

pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 载体的构建和初步表达鉴定

傅锐斌¹, 袁平生¹, 袁戴铁英¹, 袁文岩¹, 袁建² 第一军医大学南方医院心内科袁广东 广州 510515 曰广州军区广州总医院心内科袁广东 广州 510010 冤

摘要目的 克隆和构建带人低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)基因真核表达载体 pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 遥方法 以大肠癌细胞株 HT29 的总 RNA 为模板袁进行逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)袁获得 HIF-1 α 的 cDNA袁克隆入 T 载体袁测序证实后克隆入真核表达载体 pcDNA3.1⁺袁酶切鉴定重组子遥将构建好的 pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 用脂质体法转入 HEK293 细胞袁 RT-PCR 鉴定重组质粒的表达遥结果 扩增出 HIF-1 α cDNA 全长袁测序结果与 Genbank 记载完全一致袁成功克隆入真核表达载体 pcDNA3.1⁺建立了稳定的细胞株 HEK293/pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 遥结论 成功克隆和构建带人 HIF-1 α 基因真核表达载体 pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 袁并证明其能在真核细胞内表达遥

关键词低氧诱导因子; 逆转录-聚合酶链反应; 克隆; 分子; 真核表达载体; 质粒; 转染

中图分类号 R392.12; R394.2 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)11-1134-03

Construction and expression analysis of recombinant vector pcDNA3.1⁺-HIF-1 α

FU Rui-bin¹, WU Ping-sheng¹, DAI Tie-ying¹, LAI Wen-yan¹, QIU Jian²

¹Department of Cardiology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

²Department of Cardiology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression vector for human hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) gene and examine its expression. Methods Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on the total RNA extracted from HT29 cells to obtain the cDNA of HIF-1 α which was inserted into T vector pUC18. DNA sequencing was performed before the amplified products were cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1⁺ identified by endonuclease digestion. This recombinant vector was transfected into HEK293 cells by means of liposome and its expression examined. Results The amplified products were confirmed as the cDNA of HIF-1 α by DNA sequencing, and pcDNA3.1⁺-HIF-1 α obtained was verified by endonuclease digestion, being capable of expression in HEK293 cells. Conclusion We have successfully constructed the eukaryotic expression vector for HIF-1 α which can be expressed in HEK293 cells.

Key words: hypoxia-inducible factor; reverse transcriptase-polymerase chain reaction; cloning; molecular; eukaryotic expression vector; plasmids; transfection

低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)在调节机体或细胞对缺氧的反应中起关键作用遥HIF-1是一种转录激活因子袁由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两种亚基组成遥它通过结合下游基因的低氧反应元件使下游基因的表达增加袁从而调节细胞和机体功能遥HIF-1的下游基因包括促血管新生基因尧促红细胞生成基因尧能量代谢基因和促细胞增殖调亡基因等遥氧浓度是调节 HIF-1 α 功能的重要因素遥在正常氧的条件下袁HIF-1 α 亚基容易被蛋白酶降解袁而 β 亚基则比较稳定遥缺氧时HIF-1 α 的稳定性和活性大大增加遥本实验构建了 pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 重组载体并将其转到 HEK293 细胞内袁建立了 HEK293/pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 细胞株遥

1 材料和方法

1.1 细胞株尧菌株和质粒

HEK293 细胞由本室陈哲明医生提供袁大肠癌细胞株 HT29 由消化科崔海宏医生提供袁大肠杆菌 JM109 和 DH-5 α 及质粒 pcDNA3.1⁺由本室周忠江博士惠赠袁载体 pUC18 购自美国 Stratagene 公司遥

1.2 酶和试剂

胎牛血清为杭州四季青产品袁MEM 和 RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司袁胰酶购自上海生工生物有限公司遥总 RNA 提取试剂 TRIZOL尧ipofectin 和 G418 购自美国 Invitrogen 公司遥A RT-PCR 试剂盒尧限制性内切酶 SmaI尧pnI和 BamHI以及 T4 连接酶购自大连宝生物公司遥胶回收和质粒提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司遥

