

## pEGFP-N1/PDX1 真核载体的构建与表达

唐小龙, 郭敏, 张涓, 朱康儿

(暨南大学医学院血液病研究所, 广东广州 510632)

**[摘要]** 目的: 构建胰腺十二指肠同源框蛋白1 (pancreatic and duodenal homeobox factor 1, Pdx1) 转录因子真核表达质粒, 并检测其在真核细胞中的表达能力及其生物活性。方法: 以人胚胎胰腺组织基因组的 mRNA 为模板经 RT-PCR 扩增获得 Pdx1 基因编码序列, 克隆到真核表达载体 pEGFP-N1 的多克隆位点中, 构建 pEGFP-N1/Pdx1 真核表达质粒, 并转染 L02 细胞, 用 RT-PCR、免疫组化、间接荧光法和 Western Blot 检测目的基因表达情况。结果: 酶切与测序结果表明目的基因序列克隆正确; RT-PCR 检测目的基因 Pdx1 mRNA 在靶细胞 L02 中表达; 免疫组化和间接荧光结果证实 Pdx1 主要存在于细胞核内; Western blot 检测到细胞核内 Pdx1 目的蛋白。结论: 完成人 Pdx1 基因克隆, 成功构建了目的基因 Pdx1 真核表达载体, 并在 L02 细胞中获得有效表达。

**[关键词]** 胰腺十二指肠同源框蛋白1; 质粒; 转录因子; 内切酶

**[中图分类号]** Q78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)02-0121-04

### Construction and expression of eukaryotic expression vector of pEGFP-N1/PDX1

TANG Xiao-long, GUO Ming, ZHANG Yuan, ZHU Kang-er

(Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** **Aim:** To construct recombinant eukaryotic expression vector of Pdx1 transcription factor and detect its expression in eukaryocyte. **Methods:** We obtained the Pdx1 gene exon by using human embryo pancreas tissue mRNA as the template, and cloned it into multiple cloning sites of eukaryotic expression vector pEGFP-N1 to construct pEGFP-N1/Pdx1 eukaryotic expression plasmid and the constructed plasmid was transfected L02 cell. The expression in transfected cells was detected by RT-PCR immunocytochemistry, indirect fluorescence assay and Western Blot respectively. **Results:** Restriction endonuclease and sequence analysis verified that the fragment cloned in pEGFP-N1 vector was Pdx1 cDNA. In the supernatant of L02 cells transfected by the pEGFP-N1/Pdx1 plasmid. RT-PCR verified that Pdx1 mRNA was positive in L02 cells, the expression of PDX1 protein in the nucleus of L02 cells was detected by indirect fluorescence assay and immunohistochemistry, and about 48KDa protein was detected by Western blot in the cellular nucleus of L02 cells. **Conclusion:** Eukaryotic expression plasmid of Pdx1 gene (pEGFP-N1/Pdx1) is successfully constructed and expressed effectively in L02 cells.

**[Key words]** pancreatic and duodenal homeobox factor 1; plasmid; transcription factor; endonuclease

**[收稿日期]** 2007-12-19

**[基金项目]** 国务院侨办重点学科建设项目(200510)

**[作者简介]** 唐小龙(1972-), 男, 博士研究生, 研究方向: 干细胞的分化。通讯作者: 张涓; 电话: 020-85226787; E-mail: tzyuan@jnu.edu.cn

胰腺分化发育过程中涉及多种关键转录因子及信号途径的调控,其中胰腺十二指肠同源框蛋白1(pancreatic and duodenal homeobox factor 1, PDX1)早在胰腺原基中就开始表达,有利于促进早期胰腺分化,对胰腺内分泌细胞的分化与功能成熟起关键作用<sup>[1]</sup>;PDX1缺陷鼠将不能分化发育形成胰腺组织而出现严重的糖尿病<sup>[2-3]</sup>,提示PDX1在 $\beta$ 细胞分化与发育过程中及维持 $\beta$ 细胞的正常功能等方面具有重要作用,但PDX1是如何通过调控网络诱导祖细胞向 $\beta$ 细胞分化发育目前尚不清楚,深入研究PDX1在胰腺内分泌 $\beta$ 细胞分化发育过程中的作用机制具有重要的生物学意义,因此我们构建了Pdx1真核表达载体pEGFP-N1/Pdx1。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 和质粒pEGFP-N1均为本实验室保存。RT-PCR试剂盒、T4 DNA连接酶、限制性内切酶*Nhe*I、*Xho*I及DNA marker购自大连宝生物公司;质粒提取试剂盒和DNA胶回收纯化试剂盒购自Omega公司;PCR引物与测序由上海生物工程公司完成;转染试剂JetPEI<sup>TM</sup>购自Polyplus公司;DAB酶底物显色试剂盒购自北京鼎国生物科技公司;鼠抗人PDX1抗体购自Abcam公司;HRP-抗鼠IgG与CY3-抗鼠IgG购自Bethyl公司。

