

• 基础实验研究论著 •

人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白真核表达载体的构建和鉴定*

何莹^{1,2}, 罗阳³, 王英翔⁴, 陈安², 胡川闽^{2△}

(1. 中国人民解放军第 323 医院检验科, 陕西西安 710054; 2. 第三军医大学临床生化教研室, 重庆 400038; 3. 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038; 4. 中国人民解放军 66284 部队, 北京 100020)

摘要:目的 构建人 NGAL 重组蛋白真核表达载体并转染 HEK293T 细胞进行瞬时表达。方法 从人白细胞中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增 NGAL 基因并将其克隆到真核表达载体 pcDNA3.1/His A 中构建真核重组表达质粒 pcDNA3.1/His A-NGAL, 经测序鉴定正确后用脂质体转染 HEK293T 细胞, 用 Western blot 和 ELISA 方法鉴定表达产物。结果 获得长度 597 bp 的 NGAL 蛋白基因并构建 pcDNA3.1/His A-NGAL 真核表达载体, 测序正确后转染, 用 Western blot 和 ELISA 方法证实 HEK293T 细胞可以表达 NGAL 重组蛋白并分泌出胞。结论 成功构建人 NGAL 重组蛋白真核表达载体, 转染 HEK293T 细胞表达出相应蛋白, 为下一步的研究奠定了基础。

关键词:中性粒细胞; 载脂蛋白类; 明胶酶类; 逆转录聚合酶链反应; 重组, 遗传

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1633-02

Construction and identification of eukaryotic expressing vector of neutrophil gelatinase associated lipocalin*

He Ying^{1,2}, Luo Yang³, Wang Yingxiang⁴, Chen An², Hu Chuanmin^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, No. 323 Hospital of PLA, Xi'an, Shanxi 710054, China; 2. Department of Clinical Biochemistry, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 4. Unit 66284 of PLA, Beijing 100020, China)

Abstract: **Objective** To construct eukaryotic expressing vector of NGAL and transfect into HEK293T cells for transient expression. **Methods** Recombinant NGAL was constructed by gene recombination. Total RNA was extracted from the human leukocyte. Then, the RT-PCR product was cloned to pcDNA3.1/HisA. The recombinant plasmid was identified by restriction map and sequence analysis. The NGAL expression in HEK293T cells transfected with recombinant pcDNA3.1/His A-NGAL was verified by Western blot and ELISA. **Results** 597 bp NGAL gene was obtained and recombinant pcDNA3.1/His A-NGAL plasmid was successfully constructed. After transfection, NGAL expression in the HEK293T cells was detected, which was verified by western blot and ELISA. **Conclusion** Recombinant NGAL plasmid is successfully constructed, which will benefit our further study on NGAL protein and establishment of the detection methods for NGAL.

Key words: neutrophils; apolipoproteins; gelatinases; reverse transcriptase polymerase chain reaction; recombination, genetic

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)最早是在中性粒细胞特异性颗粒中分离确定的脂质运载蛋白(lipocalin)超家族的新成员^[1]。NGAL 在人体多种组织如肾、前列腺、呼吸道和消化道上皮中呈低水平表达^[2]并参与体内多种生理、病理过程,如运输疏水性小分子,炎症发生、发展和肿瘤浸润、转移等^[3]。近年的研究表明 NGAL 与急性肾损伤(AKI)密切相关,当肾损伤发生时,NGAL 很早就显著增高,是 AKI 理想的早期诊断生化标志物^[4]。为将 NGAL 转化入临床,无论制备其单克隆抗体还是制备相应的蛋白标准品,获取与天然抗原结构相似的蛋白质抗原都非常重要。因此,本研究拟构建人 NGAL 真核表达载体,为今后进一步研究 NGAL 蛋白并建立其相关免疫学检测方法奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 大肠杆菌 TOP10 菌株为本实验室保存。TOP10 感受态细菌由本实验室自制。质粒 pcDNA3.1/His A 购自上海英骏生物技术有限公司。HEK293T 细胞为本实验室保存。

