

pcDNA3.1/NT-GFP 小凹蛋白 1 及突变体表达载体的构建及功能分析

徐阳炎¹, 杨慧龄^{1,2}, 涂 剑¹, 何淑雅¹, 廖端芳^{1,2}

(1. 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001; 2. 中南大学药学院, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 分子生物学; 小凹蛋白 1; 突变体; 克隆; 聚合酶链反应

[摘要] 目的 构建 pcDNA3.1/NT-GFP 小凹蛋白 1 及对突变体表达载体及表达蛋白生物活性进行分析。方法

采用硫化修饰引物与 Pfu 酶结合的高度保真性聚合酶链反应体系, 自行设计多对引物, 分别扩增带 His 标签的小凹蛋白 1 全长目的片段、小凹蛋白 1(缺失 81~101 位氨基酸)突变体 1 片段及小凹蛋白 1(缺失 143~156 位氨基酸)突变体 2 片段; 分别亚克隆入 pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO 真核表达载体, 转化 TOP10 E. coli 大肠杆菌, 在含氨苄的固体 LB 培养基上随机挑取 6 个克隆, 分别提取质粒后, 用 PCR 法筛选含正确插入阅读框的阳性克隆子并测序鉴定。用脂质体介导法瞬时转染入 HepG2 细胞, 用 MTT 法、Western blot 法初步鉴定 GFP-His 小凹蛋白 1 及突变体重组融合蛋白的生物活性。结果 筛选得到正确 pcDNA3.1/NT-GFP-His 小凹蛋白 1 及突变体表达载体, 测序结果无碱基突变及阅读框移码, GFP-His 小凹蛋白 1 及突变体重组融合蛋白具有天然表达蛋白相似的生物学活性。结论 成功构建具有生物学活性的 pcDNA3.1/NT-GFP 小凹蛋白 1 及突变体表达载体, 为小凹蛋白 1 的功能研究奠定基础。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Construction, Identification and Primary Functional Analysis of pcDNA3.1/NT-GFP-Caveolin-1 and Mutants Plasmids

XU Yang-Yan¹, YANG Hui-Ling^{1,2}, TU Jian¹, HE Shu-Ya^{1,2}, and LIAO Duan-Fang¹

(1. Institute of Pharmacology and Pharmacy, Nanhua University, Hengyang 421001; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Caveolin-1; Polymerase Chain Reaction; Cloning; Mutants Plasmids

[ABSTRACT] **Aim** To construct and identified the eukaryotic expression recombinant plasmids containing caveolin-1 gene and mutants for the potential functional analysis. **Methods** Using a novel high fidelity gene expression profiling strategy mediated by Pfu proofreading polymerases combining with phosphorothioate modified primers, PCR-amplified ORFs of caveolin-1 and

its mutants were inserted into a N-GFP tagging expression vector with the help of topoisomerase F-mediated ligation. After transformation into chemically competent One Shot TOP10 E. coli, the respective destination clones were selected for by plating on ampicillin selective agar plates. The correct orientation and reading frames of the constructs were identified through the PCR approach with the respective sense primer and the BGH antisense primer. The corrected reconstructs would add about 100 bp more than the RT-PCR fragments. The integrity of ORFs was verified by sequencing to exclude errors introduced in the amplification step.

MTT and western blot approaches were carried out to determine whether the overexpressed tagged proteins present the same protein activities as endogenous proteins. **Results** We obtained 3 recombined caveolin-1 mutant plasmids. In addition, we demonstrated that overexpression of two caveolin-1 mutants in HepG2 cells could result in apoptosis of HepG2. However the other caveolin-1 mutant could promote the growth of HepG2 cells. The overexpressed tagged proteins present the same protein activities as endogenous caveolin-1 protein. **Conclusion** The eukaryotic expression recombinant plasmids containing caveolin-1 gene and mutants were successfully constructed.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一综合因素诱发的疾病,细胞内胆固醇代谢紊乱,特别是胆固醇的流出障碍是导致细胞内胆固醇堆积,最终形成泡

