

细菌荧光酶报告基因载体构建及在 Hela 细胞中的表达^{*}

茆灿泉¹ 杨树德^{1**} 赵 玫² 范云霞² 徐 枫² 杨华卫¹ 黄常志²

(卫生部临床检验中心 北京 100730)¹

(中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤研究所 北京 100021)²

摘要: 采用 PCR 点突变技术, 构建含有细菌荧光酶融合 *luxAB* 报告基因的重组哺乳动物载体 pcDNA₃-*luxAB*, 脂质体 lipofectin 转染和 G418 抗性筛选稳定转染的 Hela 细胞。PCR 和酶切电泳证明构建的正确

* 国家自然科学基金资助项目 (No. C03030102) Project Granted by National Natural Science Fund (No.C03030102)

** 项目负责人

收稿日期: 1998-08-02, 修回日期: 1999-05-06

性;经稳定转染 pcDNA₃-luxAB 的 HeLa 细胞,用发光仪可测得较强的发光强度(最大值为 4.12mV/40μg 细胞总蛋白粗提物);而亲本及 pcDNA₃ 稳定转染的 HeLa 细胞则在本底值范围,pcDNA₃-luxAB 稳定转染与亲本及 pcDNA₃ 稳定转染的 HeLa 细胞在细胞形态和培养条件等方面无明显差异。本工作为细菌荧光酶作为报告基因在肿瘤细胞中的表达和应用建立了基础。

关键词: luxAB 基因, 报告基因, 细菌荧光酶, PCR, 稳定转染

中图分类号: R73 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(1999)-05-0327-06

CONSTRUCTION OF THE EXPRESSION VECTOR BY THE FUSION OF BACTERIAL LUCIFERASE GENE AND ITS EXPRESSION IN HELA CELL

MAO Canquan¹ YANG Shude¹ ZHAO Mei² FAN Yunxia² XU Feng² YANG Huawei¹ HUANG Changzhi²

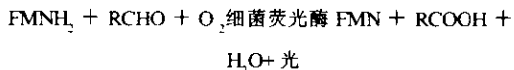
(National Center for Clinical Laboratories, Beijing 100730)¹

(Tumor Institute (Hospital) Chinese Academy of Medical sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021)²

Abstract: pcDNA₃-luxAB was constructed by the fusion of bacterial luciferase gene (*luxAB*) into the mammalian expression vector pcDNA₃ by PCR and genetic engineering, by lipofectin and G418 selection it was stably transfected into HeLa cell with HeLa cell and the HeLa cell transfected by pcDNA₃ as controls. The construction of both the construct and the stable transfect were identified by PCR and Electrophoresis; considerable light (4.12mV / 40μg extracts of total cell protein) from the pcDNA₃-luxAB transfected HeLa cell was monitored by Luminometer while the values of the controls were in the range of background; the forms along with the culturing conditions of both the transfected and the untransfected HeLa cells were indistinguishable.

Key words: *luxAB* gene, Reporter gene, Bacterial luciferase, PCR, Stable transfection

细菌生物发光基因 (*lux*) 作为一种新的报告基因,具有快速、对细胞无伤害、灵敏以及简便的突出优点^[1]。*lux* 反应是基于分子氧作用、胞内细菌荧光酶催化,将还原态的黄素单核苷酸 (FMNH₂) 及长链脂肪醛 (如: 十烷醛) 氧化为 FMN 及长链脂肪酸,同时发射 450~490nm 蓝绿光:



由于细菌荧光酶 *luxA/B* 基因属多顺反子原核基因,由相距 29 个碱基的 *luxA* 和 *luxB* 双基因组成,构建单顺反子融合 *luxAB* 基因将使其作为报告基因在肿瘤细胞和组织中的表达和应用成为可能。本工作在已知 *luxA/B* 基因序列的基础上,采用 PCR、基因工程及脂质体转染技术,构建和在 HeLa 细胞中成功表达了 pcDNA₃-

luxAB 质粒。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: PCR-90AD 型扩增仪(中国科学院遗传所); LKB-1251 型发光仪(瑞典产)。

