

凝血因子IX野生型 pIRES2-ZsGreen1 真核表达载体的构建及其在 HEK-293 细胞的表达

陈剑芳 张耀方 康建民 秦秀玉 王梅芳 王刚 杨林花

【摘要】 目的 以含有凝血因子IX(FIX)cDNA的pcDNA/FIX质粒为模板构建真核表达载体pIRES2-ZsGreen1/FIX并检测其在HEK-293细胞中的表达。方法 以pcDNA/FIX质粒为模板,扩增出目的基因FIX的开放阅读框(ORF)区,使用Infusion酶对线性pIRES2-ZsGreen1双酶切产物及FIXORF扩增产物进行连接,连接产物进行转化后筛选阳性克隆,对阳性克隆进行DNA测序及凝胶电泳鉴定。野生型pIRES2-ZsGreen1/FIX转染HEK-293细胞后,分别采用实时定量PCR、细胞免疫荧光法、一期法检测野生型FIX基因mRNA表达水平、蛋白的表达量及细胞裂解液、细胞培养液的FIX活性。结果 成功构建pIRES2-ZsGreen1/FIX并转染HEK-293细胞,实时定量PCR证实HEK-293细胞表达FIX mRNA,激光共聚焦显微镜下观察到FIX蛋白在细胞质中合成,野生型质粒pIRES2-ZsGreen1/FIX转染HEK-293细胞裂解液和细胞培养液的FIX活性分别为(92.03±0.29)%、(86.89±8.78)%,无转染的HEK-293细胞裂解液和培养液中FIX活性均为0。结论 成功构建FIX野生型pIRES2-ZsGreen1真核表达载体。

【关键词】 血友病B; 因子IX; 真核细胞; 质粒

基金项目:国家自然科学基金(81270587);山西省青年科技研究基金(2014021040-1)

Construction of the pIRES2-ZsGreen1 eukaryotic expression vector of Factor IX gene and expression in HEK-293 cells Chen Jianfang, Zhang Yaofang, Kang Jianmin, Qin Xiuyu, Wang Meifang, Wang Gang, Yang Linhua. Department of Hematology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Yang Linhua, Email: yanglh5282@163.com

【Abstract】 Objective To construct pIRES2-ZsGreen1/FIX expression vector, using the pcDNA/FIX plasmid containing FIX cDNA as template, and express in HEK-293 cells. **Methods** The total ORF of FIX gene was amplified from pcDNA/FIX plasmid, then the amplified fragment was cloned into the pIRES2-ZsGreen1 vector using the Infusion enzyme. The positive clones of eukaryotic expression vector of pIRES2-ZsGreen1/FIX were screened and expanded after transfection, then were constructed and confirmed by PCR and sequencing. Transient expression experiments were performed using HEK-293 cells transfected with the expression vectors and observed the expression of ZsGreen1 protein by confocal laser microscope. The relative expression levels of FIX mRNA, protein and FIX activity (FIX:C) were detected by real time PCR (RT-PCR), immunofluorescence microscopy, One-Stage method, respectively. **Results** The expression vector, pIRES2-ZsGreen1/FIX, was successfully constructed and expressed in HEK-293 cells. RT-PCR detected the expression of FIX mRNA in HEK-293 cells and the immunofluorescence microscopy showed FIX protein distributed in the surrounding of nucleus. FIX:C of cell lysates and cell culture fluid transfected with the expression vectors were (92.03 ± 0.29)% and (86.89 ± 8.78)%, respectively; while both FIX:C of cell lysates and cell culture fluid transfected with or without the expression vectors were 0. **Conclusion** The experimental results showed the expression vector, pIRES2-ZsGreen1/FIX, was successfully constructed, which provided experiment basement for the follow study on the location, function and molecular pathology of hemophilia B.

