

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.004

真核表达质粒 pcDNA3.1-CSRP2-HA 的构建及鉴定 *

先 俊^{1,2} 邱 娟³ 张安兵² 李 理² 黄文杰^{2△}

(1 广州医科大学研究生院 广东 广州 510182; 2 广州军区广州总医院呼吸内科 广东 广州 510010;

3 珠海市第二人民医院 广东 珠海 510090)

摘要 目的:构建并鉴定真核表达质粒 PcDNA3.1-CSRP2-HA。**方法:**据 GeneBank 中人 CSRP2 CDS 序列设计并合成引物,提取 A549 细胞总 RNA,并将其逆转录成 cDNA 作为模板,进行 PCR 扩增,获得 CSRP2 目的基因后,再与 PcDNA3.1-HA 载体进行连接重组,构建 PcDNA3.1-CSRP2-HA 真核表达质粒,经限制性内切酶消化、PCR 及 DNA 序列测序分析等方法鉴定后,瞬时转染入 A549 细胞,Western blot 法检验 CRP2 蛋白表达。**结果:**成功构建 PcDNA3.1-CSRP2-HA 真核表达质粒,Western-blot 结果显示 PcDNA3.1-CSRP2-HA 能够在 A549 细胞中表达。**结论:**PcDNA3.1-CSRP2-HA 真核表达质粒构建并鉴定成功,为后续研究 CRP2 在炎症诱发氧化损伤机制中的转录调控作用奠定了基础。

关键词:CSRP2;PcDNA3.1;真核表达质粒

中图分类号:R363 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)21-4014-04

Construction and Identification of Eukaryotic Expression Plasmid PcDNA3.1-CSRP2-HA *

XIAN Jun^{1,2}, QIU Xian³, ZHANG An-bing², LI Li², HUANG Wen-jie^{2△}

(1 Postgraduate Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510182, China;

2 General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou, Guangdong, 510010, China;

3 The Second People's Hospital of Zhuhai, Zhuhai, Guangdong, 510090, China)

ABSTRACT Objective: To construct and identify eukaryotic expression plasmid PcDNA3.1-CSRP2-HA. **Methods:** According to the sequence of CSRP2 CDS in GeneBank, a Pair of Primers were respectively designed and Synthesized, and the total RNA was isolated from A549 cells. After amplification with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the product was cloned into PcDNA3.1-HA vector, and they were identified by PCR and double restrictive edonuclease digestion and sequence analysis. Then the recombinant expression plasmid was transferred into A549 cells, and the CRP2 protein expression was identified by Western-blot. **Results:** The PcDNA3.1-CSRP2-HA eukaryotic expression plasmid was successfully established, and the expression of PcDNA3.1-CSRP2-HA could be detected in A549 by Western-blot. **Conclusions:** The PcDNA3.1-CSRP2-HA eukaryotic expression plasmid was constructed successfully, which lays the foundation for the research of CRP2 in transcription regulation mechanism of oxidative damage induced by inflammation.

Key words: CSRP2; PcDNA3.1; Eukaryotic expression plasmid

Chinese Library Classification(CLC): R363 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)21-4014-04

前言

CRP2 作为体内重要的转录因子,参与多种细胞的增殖分化,促进细胞进入有丝分裂^[1,2]。在成年哺乳动物中 CRP2 主要在血管平滑肌细胞中表达,目前对 CRP2 蛋白功能的研究还主要集中在心血管系统,但作用机还尚未完全阐明^[3]。本实验室前期在研究 Nox1 启动子转录调控的过程中以 TNF- α 刺激肺泡上皮细胞,模拟急性肺损伤体外细胞炎症-氧化损伤模型^[4],发现 CRP2 能在肺内表达,且通过 DNA pull-down 等实验发现 CRP2 与 Nox1(NADPH oxidase 1)基因启动子结合,与 TNF- α

