

补体成分 C3 及其缺失突变体蛋白的表达及与 CLIC1 蛋白共定位的研究

王二宁 陈丹丹 刘晓颖 范礼斌

摘要 目的 研究补体成分 C3 及其缺失突变体 C3(1-840)、C3(824-1663) 在真核细胞内的表达及与氯离子通道蛋白(CLIC1)的共定位。方法 构建 pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG、pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 三个真核表达质粒(缺失突变体根据 C3 的结构域及其裂解断裂位置设计),并分别转染至 HEK 293T 细胞中,Western blot 检测表达情况;上述质粒分别瞬时单转至 COS7 细胞和分别与 GFP-CLIC1 共转至 COS7 细胞内,观察共定位情况。结果 成功构建带 FLAG 标签的 C3 基因及其两个缺失突变体 [C3(1-840)、C3(824-1663)] 的真核表达载体,Western blot 结果显示它们在 HEK 293T 细胞中均能成功表达;免疫荧光显示它们在 COS7 细胞中均主要分布于细胞质,且三个真核表达载体中只有 C3(824-1663) 与 CLIC1 有共定位。结论 补体 C3 及其缺失突变体 C3(1-840) 和 C3(824-1663) 在 HEK 293T、COS7 细胞中均能高效表达,且主要分布在细胞质内,C3(824-1663) 与 CLIC1 蛋白有共定位。
关键词 C3; 转染; 基因表达; 定位
中图分类号 Q 28; R 392.7
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1533-05

补体是存在于血清及组织液中的一组具有酶活性的球蛋白,主要是由巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞、骨髓、腹膜和肝脏等合成的一种 β 球蛋白^[1]。补体系统由 30 多种血浆蛋白和血细胞受体组成,约占血清总蛋白的 10%,其中补体成分 C3(complement component, C3) 在血清中含量最高,是在补体系统中起关键作用的成分^[1]。人体内的补体系统共有三条激活途径,分别称为经典、旁路和甘露聚糖结合凝集途径,三条途径均是独立的,但都需要经过 C3 的裂解,激活途径才能启动^[2-3]。因此, C3 是所有补体介导炎症反应的必需因子和汇合点^[1]。从原始的脊椎动物和无脊椎动物中发现了组成补体系

统的有关成分如 C3 和 B 因子,同时也能检测出补体活性^[4]。因此,补体作为独立的先天性免疫防御机制,出现远远早于特异性免疫,表明补体系统在进化起源上比较早^[5-6]。无论是先天性还是特异性的免疫都是无可替代的。

该研究通过构建下游带有 FLAG 标签的真核表达质粒即 pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG、pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG,然后分别转染至 HEK 293T 和 COS7 细胞中,来研究其在真核细胞内的表达及其和氯离子通道蛋白(CLIC1)的共定位情况。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 含人 C3 全长 cDNA 序列的质粒由韩家淮教授实验室惠赠,pcDNA3.1(+) 真核表达载体、TG1 感受态菌株、COS7 和 HEK 293T 细胞株均由本实验室 -80 °C 保存。

1.2 主要试剂与仪器 引物合成由上海生工生物有限公司完成,DNA Polymerase 酶(日本 TaKaRa 公司),AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(美国 Axygen 公司),Hind III、Xho I、EcoR I、EcoR V 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker(加拿大 Fermentas 公司),DMEM 培养基与胎牛血清(美国 Thermo 公司);Lipofectamine 2000 Reagent、Opti-MEM Reduced serum Medium(上海 Invitrogen 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗小鼠 IgG/TRITC(北京中杉金桥公司);Western 及 IP 细胞裂解液和一抗二抗稀释液(中国上海碧云天公司);Monoclonal anti-FLAG M2 一抗(美国 Sigma 公司);ECL 显色试剂盒(美国 Pierce 公司);Leica DMI 6000 型荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建^[7] 根据基因序列设计下游带 FLAG 标签的 C3 及 C3(-1840) 和 C3(824-1663) 的引物,利用 PCR 法从含人 C3 全长 cDNA 序列的质粒中扩增出 C3 及 C3(1-840) 和 C3(824-1663),通过聚丙烯酰胺凝胶电泳、琼脂糖电泳,胶回收

2015-06-20 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81201368)

作者单位:安徽医科大学生命科学院生物教研室,合肥 230032

作者简介:王二宁,男,硕士研究生;