【Key words】 Hemophilia B; Factor IX; Eukaryotic cells; Plasmids

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81270587); Shanxi Province Science Foundation for Youths(2014021040-1)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.11.009

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院血液科

通信作者:杨林花,Email:yanglh5282@163.com

血友病B是凝血因子IX(FIX)基因突变引起的X连锁隐性遗传性出血性疾病,在男性中的发病率约为1/25 000^[1],占血友病的15%~20%^[2]。FIX基因位于Xq26.3-27.2,全长34 kb,由8个外显子和7个内含子构成^[3]。FIX基因缺陷导致FIX活性或含量下降是血友病B的分子发病机制。本研究以含有FIX cDNA的pcDNA/FIX质粒为模板构建真核表达载体pIRES2-ZsGreen1/FIX野生型,为研究FIX真核表达载体在HEK293细胞中的表达及血友病B的分子发病机制奠定实验基础。

材料与方法

1. 主要试剂:含有FIX cDNA的pcDNA3.1(-)质粒pcDNA/FIX由上海瑞金医院王学锋教授惠赠;HEK-293细胞系购自美国ATCC公司;pIRES2-ZsGreen1、Infusion HD Cloning Kit购自日本Clontech公司;EcoR I、BamH I限制性核酸内切酶购自日本TaKaRa公司;PfuUltraTM HF DNA Polymerase购自美国Stratagene公司;Attractene转染试剂购自德国QIAGEN公司;鼠抗人FIX单克隆抗体购自美国Sigma公司;Dylight 649 Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)购自美国Earthox公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购自德国Roche公司;PrimeScript RT reagent Kit反转录试剂盒和SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒购自日本TaKaRa公司;实时定量PCR引物由大连宝生物公司合成。M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent购自美国Thermo Scientific公司。

2. 以pcDNA/FIX质粒为模板构建真核表达载体pIRES2-ZsGreen1/FIX:将pcDNA/FIX及pIRES2-ZsGreen1质粒在感受态细胞E.coli DH5α转化、扩增,并提取相应质粒DNA。查找pcDNA/FIX质粒目的基因开放阅读框(ORF)区,在FIXORF翻译起始位点及终止位点附近设计引物,扩增出目的基因FIX的ORF区,行琼脂糖凝胶电泳,回收PCR扩增的FIXORF片段(1 434 bp)。以限制性内切酶EcoR I和BamH I对pIRES2-ZsGreen1质粒进行双酶切。pIRES2-ZsGreen1质粒全长5 283 bp,经EcoR I和BamH I双酶切后产生32 bp及5 251 bp两个片段,凝胶电泳仅见5 251 bp一个条带,凝胶回收此片段。采用Infusion HD Cloning Kit将目的片段FIXORF插入pIRES2-ZsGreen1载体中,连接产物长度为6 660 bp。连接产物在感受态细胞E.coli DH5α转化、扩增。Cracking Buffer法筛选pIRES2-

ZsGreen1/FIX重组体的阳性克隆。根据pIRES2-ZsGreen1质粒的结构,以pIRES2-EGFP.P5'及pIRES2-EGFP.P3'为测序引物,采用双脱氧链终止法进行DNA序列分析。Chromas软件将测序结果与NCBI基因库(Gene Bank K02402.1)序列进行比对,验证载体构建是否成功。

3. 野生型pIRES2-ZsGreen1/FIX质粒的转染:将处于对数生长期的HEK-293细胞用PBS洗涤2次,加0.25%胰酶消化后,计数 2×10^4 个细胞,接种于24孔细胞培养板,加完全DMEM培养基500 μl,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育。将0.4 μg质粒溶解于60 μl无血清DMEM培养液中混匀,加入1.5 μl Attractene转染试剂混匀,室温孵育10~15 min。将上述混合物加入到24孔板中,轻柔晃动培养板,保证转染混合物分布均匀,设3个复孔同步转染。将细胞置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育24 h,弃去转染混合物,每孔加入500 μl完全培养基,继续培养48 h。转染48 h后,1×PBS洗涤细胞,更换新鲜培养液,激光共聚焦显微镜下观察ZsGreen1的荧光表达情况并拍照。

4. 实时定量PCR检测FIX mRNA的表达:转染48 h后,倒出培养液,用E.Z.N.A.™ DNA/RNA/Protein Isolation Kit提取总RNA。去除基因组DNA,并用PrimeScript RT reagent Kit反转录试剂盒逆转录为cDNA。根据NCBI基因库公布的FIX基因cDNA序列(AF536327),设计实时定量PCR引物:FIX上游引物为5'-GGAGATCAGTGTGAGTCAATCCA-3',下游引物为5'-CTGCTCGCATCTGCCATTCTTA-3',产物大小为150 bp;β-actin上游引物为5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3',下游引物为5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3',产物大小为155 bp。采用实时定量PCR检测FIX mRNA表达,反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×) 10 μl,上下游引物各0.5 μl,ROX Reference Dye(50×) 0.4 μl,cDNA模板2~4 μl,焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水加至总体积20 μl。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火延伸30 s,共40个循环。每个标本设3个复孔,分不同批次完成。以无转染的HEK-293细胞为阴性对照。

