

pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒的构建及其表达

徐 涛 彭云云 李 琳 黄 成 张 磊 金 涌 吕雄文 李 俊

摘要 目的 构建含 NLRC5 蛋白功能区的 cDNA 序列的真核表达载体 pEGFP-C2-NLRC5,并检测其在肾成纤维细胞 (COS-7) 中的表达。方法 采用 RT-PCR 法从人肝星状细胞 (LX-2) 中获得 NLRC5 蛋白功能区的 cDNA 序列片段,用 EcoR I 和 BamH I 双切酶将片段和载体 pEGFP-C2 双酶切后,酶切产物加入 T4 连接酶 16 °C 连接过夜,构建真核表达载体 pEGFP-C2-NLRC5。将构建成功的 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒经 PCR 限制性内切酶酶切和测序鉴定后用阳离子脂质体 Lipofectamine™2000 将其转染至 COS-7 细胞,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达,Western blot 法鉴定融合蛋白表达。结果 阳性克隆经双酶切法鉴定可见 NLRC5 基因片段。转染重组质粒后可观察到绿色荧光蛋白的表达,而且主要分布在细胞质中,Western blot 法也可检测到在 74 ku 处有一明显条带,其大小符合 EGFP-NLRC5 表达的蛋白(NLRC5 蛋白大小约为 47 ku,EGFP 蛋白大小约为 27 ku),表明融合蛋白可在哺乳动物细胞中成功表达。结论 成功构建 pEGFP-C2-NLRC5 质粒,NLRC5 蛋白可在 COS-7 细胞中成功表达。

关键词 NLRC5; COS-7; 基因表达; 重组质粒; 转染

中图分类号 R 349.64

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)01-0005-04

天然免疫系统中的核苷酸结合寡聚结构域样受体 NOD 样受体 (NOD-like receptor, NLR) 家族成员之一——NLR 家族含 CARD 结构域 5 (NOD-like receptor family CARD domain containing 5, NLRC5) 蛋白分子,参与了对先天免疫核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号通路中一种非常重要的复合物的抑制,能够有效调控免疫细胞的活性,以防止持续的炎症反应对机体本身造成损伤^[1]。研究^[2]显示,NLRC5 在人类及小鼠的多种组织中都能表达,造血细胞中具有较高的表达量,人体和小鼠骨髓、淋巴结、胸腺和脾这些免疫组织具有高表达量的 mRNA。这些 NLRC5 可能参与了机体的免疫防御调

节。Cui et al^[3]发现 NLRC5 负向调节 NF- κ B 途径以及 I 型干扰素 (type-I interferon, IFN-I) 型信号发生途径,NLRC5 通过与 I κ B 激酶 α (I κ B kinase alpha, IKK α) 以及 IKK β 相互结合反应阻止了它们的磷酸化过程,从而抑制了 NF- κ B 途径,它也能够通过与 RIG-I 以及 MDA5 相互反应抑制介于 RLR 的 IFN-I 型信号产生途径。所以 NLRC5 具有有效抑制机体的天然免疫和炎症反应的功能。NLRC5 可能为未来提高微生物感染和免疫炎症相关疾病的免疫力提供了一个有效的治疗靶标^[4]。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,为进一步研究 NLRC5 蛋白的免疫学功能提供了依据。

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 和肾成纤维细胞 (COS-7) 来自本实验室;DH5 α 感受态细胞为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白酶、高糖 DMEM 液体培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司);BamH I、EcoR I 内切酶、T4 DNA Ligase、反转录试剂盒、DNA 扩增试剂盒 (加拿大 Fermentas 生物工程公司);Lipofectamine™2000、Opti-MEM、TRIzol Reagent (美国 Invitrogen 公司);胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒 (美国 AxyGen 公司);6 孔培养板 (美国 Corning 公司);LB-Kana 琼脂培养基为本实验室配置;倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司);显微数码摄影机 (日本 Nikon 公司)。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 抗体、二抗 (美国 Santa Cruz 公司);4',6'-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (武汉 BOSTER 公司);荧光封片胶 (Dako) (美国 Sigma 公司);RIPA 强裂解液 (上海 Beyotime 公司);PVDF 膜 (上海 Biosharp 公司);ECL 发光试剂盒 (美国 Thermo 公司);DNA Marker (日本 TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 NLRC5 cDNA 的扩增制备 根据

2013-07-12 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81273526);安徽省自然科学基金 (编号:KJ2010A178)

作者单位:安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:徐 涛,男,博士研究生;