1.2 仪器与试剂 Acc65 I 和 EcoR I 购自 New England Biolabs 公司, T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。Trizol 试剂购自上海英骏生物技术有限公司, RT-PCR 试剂盒购自凯基生物, 凝胶回收试剂试剂盒、无内毒素质粒中提试剂盒购自 OMEGA 公司。PCR 仪为美国 MJ Research 公司产品。真核转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。NGAL 检测试剂盒购自 Bioporto 公司。NGAL 蛋白对照品购自北京义翘神州生物技术有限公司。测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.3 方 法

1.3.1 引物设计 从 GenBank 获得 NGAL mRNA 序列基因 NM_005564.3, 参照 pcDNA3.1/His A 质粒序列图谱, 5'端加入 Acc65I 内切酶切位点及保护碱基, 3'端加入 EcoR I 内切酶切位点及保护碱基, 通过 Primer Express Software Program 5.0 软件设计 PCR 引物序列, 送由上海英骏生物技术有限公司合成。NGAL 上游引物序列为 5'-TAA GGT ACC CAT GCC CCT AGG TCT CCT G-3', 下游引物序列为 5'-GGT GGA ATT TTA GCC GTC GAT ACA CTG-3', 片段产度为 597 bp。

* 基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)资助项目(2011AA02A113)。作者简介:何莹,女,主治医师,主要从事肾损伤诊断试剂研究。△ 通讯作者, E-mail: chuminhu@163.com。

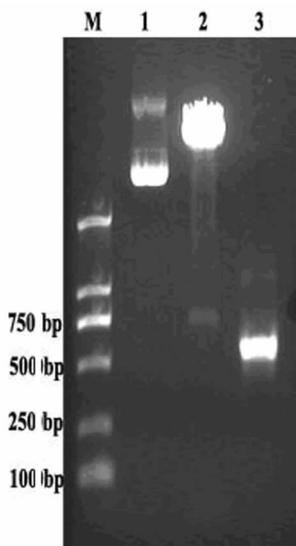
1.3.2 NGAL 基因的 RT-PCR 从人白细胞中提取总 RNA 并进行逆转录反应。以 5 μ L 逆转录产物为模板,加入引物进行 PCR 扩增。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60~66 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 25 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3.3 重组质粒 pcDNA3.1/His A-NGAL 的构建 用 Acc65 I 和 EcoR I 对 PCR 产物和 pcDNA3.1 质粒进行酶切并于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。以连接产物转化感受态 TOP10,在含氨苄青霉素(Amp⁺)的 LB 琼脂糖平板上进行筛选,随机挑选单个菌落进行扩增,提取质粒行双酶切鉴定并送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3.4 重组 pcDNA3.1/His A-NGAL 转染 HEK293T 细胞及其表达鉴定 细胞转染参照脂质体转染说明书操作,接种 HEK293T 细胞于 10 cm 培养皿中,转染时要求每个平皿细胞融合度达到 90%~95%。每皿用质粒 12 μ L,LipofectamineTM 2000 60 μ L。培养 48 h 后,收取细胞培养上清并提取细胞蛋白。分别用 Western blot 和 Bioporto 试剂盒检测 NGAL。

2 结 果

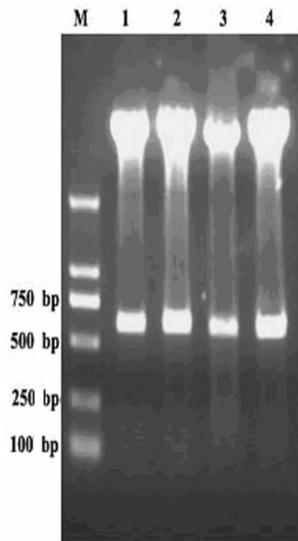
2.1 pcDNA3.1/His A-NGAL 重组质粒的构建 将 PCR 得到的 NGAL 基因与质粒分别进行 Acc65 I 和 EcoR I 双酶切,行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示在 500 bp 到 750 bp 位置之间有片段出现,约为 597 bp(图 1)。回收酶切片段并与酶切质粒连接过夜,将重组质粒转化入 TOP10 感受态菌体中,在 Amp⁺ 的 LB 平板上培养,挑取阳性单克隆用 LB 液体培养基进行摇菌扩增后抽提质粒,用 Acc65 I 和 EcoR I 双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 4 个阳性克隆 pcDNA3.1/His A-NGAL 质粒均切下 597 bp 的片段(图 2)。送上海英骏生物技术有限公司测序与已报道编码序列一致。



