核表达载体的构建和表达

王烈峰¹, 汪华侨¹, 张 革², 邹俊涛¹, 谢 瑶¹, 袁群芳¹, 姚志彬¹

(中山大学 1. 基础医学院解剖学教研室, 2. 药学院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】构建以 β -淀粉样蛋白为靶单价及二价真核表达载体 pcDNA3.1-A₁₋₄₂、pcDNA3.1-A_{42x2}, 并在真核细胞中表达目的蛋白。【方法】PCR 法扩增编码 β -淀粉样蛋白的目的基因, 利用基因克隆技术构建单价及二价真核表达载体; 应用酶切及测序鉴定真核表达载体构建成功后, 用 Western blot 和细胞免疫组化染色检测其在真核细胞中的表达。【结果】相应的双酶酶切能够获得插入的目的基因片段 (分别为 137 bp 和 269 bp), 测序未发现突变; Western blot 结果可见两条约为 4 ku 和 8 ku 的条带, 细胞免疫组化染色可见阳性细胞。【结论】单价及二价真核表达载体构建成功; 真核表达载体能在真核细胞中表达出目的蛋白。

关键词: 老年性痴呆; β -淀粉样蛋白; Tg2576 转基因鼠; 重组质粒; 真核表达载体

中图分类号: R749.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0250-04

Construction and Expression of Oligomer and Bigemina Eukaryotic Express Vector Aimed Amyloid- β as a Target

WANG Lie-feng¹, WANG Hua-qiao¹, ZHANG Ge², ZOU Jun-tao¹, XIE Yao¹, YUAN Qun-fang¹, YAO Zhi-bin¹

(1. Department of Anatomy and Brain Research, The School of Preclinical Medicine, 2. Pharmaceuic College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To construct the oligomer and bigemina eukaryotic express vector aimed amyloid-protein as a target and express the goal proteins in the eukaryotic cells. 【Methods】Coding sequence of A β was amplified by PCR. The gene fragment was cloned directionally into the multi-cloning site of the plasmid and the recombine plasmid was constructed. The eukaryotic express vector was identified according to enzyme digesting and gene sequencing. The expressing proteins were determined by Western blot and the transfected cells were investigated by immunohistochemistry. 【Results】The goal gene (137 bp and 269 bp) can be achieved after the restriction analysis, the expressed protein (4 ku and 8 ku) can be analyzed by Western blot and the positive cell can be seen by immunohistochemistry. 【Conclusion】The ligomer and bigemina eukaryotic express vectors were constructed successfully and the eukaryotic express vector can express the goal protein in the eukaryotic cell.

Key words: Alzheimer's disease; amyloid- β protein; Tg2576 transgenic mouse; recombine plasmid; eukaryotic express vector

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):250-253]

β -淀粉样蛋白(A β)异常聚集和沉积是老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)的主要病理改^[1,2]。1999年 Schenk 等^[3]发现以 A β 为抗原接种 AD 转

基因模型鼠可产生抗 A β 抗体, 可以清除或减少鼠脑 A β 异常聚集和沉积, 其血液和脑 A β 水平明显下降。进一步临床试验因部分受试者出现脑脊

收稿日期: 2005-12-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2006cb600700); 国家自然科学基金资助项目(30400512); 粤港关键领域重点突破资助项目(20054982210); 广东省自然科学基金重大资助项目(20013137), 广东省自然科学基金资助项目(04300218); 广东省社会发展资助项目(2005B10401047); 广州市科技计划资助项目(2004Z3-E0151, 2005Z3-E4021); 中国博士后科学基金(2004035603)

作者简介: 王烈峰(1974-), 男, 江西峡江人, 硕士生, 讲师, 现在赣南师范学院化学与生命科学系工作; 姚志彬, 教授, 课题负责人, 通讯作者。E-mail: anatomy@gzsums.edu.cn

髓膜炎症状而被迫中止^[4]。为寻找更安全、有效、廉价的免疫治疗AD的方案,本室构建了pcDNA3.1-A₁₋₄₂、pcDNA3.1-A₄₂₋₅₂真核表达质粒,为进一步研究A₄₂主动免疫清除老年斑的作用机制和DNA疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒、细胞株、实验动物 大肠杆菌DH5、质粒pcDNA3.1、COS-7细胞由本室保存。转基因鼠Tg2576购自Taconic公司,由本室保种,繁育。

1.1.2 主要试剂 Kpn^I、Xho^I、BamH^I及T₄DNA连接酶为大连宝生物公司产品,采用QiAquick gel Extraction kit (Qiagen), Roche High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), Western blot Lumind Reagent Solution A (Nalgene), Western blot Lumind Reagent Solution B (Nalgene), Lipofectamine 2000 (Invitrogen)。其他所用试剂均为Sigma产品。