1.1.2 试剂: 限制性内切酶、Taq 酶等主要购自华美、Promega、Biolab 公司; 脂质体 lipofectin 及 1640RPMI 培养基购自 Gibco-BRL 公司; 胎牛血清购自天津川页公司; 发光测定试剂: 癸醛、FMN、NAD-FMN 氧化还原酶、β-NADH 购自 Sigma 公司。

1.1.3 PCR 引物: 细菌荧光酶 *luxA/B* 基因的 *luxA* 引物由中国科学院微生物所基因工程中心合成; *luxB* 基因引物由上海 Sangon 公司

合成。

1.1.4 质粒载体: pUC119、pcDNA₃为肿瘤所生化室保存;含哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*,) *luxA/B* 基因的重组质粒载体 pLAV1 由美国 Texas A&M 大学 T.O. Baldwin 教授惠赠。

1.1.5 细菌菌株: *E. coli* 株 XII-blue, JM109(肿瘤所生化室保存);哈维氏弧菌株 *V. h1600* 购自中国科学院微生物所菌种保藏中心。

1.1.6 细胞株: Hela 细胞为肿瘤所生化室保存。

1.2 方法

1.2.1 细菌荧光酶 *luxA* 及 *luxB* 基因 PCR 引物设计及扩增: 利用 DNA 分析软件 Clone 和 Oligo, 根据 *V. h1600* 细菌荧光酶 *luxA/B* 基因的序列^[2-3], 设计引物, *luxA* 基因上游引物 5' 端引入 BamHI 酶切位点, 序列为: 5'-AAGGATCCGTTATGAAATTTGGAAACT-3'; 下游引物 5' 端引入 EcoRV 酶切位点, 序列为: 5'-TTGATATCAGAAAATATTAAGTACTGTTTTCTTTGAGAT-3'; *luxB* 基因上游引物 5' 端引入 EcoRV 酶切位点, 序列为: 5'-GAGATATCAAATTTGGATTATTCTTCC-TC-3'; 下游引物序列为: 5'-TGGGTACCGTTACGAGTGGTATTTGACG-3'。PCR 扩增条件: 10 × 无 Mg⁺⁺ 缓冲液: 5 μL, 10 × Mg⁺⁺ 缓冲液: 5 μL, 10mmol/LdNTP: 1 μL, 5' 引物: 10 μL, 3' 引物: 10 μL, Taq 聚合酶: 2u, 模板: 4 μL(10ng), 总体积 50 μL。变性温度和时间: 93~94℃ × 50~60s, 退火温度和时间: 52~54℃ × 60s, 延伸温度和时间: 72~74℃ × 90s, 预变性: 100℃ × 8min, 循环数: 32 个周期, 最后延伸条件为 72~74℃ × 10'。

1.2.2 pcDNA₃-*luxAB* 重组质粒载体的构建: 以 pLAV1 质粒为模板, PCR 分别扩增 *luxA* 及 *luxB*, 用玻璃奶洗脱法回收 *luxA* 及 *luxB*, *luxA* 用 BamHI 和 EcoRV 双酶切, 与经同样双酶切的 pcDNA₃ 相连, 获得 pcDNA₃-*luxA*; *luxB* 经 Klenow 酶补平后, 与经 SmaI 酶切的 pUC119 相连, 筛选反向插入 *luxB* 的 pUC119-*luxB*; 最后从 pUC119-*luxB* 上用 XbaI+EcoRV 双酶切下 *luxB* 基因, 插入到经同样双酶切的 pcDNA₃-*luxA*

中, 获得 pcDNA₃-*luxAB*。

1.2.3 细胞培养: 基础培养基为: 1640 RPMI+10% 胎牛血清 +1 × PS(青霉素 100 μg/mL; 链霉素 100 μg/mL)。

1.2.4 稳定转染 Hela 细胞按照 Gibco-BRL 的 lipofectin 方案进行: 转染前 2d 以 1.25 × 10⁶ 个 Hela 细胞接种到容量为 100mL 的培养瓶中, 按 10 μg 质粒 DNA: 20 μL lipofectin 量进行转染, 48h2d 后用 G418(400 μg/mL) 筛选稳定转染克隆, 约 15d 后挑选 G418 抗性的单克隆细胞。