M: 标记物;1: 未酶切质粒;2: 酶切后质粒;3: 酶切后 NGAL 扩增片段。

图 1 酶切产物鉴定

2.2 pcDNA3.1/His A-NGAL 转染 HEK293T 细胞后表达检测 以空载体质粒转染的 HEK293T 细胞为阴性对照,NGAL 蛋白对照品做阳性对照用 Western blot 和 ELISA 分别对所得培养上清液和细胞蛋白提取液进行鉴定。蛋白提取液和培养上清液的泳道在相对分子质量 25×10^3 处均可见蛋白条带(图 3)。用 Bioporto 试剂盒测定上述样本,结果与 Western blot 结果一致(图 4)。



M: 标记物;1~4: 4 个阳性克隆。

图 2 重组质粒鉴定

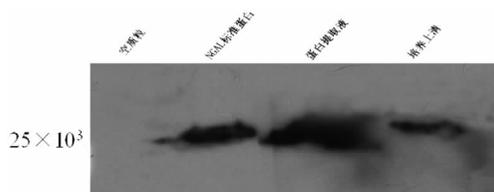


图 3 pcDNA3.1/His A-NGAL 重组质粒转染效果 Western blot 鉴定

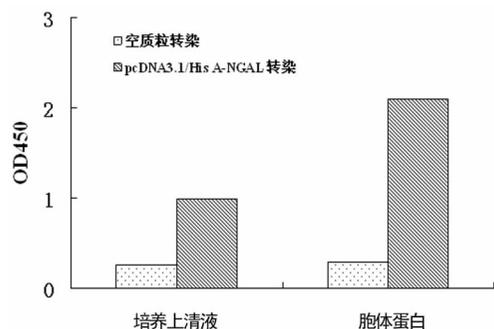


图 4 pcDNA3.1/His A-NGAL 重组质粒转染效果 ELISA 鉴定

3 讨 论

AKI 是临床多种疾病常见的严重并发症之一,具有高发病率、高病死率和早期诊断困难的特点^[5-7]。发现和鉴定 AKI 新的敏感生化标志物并建立准确的测定方法是 AKI 防治研究的重要方向。NGAL 作为一个新的肾损伤早期诊断生化标志物备受关注,近年来众多的实验室和临床研究表明早在肾损伤发生后 3 h 内 NGAL 就已经达到高峰,其在诊断 AKI 方面具有较高的敏感性和特异性^[8-9]。

建立 NGAL 相关检测方法需要获得 NGAL 蛋白抗原。已知 NGAL 蛋白是一个由 198 个氨基酸组成,相对分子质量约为 25×10^3 的分泌型糖蛋白^[1]。其在 86 位氨基酸处有明显的 N-糖基化位点,并具有多处潜在的 O-糖基化位点以及多处磷酸化位点。为尽可能保持 NGAL 蛋白的二级结构,获得与天然 NGAL 分子相似的蛋白抗原,本研究选择构建 NGAL 真核表达质粒,并选用具有较高表达效率和稳定性的 HEK293T 细胞表达系统^[10]表达 NGAL 重组蛋白。(下转第 1637 页)

学说,认为对于肿瘤而言免疫系统是一把双刃剑,在早期免疫系统发挥“免疫监视”作用清除肿瘤,而在平衡期免疫系统重塑了肿瘤的免疫原性促进了肿瘤的发生^[8,9]。众多研究都指出 IFN- γ 在“肿瘤免疫编辑”过程中发挥了重要的作用,不但参与免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤同时也参与了免疫系统对肿瘤细胞免疫原性的重塑^[10-12]。因此构建 hIFN- γ 腺病毒重组载体对于开展肿瘤细胞 IFN- γ 的敏感性改变的相关研究十分必要。