诱发 A549 细胞的活性氧释放及氧化应激损伤密切相关。鉴此,本研究拟提取 A549 细胞总 RNA,通过 PCR、酶切、连接等方法构建表达质粒 PcDNA3.1-CSRP2-HA,为进一步探讨在炎症诱发氧化损伤过程中 CRP2 对 Nox1 的转录调控作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、A549 细胞由本实验室所保存,真核表达载体 PcDNA3.1-HA 南方医科大学实验室惠赠,其中 -HA 为蛋

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070003、81370173);国家青年科学基金项目(81200002)

作者简介:先俊(1985-),男,硕士研究生,主要研究方向:呼吸系统炎症与感染,Tel:020-88653557,E-mail:xianjunsclz@sina.com

△ 通讯作者:黄文杰,Tel:020-88653557,E-mail:huangyelu1029@vip.163.com

(收稿日期:2013-11-11 接受日期:2013-12-10)

白标签。限制性内切酶 *EcoR*I / *Xho*I、T4 DNA 连接酶、Maker 等购自 TAKARA 公司。大量胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂均购自天根生化科技公司。RAPA 强裂解液和抗 HA 一抗购自江苏碧云天科技公司。琼脂糖、氨苄青霉素等购自广州威佳科技公司。PVDF 膜、发光液等购自 Milipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计及合成 CSRP2 (Gene ID: 1466) 上游引物 5'AATGAATTCATGCCTGTCTGGGGAGGTGG AAACAAG (含 *EcoR*I 酶切位点和起始密码 ATG), 下游引物 5'AATCTC-GAGCTG GGCATGAACAAGAGC3'(含 *Xho*I 酶切位点), 由上海公司合成英骏公司合成。

1.2.2 总 RNA 提取及 PCR 扩增 收集未做任何处理的 A549 细胞, 提取总 RNA, 利用蛋白核酸分析仪测定 RNA 纯度和浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。取 500 ng 总 RNA 按逆转录试剂盒制备 cDNA。PCR 反应条件: 25 μ L 反应体系, 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 36 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物作 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像仪上观察分析, 切取含 600 bp (CDS 全长 582 bp, 酶切位点加保护碱基共 18 bp) 的目的片段凝胶, 利用大量胶回收试剂盒回收纯化目的片段。

1.2.3 pcDNA3.1-CSRP2-HA 真核表达质粒构建 用 *EcoR*I 和 *Xho*I 分别酶切 pcDNA 3.1-HA 空质粒和上述回收、纯化的 CSRP2 目的片段, 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 分别将酶切产物经 1% 凝胶电泳后再次切胶回收, 获得带有黏末端的线性 pcDNA3.1 载体和 CSRP2 全长 CDS (Coding sequence 的缩写, 是编码一段蛋白产物的序列), 利用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。最后将连接产物直接转化至感受态细胞 DH5 α , 含氨苄青霉素的 LB 平板筛选后, 挑取单克隆菌落, 37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜, 按天根质粒小提试剂盒说明书提取质粒, 并通过 PCR、酶切及测序鉴定重组质粒。

1.2.4 Western blot 法检测 CSRP2 的表达 将 A549 细胞分为 1. 空白组 2. 转染 pcDNA3.1-HA 3. 转染 pcDNA3.1-CSRP2-HA 组, 取 3~5 代对数生长期的 A549 细胞种于 6 孔板, 待细胞生长密度达 70%~90% 时, 在 LipofectamineTM2000 介导下将重组质粒 pcDNA3.1-CSRP2-HA 和空质粒 pcDNA3.1-HA 分别转染 A549 细胞, 空白组不作任何处理, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 后跟换为普通培养基继续培养 42 h。转染 48 h 后收集 A549 细胞, 弃上清后, PBS 漂洗两遍后按每孔加入 RAPA 强裂解液 50 μ L, 冰上孵育 30 min, 离心 (4 $^{\circ}$ C 12000 r/min, 10 min) 得到细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后, 用 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入抗 HA 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤三次后, 加入抗兔二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗涤三次后用化学发光法检测。