5. 细胞免疫荧光法检测FIX蛋白的表达:24孔板中置入干净玻片,加入HEK-293细胞,待细胞至90%融合后进行野生型FIX质粒转染。转染24 h后吸去培养基,用PBS洗细胞3次(每次5 min)。4%多聚甲醛室温下固定细胞15 min。0.2% Triton室

温透化处理 15 min。10% 正常山羊血清封闭 30 min。鼠抗人 FIX 单克隆抗体(1:200)4 °C 孵育 14~16 h。PBS 洗细胞 2 次(每次 5 min), Dylight 649 Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(1:50)37 °C 孵育 30 min。PBS 洗细胞 2 次(每次 5 min), 加入 DAPI(1:1 000)染色 15 min。滴加 2~3 μ l 抗荧光衰减封片剂, 指甲油封片。激光共聚焦显微镜下观察结果并照相。以转染 pIRES2-ZsGreen1 的 HEK-293 细胞为阴性对照。

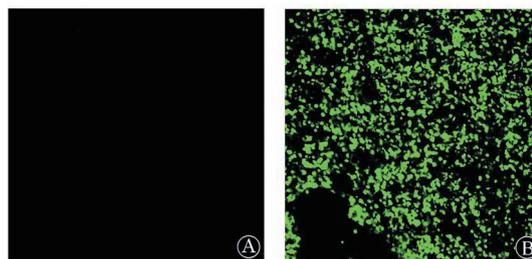
6. 一期法测定 FIX 活性(FIX:C): 转染 48 h 后倒出培养液, 每孔加入含有 1% Halt Protease Inhibitor Cocktail 的 M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent 200 μ l, 将裂解液及培养上清液冻存。进行总蛋白浓度测定。采用一期法, 乏因子血浆用 1 ml 蒸馏水溶解, 使用前保持 15~25 °C 至少 15 min, 然后摇匀至溶解, 吸取 APTT 试剂 100 μ l, 37 °C 温育 4 min, 加入乏因子血浆 100 μ l、待测蛋白 100 μ l, 混匀, 37 °C 温育 5 min。加入已预热至 37 °C 的 0.02 mol/L CaCl₂ 溶液 100 μ l, 在全自动血凝仪上检测并记录凝固时间。每个标本设 3 个复孔, 分不同批次完成。以无转染的 HEK-293 细胞作为阴性对照。

结 果

1. pIRES2-ZsGreen1/FIX 电泳及测序鉴定: pIRES2-ZsGreen1/FIX 重组体长度为 6 660 bp(图 1), 根据 pIRES2-ZsGreen1 质粒的结构, 以 pIRES2-EGFP.P5' 及 pIRES2-EGFP.P3' 为测序引物, 采用双脱氧链终止法进行 DNA 序列分析。Chromas 软件将测序结果与 NCBI 基因文库(Gene Bank K02402.1)序列进行比对, 拼接结果完全正确。

2. 激光共聚焦显微镜下观察 pIRES2-ZsGreen1/FIX 转染: 转染 48 h 后, 1 \times PBS 洗涤细胞, 更换新鲜

培养液, 激光共聚焦显微镜下观察 ZsGreen1 荧光表达情况并拍照。未转染 HEK-293 细胞中无绿色荧光, 转染 pIRES2-ZsGreen1/FIX 的 HEK-293 细胞中可见绿色荧光散在分布(图 2)。