1.2 方 法

1.2.1 Tg2576转基因鼠基因组DNA提取 剪取8周龄鼠的鼠尾,加入DNA提取液匀浆。蛋白酶K消化过夜,用等体积饱和苯酚氯仿(1:1)混合液以及氯仿各抽提1次。NaAc(pH 5.2)和无水乙醇沉淀,TE缓冲液溶解。8 g/L琼脂糖电泳,紫外灯下观察。

1.2.2 引物的设计与合成 根据AD转基因模型鼠Tg2576 hAPP695双突变基因设计引物。引物P1引入Kpn^I酶切位点和kozak序列;引物P2引入Xho^I酶切位点;引物P3引入BamH^I酶切位点;引物P4引入BamH^I酶切位点。P1:GGGTTACCG(Kpn^I)ACC ATG* GAT GCA GAA TTC CGA CAT; P2:CCG CTCGAG(Xho^I)TCA* CGC TAT GAC AAC ACC GCC; P3:GGG GGATCC(BamH^I)GAT GCA GAA TTC CGA CAT; P4:GGGGGATCC(BamH^I)CGC TAT GAC AAC ACC GCC。引物由上海博亚生物工程公司合成。

1.2.3 目的基因的PCR扩增 以Tg2576转基因鼠基因组DNA为模板,用上游引物P1和下游引物P2,PCR法扩增出A₁₋₄₂基因片段;用上游引物P1和下游引物P4,扩增A₄₂₋₁基因片段;用上游

引物P3和下游引物P2,扩增A₄₂₋₂基因片段。PCR反应体系:25 mmol/L dNTP,上下游引物各0.5 μmol/L,高保真EX Taq酶2.5 U,DNA模板0.1 μg/μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃30 s,55℃30 s,72℃45 s共35个循环,最后72℃延伸10 min,10 g/L琼脂糖电泳观察PCR反应结果,PCR产物4℃保存。

1.2.4 真核表达载体的构建及鉴定 QiAquick gel extract kit纯化PCR产物,将纯化的PCR产物和质粒载体pcDNA3.1用相应的两个酶双酶切,用Qiagen gel Extract kit试剂盒回收酶切后的产物。T₄DNA连接酶酶切纯化产物并转化感受态细胞。手工法提取少量质粒DNA,Kpn^I、Xho^I酶切质粒DNA后,将酶切产物上样电泳。根据电泳情况初步确定阳性克隆,将其菌液以甘油保存,并送上海生工生物工程公司测序。

1.2.5 重组质粒在COS-7细胞的转染与表达 Roche High Pure Plasmid Isolation Kit制备用于转染的质粒,紫外分光光度计测A₂₆₀及A₂₈₀,计算其纯度和浓度。新鲜cos-7细胞铺24孔板,次日细胞密度长至90%~95%。取质粒DNA 2 μL(0.8 g)和2 μL lipofectamine 2000分别溶于48 μL不含血清的DMEM培养基中,将质粒DNA与lipofectamine 2000(总量为100 μL)混匀后室温孵育20 min。更换孔中旧培养基后,将DNA-lipofectamine 2000混合物加入每个孔,37℃、0.5 mL/L CO₂培养箱孵育24~48 h。

1.2.6 Western blot 鉴定 SDS-PAGE凝胶电泳方法参见分子克隆实验指南^[5]。40 V恒压电泳约40 min后恒压60 V约3 h。恒压100 V,转膜1.5 h。抗(12 000)室温孵育2~3 h。抗(15 000)室温孵育1 h。将显色液滴加于PVDF膜上,室温放置1~2 min,X线胶片曝光,显影,定影。

1.2.7 转染细胞免疫组化 0.4 g/L多聚甲醛固定细胞,0.03 mL/L H₂O₂ 30 min,0.1 g/L BSA封闭2 h,抗A₄₂多克隆抗体(1 100)4℃孵育过夜,HRP标记的羊抗兔抗体(1 500)室温孵育10 min,DAB显色。