2 结果

2.1 CSRP2 CDS 全长序列 PCR 扩增及鉴定

以 A549 细胞总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 反应, 得到 1 个约 600bp 的片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳与预期的片段大小相符 (见图 1)。经华大基因测序证实, 上述 PCR 产物胶回收产物与 pubmed 上提供的人 CSRP2 CDS 基因序列 99.9% 一致。

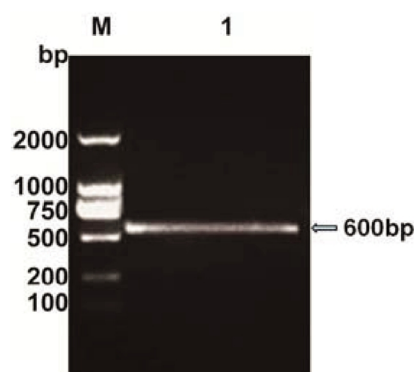


图 1 CSRP2 PCR 反应电泳结果图: M: Marker (DL2000); 1: CSRP2 PCR 产物

Fig.1 Cloning of the CSRP2 detected by agarose gel electrophoresis: M: Marker (DL2000); 1: CSRP2 PCR product

2.2 载体准备

将 pcDNA3.1-HA 空质粒和经 *EcoR*I、*Xho*I 双酶切 pcDNA3.1-HA 空质粒电泳 (见图 2)。未经酶切的空质粒呈环状, 电泳速度慢, 且为两条条带。经 *EcoR*I、*Xho*I 双酶切后的质粒呈线性, 电泳呈一条条带。胶回收经双酶切后的线性质粒, 用于后续的连接反应。

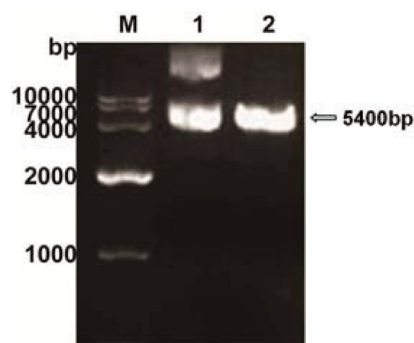


图 2 pcDNA3.1-HA 质粒电泳图: M: Marker (DL10000); 1: pcDNA3.1-HA 质粒; 2: *EcoR*I、*Xho*I 双酶切后 pcDNA3.1-HA

Fig.2 The plasmid of pcDNA3.1-HA detected by agarose gel electrophoresis: M: Marker (DL10000); 1: pcDNA3.1-HA; 2: pcDNA3.1-HA digestion by *EcoR*I, *Xho*I

2.3 重组真核表达质粒 pcDNA3.1-CSRP2-HA 的构建及鉴定

CSRP2 CDS 全长片段和 pcDNA3.1-HA 载体质粒经双酶切后, 进行连接、转化、涂抗性平板培养, 挑取单克隆菌落, 摇菌提取质粒, 再次进行 PCR 验证和 *EcoR*I、*Xho*I 双酶切鉴定 (见图 3、4)。取酶切验证正确的质粒送华大基因公司测序, 与理论序列比对 99.9% 一致。

2.4 Western blot 法检测 CSRP2 的表达

空白组及转染空质粒 pcDNA3.1-HA 组未见条带, 而转染 pcDNA3.1-CSRP2-HA 组后, 在 21KD 处见一特异性条带, 与预期大小基本一致。证明转染真核表达载体 pcDNA3.1-CSRP2-HA 入 A549 细胞后能在其细胞内表达 (见图 5)。