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

目的基因序列 根据引物设计原则设计 PCR 特异性引物,上游引物: 5'-CCGGAATTCGGATGGCCAGGAAGCTGGA-3';下游引物: 5'-GGGATCCCCGTAC-CTGAGTGTCTTCC CA-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;所有引物由上海生工生物技术有限公司合成。扩增长度为 1 276 bp。PCR 扩增 NLRC5 cDNA 条件:以逆转录所得 LX-2 cDNA 为模板,采用 PCR 法扩增 NLRC5 全长 PCR 体系(50 μ l)、其中上、下游引物各 1 μ l,cDNA 2.5 μ l。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s;65 $^{\circ}$ C 退火 40 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s;循环 30 次后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,按照试剂盒说明回收 DNA 并纯化。

1.2.2 重组真核表达载体 pEGFP-C2-NLRC5 的构建 1.2.1 中回收得到的 NLRC5 扩增产物和 pEGFP-C2 质粒分别用 EcoR I、BamH I 内切酶进行双酶切,凝胶电泳分离,回收 NLRC5 基因和质粒,用 T4 DNA 连接酶连接,在 16 $^{\circ}$ C 条件下连接反应进行 4 h。连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,转化的菌液涂布于 LB-Kana 琼脂培养基上,37 $^{\circ}$ C 倒置过夜。挑取单个菌落接种 LB-Kana 液体培养基,37 $^{\circ}$ C、150 r/min 摇菌过夜。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 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒转染 COS-7 细胞 COS-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 COS-7 细胞消化计数(密度为 2×10^5 /ml),取 2 ml 于 6 孔板中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后细胞融合生长至 90%~95%,分别将 4 μ g 质粒和 10 μ l 脂质体溶于 250 μ l Opti-MEM 培养基中,5 min 后将两者混合于室温静置 20 min;用无血清 DMEM 洗涤细胞 2 次后加入 1.5 ml 无血清 DMEM,再逐滴加入质粒-脂质体混合物,轻轻摇晃,置 37 $^{\circ}$ 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,即为重组质粒转染组,实验中同时设置未转染组、空质粒转染组作为对照。

1.2.4 免疫荧光制片 细胞爬片的制备:首先用多聚赖氨酸润洗盖玻片洗面向上平铺于 33 mm 培养皿中,置超净台风干,加适量培养液。然后用胰酶消化细胞,适量密度重新种入放置了盖玻片的培养皿中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养过夜,待转染。即转染 24 h

后取出培养皿,弃培养基。用预冷的 PBS 溶液洗 3 遍。-20 $^{\circ}$ C 预冷的甲醇固定 2 min,弃甲醇;70% 乙醇固定 5 min,弃乙醇;PBS 溶液洗 3 次,每次 5 min,弃 PBS。然后 1% 的脱脂奶粉封闭 30 min,弃封闭液;加 GFP 一抗(1:200)室温孵育 2 h,弃一抗,封闭液洗 3 次,每次 5 min。再加罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG(1:500)室温作用 1 h,弃二抗;PBS 溶液洗 3 次,每次 5 min,弃 PBS。再加 0.15 g/L DAPI 溶液,室温 2 min,弃 DAPI 溶液;PBS 溶液洗 3 次,每次 5 min。最后用滤纸尽可能去除盖玻片上的溶液,用荧光封片胶(Dako)将盖玻片封于载玻片上。4 $^{\circ}$ C 储存过夜后荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 Western blot 法检测转染 24 h 后细胞中 GFP 的蛋白表达 pEGFP-C2 和 pEGFP-C2-NLRC5 质粒转染 COS-7 细胞 48 h 后检测细胞 GFP 融合蛋白表达。倒掉培养液,4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次后吸干液体,每孔加 RIPA 强裂解液 80 μ l,冰上裂解 30 min。收集细胞裂解悬液,4 $^{\circ}$ C 高速离心 10 min,吸取上清液。BCA 法测定总蛋白质浓度。SDS-PAGE 垂直电泳分离蛋白质并转膜,37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。GFP 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,用 TBST 简单洗 2 次,37 $^{\circ}$ C 孵育 β -actin 单克隆抗体 2 h。TBST 洗 3 次,每次 10 min,37 $^{\circ}$ C 孵育辣根过氧化物标记二抗 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min。ECL 化学发光法显示目的蛋白质。

2 结果

2.1 目的基因 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 1 276 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,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 上的完全一致。

2.2 pEGFP-C2-NLRC5 在 COS-7 中的表达 转染 24 h 后荧光显微镜下观察可见绿色荧光细胞,免疫荧光制片的图中也可以看到 pEGFP-C2-NLRC5 转染细胞核周围有绿色荧光表达,定位清晰,而 pEGFP-C2 载体在细胞中呈现弥散性分布表达,见图 2。