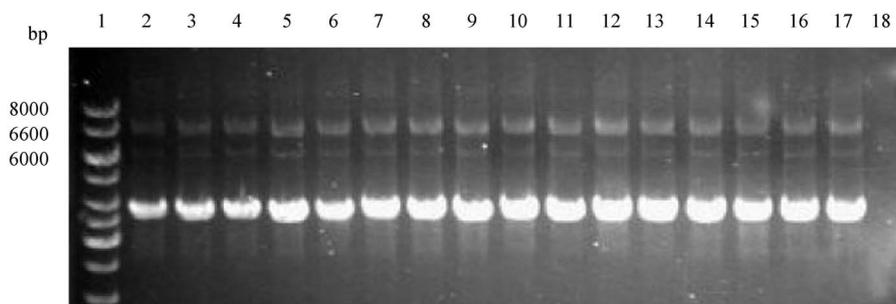


A: 阴性对照(无转染的 HEK293 细胞); B: 转染 pIRES2-ZsGreen1/FIX 的 HEK-293 细胞

图 2 激光共聚焦显微镜下观察 pIRES2-ZsGreen1/FIX 转染

3. 实时定量 PCR 检测 FIX mRNA 的表达: 使用 SYBRGreen1 非探针法、比较 Ct 值($2^{-\Delta\Delta C_t}$)的相对定量方法对目的基因进行实时荧光定量检测, 并结合 PCR 后的熔解曲线进行分析。以 β -actin 为内参基因, 检测 FIX 在 HEK-293 细胞中的表达。目的基因与内参基因熔解曲线为特异单峰, 无杂峰及特异性信号干扰, 表明产物纯度高, 具有良好的特异性。无转染的 HEK-293 细胞提取 RNA 为阴性对照, 未检出 FIX mRNA 表达, 提示 HEK-293 细胞本身不表达 FIX mRNA。

4. 细胞免疫荧光法检测 FIX 蛋白的表达: 转染 HEK-293 细胞后, 激光共聚焦显微镜下观察 FIX 蛋白表达。Dylight 649 标记的羊抗鼠二抗显示为红色荧光, ZsGreen1 显示为绿色荧光, DAPI 显示为蓝色荧光。ZsGreen1 蛋白绿色荧光与 DAPI 蓝色荧光基本重合, 提示 ZsGreen1 蛋白定位于细胞核, 而 Dylight 649 标记的红色荧光均匀分布于细胞核周围, 提示 FIX 蛋白在细胞质中合成。转染 pIRES2-ZsGreen1 的 HEK-293 细胞为阴性对照, 可见



1: DNA Marker; 2~17: pIRES2-ZsGreen1/FIX; 18: 阴性对照

图 1 pIRES2-ZsGreen1/FIX 质粒琼脂糖凝胶电泳图

ZsGreen1 蛋白绿色荧光与 DAPI 蓝色荧光表达,无 Dylight 649 标记的红色荧光表达,提示 HEK-293 细胞不表达 FIX 蛋白(图3)。

5. 一期法测定 FIX:C:野生型质粒 pIRES2-ZsGreen1/FIX 转染细胞裂解液、细胞培养液的 FIX:C 分别为 $(92.03 \pm 0.29)\%$ 、 $(86.89 \pm 8.78)\%$,而无转染的 HEK-293 细胞裂解液、培养液中 FIX:C 均为 0。提示 pIRES2-ZsGreen1/FIX 质粒成功转染 HEK-293 细胞并表达具有活性的 FIX 蛋白,HEK-293 细胞不表达 FIX 蛋白。

讨 论

FIX 基因位于 Xq26.3-27.2,全长 34 kb,由 8 个外显子、7 个内含子及侧翼顺序中的调控区域构成^[3]。8 个外显子长度 25~1 933 bp,分别编码信号肽、前肽和羧基谷氨酸区(GLA 区)结构域、类表皮生长因子结构域 I (EGF-1)、EGF-2、活化结构域及催化结构域^[4]。FIX 蛋白是由 415 个氨基酸残基组成的单链糖蛋白,含糖量约 17%,包括 GLA 区、2 个 EGF 区和催化区 4 个结构域^[5]。