刘晓颖,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: liuxi-aoying@ahmu.edu.cn;

范礼斌,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

PCR 产物,用限制性内切酶分别对 pcDNA3.1(+) 载体和 PCR 产物进行双酶切,用 T4 DNA 连接酶 16 °C 孵育 13 h 左右,连接产物转化 TG1 感受态细胞,培养 8 ~ 10 h,挑取单克隆进行摇菌,37 °C 恒温培养 12 h 后抽提质粒,并用限制性内切酶进行酶切鉴定,鉴定正确的质粒送公司测序。见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列
C3-正向	5'-CCCAAGCTTGGGGCCACCATGGGACCCACCTCA-3'
C3-反向	5'-CCGCTCGAGCGGTCACTTGTCTCATCGTCTTTG TAGTCGTTGGGGACCCAAA-3'
C3(-840)-正向	5'-GGAATTCGGCCACCATGGGACCCACCTCA-3'
C3(-840)-反向	5'-CCGCTCGAGCGGTCACTTGTCTCATCGTCTTTG TAGTCAACAACAGTAGGCTAG-3'
C3(824-1663)-正向	5'-CCGATATCCGGGGCCACCATGACAGTAATGCAG GAC-3'
C3(824-1663)-反向	5'-CCGCTCGAGCGGTCACTTGTCTCATCGTCTTTG TAGTCGTTGGGGACCCAAAAGAC-3'

1.3.2 细胞培养 蛋白表达实验中,对 HEK 293T 细胞进行传代,并且以适当密度接种至 60 mm 的培养皿中(不含双抗培养基),待转染。在荧光定位实验中,在 30 mm 培养皿中放入经高压灭菌、多聚赖氨酸包被的盖玻片,充分晾干。同时,对 COS7 细胞进行传代,并以 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 的密度接种于铺有盖玻片的 30 mm 培养皿中,待转染。置 5% CO_2 , 37 °C 恒温培养箱中培养过夜。

1.3.3 质粒转染 在蛋白表达实验中,待前一天接种的 HEK 293T 细胞长至 80% ~ 90% 的汇合度时,根据 Lipofectamine 2000 试剂盒提供的方法转染细胞,把培养皿置于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养。6 h 后更换为新鲜的 DMEM 培养基,继续培养;在荧光定位实验中,COS7 细胞长到 30% ~ 40% 的汇合度即可进行转染。

1.3.4 免疫荧光制片^[8] 转染后约 24 h,取出长有 COS7 细胞的盖玻片,用 PBS 清洗; -20 °C 预冷的甲醇固定 2 min,70% 的乙醇固定 5 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;含 1% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 30 min,弃封闭液;FLAG 一抗(1:100,用封闭液配制)室温孵育 2 h,回收一抗,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:1000,用封闭液配制)室温孵育 1 h,弃二抗;PBS 清洗 3 次,每次 5 min;0.15 g/L DAPI 溶液染核,室温 2 min,弃 DAPI 溶液;PBS 清洗 3 次,每次 5 min;滤纸尽可能吸去盖玻片上的残液,荧光封片胶(Dako)把盖玻片封于洁净载玻片上;4 °C 保存过夜,荧光显微

镜进行观察和拍照。

1.3.5 Western blot 检测 C3 及缺失突变的表达^[9]

转染后约 48 h,在冰上用细胞裂解液裂解 HEK 293T 细胞约 30 min,然后 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min,收集上清液;取出部分上清液加入等量 $2 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液混合,沸水浴 5 min,冰浴 3 min;SDS-PAGE 电泳 2 h,100 V 恒压电转 1.5 h;取出 PVDF 膜,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h,TBST 清洗。FLAG 一抗(1:500,用一抗稀释液稀释)4 °C 孵育过夜,TBST 清洗;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5000,用封闭液稀释)室温孵育 1 h,用 TBST 清洗;使用 ECL 试剂盒在暗室中用 X 线片曝光之后显影和定影,X 线片晾干后进行扫描。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG、pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 真核表达载体的构建 对抽提质粒 pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG、pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 分别进行双酶切鉴定,结果如图 1 所示,以上质粒都被切出两条亮带,经过跟 Marker 比较,一条带大小约为 5.4 kbp,与载体 pcDNA3.1 的大小基本一致,另一条分别与各自的目的片段大小一致,表明连接成功,测序结果进一步表明质粒构建正确。

