

带 J 链的 α -防御素-1 基因转染 COS-7 细胞后的表达检测

刘贤华 白晓东 仝青英 张韶峰

【摘要】 目的 将 α -防御素-1(HNP-1)基因与 J 链基因重组为一种新的杀菌肽分子 J-HNP-1, 观察 J-HNP-1 在细胞内的表达及分泌情况。方法 采用聚合酶链反应(PCR)方法分别从 pCH-J 质粒和 pBabeNeo-HNP-1 质粒中扩增出 J 链和 HNP-1; 进行重组 PCR, 获取 J-HNP-1 DNA 片段, 并插入哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 中; 用脂质体转染法将此重组真核表达载体导入 COS-7 细胞, 然后应用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 His-tag 标签基因。结果 用抗 His 抗体检测到细胞可溶性蛋白及培养上清在约 24 ku 处均有强反应条带显示, 其大小与预测相符; 对照组未见相应条带显示。结论 采用 Western blot 检测到新的杀菌肽分子 J-HNP-1 在细胞内得到表达并分泌到细胞外, 为进一步研究 J-HNP-1 杀菌肽的抗菌活性奠定了基础。

【关键词】 重组聚合酶链反应; 杀菌肽; J 链; α -防御素-1; 转染

Expression of α -defensin-1 with J chain in the transfected COS-7 cells LIU Xian-hua, BAI Xiao-dong, TONG Qing-ying, ZHANG Shao-feng. Central Laboratory, General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Beijing 100039, China

【Abstract】 Objective To recombine the α -defensin-1 (HNP-1) and J chain cDNA fragment into a new germicidal molecule J-HNP-1, and investigate its expression in the transfected COS-7 cells. **Methods** J chain and HNP-1 cDNA were amplified from the plasmids pCH-J and pBabeNeo-HNP-1 respectively, then the J-HNP-1 DNA fragment was obtained by recombinant polymerase chain reaction (PCR). The J-HNP-1 fragments were inserted into pcDNA3.1(-)/Myc-HisC, which subsequently was made to transfect the COS-7 cell by lipid transfection method. The expression was confirmed by Western blot. **Results** Determination with His antibody, a dense band at 24 ku was displayed by the cell lysate and the cell culture supernatant in concordance with that of the predicted extent, but not in the control. **Conclusion** The new germicidal peptide J-HNP-1 is found to be expressed intracellularly and could be secreted. The results lay the foundation for further study on the germicidal activity of J-HNP-1.

【Key words】 recombinant polymerase chain reaction; antimicrobial peptide; J chain; α -defensin-1; transfection

防御素(defensin)是近几年来非常引人关注的一种阳离子多肽,它是一大类家族,广泛存在于昆虫、低等脊椎动物及哺乳动物体内,由 30~35 个氨基酸组成。防御素分为昆虫防御素、植物防御素和哺乳动物防御素,动物防御素根据结构又可分为 α -防御素和 β -防御素,它主要来源于皮肤、呼吸道等上皮组织^[1,2],遇到病原微生物刺激时表达增强,是机体抵抗病原微生物入侵的重要免疫屏障。我们设计本实验,将 α -防御素-1(HNP-1)进行分子改建,使 HNP-1 带有 J 链分子, J 链分子与细胞膜上具备的多聚 IgA 受体(pIgR)结合,从而使防御素能顺利进入细胞内发挥杀菌作用。

1 材料和方法

1.1 材料:哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1(-)/

Myc-HisC 购自 Invitrogen 公司; pCH-J 质粒由挪威奥斯陆大学 Johansen 教授赠送; 人防御素真核表达质粒 pBabeNeo-HNP-1 由华西医科大学赠送; 金黄色葡萄球菌标准菌株 6538 由北京军事医学科学院九所提供; 细胞株 COS-7 细胞由北京军事医学科学院二所赠送。限制性内切酶 BamH I、兔抗多聚组氨酸抗体(即 His 抗体)购自北京华美生物公司; 聚合酶链反应(PCR)产物克隆试剂盒购自北京天象邦定生物科技有限公司; 脂质体转染试剂购自北京天为时代公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计:①J 链上游引物 P1:5'-gga tcc atg aag aac cat ttg ctt-3'; 下游引物 P2:5'-acc acc acc acc gtc agg ata gca ggc atc-3'。②HNP-1 上游引物 P3:5'-ggg ggt ggt ggt atg agg acc ctc gcc atc-3'; 下游引物 P4:5'-gga tcc gca gca gaa tgc cca gag-3'。③根据预测 J-HNP-1 cDNA 序列设计 PCR 引物: P5:5'-atg aag aac cat ttg ctt ttc tgg