3 讨论

CRP2 由 193 个氨基酸组成, 其编码基因为 CSRP2, 分子

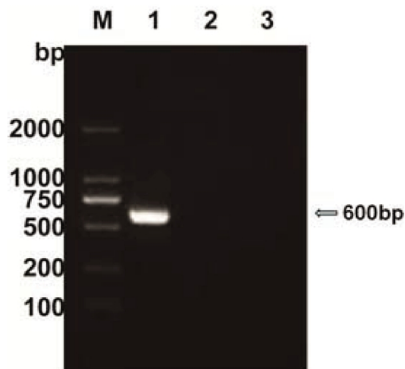


图3 PcDNA3.1-CSRP2-HA PCR 鉴定结果:M:Marker(DL2000);
1: PcDNA3.1-CSRP2-HA 为模板; 2: PcDNA3.1-HA 为模板; 3:灭菌双
蒸水对照

Fig.3 PCR analysis of PcDNA3.1-CSRP2-HA:M:Marker(DL2000);
1: PcDNA3.1-CSRP2-HA as a template; 2: PcDNA3.1-HA as a template;
3: Steam sterilization water control

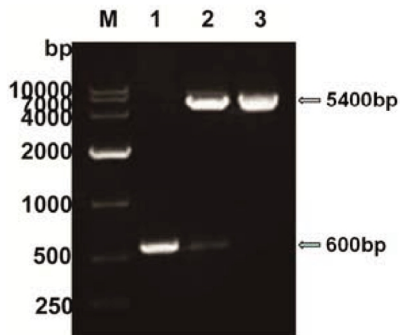


图4 PcDNA3.1-CSRP2-HA 双酶切鉴定图:M:Maker(DL10000); 1:
PcDNA3.1-CSRP2-HA 质粒 PCR; 2:PcDNA3.1-CSRP2-HA 重组质粒双
酶切; 3:PcDNA3.1-HA 空质粒双酶切

Fig.4 PcDNA3.1-CSRP2-HA identified by *EcoRI* , *XhoI* double
restrictive edonuclease digestion:M:Maker(DL10000); 1:PcDNA3.
1-CSRP2-HA PCR product; 2:PcDNA3.1-CSRP2-HA after digestion by
EcoRI , *XhoI* ; 3: PcDNA3.1-HA after digestion by *EcoRI* , *XhoI*

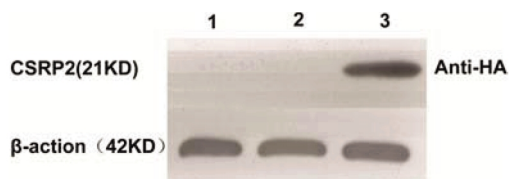


图5 western-blot 法检测 pcDNA3.1-CSRP2-HA 在 A549 细胞中的表
达:1:空白组; 2:转染 pcDNA3.1-HA 组; 3:转染 pcDNA3.1-CSRP2-HA组

Fig.5 The expression of pcDNA3.1-CSRP2-HA in A549 cells by
Western-blot:1:Control; 2:Transfection of pcDNA3.1-HA; 3: Transfection
of pcDNA3.1-CSRP2-HA

量约为 21KD,CRP2 蛋白的特点是含有 2 个 LIM 结构域,两个 LIM 结构域之间还有一个核定位信号(KKYGPK)^[5]。LIM 结构域存在于许多具有不同调节功能的蛋白质中,由 50~60 个氨基酸共有序列组成,形成 2 个半胱氨酸丰富的锌指结构^[6],但不具有与 DNA 直接结合的能力^[7]。CRP2 可在细胞胞浆及胞核定位^[8-10],胞浆中的 CRP2 可作为脚手架与细胞骨架蛋白 α -actin (a- 辅肌动蛋白)和 zyxin(斑联蛋白)相互作用^[11],因而可能具有