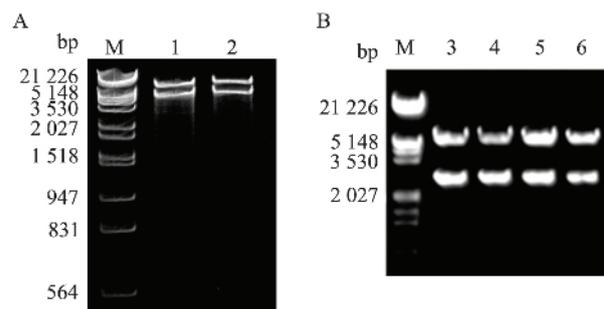


图 1 重组质粒 pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG、pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 的酶切鉴定

M: Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker; A: 质粒酶切产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果; B: 质粒酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果; 1、2: pcDNA3.1-C3-FLAG 的酶切鉴定产物; 3、4: pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG 的酶切鉴定产物; 5、6: pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 的酶切鉴定产物

2.2 C3 及其缺失突变体蛋白在哺乳动物细胞中的表达情况 对转染了 pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG 和 pcDNA3.1-C3(824-

1663)-FLAG 的 HEK 293T 细胞进行 Western blot 检测。结果显示裂解液都能检测相应的目的条带,与预染的蛋白 Marker 进行对比,pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG 及 pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 的条带与预期一致,即分别为 187、105 和 105 ku。表明 C3 及其 C3(1-840) 和 C3(824-1663) 在 HEK 293T 细胞中能够正常表达。见图 2。

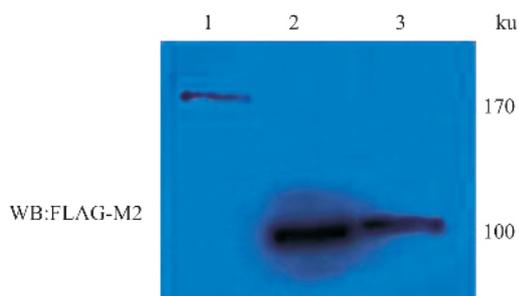


图 2 Western blot 检测 C3、C3(1-840) 和 C3(824-1663) 蛋白过表达结果

1、2、3: 分别转染 pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG、pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 的 HEK 293T 细胞裂解液

2.3 C3 及其缺失突变体 C3(1-840) 和 C3(824-1663) 在 COS7 细胞中的定位 COS7 细胞在分别转染 pcDNA3.1-C3-FLAG、pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG 和 pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 继续培养 24 h 后,根据 1.3.5 中的方法进行免疫荧光制片,荧光显微镜下观察定位情况。结果表明三者均主要定位在细胞质中,细胞核内几乎没有,但是 pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG 在细胞质中靠近核膜一侧有斑块状集中分布。见图 3。

2.4 C3 及其缺失突变体蛋白与 CLIC1 蛋白在 COS7 细胞中的共定位 将 C3 及其缺失突变体分别与 GFP-CLIC1 共转至 COS7 细胞中,继续培养 24 h 后,根据 1.3.5 中的方法进行免疫荧光制片,荧光显微镜下观察定位情况。结果显示,全长 C3 和 C3(1-840) 与 CLIC1 蛋白没有共定位,但是 C3(824-1663) 与 CLIC1 蛋白有共定位现象,主要共定位在细胞质中。有无共定位判断依据是选择两种蛋白分布的同一个点或者位置进行比较,观察分布是否相同再通过叠加图比较。见图 4。

