

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)09-0769-04

人 DDR2 基因 pShuttle-CMV 穿梭载体的构建及表达

任婷婷, 刘新平, 车红磊, 张健, 张璟, 李霞, 苏金

(第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710033)

Construction of pShuttle-CMV vector of human DDR2 gene and its expression

REN Ting-Ting, LIU Xin-Ping, CHE Hong-Lei, ZHANG Jian, ZHANG Jing, LI Xia, SU Jin

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct the pShuttle-CMV vector of human DDR2 with flag tag, to test its expression in human embryonic kidney cells and to observe the subcellular distribution of DDR2. **METHODS:** DDR2-C gene tagged with 24 bp flag was amplified by PCR using plasmid encoding human DDR2 as templates, and then digested by *Nco*I/*Eco*R V, subcloned into the pMD18-T vector which contained the full length DDR2 gene, for replacing the original C-terminal. After splicing and sequencing in T vector, the new full length DDR2 with flag tag was then subcloned into pShuttle-CMV. The recombinant vector was then transfected into HEK293 cells with Lipofectamine and its expression was detected by Western Blot. The subcellular distribution of DDR2 in cultured HeLa cells was studied by confocal microscopy. **RESULTS:** The eukaryotic expression vector pShuttle-CMV encoding DDR2 was constructed and identified by the digestion of restriction enzymes. It expressed in HEK293 cells and could be detected by Western Blot after transfection using Lipofectamine. After the experiment of indirect immunofluorescence, green fluorescent signals were detected mainly in the cytoplasm and plasma membrane of HeLa cells by confocal microscopy. **CONCLUSION:** The eukaryotic expression vector encoding DDR2 has been constructed and it can express DDR2-flag fused protein correctly in HEK-293 cells. DDR2 mainly distributes in the cytoplasm and plasma membrane.

【Keywords】 DDR2; polymerase chain reaction; molecular cloning; gene expression; immunofluorescence

【摘要】目的: 构建带有 flag 标签的人 DDR2 pShuttle-CMV 载体, 检测其真核表达并观察 DDR2 分子的亚细胞分布。方法: 以含有人全长 DDR2 cDNA 的质粒为模板, 用 PCR 方法扩增 DDR2 基因的 C-端(DDR2-C), 并在其 C 末端带上含 24 bp 的 flag 标签, *Nco*I/*Eco*R V 酶切后亚克隆入含有 DDR2 全长序列的 pMD18-T 载体, 即替换掉原有 DDR2 序列的 C-端, 引入 flag 标签, 测序正确后再克隆入 pShuttle-CMV 表达载体, 酶切鉴定正确后采用脂质体法瞬时转染 HEK293 细胞, Western Blot 检测 DDR2-flag 在细胞中的表达。瞬时转染 HeLa 细胞, 通过间接免疫荧光法观察 DDR2 分子在细胞内的分布情况。结果: 测序及酶切显示 DDR2-flag/pShuttle-CMV 载体构建符合预期, 脂质体法转染 HEK293 细胞 24 h 后用 Western Blot 方法检测到目的蛋白的表达, 对转染了目的载体的细胞应用 FITC 标记的抗体进行间接免疫荧光实验, 激光共聚焦显微镜观察到 DDR2 分子主要分布于细胞质与细胞膜。结论: 成功构建并表达了 C-末端带 flag 标签的 DDR2 真核表达载体, 使其在真核细胞中表达, 并观察到其亚细胞分布。

【关键词】 DDR2; 聚合酶链式反应; 分子克隆; 基因表达; 免疫荧光

【中图分类号】R349.82

【文献标识码】A

0 引言

盘状结构域受体 2 (discoidin domain receptor 2, DDR2) 属于一种受体型蛋白酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTKs), 可被天然纤维型胶原活化, 从而介导基质金属蛋白酶 (MMP-1, MMP-8, MMP-13) 的表达^[1-2]。DDR2 在类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 成纤维样滑膜细胞中呈高表达状态, 并具有较高的磷酸化水平, 而其所活化的下游分子中, 特别是 MMP-13 对关节软骨的主要成分 II 型胶原的降解能力高于其他胶原酶, 因此认为“II 型胶原-DDR2-MMPs”通路中的关键分子可能成为减轻 RA 关节软骨破坏的药物作用靶位^[3]。然而目前有关此通路的研究报道甚少, 我们构建 C-末端融合 flag 标签的人 DDR2 基因真核表达载体, 旨在为进一步研究 DDR2 信号通路在 RA 中的影响奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌菌株 XL-10, pcDNA3.1(+)真