沫细胞的重要诱因。小凹(caveolae)是与细胞膜生物功能多样性密切相关的关键性结构,为日本学者 Palade 等于 1950 年发现和命名的直径为 50 nm 到 100 nm 大小的细胞膜上的内陷囊泡,但其含义现在已扩展。研究发现小凹既能够内陷,又能在质膜平面展平,还能够和质膜分离成为囊泡;此外,小凹内吞泡之间能相互融合形成葡萄串状结构和直径远大于 100 nm 的管状结构^[1,2]。大量研究表明小凹是细胞内胆固醇流出的关键结构,其标志性表面蛋白小

[收稿日期] 2005-04-27

[修回日期] 2005-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30400265);湖南省自然科学基金项目(03JJY3037)

[作者简介] 徐阳炎,硕士研究生。通讯作者杨慧龄,博士,副教授,硕士研究生导师, E-mail 为 xuhengyuy999@yahoo.com。廖端芳,博士,教授,博士研究生导师, E-mail 为 dfliao66@yahoo.com。

凹蛋白 1 对维持细胞胆固醇代谢平衡具有重要意义,但机制未明。本研究拟构建 pcDNA3.1/NT-GFP 小凹蛋白 1 及突变体表达载体,为小凹蛋白的功能多样性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

Taq 酶(MBI 公司), Pfu 酶(BBI 公司), pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO TA 真核表达载体试剂盒(Invitrogen 公司); pUC18-小凹蛋白 1(含人小凹蛋白 1 编码全长基因)由本室自行构建保存; RNA 提取试剂盒(Invitrogen); dNTP(上海生工); 兔抗人小凹蛋白 1 多克隆一抗(Santa Cruz 公司), 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(Santa Cruz 公司); Opti-MEM、Lipofectamine™ 转染试剂(Invitrogen 公司); BCA 蛋白含量测定试剂(Hyclone-Pierce 公司)。

1.2 引物

根据小凹蛋白 1 基因全长编码区、突变体及 pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO 表达载体设计合成多对引物,所有引物 3' 末端硫化修饰(上海生工合成)。小凹蛋白 1 全长基因上游引物(带 6 个组氨酸 His 蛋白纯化标签) 5'-CAT CAT CAC CAT CAC CAT TCT GGG GGC A-3'; 下游引物 5'-TTA TAT TTC TTT CTG CAA GTT GAT G-3'; 小凹蛋白 1 下游 142 位氨基酸 5'-CTG AAT CTC AAT CAG GAA GCT CTTA-3'; 小凹蛋白 1 下游 80 位氨基酸 5'-ACT GTG TGT CCC TTC TGG TTC TGC-3'; 102 位氨基酸上游引物 5'-TTG CTG TCT GCC CTC TTT GG-3'; 80 位与 102 位氨基酸跨度引物 5'-AAC CAG AAG GGA CAC ACA GTT TGC TGT CTG CCC TCT TTG G-3'; 缺失 143~156 位氨基酸合成序列 5'-AGC TTC CTG ATT GAG ATT CAG GAC CCA CTC TTT GAA GCT GTT GGG AAA ATA TTC AGC AAT GTC CGC ATC AAC TTG CAG AAA GAA ATA-3'。

1.3 扩增目的编码区

采用硫化修饰结合 Pfu 酶构成的高保真 PCR 系统^[3,4],以 puc18 小凹蛋白 1(含人小凹蛋白 1 编码全长基因)质粒为模板,分别以新的带 His 标签的小凹蛋白上下游引物、80 位氨基酸、102 位氨基酸、142 位氨基酸、80 位与 102 位氨基酸跨度引物、缺失 143~156 位氨基酸合成序列扩增出新的小凹蛋白全长及突变体 1(缺失 81~101 位氨基酸骨架区)和突变体 2(缺失 143~156 位氨基酸脂质结合区)的编码区。PCR 反应条件为 94℃预变性 3 min → 94℃变性 30 s → 52℃退火 30 s → 72℃延伸 45 s,循环 30 次。反应