协调细胞骨架的功能;而在胞核中表达则具有细胞增殖分化、基因表达的辅酶功能^[12],至今为止文献报道 CRPs 能和核蛋白结合,特别是与转录因子结合,并且 CRP2 本身也是其重要的转录因子^[13]。关于 CSRP 家族的研究,早期一直聚焦在平滑肌细胞,后来逐渐扩展到动、静脉血管平滑肌细胞。后来,Järvinen PM 等研究发现在特发性肺间质纤维化小鼠肺内发现 CSRP1/CSRP2 的表达^[14]。本实验室前期在研究 Nox1 启动子转录调控的过程中,用 TNF- α 刺激 A549 细胞,通过 DNA-pull down、二维凝胶电泳及质谱分析实验发现 CRP2 在胞核内与 Nox1 基因启动子结合,参与了 TNF- α 诱发 A549 细胞氧化应激损伤,我们推测 CRP2 可能以转录辅因子的作用参与了对 Nox1 基因的调控。研究表明 Nox1 主要在肺泡上皮细胞中表达^[15],Nox1 是细胞内催化生成 ROS(reactive oxygen species)的重要酶,ROS 的生成剂量跟细胞的损伤程度呈正相关^[16,17],从而研究 CRP2 对 Nox1 的转录调控具有重要的意义。

pcDNA3.1 载体能够在哺乳动物细胞或宿主内高水平稳定或瞬时表达的真核表达载体,pcDNA3.1 含 SV40 启动子,neomycin ORF,全长 5400bp,可融合表达多种外源基因蛋白^[18]。HA 为蛋白标签,标签序列为 YPYDVPDYA,源于流感病毒的红细胞凝集素表面抗原决定簇,9 个氨基酸,对外源靶蛋白的空间结构影响小,容易构建成标签蛋白融合到 N 端或者 C 端,易于用 Anti-HA 抗体和 ELISA 检测^[19]。HA 标签抗体能特异识别 C 末端或 N 末端带有 HA 标签(HA-tagged)的融合蛋白,可以用于检测和 HA tag 融合表达蛋白的表达、细胞内定位,以及纯化、定性或定量检测 HA tag 融合表达蛋白等,易于与实验细胞自身表达 CRP2 蛋白鉴别。此外标签的使用可以简化蛋白质的纯化过程^[20]、控制蛋白质固定的空间取向、使体内生物事件可视化、提高重组蛋白质的产量^[21]、增强重组蛋白质的可溶性和稳定性^[22]等。鉴此本研究通过抗 HA 的抗体即可检测到外源性导入的真核表达载体 pcDNA3.1-CSRP2-HA 在 A549 细胞内表达,为进一步探索 CRP2 的生物学功能及其为后续研究 CRP2 在炎症诱发氧化损伤机制中的转录调控作用奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Henderson JR, Brown D, Richardson JA, et al. Expression of the gene encoding the LIM protein CRP2: a developmental profile[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2002, 50(1): 107-111
- [2] Chang DF, Belaguli NS, Iyer D, et al. Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors [J]. Developmental cell, 2003, 4(1): 107-118
- [3] Herrmann J, Borkham-Kamphorst E, Haas U, et al. The expression of CSRP2 encoding the LIM domain protein CRP2 is mediated by TGF- β in smooth muscle and hepatic stellate cells[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2006, 345(4): 1526-1535
- [4] 吴炜景,李跃飞,李理,等. 沉默 NF- κ B p65 基因下调 TNF- α 诱导的肺泡上皮细胞的炎症反应 [J]. 免疫学杂志, 2012, 28(1): 24-28
Wu Wei-jing, Li Yue-fei, Li Li, et al. NF- κ B p65 silencing by RNAi downregulates the inflammation in TNF- α -activated type II alveolar epithel cell[J]. Journal of Immunology, 2012, 28(1): 24-28
- [5] 高雪. LIM 蛋白 CRP2 及 CRIP2 在大鼠内耳的表达及在嗅球前体细胞中的分布[D]. 西安,第四军医大学,2008

