

人整合素 $\beta 3$ 亚基真核表达载体的构建及表达

牟丹蕾, 白雪帆**, 李光玉, 潘蕾, 黄长形, 杨为松

(第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, 陕西 西安 710038)

The Construction and Expression of Eukaryotic Expression Vector Harboring Homo Sapiens Integrin beta 3 ORF Gene Segment

MOU Dan-lei, BAI Xue-fan, LI Guang-yu, PAN Lei, HUANG Chang-xing, YANG Wei-song

(Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: To study the cellular entry of Hantavirus, we constructed eukaryotic expression vectors harboring Homo sapiens integrin $\beta 3$ gene. The 2.3kb ORF region of human integrin $\beta 3$ subunit cDNA was amplified from the plasmid containing cDNA of human integrin $\beta 3$ by PCR. Then the PCR products with the blunt-ends were directly cloned into eukaryotic expression vector pcDNA 3.1/V5-His TOPO by TA Cloning. It shows that the integrin gene was inserted into the plasmid vector by restriction enzyme analysis and PCR, and the sequence is identical with the reported human integrin $\beta 3$ ORF gene, then the recombinant expression plasmids were transfected into CHO cells in vitro. The transient expression products were analyzed by IFA. The results above suggested that the eukaryotic expression vectors, pcDNA3.1- $\beta 3$, has been successfully constructed and the expressed protein could be detected distinctly and peculiarly. It lies a basis for the further study of hantavirus pathogenicity and biological characteristics.

Key words: Integrin; Beta3 subunit; PCR; Eukaryotic expression

摘要: 构建人整合素 $\beta 3$ 亚基全读码框 (ORF) 基因真核表达载体, 为探讨整合素 $\beta 3$ 作为汉坦病毒 (Hantavirus, HV) 受体的特异性奠定基础。根据已公布的序列设计引物, 用 PCR 方法从原核质粒中扩增出人整合素分子 $\beta 3$ 亚基 ORF 基因, 应用 TA 克隆将其插入 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中, 采用酶切和 PCR 鉴定, 选取初筛正向插入的阳性克隆进行测序, 序列分析表明与公布的人整合素 $\beta 3$ 亚基 ORF 核苷酸序列基本一致, 并通过脂质体介导转染至 CHO 细胞中进行瞬时表达, 经间接免疫荧光法检测证实 pcDNA3.1- $\beta 3$ 能在宿主细胞中高效表达。

关键词: 整合素; $\beta 3$ 亚基; 汉坦病毒; 聚合酶链反应; 真核表达

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)01-005-04

汉坦病毒 (Hantavirus, HV) 与易感细胞表面受体的结合是感染致病的关键。1998 Gavrilovskaya IN 等^[1] 首次提出整合素 $\beta 3$ 可能促进 HV 的入胞作用, 引起了各国学者的关注。本文用 PCR 方法扩增出人整合素分子 $\beta 3$ 亚基开放读码框 (ORF) 基因, 将其克隆入 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中, 成功构建了人整合素 $\beta 3$ 亚基 ORF 基因真核表达载体, 并通过脂质体介导转染至中国仓鼠卵巢 (China hamster ovary, CHO) 细胞中进行瞬时表达。此

研究为进一步了解整合素 $\beta 3$ 在 HV 入胞中的作用及阐明 HV 的致病机制奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞株: 含人整合素分子 $\beta 3$ 全长 cDNA 的原核表达质粒由美国 TSRI 的 Ginsberg M 惠赠; 真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 购自 Invitrogen 公司; DH5 α 菌株引自中国预防医学科

