

鼠源 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒的构建及其表达

李琳 彭云云 黄成 徐涛 李俊

摘要 目的 构建鼠源 pEGFP-C2-NLRC5 表达质粒,并观察其在 RAW264.7 细胞中的表达。方法 从小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中获得 NLRC5 基因的 cDNA,用 EcoR I 和 BamH I 限制性内切酶双酶切后连接至 pEGFP-C2 载体上。表达载体经 PCR、限制性内切酶酶切和 DNA 序列分析正确后转染至小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达,RT-PCR 法鉴定其转录,Western blot 法分析其蛋白表达。结果 进行双酶切鉴定该质粒可见 NLRC5 DNA 片段,转染重组质粒后可观察到绿色荧光蛋白的表达,RT-PCR 法可检测到 NLRC5 基因的转录,Western blot 法可检测到 NLRC5 蛋白表达。结论 成功构建重组 pEGFP-C2-NLRC5 表达载体,NLRC5 蛋白可与绿色荧光蛋白在 RAW264.7 细胞中融合表达。

关键词 NLRC5; pEGFP-C2; RAW264.7; 基因表达; 蛋白表达

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0145-04

NOD 样受体家族 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing, NLR) 是最近几年发现的一类新型的胞内模式分子识别受体 (pathogen pattern receptors, PRRs)。这些分子具有识别病原相关分子模型 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的功能,通过激活 NF- κ B 通路或炎症小体的途径激发天然免疫反应,在机体抵抗感染的过程中具有重要作用^[1-2]。随着对免疫相关性疾病的深入,研究^[3]表明免疫系统在保护机体的同时,过渡的功能亢进对机体亦产生损伤作用。因此如何抑制过渡的免疫功能亢进,成为研究的热点。研究^[4-5]显示 NLRC5 能够有效抑制机体的天然免疫和炎症反应,可能成为未来治疗免疫相关性疾病的分子靶点。该研究拟在 pEGFP-C2 的多克隆位点插入 NLRC5 cDNA,构建能够融合表达绿色荧光蛋白与 NLRC5 蛋白的重组质粒,为进一步探讨

NLRC5 蛋白的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 真核表达重组质粒 pEGFP-C2、小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由本实验室保存;DH5 α 感受态细胞为安徽省天然药物活性研究重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白酶、高糖 DMEM 液体培养基 (Hyclone 公司,美国);BamH I、EcoR I 内切酶、T4 DNA Ligase、逆转录试剂盒 (Fermentas 生物工程公司,加拿大);Lipofectamine 2000、Opti-MEM、TRIzol Reagent (Invitrogen 公司,美国);NLRC5 一抗 (Abcam 公司,英国);胎牛血清 (杭州四季青生物材料研究所);倒置荧光显微镜 (Olympus 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 鼠源目的基因 NLRC5 cDNA 的扩增制备 根据目的基因序列及引物设计原则设计 NLRC5 PCR 特异性引物^[6],上游引物:5'-CCGGAATTCCG-GCAGATGGTGGAACCTTTTAGCC-3';下游引物:5'-CGCGGATCCGCGAAGCTTCCTTAGCACCTGGATCA-3',上、下游引物分别引入酶切位点 EcoR I、BamH I 及保护性碱基,并保持 NLRC5 阅读框正确,引物由上海生工生物技术有限公司合成,扩增长度为 484 bp。NLRC5 cDNA PCR 扩增条件:以逆转录所得 RAW264.7 cDNA 为模板采用 PCR 法扩增 NLRC5,PCR 反应体系 (25 μ l): mix 12.5 μ l, water 10.5 μ l, 上、下游引物各 0.5 μ l, cDNA 1 μ l。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s; 58 $^{\circ}$ C 退火 40 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 循环 40 次后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,按照胶回收试剂盒说明回收 cDNA 并纯化。

1.2.2 鼠源重组真核表达载体 pEGFP-C2-NLRC5 的构建 将回收得到的 NLRC5 cDNA 和 pEGFP-C2 质粒分别用 EcoR I、BamH I 限制性内切酶进行双酶切,37 $^{\circ}$ C 条件下连接反应 6 h。1% 琼脂糖凝胶电泳分离,回收 NLRC5 基因和质粒,在 16 $^{\circ}$ C 条件下连接 4 h。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单个菌落接种 LB-Kana 液体培养基,37 $^{\circ}$ C、150 r/min 摇

2013-07-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81273526、81072686)

作者单位: 安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介: 李琳,女,硕士研究生;