1.3 引物设计与合成

从 Genbank 检索出 HIF-1 α DNA 序列设计引物遥HIF-1 α DNA 片段上游引物 P1尧'GAAACCA CCTATGACCTGC 3'袁下游引物 P2尧'GTCGTGCTG

收稿日期 003-04-23

基金项目 国家自然科学基金 渊9870812冤 曰 广东省自然科学基金 渊80235冤

Supported by National Natural Science Foundation 渊9870812冤 of China and by Natural Science Foundation of Guangdong Province 渊80235冤

作者简介 傅锐斌 渊974-) 男 袁福建诏安人 袁第一军医大学在读硕士研究生 袁主治医师 袁电话 20-85141504 袁 e-mail: furb7@sohu.com

AATAATACCACTC 3'全长上游引物 P3 5'-TATAG GTACCATGGAGGGCGCCGGCG3'下游引物 P4 5'-GCGCGGATCCTCAGTAACTT GATCCAA 3'遥下划线处分别是 KpnI 和 BamHI 酶切位点遥内参照 茁actin 上游引物 P5 5'-AGCGGGAAATCGTGCGT GACA3'下游引物 P6 5'-GTGGACTTG GGAGAGGA CTGG 3'遥

1.4 总 RNA 的提取和 RT-PCR 法获取 HIF-1 α 基因

采用 TRIZOL 试剂按照说明书的方法从 1伊0⁶ 个大肠癌细胞 HT29 中提取总 RNA 袁琼脂糖电泳鉴定总 RNA 有无降解遥然后以引物 P3 和 P4 用 RT-PCR 方法扩增 HIF-1 α 基因全长袁4 益变性 30 s袁5 益退火 30 s袁2 益延伸 4 min袁循环 25 次袁末次循环后 72 益再延长 5 min遥参照 LA RT-PCR 试剂盒说明书遥

1.5 T 载体的制备及 TA 克隆

pUC18 用 SmaI 酶切袁8% 琼脂糖凝胶电泳袁取线性片段袁回收纯化试剂盒纯化遥在 50 滋反应体系中袁含 dTTP 2 滋mol/L袁ap DNA 多聚酶 2.5 U袁线性质粒模板 1 滋袁2 益 3 h袁电泳回收纯化遥20 滋的连接反应体系中分别加入 10伊连接 Buffer 2 滋袁纯化的 PCR 产物 10 滋袁载体 5 滋袁4 DNA 连接酶 2 U袁12~16 益 16 h遥连接产物转化 JM109 菌株遥酶切尧克隆尧阳性重组子鉴定的具体方法见参考文献响馨

1.6 DNA 序列测定

由大连宝生物公司完成遥采用双脱氧链末端中止法袁以 DNA 全自动测序仪测定核苷酸序列袁同一片段经正反两个方向重复测定遥

1.7 pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 真核表达载体的构建及鉴定

pUC18-HIF-1 α 质粒经 KpnI 和 BamHI 双酶切袁获得 HIF-1 α DNA 全长袁插入到 pcDNA3.1⁺的 KpnI 和 BamHI 酶切位点袁获得重组质粒 pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 遥酶切鉴定得到含 HIF-1 α 的表达载体 pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 遥酶切尧克隆尧阳性重组子鉴定的具体方法见参考文献响馨

1.8 基因转染

在 6 孔培养板的每一孔内接种 1.5 ml 含 6伊0⁵ 个细胞的培养液袁7 益 5% CO₂ 温箱培养约 24 h袁至 80%~90% 汇合时袁用无血清 DMEM 培养基漂洗细胞 2 次遥每孔加入 Lipofectin-pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 复合液 2 ml遥每孔的转染液中含 2 滋 DNA 和 10 滋 Lipofectin袁转染时间 5 h遥吸除无血清转染液袁换入含 10% 胎牛血清培养液继续培养 48 h袁然后按 1 颐的比例传代遥用含 800 mg/ml G418 的培养液进行筛选遥当未进行转染的细胞大部分死亡时渊~5 d冤再更换 1 次培养液遥 14 d 左右未进行转染的细胞均死亡袁转染的细胞孔内有抗性的克隆团出现袁待其增大后再转入另