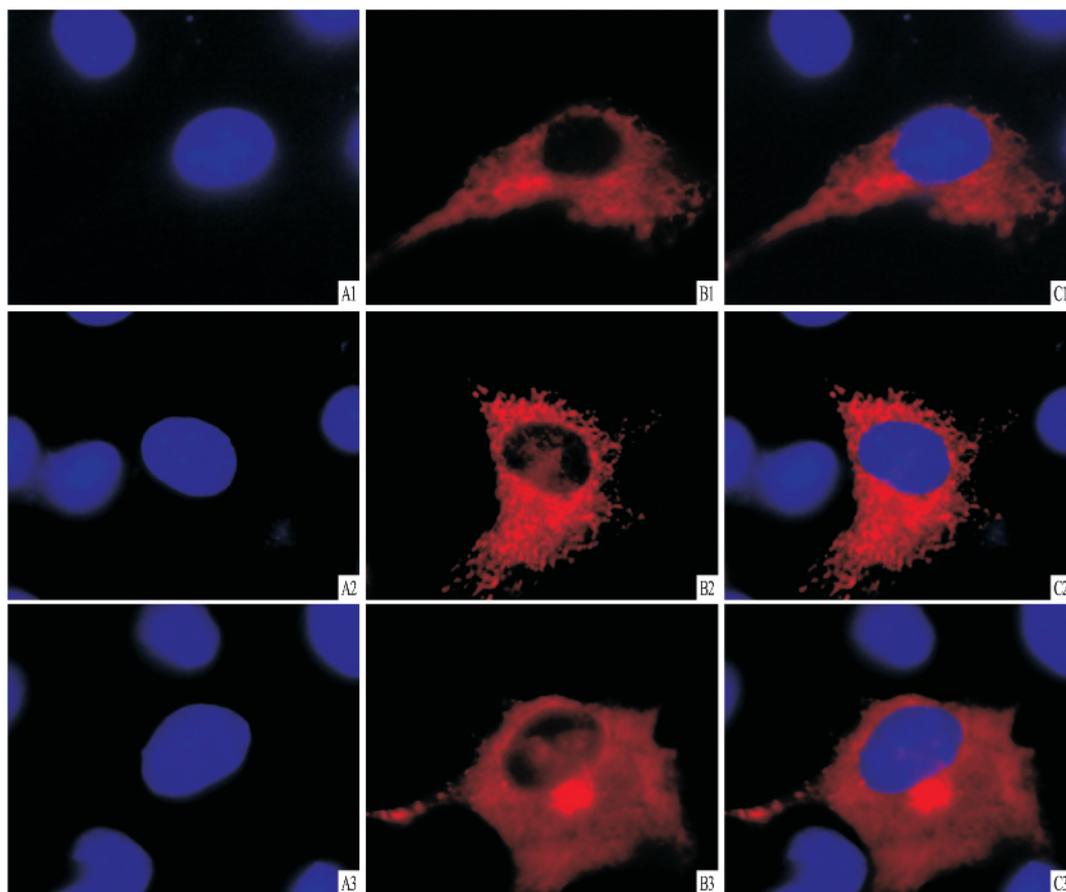


图 3 C3 及 C3(1-840) 和 C3(824-1663) 蛋白在 COS7 细胞中的定位

A: DAPI 显示细胞核; B: FLAG 标签蛋白的定位; C: A 和 B 的叠加图; 1: C3; 2: C3(1-840); 3: C3(824-1663)