李俊,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

菌过夜。采用 EcoR I 和 BamH I 双酶切方法筛选、鉴定阳性重组质粒,并由上海 Invitrogen 生物技术有限公司作进一步的测序鉴定。

1.2.3 鼠源 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 RAW264.7 细胞在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中培养,转染前 1 d 将对数生长期的 RAW264.7 细胞消化计数(密度为 1.5×10^5 /ml),取 2 ml 于 6 孔板中,置 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后细胞生长至 90% ~ 95%,分别将 6 μ l 质粒和 8 μ l 脂质体溶于 150 μ l Opti-MEM 培养基中 5 min 后将两者混合室温静置 20 min;用 PBS 洗涤细胞 2 次后加入 1.7 ml Opti-MEM,再逐滴加入质粒-脂质体混合物,轻轻摇晃,置 37 °C、5% CO₂ 培养 6 h,然后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 2 ml,继续培养,分别于转染后 24 h 在荧光显微镜下观察,实验中同时空质粒转染组作为对照。

1.2.4 转染 24 h 后利用 RT-PCR 法检测细胞中 NLRC5 的基因表达 取转染后细胞,按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA,分光光度计法测量 RNA 的浓度及纯度。按反转录试剂盒说明书合成 cDNA,反应体系为 20 μ l: 总 RNA 9 μ l、Oligo (dT) 1 μ l、Nuclease-free 水补至 12 μ l,混匀后 65 °C 孵育 5 min,降温至 4 °C 后加 5 $\times$ Reaction Buffer 4 μ l、Rlbock™ RNase inhibitor 1 μ l、10 mmol/L dNTPMix 2 μ l,混匀后 37 °C 孵育 5 min,降温至 4 °C,RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μ l,混匀后 42 °C 孵育 60 min,70 °C 加热 10 min。设计 RT-PCR NLRC5 的引物序列,上游引物: 5'-CCTGAACGATGACAGCCTGA-3'; 下游引物: 5'-AACAGCATGGCTTAGGGACC-3',扩增长度 178 bp。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 40 s,55.5 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,共 40 个循环,72 °C 延伸 10 min;内参 β -actin 的引物序列,上游引物: 5'-TGGAATCTGTGGCATC-CATGAAAC-3'; 下游引物: 5'-ACGCAGCTCAGTAA-CAGTCCG-3',扩增长度 344 bp;扩增条件: 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 40 s,51 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 °C 延伸 10 min,1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 转染 48 h 后利用 Western blot 法检测细胞中 NLRC5 的蛋白表达 转染 48 h 后,提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,8% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜并封闭非特异性结合位点,TBST 洗膜后,分别用抗 β -actin、NLRC5 的一抗孵育(抗体稀释浓度分别为 1 : 1 000、1 : 1 500),4 °C 封闭过夜,

TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠和抗兔二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜后,加入 ECL 发光剂反应 30 s,电脑显影成像,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 NLRC5 的扩增及重组载体 pEGFP-C2-NLRC5 鉴定 NLRC5 引物中引入酶切位点和保护性碱基,整个扩增基因片段长度为 484 bp,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,与 DNA Marker 比对片段大小符合,pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒经 EcoR I、BamH I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳分离,可见一条符合预期大小的条带(500 bp),表明 NLRC5 已被插入到 pEGFP-C2 载体中,见图 1。基因序列分析测序结果进一步证实 NLRC5 基因正确插入 pEGFP-C2 载体,NLRC5 序列与 GenBank 上的一致。

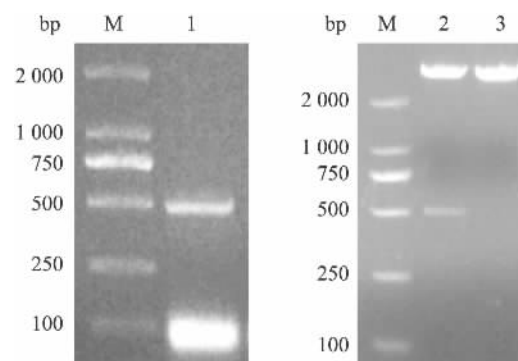


图 1 NLRC5 基因 PCR 扩增及重组质粒 pEGFP-C2-NLRC5 经双酶切鉴定电泳图

M: DNA Marker; 1: 扩增的 NLRC5; 2: EcoR I 和 BamH I 双酶切质粒 pEGFP-C2-NLRC5; 3: EcoR I 和 BamH I 双酶切载体 pEGFP-C2

2.2 荧光显微镜下观察 pEGFP-C2-NLRC5 在 RAW264.7 细胞中的表达 在转染 24 h 后观察可见绿色荧光细胞,pEGFP-C2 载体在细胞中呈现弥散性分布表达,见图 2。

2.3 NLRC5 基因在转染 RAW264.7 细胞中的表达检测 经 RT-PCR 法检测显示,NLRC5 转染组和空质粒 pEGFP-C2 对照组的细胞内均有 NLRC5 mRNA 表达,转染后 NLRC5 基因的转录明显高于空载体转染细胞,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

