

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)24-2209-03

人 *cbl* 基因真核表达载体的构建及表达李霞¹, 张璟¹, 苏金¹, 王立峰¹, 刘新平¹, 刘云才², 药立波¹ (¹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, ²美国 La Jolla 变态反应与免疫学研究所 California 92121, USA)Construction of eukaryotic expressing vector of human *cbl* gene and its expressionLI Xia¹, ZHANG Jing¹, SU Jin¹, WANG Li-Feng¹, LIU Xin-Ping¹, LIU Yun-Cai², YAO Li-Bo¹¹Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China ²La Jolla Institute for Allergy & Immunology, San Diego, California 92121, USA

【Abstract】 AIM: To construct the eukaryotic expressing vector of human *cbl* and test its expression in African green monkey kidney cell line COS-7. METHODS: Human *cbl* gene tagged with flag was amplified from pEFHAcbl plasmid by PCR. The product was cloned into pGEM-T easy, sequenced and then subcloned into eukaryotic expressing vector pcDNA3.1(+). The recombinant vector was then transfected into COS-7 cells with lipofectin and the expression of *cbl* gene was detected by Western blot. RESULTS: The eukaryotic expressing vector encoding human *cbl* was successfully constructed and its expression in COS-7 cells could be detected. CONCLUSION: The eukaryotic expressing vector encoding human *cbl* is constructed and it expresses flag-*cbl* fused protein correctly in COS-7 cells.

【Keywords】 *cbl*; polymerase chain reaction; cloning; molecular; gene expression

【摘要】目的:构建带有 flag 标签的人 *cbl* 基因真核表达载体,并检测其在真核细胞中的表达。方法:以含有人全长 *cbl* cDNA 的质粒 pEFHAcbl 为模板,采用 PCR 方法扩增 *cbl* 基因,并在其 N-末端带上含 24 bp 的 flag 标签,克隆到 pGEM-T easy 载体并测序,再亚克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(+),酶切鉴定正确后采用脂质体法瞬时转染 COS-7 细胞,Western blot 检测 flag-*cbl* 在细胞中的表达。结果:测序证实以 pEFHAcbl

收稿日期 2004-08-24; 修回日期 2004-10-20

基金项目 国家杰出青年科学基金 B 类(30228012)

通讯作者 药立波. Tel.(029)83374516

作者简介 李霞(1973-),女(汉族),陕西省府谷县人,博士生(导师药立波). Tel.(029)83374516 Ext.17 Email. lixia7305@yahoo.com.cn

为模板获得的 flag-*cbl* 融合基因的序列以及读框全部正确,重组质粒 pcDNA3.1(+)-flag-*cbl* 经酶切后产生与理论预期长度相符的片段,脂质体法转染 COS-7 后检测到预期目的蛋白的表达。结论:成功构建了 N-末端带 flag 标签的 *cbl* 真核表达载体,并使其在真核细胞 COS-7 中表达。