收稿日期 2006-12-05; 接受日期 2007-01-24

基金项目 国家自然科学基金 (30300319)

通讯作者 苏金. Tel (029) 84774516 Email sujin@fmmu.edu.cn

作者简介: 任婷婷, 硕士生 (导师刘新平, 药立波). Tel: (029)

84774516 Ext. 11 Email rtt419@Yahoo.com.cn

核表达载体,含人全长 DDR2 cDNA 的质粒,HEK293 细胞及 HeLa 细胞由第四军医大学生物化学与分子生物学教研室保存。dNTP,dATP,pfu 高保真聚合酶,Taq DNA 聚合酶,各种限制性内切酶,pMD18-T 载体,T4 DNA 连接酶,DL2000 DNA marker(日本 TaKaRa 公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);抗 flag M2 mAb(美国 Sigma 公司);抗 DDR2 抗体及 FITC 标记的羊抗鼠第二抗体(美国 Santa Cruz 公司);Western Blot 所用发光底物(美国 Pierce 公司),其他试剂均为国产分析纯。用于 PCR 反应的引物由北京三博远志生物公司合成,质粒提取和 DNA 回收试剂盒由安徽优晶生物工程公司提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 DDR2-C 上游引物序列 5'-GTC A CC ATG G AC CTG CTC TCA GG-3',其中 CCA TGG 为位于 DDR2 序列 1631 bp 处的 *Nco* I 酶切位点;下游引物序列:5'-GAA TTC GAT ATC TCA CTT GTC ATC ATC GTC CTT GTA ATC CTC GTC GCC TTG TTG AAG GA-3',GAA TTC 为 *Eco*R I 酶切位点,GAT ATC 为 *Eco*R V 酶切位点,其中前者可用于将 DDR2-C(含 flag)的 PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体,后者用于将带有 flag 标签的 DDR2 全长序列亚克隆入 pShuttle-CMV 载体,下划双线部分为编码 flag 标签的核苷酸序列。

1.2.2 PCR 扩增 DDR2-C(含 flag)基因及产物修饰 扩增条件为 94℃ 5 min,94℃ 40 s,55℃ 40 s,72℃ 1 min,30 个循环。产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行分离,回收后进行加'A'反应 72℃ 40 min。

1.2.3 PCR 产物克隆及序列测定 加'A'后的 PCR 产物回收,克隆到 pMD-18T 载体,转化大肠杆菌 XL-10 感受态细胞,挑选阳性克隆进行酶切鉴定并测序。

1.2.4 DDR2 全序列拼接及鉴定 用 *Nco* I/*Eco*R I 双酶切 DDR2-C/pMD-18T,得到含 flag 的 DDR2C-端,置换出 pMD18-T 载体中不含 flag 标签的 DDR2 C-端,并进行酶切鉴定,即在 pMD18-T 载体中完成含有 flag 的新 DDR2 全长序列的拼接。

1.2.5 真核表达载体的构建 用 *Hind* III/*Eco*R V/*Sca* I 三酶切含有拼接 DDR2 序列的 pMD18-T 载体,其中 *Hind* III/*Eco*R V 可切下完整的 DDR2 序列(2568 bp),*Sca* I 将余下的 pMD18-T 载体(2692 bp)切割为两个小片段(924 bp + 1768 bp),便于电泳分离。

1.2.6 基因转染 HEK293 细胞在含 100 mL/L 新生小牛血清的 DMEM 培养基中,于 37℃,50 mL/L

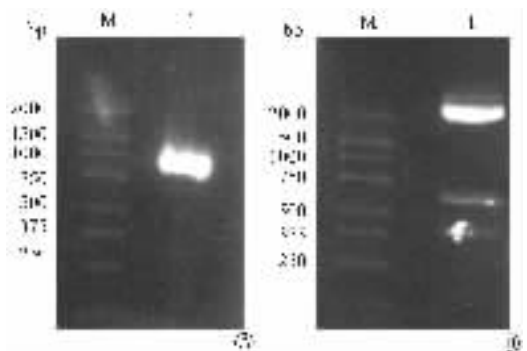
CO₂ 饱和湿度下培养,80% 汇合时按照 Lipofectamine2000 说明书进行空质粒和重组表达质粒的转染。