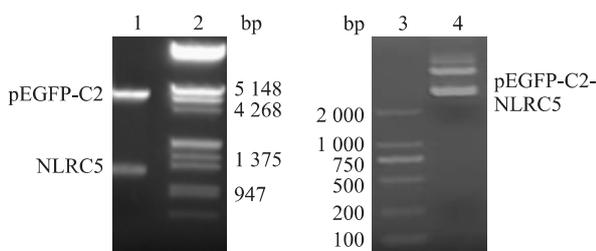


图1 重组质粒电泳及重组质粒 pEGFP-C2-NLRC5 经双酶切鉴定电泳图

1: EcoR I 和 BamH I 双酶切质粒 pEGFP-C2-NLRC5; 2、3: DNA Marker; 4: pEGFP-C2-NLRC5

2.3 pEGFP-C2-NLRC5 基因转染 COS-7 细胞中的表达检测 转染 48 h 后发现荧光细胞数量最多, 收集此时的细胞裂解, 见图 3。重组质粒转染组 GFP-NLRC5 融合蛋白在 74 ku 处表达。空质粒转染组在 27 ku 处表达。

3 讨论

NLRs 是细胞内模式识别受体家族, 该家族已发现了 5 个亚家族, 其中在人类至少发现了 23 个成员, 在鼠中至少发现了 34 个成员。这些成员通常含有 3 个结构区域: C 端为 LRRs 区域(亮氨酸重复区域)能够识别相应的配体; 中部区域为 NBD (也称 NOD、NACHT) 区, 在 NLRs 与核苷酸链的结合以及自我聚合方面具有重要作用^[5]。NLRs 的 N 端为 CARD、PYD 或者 BIRs 区域, 能够结合下游效应分子从而激活 NLRs, 故这个区域称为功能结构域。

NLRs 参与了许多免疫调节过程。近期新发现的 NLRC5 被证明能够参与到以上多种免疫反应, 但它在免疫调节过程中具体扮演什么角色还具有争议性^[6]。NLRC5 通过调控 I 类主要组织相容性复合体(MHC I)的转录表达^[7], 进而影响细胞内病原体特异性 CD8⁺T 细胞的激活与增殖, 从而有效清除病原菌, 慢性炎症是导致癌症的主要原因之一, 因而而发展免疫疗法成为治疗癌症的理想靶点分子^[8]。COS-7 细胞是研究蛋白质结构与功能的有利工具, 多种载体可以在 COS-7 细胞中表达外源基因, 本研究采用成功构建的真核表达载体 pEGFP-C2-NLRC5 转染宿主细胞 COS-7 对 NLRC5 基因的真核表达进行了初步研究。

pEGFP-C2 就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, 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^[10]。

