

[文章编号] 1000-4718(2009)03-0622-03

M - CSF 核内稳定表达细胞系的构建和鉴定*

涂 剑¹, 滕淑静², 张晓红³, 赵雪琴¹, 唐圣松^{1△}

(南华大学¹ 药物药理研究所,³ 组织胚胎学教研室,湖南 衡阳 421001;² 岳阳职业技术学院,湖南 岳阳 414000)

[摘 要] 目的: 构建真核细胞 pCMV/nuc/M - CSF 载体, 建立 M - CSF 核内稳定表达细胞系, 为进一步研究 M - CSF 的核内作用奠定基础。方法: 采用 PCR 扩增人 M - CSF 活性片段, 将 M - CSF 片段插入真核表达载体 pCMV/myc/nuc, 强制性把 M - CSF 引入细胞核内, 通过 PCR、测序鉴定筛选阳性重组体 pCMV/M - CSF, 脂质体介导转染 HeLa 细胞, 经 G418 筛选后, 用 RT - PCR、间接免疫荧光鉴定其在 HeLa 细胞中的表达及定位分布。结果: 琼脂糖电泳结果显示插入片段为 1 400 bp 左右, 与预期 M - CSF 分子大小相当; DNA 测序分析表明插入质粒的 M - CSF 无读码框移位, 并与来源序列一致。RT - PCR 和间接免疫荧光检测表明, 转染 pCMV/M - CSF 的 HeLa 细胞能稳定表达 M - CSF mRNA 与 M - CSF 蛋白, 且表达的 M - CSF 定位于 HeLa 细胞的细胞核。结论: 成功构建了真核细胞 pCMV/nuc/M - CSF 载体, 建立了 M - CSF 核内稳定表达细胞系。

[关键词] 巨噬细胞集落刺激因子; pCMV/myc/nuc 载体; HeLa 细胞

[KEY WORDS] Macrophage colony - stimulating factor; pCMV/myc/nuc vector; HeLa cells

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony - stimulating factor, M - CSF) 是细胞信号调控网络中一个重要的细胞因子^[1], 通常通过与其靶细胞膜上的受体 c - Fms 结合, 触发细胞内的多条信号转导途径, 从而使细胞产生多种生物学效应。在本课题组前期工作中, 用酵母双杂交系统筛选出真核细胞内与 M - CSF 相互作用的 3 个非受体靶分子^[2]。为进一步研究 M - CSF 的核内作用, 我们构建真核细胞 pCMV/nuc/M - CSF 载体, 经稳定转染 HeLa 细胞, 建立 M - CSF 核内稳定表达细胞系。

材 料 和 方 法

1 材料及主要试剂

1.1 菌株、质粒和细胞株 *E. coli* DH5α 为大肠杆菌质粒受体菌, 本室保存; pCMV/myc/nuc 购自 Invitrogen, pET32c + /M - CSF 质粒, 由曹震宇博士惠赠; HeLa 细胞购自中山医科大学细胞库。

1.2 主要试剂 RPMI - 1640 为 Gibco 产品, 无支原体新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司, Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒、G418 购自 Invitrogen, DNA 回收试剂盒购自上海生物技术有限公司, Efficient Competent Cell Preparation Kit (高效感受态制备试剂盒) 购自 BBI, RT 试剂盒购自 MRI, PCR 试剂盒购自天为时代科技有限公司, pyrobest DNA polymerase 为 TaKaRa 产品, T4 连接酶、*Nco* I、*Sal* I、*Eco*R I 限制性内切酶购自 MBI, 鼠抗人 M - CSF 单克隆抗体为 Santa Cruz 产品。

2 方法

2.1 pCMV/nuc/M - CSF 载体的构建和鉴定 碱裂解法小

量制备 pET32c + /M - CSF 质粒 DNA, 参照文献^[3]扩增 M - CSF 活性区的引物: P1 5' - CTTGCCATGGAGGAGGTCTCG - GAGTACTG - 3', 含有 *Nco* I 酶切位点; P2 5' - ATGTGTCGAC - CTCCTGGAGCTGCGGGCTG - 3', 含有 *Sal* I 酶切位点。PCR 扩增: 94 °C 30 s, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环后 72 °C 延伸 7 min, 终止反应。试剂盒回收纯化 PCR 产物。对纯化的 PCR 产物双酶切及体外重组、质粒转化, 碱裂解法提取阳性菌落的质粒, 挑取经酶切初步证实插入正确的单克隆菌落, 将阳性菌液 1.5 mL 寄上海生工进行 DNA 序列测定。