1.2.7 Western Blot 检测转染后细胞中目的基因的表达 转染后 24 h 裂解细胞收集总蛋白,取 20 μg 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 NC 膜,5 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,与适当稀释后的一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,与 1:4000 稀释的 FITC 标记的二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜后加入发光底物孵育 1 min X 光片曝光 显影 定影。

1.2.8 间接免疫荧光观察 DDR2 亚细胞定位 HeLa 细胞在含 100 mL/L 新生小牛血清的 DMEM 培养基中,于 37℃,50 mL/L CO₂ 饱和湿度下培养 80% 汇合时按照 Lipofectamine2000 说明书进行空质粒和重组表达质粒的转染,于转染 24 h 后收细胞 40 mL/L 多聚甲醛 4℃ 固定 15 min,10 mL/L TritonX-100 室温孵育 10 min,用含 10 mL/L BSA 的一抗(1:100 稀释)4℃ 过夜,FITC 标记的二抗(1:100 稀释)室温孵育 2 h,核染料 PI 37℃ 孵育 5 min,甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 DDR2-C(含 flag)片段的扩增、克隆及序列分析 DDR2-C(含 flag)的 PCR 产物为 937 bp 的特异性条带(图 1A)。测序结果经 Blast 分析表明,PCR 扩增获得并克隆的 DDR2-C 片段序列完全正确。通过位于片段内的 *Bam*H I 与 T 载体多克隆位点处的 *Hind* III 进行双酶切,可切出预期大小的片段,分别为 343 594 2692 bp 的三条带(图 1B)。

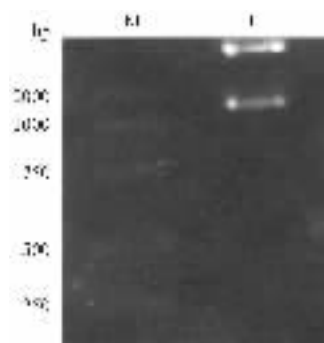


A M: DL2000 marker; 1: DDR2-C(含 flag) PCR 片段。B M: DL2000 marker; 1: 克隆入 pMD18 载体的 DDR2-C(含 flag)片段经 *Bam*H I,*Hind* III 双酶切。

图 1 PCR 产物及重组载体的鉴定

2.2 DDR2 全长片段的拼接 拼接后的 DDR2flag/PMD18-T 用 *Nco* I/*Eco*R V 酶切,可见切出 937 bp 的

目的片段(图2)。



M: DL2000 marker; 1: DDR2flag/PMD18-T *Nco* I/*Eco*R 双酶切结果。

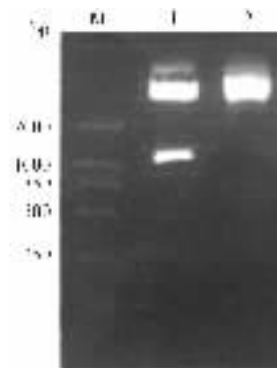
图2 DDR2flag/PMD18-T 重组质粒的酶切鉴定

2.3 DDR2flag/pShuttle-CMV 真核表达载体的构建 拼接成功后的 DDR2flag 片段经 *Hind* III/*Eco*R V 双酶切,回收 2592 bp 的片段连入真核载体 pShuttle-CMV,用 DDR2 序列内部的两个 *Bam*H I 酶切位点鉴定,构建成功可见切出 1029 bp 的目的片段,反之则没有(图3)。

2.4 真核表达载体 DDR2flag/pShuttle-CMV 在 HEK293 细胞中的表达 构建成功的 DDR2flag/pShuttle-CMV 和空质粒 pShuttle-CMV 分别瞬时转染 HEK293 细胞,转染后 24 h 用抗 flag 抗体检测 DDR2flag 在蛋白水平的表达,而对照的空质粒转染后则没有相应的条带(图4)。

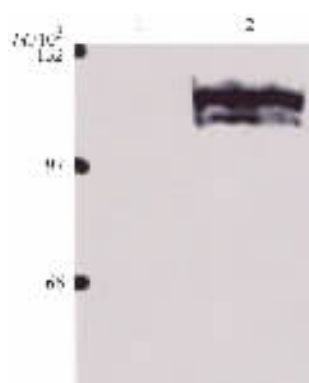
2.5 DDR2 的亚细胞定位 将构建的重组表达载体 DDR2flag/pShuttle-CMV 瞬时转染 HeLa 细胞,激光共