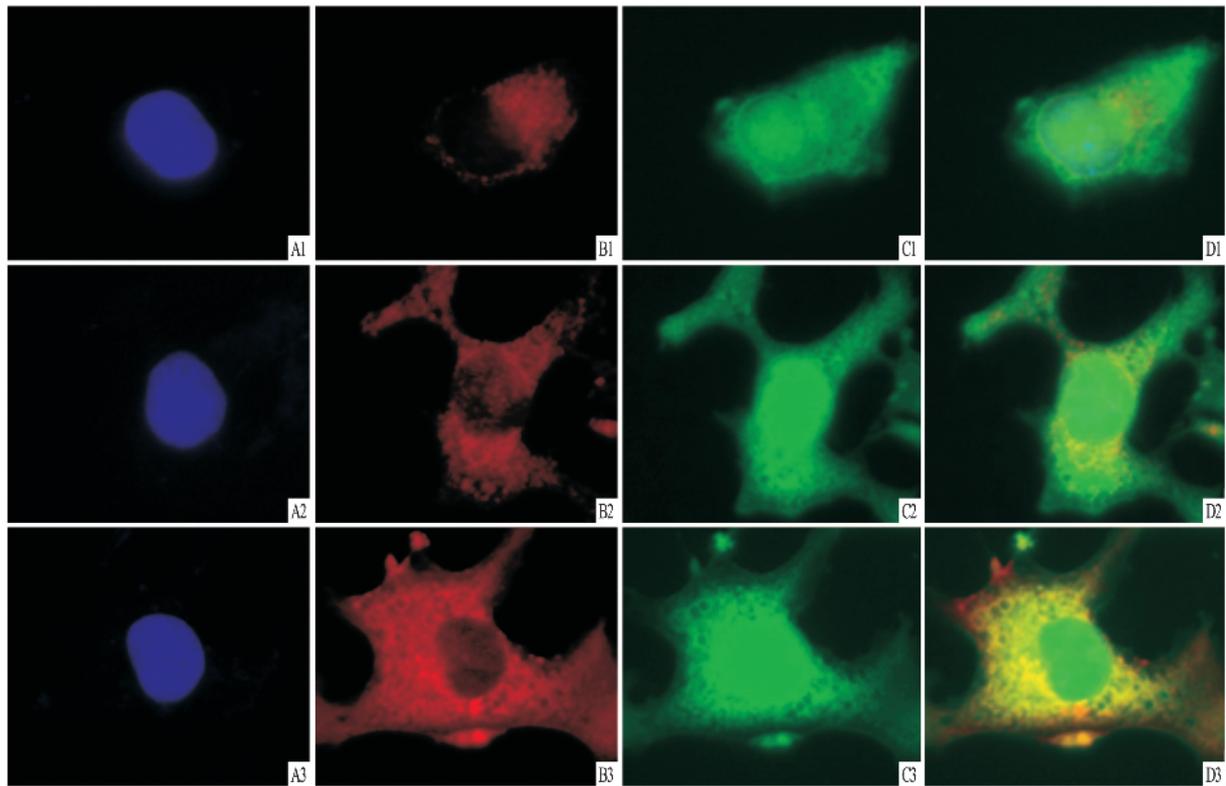


图4 C3 蛋白及其缺失突变体与 CLIC1 蛋白在 COS7 细胞内的共定位

A: DAPI 显示细胞核; B: FLAG 标签蛋白(红色); C: GFP-CLIC1 蛋白(绿色); D: A、B、C 图像的叠加(黄色); 1: pcDNA3.1-C3-FLAG; 2: pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG; 3: pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG

3 讨论

该研究通过构建含有 C3 全长基因及其缺失突变体 C3(1-840)、C3(824-1663) 的 3 个真核表达质粒,并分别转染至 HEK 293T、COS7 等真核细胞内,通过免疫荧光和免疫印迹技术,检测 C3 全长基因及其缺失突变体 C3(1-840)、C3(824-1663) 在真核细胞内的表达和定位情况。根据文献^[10]报道,标签在上游有可能对蛋白表达产生一定影响,所以在基因的下游加入了 FLAG 标签。蛋白表达实验中,Western blot 检测 HEK 293 细胞内的 C3 及其缺失突变体 C3(1-840)、C3(824-1663) 蛋白都能正常表达。共定位实验通过免疫荧光或者 GFP 融合蛋白表达的方法借助荧光显微镜观察,若蛋白共定位,则作为该两个蛋白有相互作用的一个佐证,从而推断蛋白的功能。荧光显微镜观察发现,C3 及其缺失突变体蛋白主要都定位在细胞质中,共定位实验表明 C3(824-1663) 与 CLIC1 蛋白在细胞质中有共定位现象,这将为研究 C3 这种大分子蛋白通过裂解形成片段与 CLIC1 相互作用提供一定的基础。对于定

位和表达选择两种细胞的理由是:一种是 COS7 细胞,该细胞特点是细胞核较大在荧光显微镜下观察,能够比较清晰观察该重组蛋白在细胞中的分布;另一种是 HEK 293T 细胞,该细胞特点是细胞生长快且转染效率比较高,易于表达蛋白。

哺乳动物补体系统的主要功能包括宿主防御微生物,消除免疫复合物和细胞凋亡,促进适应性的免疫反应^[11]。其中补体 C3 起着关键性作用,因为 3 条补体途径的激活都要通过活化 C3 才得以实现^[12-13],C3 在 C3 裂解酶的作用下进一步裂解,参与许多补体的激活^[11]。补体 C3 由 A 链和 B 链通过二硫键连接而成,C3 基因位于第 19 号染色体,长约 41 kbp,编码 1 663 个氨基酸。C3 蛋白为 187 ku,属于 $\alpha 2$ -巨球蛋白家族($\alpha 2M$)。C3 为 2 个肽链结构分别为 α 链和 β 链,由 13 个结构域构成^[11]: MG1-8、LINK、ANA、CUB、TED 和 Anchor。越来越多的研究^[12]表明,许多疾病都与 C3 的变化有关。例如:抗原-抗体复合物引起的胃炎患者血清总补体和 C3 均明显下降。大多数全身性红斑狼疮患者血清补体的降低和病情恶化有关,活动性全身性红斑狼