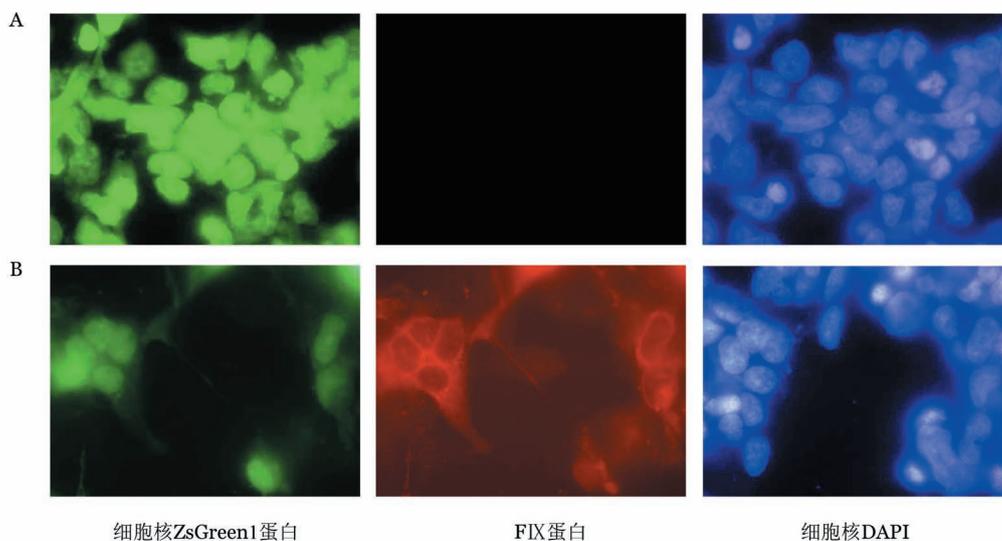
FIX 基因缺陷主要包括点突变、基因缺失、异常基因插入、基因片段重排及影响 mRNA 剪接的突变等^[6]。国际血友病 B 突变数据库(<http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html/>)共报道了 1 000 余种 FIX 基因突变,其中最常见的是点突变(约占 90%),7% 为小片段插入或缺失,3% 为大片段

插入或缺失。

目前,真核表达载体应用于外源基因的转导和表达往往是表达双基因载体,两个基因(1 个目的基因和 1 个筛选基因)在不同的转录启动子下启动转录表达。常见的报告基因主要有 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酸酶、荧光虫荧光素酶等,但这些基因都需要底物和辅助因子,而且对细胞有一定的损伤^[7-9]。理想的报告基因为无毒、高效表达的小分子蛋白,便于检测且不依赖底物和辅助因子^[10]。

荧光蛋白珊瑚分离蛋白 ZsGreen1 是 ZsGreen 蛋白的衍生物,最大激发波长为 493 nm,最大发射波长为 505 nm,在肺部组织、肌肉组织及培养细胞中比 EGFP、AcGFP、hMGFP 等绿色荧光蛋白更亮,且 8~12 h 就可以观察荧光表达^[11]。Ekberg 等^[12]报道,ZsGreen1 在哺乳动物嗅觉系统中的活体和固定嗅觉神经细胞中高效表达,而且在多次扫描后荧光强度无明显衰减,提示 ZsGreen1 不仅能够用于蛋白定位,而且可作为稳定的活体标志物用于观察细胞的生长和运动。

目前,真核表达载体多表达融合蛋白,可影响目的蛋白的生物活性。含有内部核糖体结合位点(internal ribosome entry site, IRES)的真核表达载体,使目的基因和报告基因共表达,经同一 mRNA 转录本分别翻译目的基因和报告基因使其高效表达,可方便地检测目的基因的表达水平和转染效率。IRES 是指在真核细胞或病毒中表达的基因 5'端具



A: 转染 pIRES2-ZsGreen1 质粒(阴性对照):激光共聚焦显微镜下可见 ZsGreen1 蛋白绿色荧光与 DAPI 蓝色荧光表达,无 Dylight 649 标记的红色荧光表达; B: 转染 pIRES2-ZsGreen1/FIX 质粒:激光共聚焦显微镜下 ZsGreen1 蛋白绿色荧光与 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)蓝色荧光基本重合,提示 ZsGreen1 蛋白定位于细胞核,Dylight 649 标记的红色荧光均匀分布于细胞核周围,提示 FIX 蛋白在细胞质中合成

图3 细胞免疫荧光法检测转染 pIRES2-ZsGreen1/FIX 质粒后 HEK-293 细胞凝血因子 IX (FIX) 的表达

有一段较短的RNA序列(150~250 bp),能够折叠成类似于起始tRNA的结构,从而介导核糖体与RNA结合,启动蛋白质翻译。这个翻译机制不同于帽依赖翻译启动机制(cap-dependent translation initiation),与小核糖体扫描模型有别,这种非帽依赖翻译机制存在于绝大多数真核细胞和病毒mRNA的表达^[13-15]。因此本研究选择含有IRES的pIRES2-ZsGreen1真核表达载体,使目的基因FIX和荧光蛋白珊瑚分离蛋白ZsGreen1共表达,此时荧光蛋白只作为目的蛋白转录和翻译的指示剂而不影响目的蛋白的功能。