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30100197)

作者单位:100039 北京,武警总医院

作者简介:刘贤华(1971-),女(汉族),湖北洪湖人,硕士,主管技师。

g-3'; P6: 5'- gca gca gaa tgc cca gag tc-3'.

①测序引物:正向引物为 T7: 5'- TAATACGAC-TCACTATAGGG-3';反向引物为 BGH-rev: 5'- TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'。以上引物均由北京军事医学科学院合成。

1.2.2 pIgR 配体样杀菌肽分子 J-HNP-1 的构建:用 PCR 方法以 P1、P2 为引物从原质粒 pCH-J 中扩增出 J 链片段。用 PCR 方法以 P3、P4 为引物从原质粒 pBabeNeo-HNP-1 中扩增出 HNP-1 片段。用重组 PCR 技术,以 J 链扩增产物和 HNP-1 扩增产物的混合物为模板,以 P1、P4 为引物扩增获取 J-HNP-1 基因。将此杂合基因 J-HNP-1 DNA 片段先利用 PCR 产物克隆试剂盒与 pGM-T Easy 载体相连接,再用限制性内切酶 BamH I 进行酶切以获取 J-HNP-1 DNA 片段。将 J-HNP-1 DNA 片段插入真核表达质粒 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 的多克隆位点,并紧邻报告基因 Myc 表位和 6×His 的上游,从而构建成为重组真核表达载体 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1。用该重组质粒转化大肠杆菌 TOP10,并接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的琼脂糖(LB)培养基,过夜培养后挑取阳性克隆,提取质粒 DNA,随机挑取 8 个阳性克隆提取质粒 DNA,用限制性内切酶 BamH I 进行酶切鉴定,并对阳性克隆质粒进行 DNA 测序。

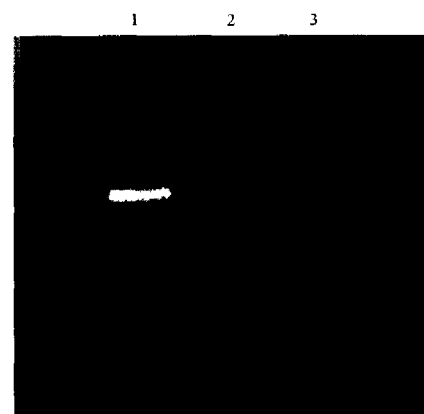
1.2.3 基因转染:COS-7 细胞培养于含体积分数为 10%胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)中。转染前 1 d,将细胞转移至 6 孔板,使细胞达 90%~95%。用脂质体转染试剂将 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 导入 COS-7 细胞。同时设置转染空质粒 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC 的 COS-7 细胞作为阴性对照。

1.2.4 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测:于转染后 36 h 收集各组细胞及培养上清(无胎牛血清和抗生素)。用蛋白质提取试剂提取细胞可溶性蛋白^[3]。培养上清先用蒸馏水透析后经冷冻干燥机浓缩,将以上各组样品经质量分数为 12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)后转染聚偏氟乙烯(PVDF)膜。将 PVDF 膜放入封闭液[用磷酸盐缓冲液(PBS)配置的体积分数为 1%牛血清白蛋白(BSA)]中 4℃封闭过夜,以去除非特异结合部分。加 1:1 500 稀释的抗 His 抗体(一抗),37℃孵育 1 h;加入辣根过氧化物酶标记的抗兔抗体 IgG(二抗),37℃孵育 1 h;室温暗处于 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色液(含质量分数为 0.05%DAB、体积分数为 0.03% H_2O_2