收稿日期: 2002-4-19, 修回日期: 2002-06-17

作者简介: 牟丹蕾(1973-), 女, 黑龙江哈尔滨籍, 主治医师, 硕士, 研究方向为 HV 抗感染免疫。

** 通讯作者简介: 白雪帆(1951-), 男, 河南睢县籍, 教授, 博士, 研究方向为肾综合征出血热、艾滋病、病毒性肝炎。Correspondence author.

学院病毒学研究所。CHO 细胞株由第四军医大学任君萍硕士惠赠。

1.1.2 主要试剂: 试验用工具酶 *Hind* III、*Xho* I、*Bam*H I、*Pst* I、*Xba* I 及 TaqDNA 聚合酶购自 Promega 公司; DNA 回收试剂盒购自 Promega 公司; 小量质粒抽提纯化试剂盒为上海华舜公司的产品; 脂质体 Lipofectamine-2000 及 CHO 专用培养基 CHO-S-SFM II 购自 Gibco 公司; 小鼠抗人整合素 $\beta 3$ 亚基单克隆抗体及异硫氰酸盐荧光素 (*Fluorescein Isothiocyanate*, FITC) 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于 Chemicon 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与目的基因的扩增: 参照 GenBank 公布的人整合素分子 $\beta 3$ 全长 cDNA 序列的资料, 借助于 DNASTar 和 Oligo 6 生物软件设计了 4 条引物, 由九鼎鑫生物工程公司合成。其中 2 条内引物是防止一次性扩增 2.3kb 片段难以成功, 为分断扩增而准备的, 并于 P4 5' 端引入 *Xho* I 酶切位点, *Xho* II 是片段内的酶切位点, 为方便连接所选。

以含人整合素分子 $\beta 3$ 全长 cDNA 的质粒 pBluescript II SK (+) Integrin $\beta 3$ 为模板, 分别以 P1、P4; P1、P2; P3、P4 为引物扩增 $\beta 3$ 亚单位基因 ORF 区 (21-2342bp)。以 P1、P4 为引物 1 次性扩增全读码框, PCR 反应体系: 模板 0.2 μ L 引物 P1、P4 各 10 μ mol, 2.5 μ mol/L dNTP 5 μ L, Taq 酶 50n kat, 10 \times Buffer 5 μ L, 补加去离子水至总体积 50 μ L。PCR 反应条件: 在高温下 (70 $^{\circ}$ C 左右) 使酶、模板与引物混合, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 60s, 62 $^{\circ}$ C 退火 60s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120s, 共 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30min。用引物 P1、P2 和 P3、P4 分段扩增的 PCR 反应体系同前, 但 Taq 酶减半量使用。循环参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 62 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 15min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 并用 Promega 公司 PCR 产物回收试剂盒回收纯化。

1.2.2 真核表达载体的构建及鉴定: 将从原核质粒中扩增出的 2.3kb 的 $\beta 3$ 亚单位 ORF 基因克隆入真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His⁺TOPO⁺ (Fig.1), 参照 Invitrogen 公司的 pcDNA3.1/V5-His⁺TOPO⁺ TA cloning Kit 操作说明并加以适当改进后进行连接、转化。连接体系: 回收纯化全长 $\beta 3$ 亚基编码基因的 PCR 产物 9 μ L, TOPO⁺ 载体 1 μ L, 6 \times Buffer 2 μ L。目的基因和载体在 TOPO 酶的作用下, 12 $^{\circ}$ C~16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 取 6 μ L 连接产物转化感受态细菌, 涂于

Amp^rLB 平板中 37 $^{\circ}$ C 温育 16h 随机挑取单菌落, 扩增后抽提、纯化质粒, 采用双位点单、双酶切和 PCR 鉴定。选取正向插入的阳性克隆, 送交上海申友公司在 ABI PRISMTM 377XL DNA 自动测序仪上进行核苷酸序列测定, 应用 DNASTar 生物软件进行序列分析。

1.2.3 重组质粒转染 CHO 细胞: 采用脂质体介导 DNA 转染。CHO 细胞用含 100mL/L 胎牛血清 (含

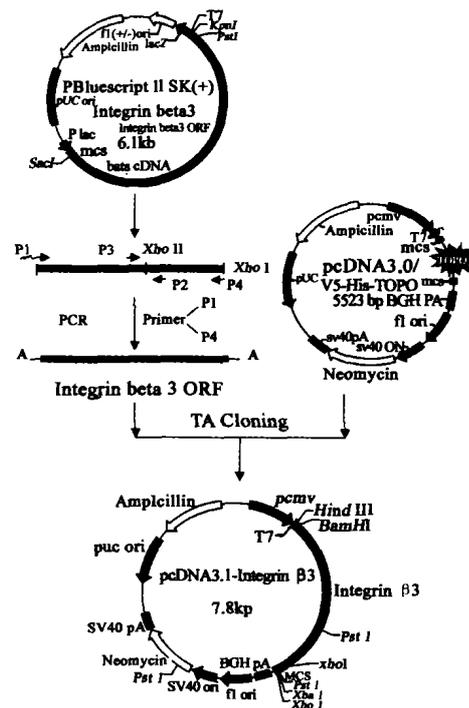


图 1 重组真核表达质粒 pcDNA3.1- $\beta 3$ 的构建

Fig.1 The constructed recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1- $\beta 3$