2.2 细胞培养及转染 HeLa 细胞于含 10% 新生牛血清的 RPMI - 1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养, 取对数生长期细胞转至 24 孔板, 按 Invitrogen 公司提供的脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染程序进行, 同时采用 pCMV/myc/nuc/HeLa 细胞作为空白对照。细胞在转染 24 h 后, 稀释细胞传代培养, 待细胞增至 50% - 60% 汇合时, 更换为含 G418 (800 mg/L) 培养液进行筛选, 每 3 d 换 1 次培养基。持续培养 14 d 后, 可见抗性克隆形成, 收集细胞分析。

2.3 稳定转染细胞的 RT - PCR 检测 按总 RNA 提取试剂盒说明提取细胞总 RNA, 用 RT - PCR 的方法合成 cDNA 第 1 链, 引物序列及 PCR 反应同前, 取 5 μL PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 内参照片段长度为 697 bp。

2.4 稳定转染细胞的间接免疫荧光法检测 细胞分组接种于 6 孔板中, 待细胞长至 50% - 70% 融合, 4% 多聚甲醛溶液固定 (室温, 15 min), PBS 洗 3 次, 常规 0.1% Triton 作用、血清封闭。M - CSF I 抗 (1:200) 4 °C 孵育过夜, 1% BSA 的 PBS 洗 3 次, FITC 标记山羊抗小鼠 II 抗 (1:100) 室温孵育 1 h (避光); PBS 洗 3 次, 荧光显微镜下观察。

[收稿日期] 2008 - 02 - 03 [修回日期] 2008 - 06 - 13

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30270684); 湖南省学科建设资助项目

△ 通讯作者 Tel: 0734 - 8282753; E - mail: tangss111@yahoo.com.cn

3 统计学处理

RT-PCR 和免疫荧光结果通过相应软件扫描,所得数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验,由 SPSS12.0 统计软件完成。

结 果

1 pCMV/nuc/M - CSF 的构建及 PCR 鉴定

以含有 J6-1 细胞 M-CSF cDNA 序列的 pET32c+/M-CSF 质粒为模板,以 M-CSF 特异性的引物进行 PCR 扩增,PCR 产物与表达质粒 pCMV/nuc/M-CSF 经 *Sal* I/*Nco* I 酶切,酶切产物在 T4 DNA 连接酶的催化下进行定向 DNA 重组。连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α ,LB/amp(100 mg/L) 平板培养过夜。随机挑取阳性克隆菌,用碱裂解法抽提转化 DNA 质粒。以含有插入片段的阳性重组质粒为模板,用 M-CSF 特异性的引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳显示:扩增获得大小约为 1 400 bp 的条带,见图 1。

2 DNA 测序鉴定

随机挑取 1 个单克隆进行 DNA 测序,进一步确定插入片段是否存在由于 PCR 扩增所带来的突变以及插入片段的阅读框是否正确。结果显示(图 2):插入片段的阅读框正确

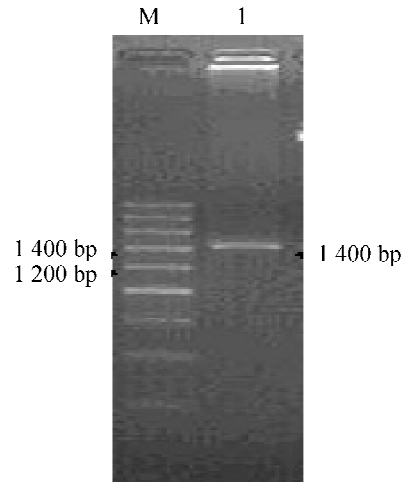


Fig 1 Characterization of pCMV/nuc/M - CSF recombinant plasmid by PCR. M:200 bp marker; Lane 1: pCMV/nuc/M - CSF recombinant plasmid.