疮患者血清中 C1、C2、C4 和 C3 降低,病情缓解时血清补体水平恢复正常。肿瘤患者补体量升高,特别是肝癌,C3 升高最为明显,具有临床诊断意义。因此对于补体成分 C3 的研究意义重大。

本研究结果表明补体 C3 及其缺失突变体在 HEK 293T 细胞中能够正常表达,在 COS7 细胞中主要定位在细胞质中,只有缺失突变体 C3(824-1663)与 CLIC1 有共定位。这将为本课题组在以后研究蛋白质的相互作用提供依据。

参考文献

- [1] 谢志贤,刘倩.血清补体 C3、C4 水平与 SLE 活动性的关系研究[J].中华现代临床医学杂志,2006,8(9):1450-1.
- [2] Carroll M C. The complement system in regulation of adaptive immunity[J]. *Nature Immunol* 2004, 5(10): 981-6.
- [3] Walport M J. Complement. First of two parts[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(14): 1058-66; Complement. Second of two parts[J]. *N Engl J Med* 2001, 344(14): 1140-4.
- [4] Zhang S C, Wang C F, Wang Y J et al. Presence and characterization of complement-like activity in the amphioxus *Branchiostoma belcheris* [J]. *Zoological Science* 2003, 20(10): 1207-14.
- [5] Smith L C, Azumi K, Nonaka M. Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 42(1-3): 107-20.
- [6] Nonaka M, Takahashi M. Complete complementary DNA sequence of the third component of complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing proteins [J]. *J Immunol*, 1992, 148(10): 3290-5.
- [7] 潘林鑫,李新颖,徐南,等.人 RB1 及其突变体的表达与定位[J].安徽医科大学学报,2013,48(8): 853-8.
- [8] 李春雨,潘林鑫,刘晓颖,等.人类胞内氯离子通道蛋白 3 在原核细胞及真核细胞内的表达等[J].安徽医科大学学报,2014,49(9): 1202-5.
- [9] 乔正,赵健,潘林鑫,等.人 RACK1 蛋白在 HEK 293T 和 BL21 细胞中的表达及 COS7 细胞的定位[J].安徽医科大学学报,2014,49(9): 1189-92.
- [10] 巨红妹,张霞,王云华.新型蛋白标签在分子生物学中的应用[J].中国病原生物学杂志,2011,6(8): 632-4.
- [11] Janssen B J, Huizinga E G, Raaijmakers H C, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity [J]. *Nature* 2005, 437(7058): 505-11.
- [12] 陈凤平,单万水,谷任峰,等. SARS 患者血清免疫球蛋白.补体的含量及结果分析[J].实用预防医学,2005,12(2): 282-3.
- [13] 余新沛,陈政良. C3 研究进展[J].免疫学杂志,2004,20(6): 483-6.

The expression of human complement component C3 and its deletion mutants and the colocalization with CLIC1

Wang Erning, Chen Dandan, Liu Xiaoying et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the expression and cell localization of complement component C3 and its deletion mutants C3(1-840) and C3(824-1663) in eukaryotic cells and the colocalization with CLIC1. **Methods** To construct three eukaryotic expression plasmids of pcDNA3.1-C3-FLAG, pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG and pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG (according to C3 structure domain and splitting position). The plasmids were transfected into HEK 293T cells. Then the expression was detected by Western blot and their cellular localization was detected in COS7 cells by fluorescence microscopy. **Results** The eukaryotic expression plasmids of pcDNA3.1-C3-FLAG, pcDNA3.1-C3(1-840)-FLAG and pcDNA3.1-C3(824-1663)-FLAG were constructed successfully, which could be expressed in HEK 293T and COS7 cells, and the cellular localization of C3 and C3(1-840), C3(824-1663) appeared similar, mainly in the cytoplasm, and only C3(824-1663) co-localized in the cytoplasm with CLIC1. **Conclusion** Complement C3 and its deletion mutants C3(1-840), C3(824-1663) can be effectively expressed in HEK 293T and COS7 cells, and all of them are mainly distributed in the cytoplasm and C3(824-1663) co-localized in the cytoplasm with CLIC1.

Key words C3; transfection; gene expression; localization