左氟沙星 10mg/L) 的低糖 DMEM 培养基 37 $^{\circ}$ C 50mL/L CO₂ 培养, 细胞在转染前 24h 经胰酶传代, 以 2 $\times 10^5$ 细胞/孔接种至 24 孔培养板 (内置无菌玻片), 待细胞的汇合度达到 90% 以上后, 更换为无血清及抗生素的 CHO 专用培养液 500 μ L/孔, 向每孔直接加入 100 μ L pcDNA3.1- $\beta 3$ (1.0 μ g) /脂质体 (3 μ L) 混合物, 37 $^{\circ}$ C 50mL/L CO₂ 培养 6h 后, 更换为新鲜的含抗生素的无血清 CHO 专用培养基, 继续培养 42h 后, 取出细胞爬片, 冷丙酮固定 15min, 风干。

1.2.4 重组质粒在宿主细胞中表达的检测: 采用间接免疫荧光方法。细胞爬片固定后用 PBS 洗 5min $\times 2$, 过水, 吹干, 滴加 1:50 稀释的小鼠抗人整合素 $\beta 3$ 亚基单克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 湿育 1h; PBS 洗 5min $\times 2$, 过水, 吹干, 再加入 1:200 稀释的 FITC 标记的兔抗小鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 湿育 1h。PBS 洗

5min \times 3, 过水, 吹干。荧光显微镜下观察, 分别以无关一抗和空载体转染的 CHO 细胞作阴性对照。

2 结果

2.1 目的片段扩增及克隆

用引物 P1、P4 扩增出 2.3kb 的 $\beta 3$ 亚单位 ORF 基因, 同理论预期结果相符, 无非特异性产物。将该片段克隆入 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中, 转化感受态 DH5 α , 在 Amp 抗性的 LB 平板上可见散在分布的抗性克隆菌落生长。由于以 P1、P4 为引物扩增成功, 为节省时间、简化步骤, 首先利用此 PCR 产物作为目的基因直接构建真核表达载体, 而分段扩增以备序列出现突变或表达失败后用。

2.2 重组质粒 pcDNA3.1- $\beta 3$ 的鉴定

2.2.1 PCR 鉴定: 用引物 P1、P4 扩增出与预期结果相符的片段, 表明目的基因已克隆入载体。

2.2.2 酶切鉴定: pcDNA3.1- $\beta 3$ 用 *Xho* I 酶切得到 7.8kb 的预期片段, 用 *Pst* I 酶切得到 768bp、1.4kb、5.6kb 的预期片段, 用 *Bam* HI 酶切得到 1.5kb、6.3kb 的预期片段, 用 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切得到 2.3kb、5.5kb 的预期片段(Fig.2), 初步证明目的基因正向克隆入 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中。

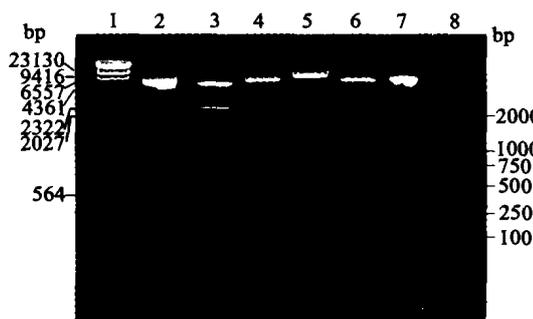


图 2 重组质粒限制性内切酶分析

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmids

1, λ -*Hind* III Marker; 2/7, pcDNA3.1- $\beta 3$ uncut; 3, pcDNA3.1- $\beta 3$ /*Xba*I+*Hind* III; 4, pcDNA3.1- $\beta 3$ /*Bam* HI; 5, pcDNA3.1- $\beta 3$ /*Xho*I; 6, pcDNA 3.1- $\beta 3$ /*Pst* I; 7, DL-2000 Marker.

2.2.3 测序鉴定: 与人整合素分子 $\beta 3$ 亚单位 ORF 基因序列比较, 有 3 处点突变, 其中 2 处为同义突变, 另一处点突变为 T \rightarrow C, 导致 $\beta 3$ 亚单位的 Ser121 \rightarrow Pro121, 但不影响 $\beta 3$ 亚单位与配基结合 (237-248 氨基酸残基构成结合位点)^[2]及二价钙离子结合 (119 氨基酸残基)^[3]功能; 另外所用的测序仪的测序结果中可能存在 2% 的碱基识别错误。进一步证明目的基因已成功克隆入真核表达载体。