2 结 果

2.1 目的基因A₁₋₄₂、A₄₂₋₁和A₄₂₋₂的PCR扩增 扩增产物在8 g/L琼脂糖电泳,紫外观测仪下

可见 3 条 152 bp 左右的特异性条带(图 1)。

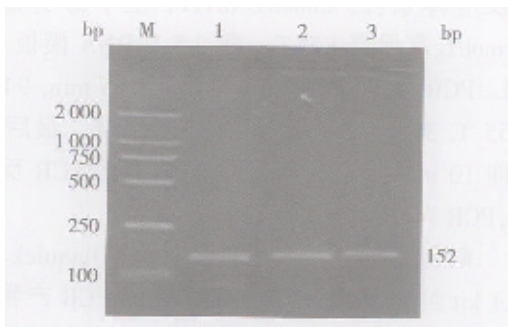


图 1 目的基因的 PCR 扩增产物

Fig.1 Goal gene amplified by PCR

M: DNA standard marker DL2 000; 1: A₁₋₄₂(147 bp); 2: A₄₂₋₁(149 bp); 3: A₁₋₄₂(152 bp)

2.2 重组质粒 pcDNA3.1-A₁₋₄₂、pcDNA3.1-A₄₂₋₁ 的酶切鉴定

阳性克隆质粒经 Kpn 和 Xho 酶切后分别得到 269 bp、137 bp 大小的 1 条特异性条带,空载体 pcDNA3.1 则不能。阳性克隆分别被命名为 pcDNA3.1-A₁₋₄₂、pcDNA3.1-A₄₂₋₁(图 2)。

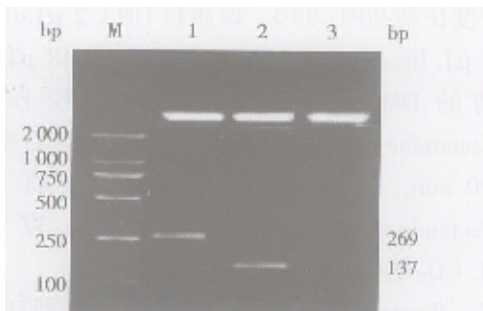


图 2 重组质粒 pcDNA3.1-A₁₋₄₂、pcDNA3.1-A₄₂₋₁ 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction analysis of pcDNA3.1-A₁₋₄₂, pcDNA3.1-A₄₂₋₁

M: DNA standard marker DL2 000; 1: digestion of pcDNA3.1-A₄₂₋₁ with Kpn and Xho (269bp); 2: digestion of pcDNA3.1-A₁₋₄₂ with Kpn and Xho (137bp); 3: digestion of pcDNA3.1 with Kpn and Xho

2.3 重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

转染后的 cos-7 细胞经用细胞裂解液裂解后经 SDS-PAGE 分离,考马斯亮兰染色(图 3)。将蛋白电转印至 PVDF 膜上,蛋白免疫印迹分析可见在 pcDNA3.1-A₁₋₄₂ 电泳图谱中有相对分子质量为 4×10^3 左右的蛋白条带,pcDNA3.1-A₄₂₋₁ 电泳图谱可见相对分子质量为 8×10^3 左右的蛋白条

带,对照(转染 pcDNA3.1 的细胞裂解产物、cos-7 细胞裂解产物)未见相应条带出现(图 4)。

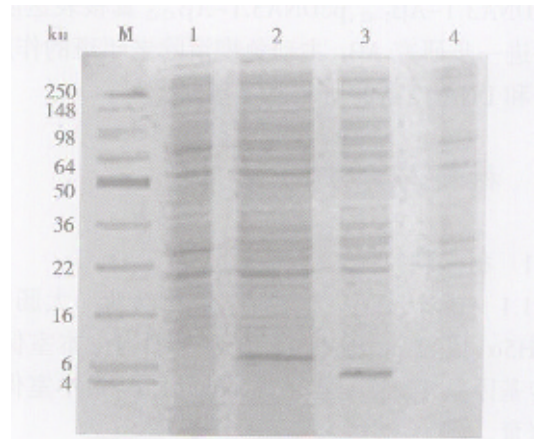


图 3 PAGE 胶考马斯亮兰染色

Fig.3 PAGE gel after Coomassie brilliant blue R250 staining

M: protein standard marker; 1: cos-7 cell lysate; 2: lysates of the cos-7 cell transfected by pcDNA3.1-A₄₂₋₁(8 ku); 3: lysates of the cos-7 cell transfected by pcDNA3.1-A₁₋₄₂(4 ku); 4: lysates of the cos-7 cell transfected by pcDNA3.1