图 1 重组质粒 pCMV/nuc/M - CSF 的 PCR 鉴定

(没有读框移位)、没有移码突变。全部测序结果经与 GenBank 上登录序列进行 Blast 同源性比较,同源性为 99%,与来源片段一致。

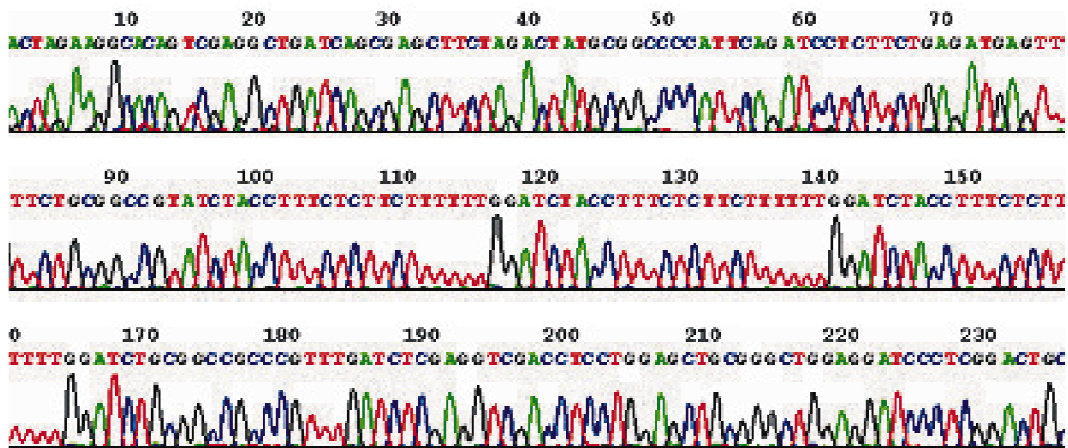


Fig 2 Result of pCMV/nuc/M - CSF recombinant plasmid by sequencing(only part manifestation).

图 2 重组质粒 pCMV/nuc/M - CSF 的测序结果

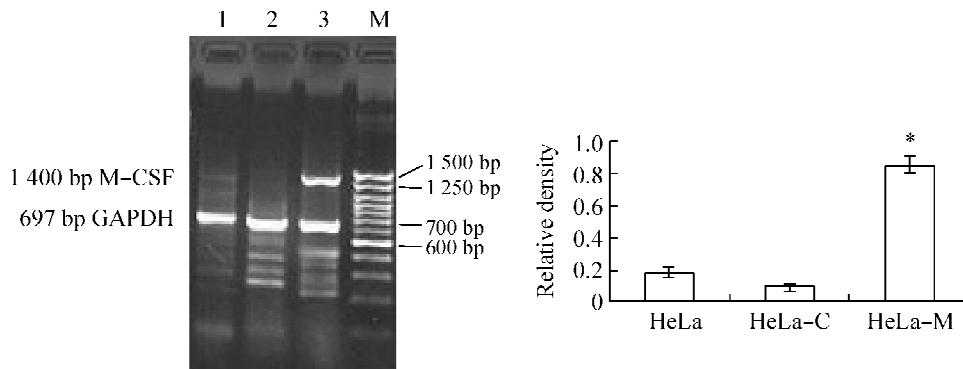


Fig 3 M - CSF mRNA expression in HeLa cells by RT - PCR. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs other two groups. Lane 1:HeLa; Lane 2: HeLa - C; Lane 3: HeLa - M; M: 100 bp marker.

图 3 RT-PCR 检测 HeLa 细胞 M-CSF mRNA 的表达

3 稳定表达细胞系中 M-CSF mRNA 的表达

提取细胞总 RNA,用 M-CSF 基因特异引物进行 RT-PCR 检测,空载体 pCMV/nuc/myc 转染组(用 HeLa-C 表示),转染 pCMV/nuc/M-CSF 的单克隆 HeLa 细胞以 HeLa-M 表示,以 GAPDH 作为内参照,结果如图 3 所示,有目的基因表达,且与未转染的 HeLa 及 HeLa-C 组比较, $P < 0.05, n = 3$ 。

4 间接免疫荧光检测稳定表达细胞系 M-CSF 蛋白质的表达

与空载体 pCMV/nuc/myc 转染组及未转染的 HeLa 细胞组比较,pCMV/nuc/M-CSF 真核表达质粒稳定转染 HeLa 细胞组,经间接免疫荧光检测可见绿色荧光位于细胞核内(图 4),荧光强度与未转染的 HeLa 及 HeLa-C 组比较, $P < 0.05, n = 3$ 。