2.3 重组质粒 pcDNA3.1- $\beta 3$ 在 CHO 细胞中的表达

脂质体介导的 pcDNA3.1- $\beta 3$ 转染 CHO 细胞的转染效率为 30% 左右, CHO 细胞胞膜上及胞浆内可见特异性绿色荧光(封 3 彩版, Fig.3A/B)。转染空载体的 CHO 细胞未见特异性荧光(封 3 彩版, Fig.3C)。IFA 结果表明, pcDNA3.1- $\beta 3$ 在 CHO 细胞成功表达了人整合素分子 $\beta 3$ 亚单位。

3 讨论

整合素是一个膜受体家族, 是粘附分子中一类普遍存在于细胞表面的跨膜糖蛋白, 其成员都是由 α 、 β 亚单位籍非共价键连接形成的异源二聚体, 迄今已发现 α 、 β 亚单位以不同组合形成 20 多种整合素分子。整合素 $\beta 3$ 亚单位又称 GP III a, 为 CD61, 分子量 105kDa, 由 741 个氨基酸残基组成, 其中 237-248 氨基酸残基对于同配体结合和粘附起着关键作用。 $\beta 3$ 组有 α II b $\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 3$ 两种形式: α II b $\beta 3$ 是血小板上一种主要的整合素, 在血小板的活化和血栓形成中发挥重要作用; $\alpha v\beta 3$ 表达于血小板、内皮细胞、某些活化的白细胞、NK 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞, 还表达于平滑肌细胞、破骨细胞和某些肿瘤细胞, 是玻连蛋白 (Vitronectin VN) 受体, 其与 VN 结合对维持毛细血管完整性起重要作用, 并介导血小板粘附到固相化的 VN, 血管平滑肌细胞上的 $\alpha v\beta 3$ 通过激活细胞内 L 型钙通道调控小动脉舒缩, 对血流及血管的紧张度起一定的调节作用。已证实整合素 $\beta 3$ 通过识别病毒表面特定的 RGD 基序可介导部分二十面体病毒 (腺病毒、口蹄疫病毒、肠道柯萨奇病毒 A9) 的人胞作用^[2,4,5]。

近年来致病的 HV 在全世界有增长趋势, 一些 HV 已经采取了新的传播方式, 并可能引起病理改变和临床表现更加复杂多样的传染病。迄今, HV 致病机理尚未完全阐明, HV 对人和易感动物均呈泛嗜性感染, 病毒的嗜性主要是由病毒细胞受体决定的, 病毒与细胞表面相应受体的结合是病毒感染复制过程中的始动环节。研究发现病毒受体大多是跨膜蛋白或糖蛋白, 包膜病毒的受体配体一般位于其包膜蛋白上, 它们都暴露于表面, 结合是特异性的, 因此可利用病毒受体或受体配体的模拟分子阻断病毒入胞即能有效中断其生活周期, 从而清除病毒, 发挥理想的抗病毒作用。

九十年代初, 国内外曾进行过 HV 受体的研究, 但没有突破性进展。1998 年美国 Stony Brook 大学医学系的 Gavrilovskaya, IN^[4]等首次提出包膜病毒 HV 可通过与特定的整合素相互作用而感染细胞, 相关

的研究重新引起关注^[6,7], 研究表明: 整合素 $\beta 3$ 可能是 HV 致病病毒株的重要的粘附受体之一, 并且与本病的血管通透性改变及血小板功能异常等致病机制有关。但国内目前尚未见相关报导。

为了进一步探讨整合素 $\beta 3$ 作为 HV 受体的特异性, 我们着手构建人整合素 $\beta 3$ 亚基 ORF 基因真核表达载体。当利用 PCR 扩增较长的片段时, 一般采用分段扩增, 虽其有扩增效率高、失败风险低及序列分析易等优点, 但需用中间载体进行酶切连接, 存在步骤繁琐、耗时、耗材等缺点。在实验中我们参照 LA-PCR (long and accurate PCR) 方法^[8,9], 一次性、较精确地扩增出 2.3kb 长的核苷酸片断, 具体优化措施如下: 一、引物设计——①与模板特异性匹配; ②适当提高 G、C 含量; ③长度均 > 20bp; ④适当降低引物浓度。二、模板完整性是实现大片断精确扩增的关键, 目前市售的小量质粒抽提纯化试剂盒一般采用大孔透析或阴离子交换树脂等方法, 较传统的酚: 氯仿抽提法更好地保持模板 DNA 的完整性。三、温度循环参数——①尽量降低变性温度, 缩短变性时间; ②适当增加延伸时间; ③热启动。四、使用中国军事医学科学院生产的 1109 DNA 扩增仪进行扩增, 它系 3 个水浴缸分别设置变性、退火和延伸温度, 能最快的实现管内不同温度的变化。由于 Taq 聚合酶本身催化的反应的碱基错误掺入率可高达 10^{-4} /碱基/循环, 在扩增 2.3kb 片段中出现 3 个碱基的错配是在所难免的, 故扩增长而精确的片段, 选取具有 3'→5' 外切核酸酶活性的 DNA 聚合酶 (如 Pfu、Vent 聚合酶), 或采用合成能力更强的 Tth 聚合酶, 以双聚合酶策略消除 DNA 合成中出现的错配将是更明智的选择。