结束后每管中加入 Taq 酶 50 kU/L, 72℃再延伸 10 min 以便将 PCR 产物 3' 末端加碱基 A。PCR 产物经 1.7% 琼脂糖电泳鉴定。

1.4 pcDNA3.1/NT-GFP 小凹蛋白 1 及突变体表达载体的构建及鉴定

分别将扩增得到的目的编码基因按试剂盒 pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO TA 真核表达载体说明,通过 5 min TOPO 酶连接反应,转化 TOP10 E. coli 大肠杆菌,在含氨苄的固体 LB 培养基上随机挑取 6 个克隆,分别提取质粒后,用小凹蛋白 1 上游引物和 pcDNA3.1/NT-GFP 载体含有的 BGH 下游引物通过 PCR 法筛选重组子,含有正确插入框的克隆 PCR 产物分别比原有的片段增加约 100 bp。将筛选的目的单克隆送上海博亚公司测序鉴定。

1.5 质粒提取、细胞转染、MTT 法测定各重组子生长曲线

将构建成功的 pcDNA3.1/NT-GFP 小凹蛋白 1 及突变体表达载体、GFP 对照载体单克隆过夜摇菌,分别提取质粒。用脂质体 Lipofectamine™ 转染 HepG2 细胞。收集各组细胞以 2.5×10^6 个/L 的密度接种在 96 孔板,连续 6 天用 MTT 法比较各组细胞生长速率,每组每天设 8 个平行孔,计算细胞存活率,细胞存活率 = 实验组吸光度(A) / 空白组吸光度 × 100%。

1.6 Western 印迹法检测小凹蛋白 1 及突变体重组蛋白生物活性

用 BCA 试剂测定蛋白含量,并用 1 × SDS 凝胶加样缓冲液调节至各组蛋白浓度一致(2.5 g/L),12.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶,90 V 恒压电泳 3 h,转移至 PVDF 膜上。4℃含 5% 脱脂奶粉的 TBST(20 mmol/L Tris base pH 7.6, 50 mmol/L NaCl, 0.1% Tween)封闭过夜,按 1:200 加入兔抗人小凹蛋白 1 一抗,室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,1:3 000 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,室温孵育 45 min。TBST 洗 3 次,用 Western blot 荧光检测试剂盒显示结果于 X 光片。Epson1650photo 扫描仪收集图像。

2 结果

2.1 小凹蛋白 1 全长及功能突变体编码框的扩增

如图 1(Figure 1)所示,小凹蛋白 1 全长基因 178 个氨基酸的片段(lane 1),通过 80 位与 102 位氨基酸跨度引物将小凹蛋白 1 的 1~80 氨基酸的片段(lane 2)与 102~178 氨基酸的片段(lane 3)连接起来得到为缺失 81~101 氨基酸信号分子结合域功能突变体 1 片段(lane 5);通过缺失 143~156 位氨基酸合