瓶增殖袁传代尧留种遥

1.9 RT-PCR 法检测重组质粒表达

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基将细胞培养至 80% 的密度袁RIZOL 试剂提取总 RNA袁取 1 滋作 RT-PCR 遥引物用 HIF-1 α cDNA 片段引物 P1 尧 P2 和内参照 茁actin 引物 P5 尧 P6 遥热循环条件是 94 益变性 30 s袁4 益退火 30 s袁2 益延伸 1 min袁循环 25 次遥反应结束后取 3 滋 反应产物行琼脂糖凝胶电泳遥

2 结果

2.1 HIF-1 α cDNA 的扩增尧克隆及鉴定

通过 RT-PCR 方法从 HT29 细胞株的总 RNA 扩增出一条 2 500 bp 左右的 DNA 片段渊图 1冤袁将其与 pUC18 T 载体连接袁转化 JM109 菌袁扩增袁提出质粒进行 DNA 测序袁所得序列与 Genbank 记载的 HIF-1 α cDNA 序列完全一致遥

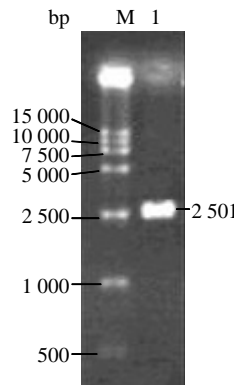


图 1 RT-PCR 扩增产物的鉴定
Fig.1 Analysis of RT-PCR amplification product
M: Marker (DNA Marker DL15000);
Lane 1: RT-PCR product

2.2 重组真核表达质粒 pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 的鉴定

用 KpnI 和 BamHI 分别单酶切重组质粒袁得到线性质粒 8 kb 袁与重组质粒大小一致袁用这两个酶双酶切袁得到线性质粒和 HIF-1 α 片段袁大小为 5.4 和 2.5 kb 袁与空质粒和 HIF-1 α cDNA 大小一致渊图 2冤遥

2.3 RT-PCR 检测重组质粒表达

用 RT-PCR 方法扩增细胞中的 HIF-1 α 和 茁actin 片段袁电泳结果渊图 3冤可见 HEK293/pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 细胞组 HIF-1 α 条带比对照组的 D 渊值和相对 D 渊值明显大于对照组细胞袁说明所构建载体能在转染细胞中转录遥

3 讨论

评价 HIF-1 α 的功能袁首先须将 HIF-1 α 的基因编码区全长克隆到合适的载体上遥我们采用 RT-PCR 方法袁用高保真的 LA Taq 酶将基因的全长扩出袁然后用 TA 克隆的方法袁成功将基因的 cDNA 克隆到 T 载体 pUC18 上袁测序证实后用双酶切法又将其克隆到真核表达载体 pcDNA3.1⁺上袁并转染到 HEK293 细胞

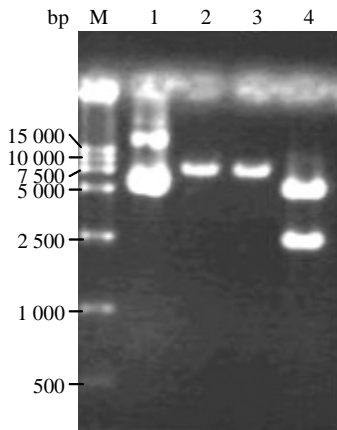


图 2 重组表达载体 pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢的鉴定
Fig.2 Identification of the recombinant expression plasmid pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢

M: Marker; Lane 1: pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢 Lane 2: pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢Kpn玉; Lane 3: pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢BamH玉; Lane 4: pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢Kpn玉+BamH玉