- Gao Xue. Expression of LIM proteins CRP2 and CRIP2 in the rat inner ear and subcellular localizations in olfactory precursor cells[D]. Xi An, Fourth Military Medical University, 2008
- [6] Konrat R, Krautler B, Weiskirchen R, et al. Structure of Cysteine-and Glycine-rich Protein CRP2 Backbone dynamics reveal motional freedom and independent spatial orientation of the lim domains[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(36): 23233-23240
- [7] Gao X, Sun J Y, Cao Z Y. Polyclonal antibodies to LIM proteins CRP2 and CRIP2 reveal their subcellular localizations in olfactory precursor cells[J]. Biochemistry (Moscow), 2009, 74(3): 36-341
- [8] Weiskirchen R, Moser M, Weiskirchen S, et al. LIM-domain protein cysteine-and glycine-rich protein 2(CRP2) is a novel marker of hepatic stellate cells and binding partner of the protein inhibitor of activated STAT1[J]. The Biochemical journal, 2001, 359(3): 485-496
- [9] Pomies P, Louis H A, Beckerle M C, et al. CRP1, a LIM domain protein implicated in muscle differentiation, interacts with alpha-actinin[J]. The Journal of cell biology, 1997, 139(1): 157-168
- [10] Arber S, Caroni P. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ[J]. Genes & development, 1996, 10(3): 289-300
- [11] Chang Y F, Wei J, Liu X, et al. Identification of a CARG-independent region of the cysteine-rich protein 2 promoter that directs expression in the developing vasculature[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(4): 1675-1683
- [12] Kong Y, Flick M J, Kudla A J, et al. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD[J]. Molecular and cellular biology, 1997, 17(8): 4750-4760
- [13] 高雪, 曹增玉, 查定军, 等. 大鼠 *crp2* 基因真核表达质粒的构建及表达[J]. 科学技术与工程, 2008, 8(6): 1410-1413
- Gao Xue, Cao Zeng-yu, Zha Ding-jun, et al. the construction and expression of eukaryotic expression plasmid of Rats *crp2* genes[J]. Science Technology and Engineering, 2008, 8(6): 1410-1413
- [14] J rvinen P M, Myll rniemi M, Liu H, et al. Cysteine-rich protein 1 is regulated by transforming growth factor- β 1 and expressed in lung fibrosis[J]. Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(6): 2605-2612
- [15] Carnesecchi S, Deffert C, Pagano A, et al. NADPH oxidase-1 plays a crucial role in hyperoxia-induced acute lung injury in mice [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2009, 180 (10): 972-981
- [16] 张志辉, 刘尚喜, 侯凡凡, 等. 晚期氧化蛋白产物通过活性氧诱导单核细胞分泌肿瘤坏死因子 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(5): 493-497
- Zhang Zhi-hui, Liu Shang-xi, Hou Fan-fan, et al. Advanced oxidation protein products-induced tumor necrosis factor α secretion in monocytes via reactive oxygen species generation [J]. Journal of first military medical university, 2005, 25(5): 493-497
- [17] 徐采云, 李理, 袁伟锋, 等. 不同浓度肿瘤坏死因子- α 对肺腺癌 A549 细胞的影响[J]. 山东医药, 2013, 53(21): 4-6
- Xu Cai-yun, Li Li, Yuan Wei-feng, et al. Effects of different concentrations of tumor necrosis factor- α on A549 cells[J]. Shandong Medical Journal, 2013, 53(21): 4-6
- [18] 林涛, 左红艳, 王德文, 等. pcDNA3.0-RKIP 重组质粒构建及其在 PC12 细胞中的表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(4): 399-401
- Lin Tao, Zuo Hong-yan, Wang De-wen, et al. Construction of the recombinant plasmid of pcDNA3.0-RKIP and expression in PC12 cells [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2011, 27(4): 399-401
- [19] 王娅宁, 李淑娟. 融合标签技术及其应用[J]. 科技经济市场, 2009, (6): 39-40
- Wang Ya-ning, Li Shu-juan. Fusion tag technology and application [J]. Keji Jingji Shichang, 2009, (6): 39-40
- [20] Lamla T, Erdmann V A. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins [J]. Protein expression and purification, 2004, 33(1): 39-47
- [21] Butt T R, Jonnalagadda S, Monia B P, et al. Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in Escherichia coli [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989, 86 (8): 2540-2544
- [22] Chayen N E. Turning protein crystallisation from an art into a science [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2004, 14(5): 577-583