2.4 NLRC5 蛋白在转染 RAW264.7 细胞中的表达检测 经 Western blot 法检测显示: NLRC5 转染

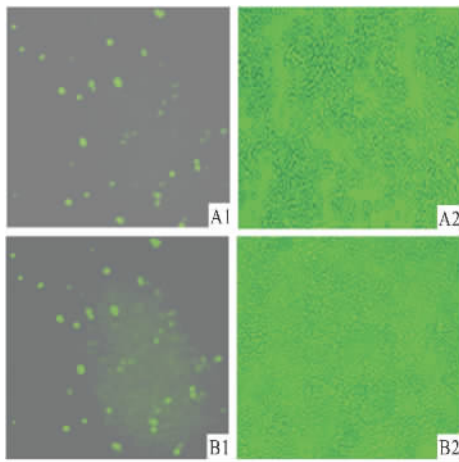


图2 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达 ×200

A: 连接质粒转染组; B: 空质粒转染组; 1: 24 h 暗场; 2: 24 h 明场

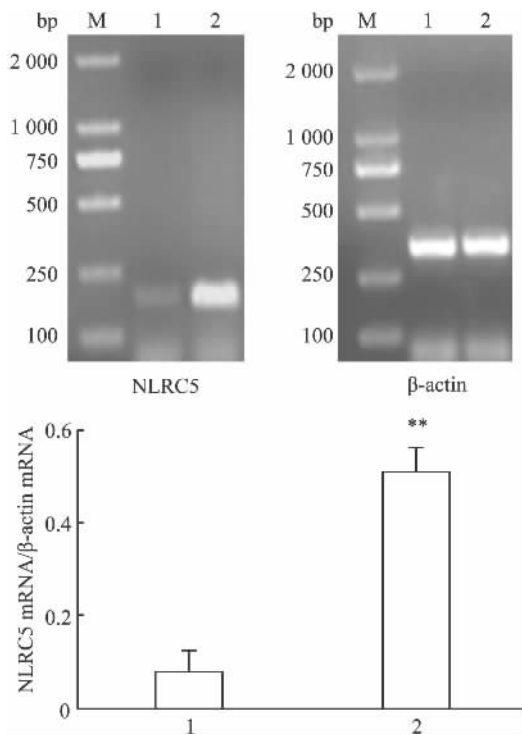


图3 RT-PCR 法检测 NLRC5 mRNA 的表达

M: DNA Marker; 1: 空质粒转染组; 2: 连接质粒转染组; 与空质粒转染组比较: ** $P < 0.01$

组和空质粒 pEGFP-C2 对照组的细胞内均有 NLRC5 蛋白表达, 转染后 NLRC5 蛋白的表达明显高于空载体转染细胞 ($P < 0.01$), 见图 4。

3 讨论

NOD 样模式识别受体是近几年研究生物学的热点, 其是一种胞质传感器, 参与检测细胞内的各种细菌病原体。目前已经发现的 NOD 基因人源有 22 种, 鼠源有 34 种。哺乳动物的 NOD 样受体根据氨

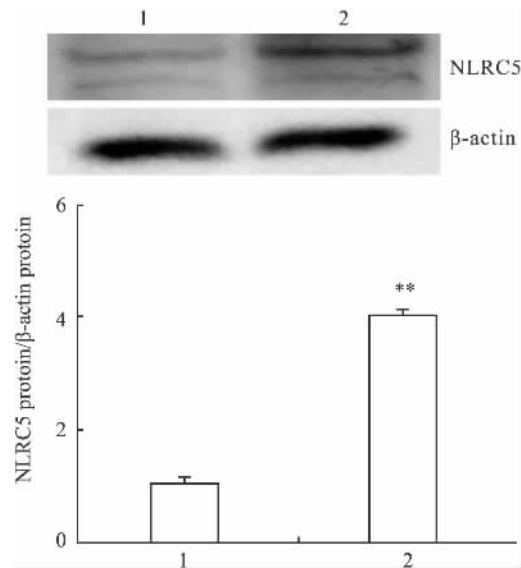


图4 Western blot 法检测 NLRC5 蛋白的表达

1: 空质粒转染组; 2: 连接质粒转染组; 与空质粒转染组比较: ** $P < 0.01$

基酸序列的相似性大致可以分为 A、B、C、P、X 等几个亚家族^[7]。鼠源的 NLRC5 为其 C 亚家族的成员, 蛋白含有 1 866 个氨基酸, 主要表达于免疫相关的组织, 如肺和脾脏。NLRC5 在结构上共有 3 个结构域: 碳端含有一个亮氨酸重复结构域 (leucine rich repeat, LRR), LRR 能够识别相应的配体, 并具有一定的特异性。中间的区域称为 NOD (也称为 NBD 或 NACHT), NOD 属于 NTPase 超家族成员, 能使 ATP 水解为 GTP。氨基端为 CARD 结构域, 可以募集下游分子而激活 NLRC5 信号传导, 故称为功能结构域。