成序列重新扩增小凹蛋白 1 的 1~ 142 氨基酸的片段(lane 4)得到缺失 143~ 156 胆固醇结合域功能突变体 2 片段(lane 6)。

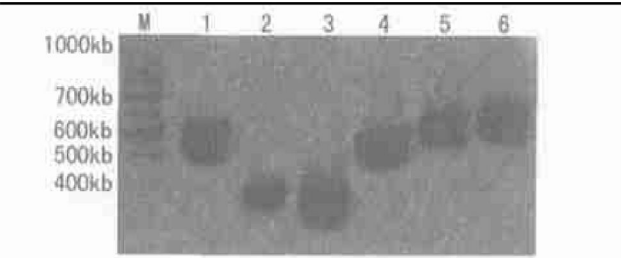


图 1. 小凹蛋白 1 不同功能区域缺失突变体聚合酶链反应扩增电泳图 M 为 DNA 标准品,1 为包含小凹蛋白 1 基因全长 178 氨基酸片段,2 为包含小凹蛋白 1 第 1~ 80 氨基酸片段,3 为包含小凹蛋白 1 第 102~ 178 氨基酸片段,4 为包含小凹蛋白 1 第 1~ 142 氨基酸片段,5 为缺失第 81~ 101 氨基酸信号分子结合域功能突变体片段,6 为缺失第 143~ 156 氨基酸胆固醇结合域功能突变体片段。

Figure 1. The amplification results of the various function domain sequences of caveolin 1

2.2 相关 GFP 及 His 复合标签表达载体的构建及鉴定

带 His 标签的小凹蛋白 1 全长、缺失 81~ 101 氨基酸信号分子结合域功能突变体 1 片段、缺失 143~ 156 胆固醇结合域功能突变体 2 片段通过 PCR 扩增、拼接后转入 pcDNA3. 1/NT-GFP-TOPO TA 真核表达载体,挑选正确重组子克隆送往 Invitrogen 公司测序鉴定以确定无碱基突变及编码区移码突变(图 2, Figure 2)。

2.3 各种转染表达载体及未转染 HepG2 细胞生长的比较

如表 1(Table 1)所示,GFP 空白对照载体转染组

表 1. MTT 法比较各种转染表达载体及未转染 HepG2 细胞生长 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of various GFP fusion expression proteins on HepG2 cells survival using MTT assay

分 组	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
HepG2 对照	0.310 ± 0.021	0.387 ± 0.025	0.518 ± 0.092	0.691 ± 0.123	0.912 ± 0.259	1.398 ± 0.368
细胞中 GFP 对照	0.325 ± 0.030	0.405 ± 0.044	0.497 ± 0.113	0.725 ± 0.050	0.853 ± 0.087	1.307 ± 0.153
小凹蛋白突变体 1	0.396 ± 0.032 ^{ab}	0.557 ± 0.091 ^{ab}	0.640 ± 0.097 ^{ab}	0.913 ± 0.278 ^{ab}	0.933 ± 0.278 ^{ab}	1.288 ± 0.203 ^{ab}
小凹蛋白突变体 2	0.233 ± 0.012 ^{ab}	0.283 ± 0.326 ^{ab}	0.355 ± 0.087 ^{ab}	0.445 ± 0.058 ^{ab}	0.509 ± 0.083 ^{ab}	0.770 ± 0.141 ^{ab}
小凹蛋白 1	0.167 ± 0.012 ^{ab}	0.177 ± 0.023 ^{ab}	0.145 ± 0.008 ^{ab}	0.141 ± 0.024 ^{ab}	0.180 ± 0.013 ^{ab}	0.214 ± 0.062 ^{ab}
阳性对照	0.218 ± 0.031 ^{ab}	0.184 ± 0.020 ^{ab}	0.152 ± 0.019 ^{ab}	0.142 ± 0.010 ^{ab}	0.170 ± 0.240 ^{ab}	0.206 ± 0.057 ^{ab}

a: $P < 0.05$, 与 HepG2 组比较; b: $P < 0.05$, 与 GFP 组比较。

2.4 Western 印迹法检测小凹蛋白 1 及突变体重组蛋白生物活性

如图 3(Figure 3)所示,相同细胞数量中,Lane 1、

与未转染 HepG2 细胞生长速率差异无显著性($P > 0.05$);小凹蛋白各组表达载体转染的 HepG2 以及 vbmdmp 促凋亡阳性对照与 GFP 空白对照载体转染组与未转染 HepG2 细胞生长速率比较差异有显著性($P < 0.01$);其中小凹蛋白全长与 vbmdmp 促凋亡阳性对照生长速率差异无显著性($P > 0.05$),说明过表达小凹蛋白能显著抑制肿瘤细胞 HepG2 的生长;而缺失 81~ 101 氨基酸信号分子结合域小凹蛋白功能突变体 1 能有效促进 HepG2 生长,缺失 143~ 156 胆固醇结合域小凹蛋白功能突变体 2 也能有效抑制 HepG2 细胞生长,但抑制效果不如全长小凹蛋白基因。