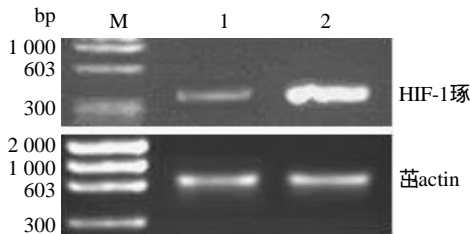


图 3 RT-PCR 扩增 HEK293/pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢细胞中 HIF-1 琢基因片段
Fig.3 Fragment of HIF-1 琢cDNA amplified by RT-PCR

M: Marker (DNA marker DL2000); Lane 1: HEK293; Lane 2: HEK293/pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢

内袁构建了 HEK293/pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢细胞株遥

心肌缺血时 HIF-1 琢和血管内皮生长因子 VEGF 表达增加遥 VEGF 是 HIF-1 琢的下游基因遥 Drake 报告袁在 VEGF 单独刺激下袁管血管网密度增加袁新生的血管出现通透性增加和畸形遥 Elson 等证实了 HIF-1 琢可诱导小鼠生成具有生理功能的新生血管遥已经发现袁多种细胞因子或药物袁 TNF 尧 IL-1 尧 N 尧 胰岛素尧 内皮素 -1 和血管紧张素域等能够促进 HIF-1 琢在体内外的表达或转录激活功能遥 2-15 遥 研究显示袁通过用巨核细胞来源的多肽 PR39 可以抑制 HIF-1 琢的降解袁引起心脏血管的新生遥

我们成功地构建了重组载体 pcDNA3.1⁺-HIF-1 琢遥初步结果显示袁转染到 HEK293 细胞后袁载体可以在细胞内表达袁在血管紧张素域的刺激下袁蛋白表达量比对照明显增多遥至于转染该基因对细胞生长的影响袁对 VEGF 尧 促红细胞生成素和葡萄糖分解酶类等 HIF-1 琢下游基因表达的影响及能否在体内引起血管新生等问题袁有待进一步研究遥

参考文献院

咱暂 Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor 咱暂 Genes Dev, 2000, 14(16): 1983-91.

咱暂 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension 咱暂 Proc Natl Acad Sci, 1995, 92(6): 5510-4.

咱暂 Piret J, Mottet D, Raes M, et al. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein 咱暂 Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6): 889.

咱暂 Iyer NV, Kotch LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha 咱暂 Genes Dev, 1998, 12(2): 149-62.

咱暂 Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF 咱暂 Science, 2001, 294(5545): 1337-40.

咱暂 Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch 咱暂 Science, 2002, 295(5556): 858-61.

咱暂 Semenza GL, Rue EA, Iyer NV, et al. Assignment of the hypoxia-inducible factor 1alpha gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q 咱暂 Genomics, 1996, 34(3): 437-9.

咱暂 Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T, et al. Molecular cloning. A laboratory manual 咱暂 New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 16-69.

咱暂 Schultz A, Lavie L, Hochberg I, et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: Significance for the development of the coronary artery collateral circulation 咱暂 Circulation, 1999, 100(5): 547-52.

咱暂 Drake CJ, Little CD. Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization 咱暂 Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92 (17): 7657-61.

咱暂 Elson DA, Thurston G, Huang LE, et al. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha 咱暂 Genes Dev, 2001, 15(19): 2520-32.

咱暂 Scharte M, Han X, Bertges DJ, et al. Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes 咱暂 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284 (3): G373-84.

咱暂 Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzgen E, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 咱暂 Blood, 1999, 94(5): 1561-7.

咱暂 Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, et al. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway 咱暂 J Biol Chem, 2002, 277(31): 27975-81.

咱暂 Spinella F, Rosan L, Di Castro V, et al. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 in ovarian carcinoma cells 咱暂 J Biol Chem, 2002, 277 (31): 27850-5.

咱暂 Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis 咱暂 Nat Med, 2000, 6(1): 49-55.