NLRC5 因具有免疫抑制作用而成为生物学研究热点。细胞因子的分泌是炎症反应的标志之一, 有文献^[8]报道研究小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌细胞因子发现, 利用 siRNA 沉默 NLRC5, 转染 48 h 后, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等细胞因子分泌明显增加, 表明 NLRC5 可调控细胞因子的分泌。NLRC5 在 RAW264.7 细胞过表达尚无研究报道, 过表达 NLRC5 对进一步研究其生理功能具有重要意义。该研究采用成功构建的真核表达载体 pEGFP-C2-NLRC5 转染宿主细胞 RAW264.7 对 NLRC5 基因的真核表达进行了初步研究。

pEGFP-C2 是一种可编码增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 的真核质粒载体, 其上携带有 EGFP 表达报告基因, EGFP 则是 GFP 的一个突变体, 其荧光强度及光漂白抗性

明显增强,是迄今为止最佳的活体分子标志物之一^[9]。绿色荧光蛋白本身性质稳定,可在多种异源生物中表达且无细胞毒性,易于构建融合蛋白,且融合蛋白仍能保持荧光激发活性,一般情况下不会影响目的基因的生物活性。

该研究通过基因重组技术,将包含起始密码子和终止密码子的 NLRC5 cDNA 插入 pEGFP-C2 载体 EGFP 的上游 5' 端,并保持相同的阅读框,成功构建 NLRC5 和绿色蛋白融合基因的真核表达载体,经双酶切鉴定证实目的基因片段插入到载体相应的位置,载体经基因测序证实基因构建成功,序列和 GenBank 上符合。将重组质粒 pEGFP-C2-NLRC5 转染 RAW264.7 细胞,荧光显微镜下观察可见细胞内有 NLRC5 和 EGFP 的融合蛋白发出绿色荧光,RT-PCR 法及 Western blot 法检测发现,NLRC5 连接质粒转染组较空质粒转染组高。

综上所述,本研究成功建立了过表达 NLRC5 的 RAW264.7 细胞,为研究 NLRC5 基因的生物活性及其在免疫相关性疾病中的作用奠定了重要的实验基础。

参考文献

- [1] Kanneganti T D, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease [J]. *Immunity*, 2007, 27 (4): 549-59.
- [2] Kersse K, Mathieu J M, Lamkanfi M, et al. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(5-6): 257-76.
- [3] Ozawa K, Hashimoto K, Shimizu E, et al. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia [J]. *Biol Psychiatry*, 2006, 59(6): 546-54.
- [4] Benko S, Magalhaes J G, Philpott D J, et al. NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways [J]. *J Immunol*, 2010, 185 (3): 1681-91.
- [5] Lamkanfi M, Kanneganti T D. Regulation of immune pathways by the NOD-like receptor NLRC5 [J]. *Immunobiology*, 2012, 217 (1): 13-6.
- [6] Cui J, Zhu L, Xia X J, et al. NLRC5 negatively regulates the NF- κ B and type I interferon signaling pathways [J]. *Cell*, 2010, 141 (3): 483-96.
- [7] Ting J P, Lovering R C, Alnemri E S, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature [J]. *Immunity*, 2008, 28(3): 285-7.
- [8] Williams A, Flavell R A, Eisenbarth S C. The role of NOD-like Receptors in shaping adaptive immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(1): 34-40.
- [9] 徐涛,黄成,李琳,等. pEGFP-C2 重组质粒的构建及表达 [J]. *安徽医科大学学报* 2012 47(1): 89-93.

Construction of recombinant pEGFP-C2-NLRC5 and its expression

Li Lin, Peng Yunyun, Huang Cheng, et al

(School of Pharmacy Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the GFP-tagged eukaryotic expression vector of NLRC5 and observe its expression in mouse macrophage RAW264.7. **Methods** The cDNA of NLRC5 was obtained from mouse macrophage RAW264.7 cells, amplified by PCR and cut with double enzyme EcoR I and BamH I, then inserted into the eukaryotic expression vector pEGFP-C2. The recombinant vector was verified by PCR, restriction enzymes cut and sequencing identified. Then transfected into mouse macrophage RAW264.7 cells and the expression of pEGFP-C2-NLRC5 was monitored by fluorescence, PCR and Western blot. **Results** To deal with recombinant pEGFP-C2-NLRC5 with double digestion, then fragments of NLRC5 could be seen, also GFP could be detected in the transfected RAW264.7 cells. NLRC5 gene expression could be detected by PCR, and its protein expression was detected by Western blot. **Conclusion** Eukaryotic expression vector of NLRC5 is successfully constructed, and the fusion expression of NLRC5 protein and GFP can be detected in RAW264.7.

Key words NLRC5; pEGFP-C2; RAW264.7; gene expression; protein expression