【关键词】 *cbl*; 聚合酶链反应; 克隆; 分子; 基因表达

【中图分类号】 Q71 **【文献标识码】** A

0 引言

Cbl (casitas B-lineage lymphoma, 简称 Cbl) 是一类广泛分布的细胞内蛋白,在哺乳类中有 Cbl、Cbl-b 和 Cbl-3 3 种。Cbl 分子中含有多个不同的结构域,可以介导与不同的细胞内分子结合,在细胞活化过程中可作为接头分子或支架分子参与信号转导,同时该分子中的 RING 结构域能够与泛素结合酶 E2 结合,作为泛素连接酶 E3 促进其结合的靶分子发生泛素化-蛋白酶体降解,因此参与细胞内信号转导的负调控机制^[1]。近年来的研究表明,突变的 Cbl 可成为癌基因^[2],而许多肿瘤细胞内与增殖有关的分子(如受体型蛋白酪氨酸激酶, RTK)发生突变后则不再受 Cbl 的负调控^[3]。我们成功构建了 N-末端融合有 flag 标签的 *cbl* 基因的真核表达载体,并采用脂质体法转染培养的 COS-7 细胞,检测其是否正确表达,为进一步研究 *cbl* 对肿瘤细胞生长的影响奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌菌株 DH5 α 、pcDNA3.1(+), 真核表达载体、COS-7 细胞由本室保存;含人全长 *cbl* cDNA 的质粒由美国 La Jolla 变态反应与免疫学研究所保存;pGEM-T easy 购自 Promega 公司;dNTP、dATP、pyrobest 高保真聚合酶、各种限制性内切酶、T4 连接酶、DL2000 DNA Marker 购自 Takara 公司;1640 培养基购自 Gibico 公司,LipofectamineTM2000 购自 invitrogen 公司,抗 flag M2 mAb 和抗 ACTIN 抗体、HRP 标记的羊抗鼠、兔第二抗体分别购自 Sigma 公司和博士德公司;Western blot 所用发光底物为 pierce 公司产品,用于 PCR 反应的引物由上海生物工程公司合成,质粒提取和 DNA 回收试剂盒由杭州维特洁公司提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 上游引物序列: 5'-GGT ACC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG ATG GCC GGC AAC GTG AAG AAG AGC-3', 其中 GGT ACC 为 *Kpn*I 酶切位点. 下划线部分为编码 flag 标签的核苷酸序列; 下游引物序列: 5'-CTC GAG CTA GGT AGC TAC ATG GGC AGG AGA AGA AAT GG-3', 其中 CTC GAG 为 *Xho*I 酶切位点.

1.2.2 PCR 扩增 flag-*cbl* 基因及产物修饰 在 25 反应体系中加入 2.5 μ L 10 \times 反应缓冲液, 2.0 μ L dNTP, pEFHA*cbl* 质粒模板 1.0 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, pyrobest 高保真酶 0.25 μ L, 补水至 25 μ L. 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min 35 cycles. 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 回收后溶于 35 μ L 去离子水中, 并进行加 "A" 反应: 50 μ L 反应体系中加入 5 μ L 10 \times 反应缓冲液, 4 μ L dATP, 3 μ L MgCl₂, 扩增产物 30 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 补水至 50 μ L, 72 $^{\circ}$ C 40 min.

1.2.3 PCR 产物克隆及序列测定 上述加 "A" 后的 PCR 产物回收, 回收片段克隆到 pGEM-T easy 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆进行酶切鉴定及测序.

1.2.4 pcDNA3.1(+)-flag-*cbl* 真核表达载体的构建 用 *Bgl*I 先将 pGEM-T easy 酶切成小片段, 因 flag-*cbl* 内部无 *Bgl*I 酶切位点, 故包含在酶切后产生的最大片段内, 将该片段回收后再用 *Kpn*I/*Xho*I 将 flag-*cbl* 切出, 插入 pcDNA3.1(+)-真核表达载体中, 构建出重组表达载体 pcDNA3.1(+)-flag-*cbl*.

1.2.5 基因转染 COS-7 细胞在含 100 mL/L 新生小牛血清的 1640 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 饱和湿度下培养, 80% 汇合时按照 LipofectamineTM 2000 说明书进行空质粒和重组表达质粒的转染.

1.2.6 Western blot 检测转染后细胞中转入基因的表达 分别于转染后 24, 48 h 收细胞并裂解细胞内总蛋白, 取 20 μ g 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 NC 膜, 5 g/L 脱脂奶封闭 1 h, 分别与适当稀释后的一抗孵育 1 h, PBST 洗膜, 然后与 1:4000 二抗孵育 1 h, PBST 洗膜后加入发光底物孵育 1 min, 暗室中用 X 光片曝光, 显影, 定影.

2 结果

2.1 人 *cbl* 基因的克隆及序列测定 用 PCR 技术以 pEFHA*cbl* 质粒为模板扩增得到 2737 bp 片段 (Fig 1), 加 "A" 后克隆到 pGEM-T easy 载体中, *Eco*RI/*Xho*I 酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳显示切出大小为

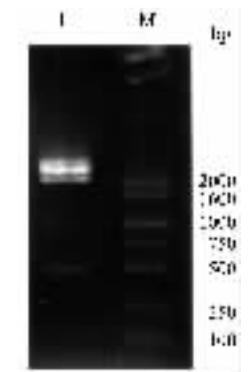
450、1190 和 3000 bp 的几种片段 (Fig 2), 表明系阳性克隆, 测序结果表明, 所克隆的人 *cbl* 基因序列以及 flag-*cbl* 融合基因的读框完全正确.