1.2.5 细胞总蛋白粗提物制备: 细胞满瓶后, 倒去培养液, 冰浴上用 PBS 缓冲液洗两遍, 采用液氮冻融法制备细胞总蛋白粗提物, 即在培养瓶中加入 100 μL 粗提缓冲液(100mmol/LKH₂P04, pH7.8, 1mmol/LDIT, 200 μg/mL PMSF) 用细胞刮刀刮下细胞并移入 1.5mL 的离心管中, 经液氮 37℃(20min, 15min) 2 次冻融, 4℃ 离心, 取上清进行蛋白测定。

1.2.6 质粒、细菌及细胞基因组 DNA 制备、细胞总蛋白粗提物测定以及分子生物学基本方法见参考文献^[4-5]。

1.2.7 细胞 in vitro(体外)发光测定: 在 200 μL 含 0.001%(W/V) 癸醛, FMN (4mol/L), BSA (0.2%), NAD-FMN 氧化还原酶 (5 × 10⁻⁴ u), 50mmol/L 的磷酸钾钠盐缓冲液 (pH7.0) 的测定管中, 加入细胞总蛋白粗提物 15 μL(总蛋白 40 μg), 置于发光仪上, 测定时迅速加入 100 μL 的 β-NADH(100 μmol/L) 启动反应, 记录最大发光强度值。

2 结果与讨论

2.1 pcDNA₃-*luxAB* 构建的 PCR、酶切电泳鉴定

2.1.1 PCR 扩增 *luxA* 及 *luxB*: 图 1A 电泳显示, 在 1.03kb 和 0.97kb 处分别出现单一带, 与 *luxA* 及 *luxB* 片段大小相符(用 *Vh1600* 基因组 DNA 为模板扩增的结果与其相同)。

2.1.2 构建 pcDNA₃-*luxA*: 由图 1B 可见, BamHI 单酶切 pcDNA₃-*luxA* 可见 6.4kb 的片段; 而用 BamHI 和 EcoRV 双酶切, 可切下

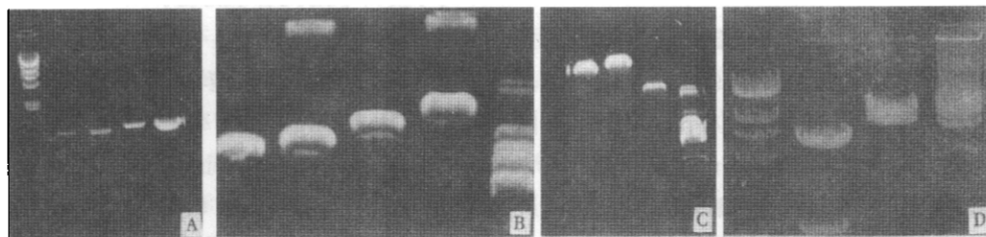


图1 pcDNA₃-luxAB构建的鉴定

A PCR扩增 luxA 和 luxB

1 luxA(模板为 pLAV1), 2 luxA(模板为 *V.h1600*),
 3 luxB(模板为 pLAV1), 4 luxB(模板为 *V.h1600*),
 5 分子量标准 / λ DNA / HindIII 单酶切

B pcDNA₃-luxA 和 pUC119-luxB 酶切鉴定

1 pcDNA₃-luxA / BamH I 单酶切, 2 pcDNA₃-luxA / EcoR V+ BamH I 双酶切, 3 pUC119-luxB / EcoR V 单酶切, 4 pUC119-luxB / EcoRV + Xba I 双酶切, 5 分子量标准 / λ DNA / Hind III 单酶切

C 重组子 PCR 鉴定

1 PCR of luxA(模板为 pcDNA₃-luxA), 2 PCR of luxB(模板为 pUC119-luxB), 3 PCR of lux AB(模板为 pcDNA₃-luxAB), 4 分子量标准 / λ DNA / HindIII 单酶切

D pcDNA₃-luxAB 酶切鉴定

1 pcDNA₃-luxAB / EcoRV 单酶切, 2 pcDNA₃-luxAB / BamH I 单酶切, 3 pcDNA₃-luxAB, 4 分子量标准 / λ DNA / Hind III 单酶切

1.03kb的 luxA 片段,以 pcDNA₃-luxA 为模板扩增 luxA,进一步佐证了构建的正确性,见图 1C.