在载体的选择上, 我们采用的 Invitrogen 公司 pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA 克隆真核表达载体, 具有定向、迅速、简捷、高效等特点, 但由于我们克隆入的片段较长 (>1.0kb), 加之与其配套的高效的 One Shot TOPI0 Chemically Competent 感受态细菌在多次冻融后失效, 最初按其操作说明进行连接、转化的结果不理想, 经过适当的改进——如增加目的基因[®]PCR 回收产物的用量、扩大连接体系、延长连接时间, 并自制新鲜感受态细菌, 在其转化效率最高的时间段进行转化, 成功的将人整合素 $\beta 3$ 亚基 ORF 基因克隆入 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中, 构建成 pcDNA3.1- $\beta 3$ 真核表达载体。

为日后深入研究整合素 $\beta 3$ 作为 HV 受体的特异性, 本实验参照 O'Tool TE 和 Loftus JC 等学者

的相关研究^[10,11], 有目的地用重组质粒 pcDNA3.1- $\beta 3$ 转染对 HV 不易感、特异性整合素 $\beta 3$ 缺乏的 CHO 细胞。采用脂质体介导 DNA 转移技术进行转染, 虽该技术相对经济简便, 但转染效率并不尽人意, 故在转染过程中更换产生重组蛋白因子的 CHO 专用无血清培养基进行培养, 以利于外源基因的表达, 结合其它优化措施使人整合素 $\beta 3$ 亚基在 CHO 细胞中得以高效表达。

人整合素 $\beta 3$ 亚基真核表达载体的成功构建及在哺乳动物细胞内的高效表达, 为从分子水平阐明 HV 的致病机制奠定了基础; 为 HV 分类提供新的依据; 也为疫苗的研制及抗 HV 新型药物的设计提供了资料。

致谢: 李新红、张文彬、滕光菊参加了部分工作, 特此致谢。

参考文献

- [1] Gavrilovskaya I N, Shepley M, Shsw R, *et al.* $\beta 3$ integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 7074-7079.
- [2] 金伯泉. 细胞和分子免疫学 [M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 2001, 9.
- [3] Loftus J C, O'Toole T E, Plow E F, *et al.* A $\beta 3$ integrins mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation [J]. Science, 1990, 249: 915-918.
- [4] Bilato C, Curto K A, Monticone R E, *et al.* The inhibition of vascular smooth muscle cell migration by peptide and antibody antagonists of the alphavbeta3 integrin complex is reversed by activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II [J]. J Clin Invest, 1997, 100: 693-704.
- [5] Wu X, Mogford J E, Platts S H, *et al.* Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by alphavbeta 3 and alpha 5 beta1 integrin ligands[J]. J Cell Biol, 1998, 143: 241-252.
- [6] Gavrilovskaya I N, Brown E J, Ginsberg M H, *et al.* Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by $\beta 3$ integrins [J]. J Virol, 1999, 73: 3951-3959.
- [7] Mackow E R, Gavrilovskaya I N. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2001, 256: 91-115.
- [8] Mukai H, Nakagawa T. Long and accurate PCR (LA PCR)[J]. Nippon Rinsho, 1996, 54: 917-922.
- [9] Ohya Y. LA-PCR-based quick method for the identification of genes responsible for the complementation of Saccharomyces cerevisiae mutations [J]. Biotechniques, 1996, 20: 772-774, 778.
- [10] O'Tool T E, Loftus J C, Plow E F, *et al.* Efficient surface expression of platelet GP II b III a requires both subunit [J]. Blood 1989, 74: 14-18.
- [11] Loftus J C, O'Tool T E, Plow E F, *et al.* A $\beta 3$ integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation [J]. Science, 1990, 249: 915-918.