本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

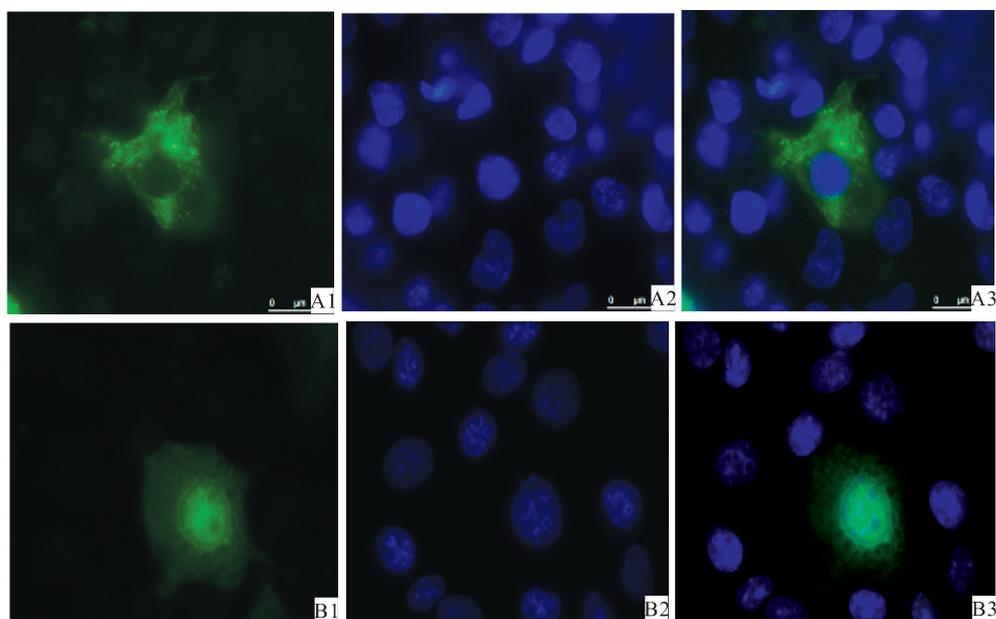


图2 免疫荧光制片观察 NLRC5 的蛋白表达及其定位情况 ×200

A: 单转 pEGFP-C2-NLRC5; B: 单转 pEGFP-C2 空载体; 1: NLRC5 的表达定位情况; 2: DAPI 染核; 3: 复合图

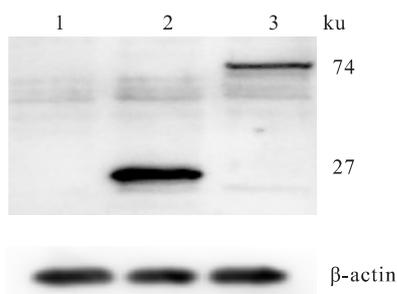


图3 Western blot 法检测 pEGFP-C2-NLRC5 转染后 COS-7 细胞

1: pEGFP-C2-NLRC5 转染的 COS-7 细胞; 2: pEGFP-C2 转染的 COS-7 细胞; 3: 未转染组 COS-7 细胞

GenBank 上完全符合。将重组质粒 pEGFP-C2-NLRC5 转染 COS-7 细胞, 荧光显微镜下观察及免疫荧光制片后都可见细胞内有 NLRC5 和 EGFP 的融合蛋白发出绿色荧光, 而且 NLRC5 蛋白定位在胞质中, 而作为对照的空载体组可见胞质和核内都见表达。Western blot 法表明单用 GFP 抗体免疫印迹时, 在约 74 ku 位置处出现一个条带, 其大小符合 EGFP-NLRC5 表达的蛋白, 另在约 27 ku 处可见一条带, 其结果符合 EGFP 蛋白的大小。NLRC5 能够起到控制天然免疫和炎症反应的关键“调节器”的作用, 有效调控免疫细胞的活性, 以防止持续的炎症反应造成对其本身的伤害, 例如癌症和自身免疫性疾病。

参考文献

- [1] Kuenzel S, Till A, Winkler M, et al. The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRC5 is involved in IFN-dependent antiviral immune responses [J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1990-2000.
- [2] Meissner T B, Li A, Biswas A, et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(31): 13794-9.
- [3] Cui J, Zhu L, Xia X, et al. NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways [J]. *Cell*, 2010, 141(3): 483-96.
- [4] Kobayashi K S, van den Elsen P J. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(12): 813-20.
- [5] Magalhaes J G, Sorbara M T, Girardin S E, et al. What is new with Nod2 [J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(1): 29-34.
- [6] Yao Y, Qian Y. Expression regulation and function of NLRC5 [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(3): 168-75.
- [7] Meissner T B, Li A, Liu Y J, et al. The nucleotide-binding domain of NLRC5 is critical for nuclear import and transactivation activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(4): 786-91.
- [8] Oldstone M B. Virus-lymphoid cell interactions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(23): 12756-8.
- [9] 朱梦瑜, 高星杰, 钱宝鑫, 等. 重组真核质粒 pEGFP-C2-hG3BP Domain(1~5) 的构建及表达 [J]. *天津医科大学学报* 2011, 39(11): 990-1.
- [10] 邓超, 黄大昉, 宋福平. 绿色荧光蛋白及其应用 [J]. *中国生物工程杂志* 2011, 1(2): 96-102.

Construction of recombinant plasmid pEGFP-C2-NLRC5 and its expression

Xu Tao, Peng Yunyun, Li Lin, et al

(School of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct pEGFP-C2-NLRC5 of expression plasmid, and observe its expression in COS-7 cells. **Methods** Get the cDNA sequence of NLRC5 protein from the LX-2 by RT-PCR. Then NLRC5 cDNA and the vector pEGFP-C2 were digested with restriction enzymes EcoR I and BamH I, and the digested productions were connected by T4 enzyme at 16 °C, and then the eukaryotic vector of pEGFP-C2-NLRC5 was constructed. The recombinant vector was identified by the double digestion with restriction enzymes EcoR I and BamH I and DNA sequencing. After the analysis, pEGFP-C2-NLRC5 was transfected into renal fibroblasts COS-7 cells by Lipofectamine™2000, and the expression of pEGFP-C2-NLRC5 was monitored by fluorescence and confocal microscope and Western blot. **Results** The NLRC5 fragment was contained in the positive recombination by identification of restriction enzymes. After transfecting recombinant plasmid, green fluorescent protein could be observed, and they were mainly distributed in the cytoplasm. A stripe of 74 ku protein could be detected by Western blot, whose size was accord with EGFP-NLRC5 of protein expression (NLRC5 protein: 47 ku, EGFP protein: 27 ku). Therefore, fusion protein could be successfully expressed in mammalian cell. **Conclusion** The eukaryotic expression vector of pEGFP-C2-NLRC5 is constructed successfully, and the fusion expression of NLRC5 protein and GFP can be detected in COS-7.

Key words NLRC5; COS-7; gene expression; recombinant plasmid; transfection