2.1.3 构建 pUC119-luxB:用 EcoRV+XbaI 双酶切 pUC119-luxB 获得约 1.0kb 的片段 luxB, EcoRV 单酶切可见 4.2kb 的质粒线性带,见图 1B. PCR 扩增 luxB 结果同样验证之,见图 1C.

2.1.4 构建 pcDNA₃-luxAB:用 BamHI 酶切可见约 2.0kb 的 luxAB 带, EcoRV 单酶切可得 7.4kb 的质粒线性带(图 1D), PCR(图 1C)扩增 luxAB 亦证明了构建的正确性.

2.2 pcDNA₃-luxAB 在 HeLa 细胞中转染和表达

2.2.1 pcDNA₃-luxAB 在 HeLa 细胞中转染:由图 2 及细胞培养观察可见,未转染的亲本 HeLa 细胞,转染空载(只转染空载体 pcDNA₃) HeLa

细胞以及 pcDNA₃-luxAB 转染 HeLa 细胞在外观形态(贴壁特性、透明度、胞膜清晰度等)及培养条件(营养需求、抗生素等)等方面无明显差异.

2.2.2 在 DNA 水平上在稳定转染的 HeLa 细胞克隆中的检测:由图 3A, B, C 可见,以细胞基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增,亲本 HeLa 细胞及空载 HeLa 细胞电泳在约 1.03, 0.97 及 2.0kb 处无带,而稳定转染 pcDNA₃-luxAB 的 HeLa 细胞电泳在约 1.03, 0.97 及 2.0kb 处可见 luxA, luxB, luxAB 目的带.

2.2.3 各细胞 in vitro 发光检测:各细胞发光测定结果见表 1,亲本 HeLa 细胞和空载转染 HeLa 细胞的发光强度均在本底值范围,而 pcDNA₃-luxAB 转染 HeLa 细胞则远高于本底值.

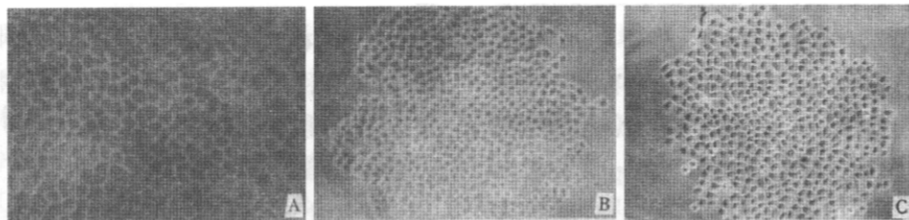


图2 转染及非转染HeLa细胞

A 亲本HeLa细胞 B pcDNA₃空载转染的HeLa细胞克隆 C pcDNA₃-luxAB转染的HeLa细胞克隆

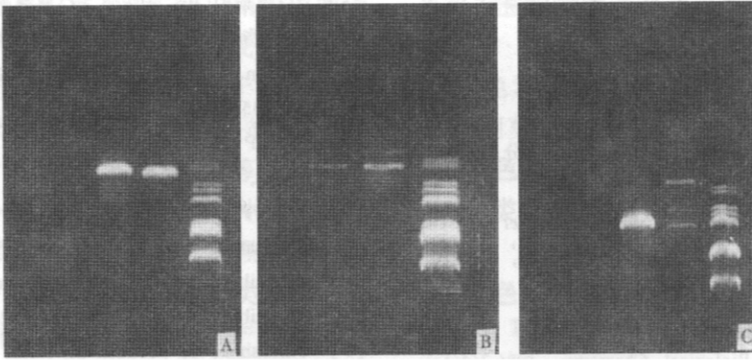


图3 pcDNA₃-*luxAB* 转染 HeLa 细胞的 *lux* 基因的 PCR 鉴定

- A PCR 扩增 *luxA*, B PCR 扩增 *luxB*, C PCR 扩增 *luxAB*
 1 模板为 HeLa 细胞基因组 DNA,
 2 模板为 pLAV1,
 3 模板为 pcDNA₃-*luxAB* 转染 HeLa 细胞的基因组 DNA,
 4 分子量标准 / λ DNA / BamHI + HindIII 双酶切