腺病毒载体与痘苗病毒载体、腺相关病毒载体、单纯疱疹病毒载体及逆转录病毒载体等都是目前常用的病毒表达载体。重组腺病毒载体因具有多种特点而被广泛应用于重要感染性疾病及恶性肿瘤的相关研究。无论是对肿瘤原代细胞转染还是进行动物实验普通的转染方式转染效率均不能满足要求,构建 hIFN- γ 重组腺病毒表达载体能过为下一步在动物实验中探索肿瘤逐渐丧失 IFN- γ 敏感性的研究提供良好的物质基础。重组腺病毒载体构建通常是将穿梭载体和骨架载体同时电转入 BJ5183 感受态细菌中,重组效率不高^[1]。改良的方法是首先将骨架质粒 pAdEasy-1 转入 BJ5183 感受态细菌中筛选获取含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态,将 *Pme* I 线性化的穿梭载体电转入含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态中,避免了将转移质粒转化到有缺陷或复制能力弱的细菌中,因而重组效率大幅提高^[2]。邹昌勇等^[3]利用改良的重组腺病毒构建方法以氯化钙化学转化法取代电穿孔法高效构建 p53 重组腺病毒表达载体。本实验将 pAdEasy-1 载体采用氯化钙化学转化入 BJ5183 感受态,而线性的 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 转化入 BJ5183-pAdEasy-1 采用的是电转化法,并且鉴定采用的是测序和双酶切使得构建过程更加合理阳性克隆获得率也较高。

参考文献

[1] Luo JZ, Deng L, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.

[2] 柳云帆, 吴小兵, 阮力. 腺病毒载体在疫苗研究中的应用[J]. 生物技术通讯, 2011, 4: 552-558.

[3] 邹昌勇, 全家妩, 田生和, 等. 简化的两步法细菌内同源重组腺病毒表达载体重组高效制备 p53 基因[J]. 中华医药杂志, 2006, 6(2): 126-129.

[4] Kubota K. Innate IFN-gamma production by subsets of natural killer cells, natural killer T cells and gammadelta T cells in response to dying bacterial-infected macrophages[J]. Scand J Immunol, 2011, 71(3): 199-209.

[5] Pillai S, Mattoo H, Cariappa A. B cells and autoimmunity[J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(6): 721-731.

[6] Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells[J]. Nat Immunol, 2000, 1(6): 475-482.

[7] Schroder KP, Hertzog J, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2): 163-189.

[8] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. Science, 2011, 331(6024): 1565-1570.

[9] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape[J]. Nat Immunol, 2002, 3(11): 991-998.

[10] Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, et al. Interferon-gamma and cancer immunoeediting[J]. Immunol Res, 2005, 32(1/3): 231-245.

[11] Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(11): 836-848.

[12] Ikeda HL, Old J, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoeediting[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(2): 95-109.

(收稿日期: 2012-12-01)

(上接第 1634 页)

本研究成功构建了 NGAL 重组真核表达载体 pcDNA3.1/His A-NGAL, 对其通过测序证实无误后转染 HEK293T 细胞, 通过 Western blot 和 ELISA 方法对表达产物进行鉴定说明 pcDNA3.1/His A-NGAL 能够在 HEK293T 细胞中表达且可以分泌到细胞外, 但细胞表达量远远大于分泌出胞蛋白量。本实验为进一步研究 NGAL 蛋白并建立其相关免疫学检测方法奠定了基础。

参考文献

[1] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengel H, et al. Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase [J]. Biol Chem, 1993, 268 (14): 10425-10432.

[2] Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin- siderophore iron complex rescues the kidney from ischemia reperfusion injury[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 610-621.

[3] Xu SY, Pauksen K, Venge P, et al. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1995, 55(2): 125-131.

[4] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2534-

2543.

[5] Prabhu A, Sujatha DI, Ninan B, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass [J]. Ann Vasc Surg, 2010, 24(4): 525-531.

[6] Gomes E, Antunes R, Dias C, et al. Acute kidney injury in severe trauma assessed by RIFLE criteria: a common feature without implications on mortality? [J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2010, 18(1): 1-6.

[7] Andrikos E, Tseke P, Balafa O, et al. Epidemiology of acute renal failure in ICUs: a multi-center prospective study[J]. Blood Purif, 2009, 28(3): 239-244.

[8] Paragas N, Qiu A, Zhang Q, et al. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time[J]. Nat Med, 2011, 17(2): 216-223.

[9] Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery[J]. Lancet, 2005, 365(9466): 1231-1238.

[10] Fricker LD, Gelman JS, Castro LM, et al. Peptidomic analysis of HEK293T cells: effect of the proteasome inhibitor epoxomicin on intracellular peptides[J]. J Proteome Res, 2012, 11(3): 1981-1990.

(收稿日期: 2012-12-08)