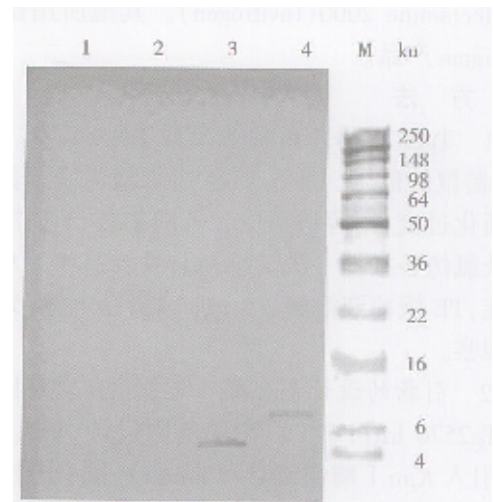


图 4 Western blot 分析重组质粒蛋白表达

Fig.4 Western blot analysis of the protein expression of the recombinant plasmid

M: protein standard marker; 1: the cos-7 cell lysate; 2: lysates of the cos-7 cell transfected by pcDNA3.1; 3: lysates of the cos-7 cell transfected by pcDNA3.1-A₁₋₄₂(4 ku); 4: lysates of the cos-7 cell transfected by pcDNA3.1-A₄₂₋₁(8 ku)

2.4 转染细胞免疫组化

转染 72 h 后细胞免疫组化染色可见重组质粒转染组核内及胞浆均有蛋白表达,而对照组(即转染质粒组)及细胞未处理组未见核内及胞浆蛋

白表达(图5)。

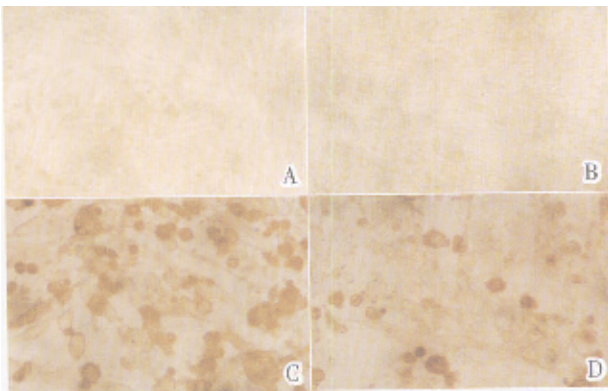


图5 转染72 h后细胞免疫组化染色

Fig.5 Immunohistochemistry of the cell transfected (72 h)

A: cell transfected by pcDNA3.1 ($\times 20$); B: cell non-transfected ($\times 20$); C: cell transfected by pcDNA3.1-A₁₋₄₂ ($\times 32$); D: cell transfected by pcDNA3.1-A₄₂₋₄₂ ($\times 32$)

3 讨论

我们构建以A_β为靶的单价及二价真核表达载体,为其应用于动物模型作准备。本室前期工作中采用A_β亚单位疫苗接种SD大鼠和AD转基因鼠产生高滴度抗A_β抗体,抗A₄₂抗体能与转基因模型鼠脑内A_β结合,A_β异常沉积减少或被清除,Tg2576转基因模型鼠的学习和记忆功能改善,并未见不良反应^[6-10]。而真核表达载体进入机体后将在真核细胞中以自然的形式表达目的蛋白A₁₋₄₂和A₄₂₋₄₂,加工后呈递给免疫识别系统,诱导机体产生抗A₄₂抗体,从而避免了接种机体可能导致的不良反应,简化了接种程序。

本室采用A₁₋₄₂免疫SD大鼠发现大鼠血清抗A₁₋₄₂抗体滴度不高,与免疫佐剂MF59合并接种后产生高滴度抗体^[6]。考虑到A₁₋₄₂免疫原性可能不强,为此我们扩增A₄₂₋₁、A₄₂₋₂,并将2个A₄₂通过柔性连接肽(Gly-Ser)串联起来,进一步强化其抗原作用。利用基因克隆技术制得重组质粒后将其转染cos-7细胞,转染24 h后cos-7细胞开始表达蛋白。转染重组质粒组细胞生长停滞,细胞密度未见变化,而对照组(即转染质粒pcDNA3.1组)和未处理组细胞继续生长。细胞转染72 h后,转染重组质粒组细胞核内及胞浆均有蛋白表达,部分转染重组质粒组细胞有凋亡现象,