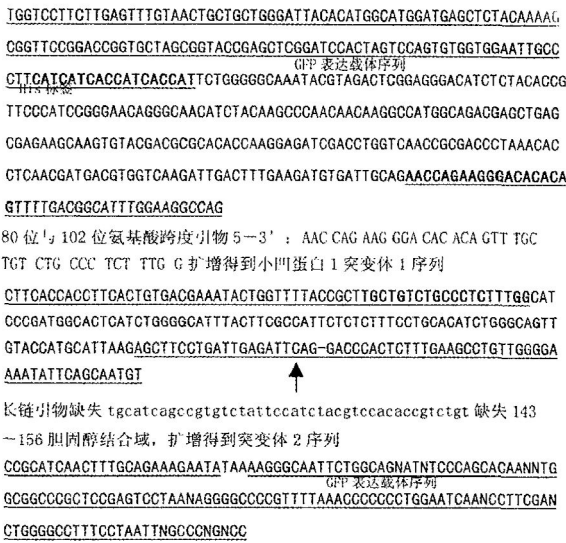


图 2. 小凹蛋白 1 GFP 表达载体测序结果示意图

Figure 2. The sequence results of the expression recombinant plasmids containing caveolin-1 gene and mutants

3 中未转染的 HepG2 细胞与转染 GFP 载体对照中小凹蛋白 1 表达量较低,两者没有显著性差异; Lane 2、4、5 分别转染小凹蛋白 1 全长质粒,缺失(81~ 101)

氨基酸突变体 1 和缺失脂质转运区的突变体 2 质粒的 HepG2 细胞中小凹蛋白 1 蛋白的表达明显上升, 与对照组相比有显著性差异。说明我们构建的小凹蛋白 1 及突变体能够表达具有天然蛋白相似生物活性的融合蛋白, 蛋白活性及天然构象没有受 GFP 荧光定位蛋白和 His 纯化蛋白标签的影响。



图 3. Western 印迹法检测转染不同载体的 HepG2B 细胞中小凹蛋白 1 蛋白活性 1 为未转染 HepG2 细胞对照, 2 为转染小凹蛋白 1 全长质粒的 HepG2 细胞, 3 为转染 GFP 载体对照, 4 为转染小凹蛋白 1 突变体 1, 5 为转染小凹蛋白 1 突变体 2。

Figure 3. Transfect HepG2 cell line and test for expression of caveolin GFP protein fusion by Western blot assay

3 讨论

小凹对细胞的胆固醇代谢具有重要的调控作用, 其表面标志蛋白小凹蛋白是介导和调节细胞内胆固醇流出和转运的主要结构蛋白。小凹蛋白有小凹蛋白 1、小凹蛋白 2 和小凹蛋白 3 三种, 其中, 小凹蛋白 1 又有 α 、 β 两种异构体^[5], 小凹蛋白 1 和小凹蛋白 3 可独自形成同聚物, 而小凹蛋白 2 往往和小凹蛋白 1 结合形成异聚物在各种组织中表达, 特别是在内皮细胞、脂肪细胞、I 型肺泡上皮细胞中表达丰富^[6]; 小凹蛋白 3 主要在肌肉组织中表达^[5]。而且, 小凹蛋白基因家族的结构与功能在进化中从蠕虫到人都是非常相似与保守的, 其生物学功能研究是近年的热点研究领域之一。已有研究表明小凹/小凹蛋白在介导细胞内外大分子物质转运(胞饮/胞吐)、维持胆固醇代谢平衡、细胞黏附、迁移与增殖以及参与信号传导和病毒感染等方面起着非常重要的作用^[4,7]。