表1 稳定转染及非转染HeLa细胞的发光强度

细胞种类	HeLa细胞	空载稳定转染 的HeLa细胞	pcDNA ₃ - <i>luxAB</i> 稳 定转染的HeLa细胞
最大发光强度 (mV/40 μ g 总蛋白粗提物)	0.025	0.031	4.12

3 讨论

单顺反子的细菌荧光酶融合 *luxAB* 原核和真核细胞表达载体的构建和表达国外已有报道^[6-9], 国外已发表构建和表达的融合 *luxAB* 载体只限于原核和真核单细胞(酵母), 尚未见哺乳动物细胞表达载体构建和表达(更未见在肿瘤细胞中表达)的报道。鉴于目前广泛研究的高温型发光菌株主要为 *V. h* 和 *X. 1* (*Xenorhabdus luminescens*), 尽管 *X. 1* 比 *V. h* 的最适发光温度要高, 前者似乎更适合于在哺乳动物细胞中应用, 但 *V. h* 比 *X. 1* 的发光强度要高, 并且用 *V. h* 的 *luxA/B* 基因构建的质粒所表达的发光强度比用 *X. 1* 的 *luxA/B* 基因构建的质粒所表达的发光强度要高得多(作者观察到的结果), 故我们选用了 *V. h* 的 *luxA/B* 作为发光基因, 在不破坏 *luxA*、*luxB* 基因的读码框架的前提

下, 利用 *luxA* 与 *luxB* 之间的 29 个间隔序列碱基, 通过 PCR 点突变手段, 去除 *luxB* 基因起始密码子 ATG, 消除 *luxA* 基因的终止密码子 TAA, 使 *luxA* 基因起始密码子 ATG 前不存在其他 ATG 密码子, 确保构建的载体从 *luxA* 基因起始密码子 ATG 读码, 这样构建了融合的单顺反子 *luxAB* 于 pcDNA₃ 质粒载体中。

pcDNA₃-*luxAB* 稳定转染的 HeLa 细胞克隆的获得, 说明其在 HeLa 细胞中 G418 抗性的表达, PCR 扩增 *luxA*、*luxB* 及 *luxAB* 的成功, 显示其在 DNA 水平上的复制, (尽管由于 PCR 条件未完全优化, *luxAB* 的扩增结果产生杂带)。对细胞总蛋白粗提物的 *in vitro* 发光检测结果表明, 其不但在蛋白质(细菌荧光酶蛋白)水平上的表达, 而且表达为具一定酶活性的蛋白质(可催化细胞发光反应); 而亲本及空载稳定转染的 HeLa 细胞则在本底值范围, 这是由于 HeLa 细胞本身不含细菌荧光酶基因之故。稳定转染重组质粒的 HeLa 细胞与亲本 HeLa 细胞以及空载稳定转染的 HeLa 细胞在细胞形态及培养条件的无明显差异, 初步说明了该重组质粒稳定转染对 HeLa 细胞无不良作用。本构建和在 HeLa 细胞中的表达成功, 为细菌荧光酶作为报告基因在肿瘤细胞中的表达及在肿瘤的早期诊断研究中的应用建立了基础。

致谢 本工作得到中国医科院肿瘤所研究生周纯, 崔亚军的热忱帮助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 茆灿泉. 国外医学, 临床生物化学和检验学分册, 1998, 19(6): 241~243.
- [2] Cohn D H, Mileham A J, Simon M I *et al.* The Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(10): 6139~6146.
- [3] Johnston T C, Thompson R B, Baldwin T O *et al.* The Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(11): 4805~4811.
- [4] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南, (第二版), 北京: 科学出版社, 1989.
- [5] F. 奥斯伯, R.E 金斯顿, J.G 塞德曼等. 精编分子生物学实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 1995.
- [6] Olsson O, Escher A, Sanberg G *et al.* Gene, 1989, 81: 335~347.
- [7] Hill P J, Swift S, Stewart G S A B. Mol Gen Genet, 1991, 226: 41~48.
- [8] Hill P J, Throup J P, Stewart G S A B. International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence: Bioluminescence and Chemiluminescence, 1993, 122~126.
- [9] Almashnau S, Musafia B, Hadar R *et al.* Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, 1990, 5: 89~97.