而对照组(即转染空质粒组)与未处理组细胞未见。可能原因是因为转染质粒无限制地复制,而细胞不能承受高水平的染色体外DNA复制,导致细胞不久死亡(在转染后70~90 h)。有文献报道A_β可以自由弥散入胞核,由于其自动聚集特性,而被选择性的滞留胞核,也可能由于某一不明核定位信号肽的作用,A_β选择性的进入胞核。这两种可能机制导致A_β聚集胞核内,改变核内状态,最终导致细胞死亡^[11]。72 h后收集细胞,样品经细胞裂解液处理后经SDS-PAGE分离蛋白。蛋白免疫印迹分析发现单价真核表达载体pcDNA3.1-A₁₋₄₂表达A₁₋₄₂,相对分子质量约为 4×10^3 ,而二价真核表达载体pcDNA3.1-A₄₂₋₄₂则表达A₄₂₋₄₂,相对分子质量约为 8×10^3 ,与我们插入的目的基因片段编码产物大小吻合。这说明单价真核表达载体pcDNA3.1-A₁₋₄₂和二价真核表达载体pcDNA3.1-A₄₂₋₄₂能表达外源基因编码的目的蛋白。A₄₂₋₄₂较A₁₋₄₂相对分子质量增加1倍,其空间结构可能发生许多未知改变,影响其抗原表位,但抗原抗体特异性结合证明A₄₂₋₄₂抗原特异性未见变化。总之,我们成功构建了单价真核表达载体pcDNA3.1-A₁₋₄₂和二价真核表达载体pcDNA3.1-A₄₂₋₄₂,为下一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] SMALL G W. Diagnosis and treatment of alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the american association for geriatric psychiatry, the alzheimer's association, and the american geriatrics society[J]. JAMA, 1997, 278(11):1363-1371.
- [2] PRICE D L, SISODIA S S. Cellular and molecular biology of Alzheimer disease and animal models [J]. Annu Rev Med, 1994, 45(20): 435-446.
- [3] SCHENK D. Immunization with amyloid-_β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse [J]. Nature, 1999, 400(3):173-177.
- [4] CHECK E. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug [J]. Nature, 2002, 415(15): 462-467.
- [5] J.萨姆布鲁克 D.W.拉塞尔.黄培堂译.分子克隆实验指南[M].第3版.北京:科学出版社,2002:884-885.
- [6] 林贤,汪华侨,徐杰,等.A₄₂及其C端亚单位疫苗接种正常SD大鼠后产生高滴度的抗A₄₂抗体[J].解剖学报,2003,34(3):231-235.
- [7] LI S B, WANG H Q, LIN X, et al. Specific humoral (下转第317页 to page 317)

和 TNF- α 水平参与 TAO 患者眼眶炎症的发展, 但具体途径需进一步研究探讨。

本研究证实抵抗素在 TAO 患者眼眶脂肪组织中广泛表达, 在前脂肪细胞中检测不到, 但在前脂肪细胞向脂肪细胞分化时很快出现。抵抗素的促炎症特性可能在 TAO 患者眼眶炎症发展中起一定作用。抵抗素对 TAO 患者眼眶前脂肪细胞分化的影响及在眼眶炎症发展中的作用值得进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] HEUFELDER A E. Pathogenesis of ophthalmopathy in autoimmune thyroid disease [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2000, 1(1-2):87-95.
- [2] 王莉菲, 吴中耀, 杨华胜, 等. 甲状腺相关眼病患者眼眶前脂肪细胞的培养及分化[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(3): 351-353.
- [3] MCTERMAN P G, MCTERMAN C L, CHETTY R, et al. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(5):2407-2410.
- [4] STEPPAN C M, BAILEY S T, BHAT S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes [J]. Nature, 2001, 409(6818): 307-312.
- [5] BANERJEE R R, LAZAR M A. Resistin: molecular history and progenesis [J]. J Mol Med, 2003, 81(4):218-226.
- [6] SORISKY A, PARDASANI D, GAGNON A, et al. Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(9):3428-3431.
- [7] KIM K H, LEE K, MOON Y S, et al. A cystein-rich adipose tissue specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation [J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 11252-11256.
- [8] GONG H, NI Y, GUO X, et al. Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation [J]. Eur J Endocrinol, 2004, 150(6):885-892.
- [9] FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(5): 911-919.
- [10] 林 贤, 胡金家, 汪华侨, 等. A₄₂ 及其亚单位疫苗接种正常成年大鼠的行为学观察[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(3):208-211.
- [11] WYCHOWSKI C, BENICHO D, GIRARD M. A domain of SV40 capsid polypeptide VP1 that specifies migration into the cell nucleus[J]. EMBO J, 1986, 5(10): 2569-2576.

(编辑 刘清海)

(编辑 张恩健)

(上接第 253 页 from page 253)

Immune responses in adult rhesus monkeys vaccinated with A 1-15 vaccine[J]. Chin Med J, 2005, 118(8): 660-664.

- [8] 胡金家, 汪华侨, 李国营, 等. 铝佐剂 A₄₂ 及其亚单位疫苗可有效诱导大鼠产生特异性抗体[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(1):39-44.
- [9] 李国营, 胡金家, 林 贤, 等. A 不同片段肽疫苗免疫鼠后血清对 A₄₂ 诱导细胞毒性作用的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(2):102-104.