的 PBS)中显色,条带出现后立即用 PBS 洗净。

2 结果

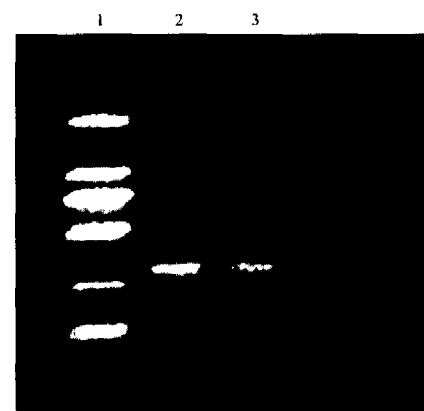
2.1 J-HNP-1 基因的构建:从 pCH-J 质粒中扩增出 J 链,产物大小为 489 bp(图 1);从 pBabeNeo-HNP-1 质粒中扩增出 HNP-1,产物大小为 297 bp(图 2)。然后以其自身产物为模板,进行重组 PCR,产生了包含 J 链和 HNP-1 这两个不同基因的杂合基因。将此杂合基因与 pGM-T Easy 载体通过连接与转化,产生阳性克隆菌落。挑菌、培养、提取质粒, BamH I 酶切质粒 pGM-T Easy/J-HNP-1,获取 J-HNP-1 片段,再次克隆入哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC。



1: DNA Marker DL2 000; 2, 3: J 链 PCR 产物;

图 1 J 链 PCR 产物电泳图

Figure 1 PCR product of J chain



1: DNA Marker DL2 000; 2, 3: HNP-1 PCR 产物

图 2 HNP-1 PCR 产物电泳图

Figure 2 PCR product of HNP-1

2.2 重组哺乳动物细胞表达载体 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 的筛选与鉴定:用随机方法挑取 8 个阳性克隆提取质粒 DNA,用限制性内切酶 BamH I 进行酶切鉴定,对 6 个阳性克隆质粒进行 DNA 测序。测序结果显示:使用正向引物 T7 和反向引物 BGH-rev 对重组质粒 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 进行 DNA 序列测定,插入

片断为 786 bp, 而且有 4 个为正向插入。在 2 个不同基因之间顺利插入了 4 个甘氨酸分子, 双重标签基因 Myc 和 6 个多聚组氨酸(His)位于杀菌肽分子 J-HNP-1 的下游。

2.3 Western blot 检测 J-HNP-1 的表达(图 3): Western blot 检测结果表明: 经 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 转染的 COS-7 细胞可溶性蛋白在约 24 ku 处有强反应条带显示, 经 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 转染的 COS-7 细胞的培养上清在约 24 ku 处也有一强反应条带显示。对照组转染空质粒 pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 的 COS-7 细胞和培养上清均未见相应条带显示。

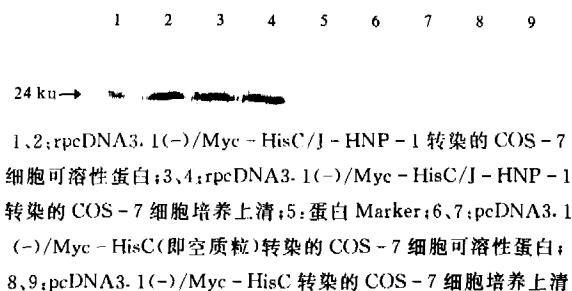


图 3 Western blot 分析转染 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 的 COS-7 细胞 J-HNP-1 的表达

Figure 3 Analysis of J-HNP-1 in COS-7 cells transfected by rpcDNA 3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 by Western blot