聚焦显微镜可观察到作为膜受体的 DDR2 分子主要分布于胞膜及胞质近膜处,也发现其存在少量胞核分布(图5)。



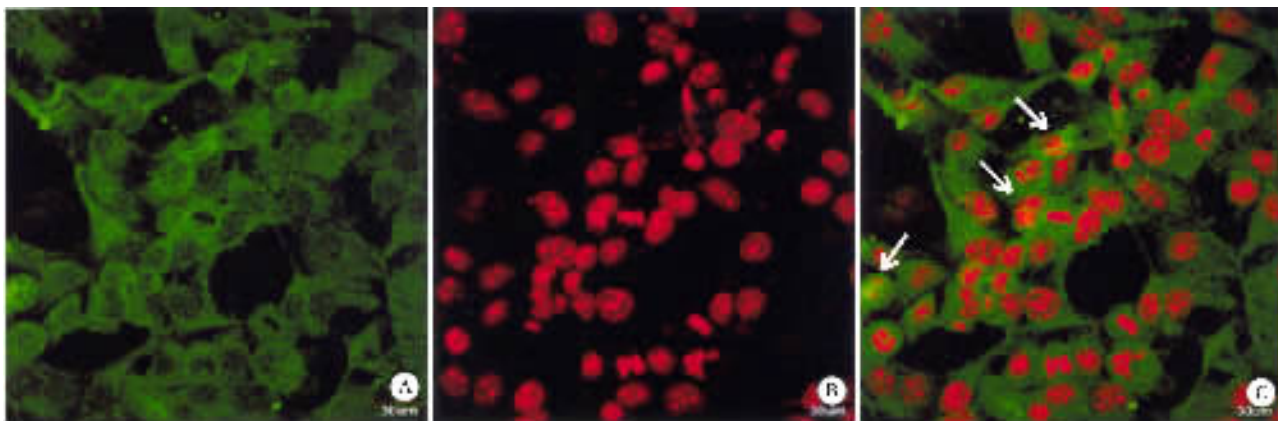
M: DL2000 marker; 1~2: DDR2flag/pShuttle-CMV *Bam*H I 酶切结果。

图3 DDR2flag/pShuttle-CMV 重组质粒的酶切鉴定



1: 阴性对照(空载体); 2: 293 细胞瞬时转染 DDR2flag/pShuttle-CMV 24 h 后蛋白电泳结果(anti-flag)。

图4 Western Blot 检测 DDR2flag 在 HEK293 细胞中的表达



A 应用 flag-抗和 FITC 标记二抗进行 DDR2flag 免疫荧光染色(绿色); B 应用 PI 进行 DNA 染色(红色); C: A 与 B 叠加图。箭头所示为 DDR2 可能存在的胞核分布。

图5 DDR2-flag 免疫荧光在 HeLa 细胞内的亚细胞分布

3 讨论

由于 DDR2 是 RA 病理进程中的关键分子,因此对其所进行的研究,无论是体内还是体外水平,都需

要高表达且易于检测的工具载体。我们构建的 DDR2flag/pShuttle-CMV 载体与以往工具载体的不同在于:一方面,它是腺病毒包装的穿梭载体,可用于

DDR2 相关腺病毒的包装,无论在 RA 滑膜细胞还是动物模型中都能达到一般真核表达载体所不具备的高转染/感染效率;同时其所携带的 flag 标签也大大提高了目的基因的检测灵敏性和特异性。

有研究发现^[4-5],DDR1 在胶原刺激下与 Src 结合后发生自身磷酸化,继而被基质金属蛋白酶水解为氨基端外功能区及酪氨酸磷酸化的胞内羧基残段(CTF),目前推测被剪切掉的胞外功能区可能有着竞争结合并中止胶原配体持续发挥作用的负反馈功能,但同属盘状结构域受体家族的 DDR2 存在此现象的文献报道尚少。有趣的是,我们在观察 DDR2 亚细胞定位时发现其存在少量胞核分布(图 5C 箭头所示),这提示,DDR2 很可能与 DDR1 一样有着类似的限制性蛋白水解现象,这也预示着 DDR2 除具有膜受体功能外,在信号转导过程中可能还具有更为复杂的作用。

我们以含有人 DDR2 全长 cDNA 的质粒为模板,通过 PCR 法获得了 C-末端融合有 flag 标签的人 DDR2 基因,并构建了 DDR2-flag 基因的真核表达载体,该表达载体在真核细胞 HEK293 中能够正确表

达定位,这为进一步研究 DDR2 功能奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Olasso E, Labrador JP, Wang L, et al. Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 3606-3613.
- [2] Xu L, Peng H, Wu D, et al. Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice [J]. *J Biol Chem* 2005, 280(1): 548-555.
- [3] Wang J, Lu H, Liu X, et al. Functional analysis of discoidin domain receptor 2 in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis [J]. *J Autoimmun* 2002, 19(3): 161-168.
- [4] Slack BE, Siniaia MS, Blusztajn JK. Collagen type I selectively activates ectodomain shedding of the discoidin domain receptor 1: Involvement of Src tyrosine kinase [J]. *Cell Biochem*, 2006, 98(3): 672-684.
- [5] Ebinu JO, Yankner BA. A RIP tide in neuronal signal transduction [J]. *Neuron*, 2002, 34: 499-502.