本实验通过查找pcDNA/FIX质粒目的基因ORF区,利用Lasergene软件查找序列中的内切酶酶切位点,选择ORF区不存在但存在于pcDNA3.1质粒及pIRES2-ZsGreen1载体上的两个限制性内切酶EcoR I和BamH I为酶切位点,对pIRES2-ZsGreen1进行双酶切。以pcDNA/FIX质粒为模板,在FIX ORF翻译起始位点及终止位点附近设计引物,扩增FIX ORF区,扩增产物进行胶回收后使用Infusion酶与线性pIRES2-ZsGreen1双酶切产物进行连接,连接产物进行转化后筛选阳性克隆,对阳性克隆进行DNA测序及凝胶电泳鉴定,成功构建野生型pIRES2-ZsGreen1/FIX,转染HEK-293细胞后,通过采用实时定量PCR检测FIX基因mRNA、细胞免疫荧光法检测FIX蛋白表达量及一期法检测检测细胞裂解液和细胞培养液中的FIX:C,证实FIX野生型pIRES2-ZsGreen1真核表达载体构建成功。

参考文献

- [1] Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M, et al. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders [J]. *Haemophilia*, 2006, 12 Suppl 3:82-89. doi: 10.1111/j.1365-2516.2006.01263.x.
- [2] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组, 中国血友病协作组. 血友病诊断与治疗中国专家共识(2013年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(5): 461-463. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.05.020.
- [3] Lillicrap D. The molecular basis of haemophilia B [J]. *Haemophilia*, 1998, 4(4):350-357. doi: 10.1046/j.1365-2516.1998.440350.x.
- [4] Giannelli F, Green PM, Sommer SS, et al. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions—eighth edition[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(1):265-268.
- [5] Schmidt AE, Bajaj SP. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(1):39-45. doi:10.1016/S1050-1738(02)00210-4.
- [6] Arruda VR, Samelson-Jones BJ. Obstacles and future of gene therapy for hemophilia[J]. *Expert Opin Orphan Drugs*, 2015, 3(9):997-1010. doi: 10.1517/21678707.2015.1069179.
- [7] Wigley WC, Stidham RD, Smith NM, et al. Protein solubility and folding monitored in vivo by structural complementation of a genetic marker protein[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(2):131-136. doi:10.1038/84389.
- [8] Fisher AC, Kim W, DeLisa MP. Genetic selection for protein solubility enabled by the folding quality control feature of the twin-arginine translocation pathway [J]. *Protein Sci*, 2006, 15(3):449-458. doi: 10.1110/ps.051902606.
- [9] Dyson MR, Perera RL, Shadbolt SP, et al. Identification of soluble protein fragments by gene fragmentation and genetic selection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(9):e51. doi: 10.1093/nar/gkn151.
- [10] Liu XY, Li LF, Su XD. Tailoring a low-molecular weight protein tyrosine phosphatase into an efficient reporting protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(4):735-739. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.099.
- [11] Bell P, Vandenbergh LH, Wu D, et al. A comparative analysis of novel fluorescent proteins as reporters for gene transfer studies [J]. *J Histochem Cytochem*, 2007, 55(9):931-939. doi: 10.1369/jhc.7A7180.2007.
- [12] Ekberg JA, Amaya D, Chehrehasa F, et al. OMP-ZsGreen fluorescent protein transgenic mice for visualisation of olfactory sensory neurons in vivo and in vitro [J]. *J Neurosci Methods*, 2011, 196(1):88-98. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.01.008.
- [13] Burks JM, Zwieb C, Müller F, et al. Comparative structural studies of bovine viral diarrhoea virus IRES RNA [J]. *Virus Res*, 2011, 160(1-2):136-142. doi: 10.1016/j.virusres.2011.06.002.
- [14] Fernández N, García-Sacristán A, Ramajo J, et al. Structural analysis provides insights into the modular organization of picornavirus IRES [J]. *Virology*, 2011, 409(2):251-261. doi: 10.1016/j.virol.2010.10.013.
- [15] Telpalo-Carpio SA, Diaz-Mitoma F, Moreno-Cuevas JE, et al. Internal ribosome entry site (IRES) from Encephalomyocarditis virus (EMCV) as a tool for shuttle expression plasmids [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4):548-553. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.120.

(收稿日期:2016-05-13)

(本文编辑:徐茂强)