3 讨论

抗生素在抗感染领域中一直发挥着巨大作用。但由于各种原因, 如细菌的变异、抗生素的滥用等等造成细菌对传统抗生素的耐药却一直困扰着整个医学界。人们一直尝试着各种途径去解决这一难题, 目前抗菌肽的研究成为热点之一。抗菌肽的种类很多, 防御素是最引人关注的, 目前国内对防御素的研究主要集中在基因重组阶段^[4,5]。防御素主要存在于肠道、女性生殖道黏膜系统中, 而黏膜上皮细胞又有一个共同的特点, 即在细胞膜上具备 pIgR。连有 J 链的 IgA 分子通过 J 链与 pIgR 结合后^[6], 将 IgA 分子转入黏膜细胞中。本实验成功地将 HNP-1 进行了分子改建, 使其带上 J 链而成为 J-HNP-1 杀菌肽。J-HNP-1 分子的一端为 J 链, 另一端为防御素, 称之为多聚 IgA 受体(pIgA) 配体样杀菌肽。这种外源性防御素借助于 J 链的作用被送入黏膜上皮细胞内, 使黏膜上皮获得象中性粒细胞一样的杀菌功能, 从而杀灭细胞内移位菌。

为了解 J-HNP-1 基因被转录后是否能被翻译表达成蛋白质, 我们利用抗报告基因 6×His 表达产物的特异性抗体(抗 His 抗体), 用 Western blot

法检测 J-HNP-1 的表达。采用 Western blot 能否检测到表达蛋白, 关键是蛋白质的成功转移, 而影响蛋白质成功转移的因素主要有以下几点: ①十二烷基硫酸钠(SDS)的存在。尽管 SDS 对于蛋白分离是必要的, 但它对有效转印极为不利。因为首先 SDS 会使蛋白质分子带很多的负电荷, 引起蛋白质分子快速穿透膜, 降低孔结构上的截留量, 使分子相互作用的机会降至最低。其次, SDS 可能将蛋白质分子包被起来, 从而限制了蛋白质分子与 PVDF 接触, 因此凝胶在转印之前需先用甲醇进行平衡。②电流和转移时间。适当的电流和转移时间是成功印迹的关键。电流太低或时间不足会导致不完全性转移; 反之, 电流太高, 蛋白质分子在膜中迁移太快将导致无法有效吸附。③转移缓冲液的 pH。①平衡时间。SDS-PAGE 系统中在电泳缓冲液中加入 SDS, 从阴极出来的 SDS 会浓缩并进入凝胶, 跑在溴酚蓝示踪染料的后边。因多数凝胶在示踪染料跑到凝胶底部时停止, 所有过量 SDS 都截留在凝胶中并被带到印迹操作中, 如果在转移之前不使它扩散出来, 将干扰蛋白质吸附。平衡时间可延长到 30 min, 并使用足量的缓冲液以使 SDS 降到最低水平。本实验用 Western blot 检测 J-HNP-1 的表达结果提示: 经 rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 转染的 COS-7 细胞可溶性蛋白和细胞培养上清在约 24 ku 处均有强反应条带显示。此结果说明带 J 链的杀菌肽分子 J-HNP-1 已在 COS-7 细胞内表达, 其表达的产物蛋白同时被分泌到细胞外, 为进一步研究 J-HNP-1 杀菌肽的抗菌活性奠定了基础。

参考文献:

- 1 Fellermann K, Stange E F. Defensins - innate immunity at the epithelial frontier [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001, 13: 771-776.
- 2 Sela B. Defensins of innate immunity serving as first-line antimicrobial defense [J]. Harefuah, 2002, 139: 112-116.
- 3 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 北京科学出版社, 1996: 870-873.
- 4 陈姗, 董燕麟, 何凤田, 等. 人 β-防御素 3 的 cDNA 克隆和表达载体的构建 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25: 617-619.
- 5 蔡绍晖, 杜军, 陈新年, 等. C 端带 Myc 和多聚组氨酸双重标记的重组人 β-防御素-2 在 COS-7 细胞的转染表达 [J]. 生物医学工程学杂志, 2003, 20: 255-259.
- 6 Johansen F E, Norderhaug I N, Ree M, et al. Recombinant expression of polymeric IgA; incorporation of J chain and secretory component of human origin [J]. Eur J Immunol, 1999, 29: 1701-1708.

(收稿日期: 2005-07-24 修回日期: 2006-01-16)

(本文编辑: 李银平)