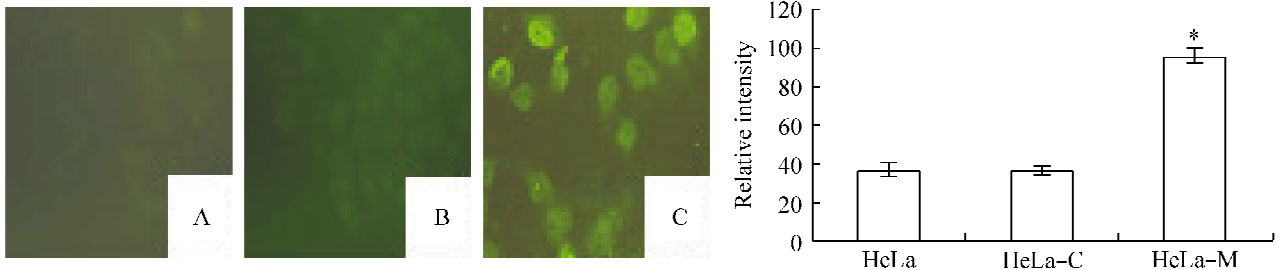


Fig 4 M-CSF protein expression in HeLa cells by immunofluorescence($\times 400$). $\bar{x} \pm s. n = 3. *P < 0.05$ vs other two groups. A: HeLa; B:HeLa-C; C:HeLa-M.

图 4 间接免疫荧光检测 HeLa 细胞 M-CSF 蛋白质的表达

讨 论

通常情况下,成熟的 M-CSF 都作为细胞外信号分子,通过激活受体把胞外信号传递入细胞核,调控相应基因的表达而影响细胞功能。但细胞核内 M-CSF 的出现则与之抵触,M-CSF 通过直接进入细胞核的方式传递信息,背弃了细胞外因子的经典形象^[4]。为进一步研究 M-CSF 的核内作用,我们计划应用 pCMV/myc/nuc 构建 pCMV/nuc/M-CSF 载体,建立 M-CSF 核内稳定表达细胞系。

pCMV/myc/nuc 是 pShooter 载体系统的一种,含有 3 个核定位信号(nuclear localization signal, NLS),与目的蛋白融合后,可通过细胞内的转运系统把目的蛋白强制性带入细胞核^[5]。该载体还带有 1 个能在哺乳动物细胞中表达的强启动子 pCMV 以保证目的蛋白在细胞中的持续表达。此外,在目的蛋白编码的下游融合有 1 个新霉素抗性基因(neo)作为转染哺乳动物细胞的筛选标记。本实验借用 pCMV/myc/nuc 构建了 M-CSF 靶向定位蛋白表达载体 pCMV/nuc/M-CSF,通过脂质体转染 HeLa 细胞,经 G418 筛选,RT-PCR 与间接免疫荧光检测到了 M-CSF 的 mRNA 与蛋白表达,且 M-CSF 能准确定位于细胞核内。这些结果表明:我们获得了 1 个 M-CSF 核内稳定表达细胞系,为进一步研究核内

M-CSF 的作用及其机制提供了一个平台。

[参 考 文 献]

- [1] 张燕,王威,陈兵,等. 骨调素和巨噬细胞集落刺激因子在糖尿病大鼠肾组织中的表达及霉酚酸酯的干预作用[J]. 中国病理生理杂志,2008,24(6):1173-1177.
- [2] 李剑敏,雷小勇,孙文清,等. 用于酵母双杂交的 M-CSF 诱饵载体的构建和鉴定[J]. 南华大学学报(医学版),2005,33(2):144-147,165.
- [3] Cao ZY, Wu KF, Song YH, et al. M-CSF targeting into LCL nucleus behaves as a malignancy promoter[J]. Chinese Journal of Cancer Research 2003,15(4):262-268.
- [4] Song Z, Wang M, Wang X, et al. Nuclear actin is involved in the regulation of CSF1 gene transcription in a chromatin required, BRG1 independent manner[J]. J Cell Biochem,2007,102(2):403-411.
- [5] Li L, Gondi CS, Dinh DH, et al. Transfection with anti-p65 intrabody suppresses invasion and angiogenesis in Glioma cells by blocking nuclear factor- κ B transcriptional activity[J]. Clin Cancer Res,2007,13(7):2178-2190.