1: PCR product of flag-*cbl* (2737 bp) M: Marker.

Fig 1 PCR analysis of flag-human *cbl*

图 1 人 *cbl* 基因 PCR 扩增产物的鉴定



1: pGEM-T easy-flag-*cbl* digested by *Eco*RI and *Xho*I M: Marker.

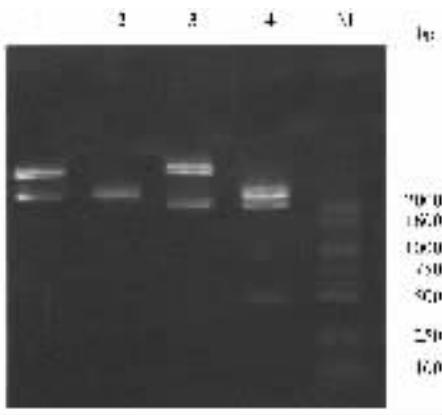
Fig 2 Identification of recombinant pGEM-T easy-flag-*cbl*

图 2 pGEM-T easy-flag-*cbl* 重组质粒的酶切鉴定

2.2 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-flag-*cbl* 的构建

利用酶切后产生的载体和片段之间互补的黏性末端进行亚克隆. 构建成功的 pGEM-T easy-flag-*cbl* 先用 *Bgl*I 将 pGEM-T easy 酶切成小片段, 而 flag-*cbl* 内部无 *Bgl*I 酶切位点, 包含在最大片段内, 将该片段回收后再用 *Kpn*I/*Xho*I 双酶切将 flag-*cbl* 切出, 插入 pcDNA3.1(+)-真核表达载体. *Kpn*I/*Xho*I 双酶切和 *Eco*RI/*Xho*I 双酶切鉴定均表明 pcDNA3.1(+)-flag-*cbl* 表达载体构建成功 (Fig 3).

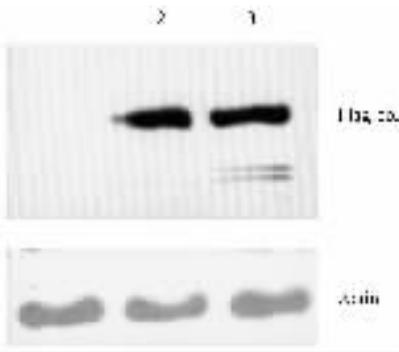
2.3 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-flag-*cbl* 在 COS-7 细胞中的表达 构建成功的 pcDNA3.1(+)-flag-*cbl* 和空质粒 pcDNA3.1(+)-分别瞬时转染 COS-7 细胞, 转染后 24 h 和 48 h anti-flag 抗体均检测到 flag-*cbl* 在蛋白水平的表达, M_r 约为 120×10^3 ; 而对照的空质粒转染后则没有相应的条带 (Fig 4). 表明所构建的真核表达载体 pcDNA3.1(+)-flag-*cbl* 可以在真核细胞内正确表达.



1: pcDNA3.1(+)-flag-cbl digested by *Kpn*I; 2: pGEM-T easy-flag-cbl digested by *Kpn*I and *Xho*I; 3: pcDNA3.1(+)-flag-cbl digested by *Eco*RI and *Xho*I; 4: pGEM-T easy-flag-cbl digested by *Eco*RI and *Xho*I; M: Marker.

Fig 3 Identification of recombinant pcDNA3.1(+)-flag-cbl and pGEM-T easy-flag-cbl vectors

图3 pcDNA3.1(+)-flag-cbl 与 pGEM-T easy-flag-cbl 重组质粒的酶切鉴定



1: Control; 2, 3: COS-7 cells transfected with pcDNA3.1(+)-flag-cbl at 24 and 48 h (anti-flag).