编辑 杨湘华

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)09-0772-01

肝性脑病的早期临床观察及护理 38 例

姚茹¹, 商玉兰², 肖莉¹, 刘蕊¹

(¹ 解放军第 451 医院空勤科, 陕西 西安 710054; ² 解放军空军总医院急诊科, 北京 100036)

【关键词】肝性脑病, 临床观察, 护理

【中图分类号】R575.3 【文献标识码】B

1 临床资料 收集 2003-05/2005-12 我院收治的各种病因的肝硬化患者 160 例, 随机抽取肝硬化 38(男 30, 女 8)例, 平均年龄 43.6(38~65)岁, 平均病程 6.8(2~20)a。平均发生肝性脑病 8.5(6~12)次。首先针对此类患者进行肝性脑病风险性预测, 包括上消化道出血、感染、电解质紊乱及酸碱平衡失调和精神意外打击。其次进行早期症状观察及护理, 并根据护理中发现问题, 调整治疗护理方案。在 38 例患者中, 18 例由于消化道出血引发肝性脑病, 其中 12 例经止血、排出体内积血后病情得到控制, 9 例酸碱失调的患者在给予积极修正后早期症状得到明显改善, 6 例患者由于过食蛋白质而引发肝性脑病, 经限制蛋白质摄入量、静点精氨酸和六合氨基酸病情得到改善, 5 例患者由于腹腔感染而出现淡漠、抑郁、计算力减退, 及时给予抗感染治疗后得到改善。

2 讨论 肝性脑病是严重肝病引起的以代谢紊乱为基础的

中枢神经系统功能失调的综合征。失代偿期肝硬化患者极易发生肝性脑病, 若抢救和护理不及时, 就会致生命危险, 早期症状的观察和护理极为重要^[1]。该结果提示预见性护理在肝性脑病的预防中具有积极意义。护理内容包括: ① 肝性脑病的前驱症状观察, 多数肝硬化患者发生肝性脑病前有性格改变及行为异常的表现, 如激动、沉默寡言、定向力和理解力减退等。护士必须经常巡视病房, 尤其在夜间^[2], 应采取与患者交谈的方式询问如年龄及 10 以内的加减法, 如果患者回答问题时出现错误应考虑肝性脑病的前期。② 保持大便通畅, 清洁肠道。及时排出肠内积血, 最好的方法是口服乳果糖, 以使大便保持在 2~3 次/日为好, 或用生理盐水或弱酸洗肠。③ 控制蛋白质的摄入。每日 40 g 以下, 鼓励患者多食蔬菜及豆制品。④ 给予高热量饮食维持正氮平衡。应保证每日热量供应在 5020~6694 kJ。⑤ 维持电解质平衡, 准确记录 24 h 液体出入量, 每日测体质量、腹围 1 次, 控制输液量应少于 2500 mL/d。⑥ 密切观察感染征象, 严格无菌操作, 加强病房管理, 减少探视, 避免交叉感染。⑦ 加强安全防护。对躁动不安的患者应去除病房内一切不安全因素, 必要时加床档或约束带。慎用安眠药以免诱发或加重肝性脑病。但肝性脑病的早期症状与患者因病产生的烦躁、抑郁不易辨别, 造成病情加重。对 1~2 期患者的性格改善和行为异常, 应予重视并严密观察, 协助医师及早诊断, 及时处理以控制病情恶化。

【参考文献】

- [1] 张传莲. 肝性脑病早期患者的临床观察及护理 [J]. *齐鲁护理杂志* 2003, 9(4): 257-258.
- [2] 宋亚妹. 肝性脑病早期预防及护理 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2000, 9(11): 1066.

编辑 王睿

收稿日期 2007-01-09; 接受日期 2007-01-22

作者简介 姚茹, 本科, 主管护师, 护士长。Tel (029) 84734096