小凹虽然在很多细胞类型均有分布, 但不同组织与小凹蛋白 1 结合的信号分子也有所不同, 因而小凹蛋白在不同的细胞其功能有差别。例如小凹蛋白 1 是一种抑癌基因, 而小凹蛋白 1 基因剔除小鼠首先表现肺部功能紊乱并且是乳腺癌的易感模型^[9]。在单核细胞、脂肪细胞中小凹蛋白主要与脂质代谢有关, 因此动脉粥样硬化发生时的泡沫细胞上可见小凹表达下调^[10]。小凹蛋白的氨基酸序列有一段高度保守的骨架区域(scaffolding domain, 第 82~101 个氨基酸残基)^[7,9,11], 这一区域在正常情况下可使小凹蛋白象分子伴侣一样, 结合并失活一些细胞内信号传导的重要分子。而 143~156 氨基酸

序列可能与脂质结合相关^[11], 因此我们构建同时具有 GFP 定位荧光蛋白和 His 纯化蛋白标签的小凹蛋白 1 真核表达载体及功能域突变体, 这将为动脉粥样硬化的发生、发展和分子机制的阐明奠定基础。由于 GFP 荧光表达蛋白分子量较大, 文献[12]报道标签蛋白的表达有可能干扰目的蛋白的正常生物活性, 因此筛选具有内源性表达蛋白相似生物活性的重组体是后继研究的前提, 从我们 MTT、免疫印迹实验结果来看, 我们构建的小凹蛋白 1 及突变体能够表达具有天然蛋白相似生物活性的融合蛋白, 蛋白活性及天然构象没有受 GFP 荧光定位蛋白和添加的 His 纯化蛋白标签的影响。因此, 此重组体的 GFP 标签以及 His 标签将为研究小凹蛋白 1 蛋白在脂质转运中的精确时空定位和相互作用蛋白的研究奠定重要基础。

[参考文献]

- [1] Liu J, Wang XB, Park DS, Michael P. Lisanti caveolin 1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 10 661-668
- [2] Dvorak AM, Liao DF. The Vesicular-Vacuolar Organelle (VVO): A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem*, 2001, **49**: 419-432
- [3] 杨慧龄, 廖端芳, 徐阳炎, 罗迪贤. 一种可消除非特异性条带的 PCR 方法及利用该方法制备的 RT-PCR 芯片. 中国专利申请号 200410045031.5
- [4] Yang HL, Fang WY, Jiang Y, Xu YY, LIAO DF, He FC. High fidelity PCR with an off/on switch mediated by proofreading polymerases combining with phosphorothioate modified primer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **328**: 265-272
- [5] Das K, Lewis RY, Scherer PE, Lisanti MP. The membrane spanning domains of caveolins 1 and 2 mediate the formation of caveolin heterooligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 18 721-726
- [6] Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 16 395-401
- [7] Scherer PE, Lewis RY, Volont D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, et al. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin 2, Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable heterooligomeric complex in vivo. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 29 337-346
- [8] Marek Drab, Paul Verkade, Marlies Elger, Michael Kasper, Matthias Lohn, Birgit Lauterbach, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin 1 gene disrupted mice. *Science*, 2001, **93**: 2 449-452
- [9] Wei Y, Lukashev ME, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, et al. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science*, 1996, **273**: 1 551-555
- [10] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. 小凹蛋白 1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 369-373
- [11] Chan TF, Su TH, Yeh KT, Chang JY, Lin TH, Chen JC, et al. Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin 1 gene in cervical cancers. *Int J Oncol*, 2003, **23** (3): 599-604
- [12] Silver PA. How proteins enter the nucleus. *Cell*, 1991, **64**: 489-497

(此文编辑 胡必利, 朱雯霞)