Fig 4 Expression of flag-cbl in COS-7 cells

图4 flag-cbl 在 COS-7 细胞中的表达

3 讨论

Cbl 家族蛋白属于泛素连接酶 E3 家族的一大类, 这类分子中具有 RING 结构域, 又称为 RING 型 E3. 遗传和进化研究显示, Cbl 家族蛋白是一类保守的蛋白酪氨酸激酶(PTK)信号通路的负调控因素. 这一现象最早是在对 *C. elegans* 研究中发现的, 功能缺失的 Cbl 同源分子 Sli-1 可以恢复 EGFR 同源分子 Let-23 的信号转导, 而增加 *Sli-1* 基因的拷贝数则可抑制此通路^[4]; 对 *Drosophila* 的研究也发现 D-Cbl 同样可负调控 EGFR 介导的信号通路^[5]. 此后, 越来越多的研究表明, C-Cbl 可以促进多种受体型蛋白酪氨酸激酶(RTK)如 EGFR、PDGFR α 、 β ^[6]、CSF-1R^[7]等发生配体诱导的泛素化和随后的蛋白酶体降解. Cbl 的这种负调控 RTK 作用对于维持正常细胞内稳机制具有重要意义. 而上述分子很多在肿瘤的发生和发展过程中具有重要作用, 有些是癌基因的产物, 并且许多肿瘤细胞内与增殖有

关的 RTK 发生突变后则不再受 Cbl 的负调控^[3]. 这就提示, 加强 Cbl 分子的负调控作用机制, 下调某些肿瘤细胞内过度活化或发生突变的 RTK 可能会抑制相应肿瘤的恶性增殖. 已有研究表明 C-Cbl 不仅可以使细胞表面的 Neu 迅速泛素化、下调, 并抑制其下游信号通路, 而且可以抑制转染了 Neu 的神经母细胞瘤在小鼠体内的生长^[8]. 与此相一致, Klapper 等认为 HER2 单抗 Heceptin 的抗癌机制与 Cbl 结合并促使 HER2 泛素化、降解有关^[9]. 另外, 膜锚定的 Cbl 可以逆转由 Hck 导致的鼠成纤维细胞恶性转化, 表现为细胞形态的改变以及锚着非依赖性生长受抑^[10]. 在鼠 NIH3T3 细胞中过表达 Cbl 可抑制 PDGF α 和 PDGF β 诱导的细胞增殖及抵抗凋亡^[6]. 这些研究结果强烈地提示: Cbl 可能能够抑制各种增殖性疾病(包括肿瘤在内)的细胞内多条信号通路, 有可能将其作为与异常活化 PTK 相关疾病的治疗手段.

我们以 pEFHAcbl 质粒为模板, 通过 PCR 法获得了 N-末端融合有 flag 标签的人 cbl 基因, 并构建了 flag-cbl 基因的真核表达载体, 该表达载体在真核细胞 COS-7 中能够正确表达. 这为我们进一步研究 cbl 对肿瘤细胞生长的影响, 探讨一种肿瘤治疗的新思路奠定了基础.

【参考文献】

- [1] Joazeiro C, Wing S, Huang H, et al. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase [J]. *Science*, 1999, 286(5438): 309-312.
- [2] Thien CB, Langdon WY. Cbl: Many adaptations to regulate protein tyrosine kinases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(4): 294-307.
- [3] Peschard P, Park M. Escape from Cbl-mediated downregulation: A recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(6): 519-523.
- [4] Jongeward GD, Clandinin TR, Sternberg PW. Sli-1, a negative regulator of let-23-mediated signaling in *C. elegans* [J]. *Genetics*, 1995, 139(4): 1553-1566.
- [5] Pai LM, Barcelo G, Schupbach T. D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis [J]. *Cell*, 2000, 103(1): 51-61.
- [6] Miyake S, Mullane-Robinson KP, Lill NL, et al. Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation. A critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(23): 16619-16628.
- [7] Lee PS, Wang Y, Dominguez MC, et al. The Cbl proto-oncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation [J]. *EMBO J*, 1999, 18(13): 3616-3628.
- [8] Levkowitz G, Oved S, Klapper LN, et al. c-Cbl is a suppressor of the neu oncogene [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(45): 35532-35539.
- [9] Klapper LN, Waterman H, Sela M, et al. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2 [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13): 3384-3388.
- [10] Howlett CJ, Robbins SM. Membrane-anchored Cbl suppresses Hck protein-tyrosine kinase mediated cellular transformation [J]. *Oncogene*, 2002, 21(11): 1707-1716.