### 1.2 细胞培养

正常成人的肝实质细胞株L02(不表达内源性的Pdx1基因)细胞购于中科院上海细胞所。将L02细胞接种于含体积分数10%新生牛血清,100 IU/mL青霉素和100 IU/mL链霉素的DMEM/F12培养基中,在含体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱37℃连续培养。

### 1.3 目的基因Pdx1的RT-PCR扩增

参照GenBank人Pdx1的CDS序列分别设计引物如下:其中Pdx1上游引物P1:5'-AAGCTAGCCCGCAGCC ATGA-3',含*Nhe*I位点、下游P2:5'-TCCTCGAGTCATCGTGGTTCCTG-3',含*Xho*I位点与终止密码子TGA,扩增基因长度为882 bp。Trizol提取人胚胎胰组织RNA,DEPC-H<sub>2</sub>O溶解RNA,检测A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub>值进行RNA纯度及含量计算;实验重复3次,每次做复管。用引物P2作Pdx1特异性引物,用RT-PCR试剂盒进行反转录转录合成相应的cDNA。PCR扩增Pdx1基因,反应体系按说明书,反应条件分别为:Pdx1为95℃预变性5

min,95℃30 s,57℃30 s,72℃60 s,35个循环,72℃10 min。扩增产物取5  $\mu$ L进行1.0%琼脂糖凝胶电泳,确定扩增产物大小正确无误。

### 1.4 pEGFP-N1/Pdx1真核载体的构建及鉴定

Pdx1 RT-PCR产物经过回收纯化后与载体pEGFP-N1同时用*Nhe*I和*Xho*I双酶切,电泳纯化后,酶切纯化的产物按照3:1的摩尔比混合,用T<sub>4</sub> DNA连接酶连接24 h。转化用低温CaCl<sub>2</sub>制备的*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细菌,于含卡那霉素30  $\mu$ g/mL的LB固体培养基中;次日随机挑取数个单菌落,分别接种于3 mL含卡那霉素的LB培养液中,37℃下150 r/min振荡培养过夜;先取少量菌液煮沸作为模板进行菌落PCR检测是否有Pdx1的存在,将菌落PCR筛选呈阳性的菌落用质粒提取试剂盒抽提质粒DNA,*Nhe*I和*Xho*I双酶切质粒DNA后电泳检测。阳性克隆的菌液测序鉴定,测序采用Sanger双脱氧链终止法,对插入序列的两端进行测定,测序工作由上海生物工程公司完成。

### 1.5 细胞转染

取对数生长期的L02细胞接种在6孔板内,待细胞生长至50%~60%时,直接在含体积分数10%胎牛血清的完全培养基的培养板中按(N/P=8)比例加入阳离子聚合物转染试剂JetPEI<sup>TM</sup>和质粒pEGFP-N1/Pdx1的混合物,细胞隔天换液。培养24 h后,开始检测Pdx1的表达情况。

### 1.6 RT-PCR检测

Pdx1用下述引物与反应条件进行检测在靶细胞中的表达水平:上游引物P3为5'-ACATCTTCAC-CATCACCTCCCA-3',下游引物P4为5'-CAGC-CAGCTCCACCCGCTCTT-3',扩增目的基因片段长度为302 bp;反应条件分别为:95℃预变性5 min,95℃30 s,57.2℃30 s,72℃60 s,30个循环,72℃10 min。扩增产物取5  $\mu$ L进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.7 免疫组化检测

以重组质粒pEGFP-N1/Pdx1转染L02细胞48 h后,去培养液,PBS洗涤,用质量分数4%的多聚甲醛固定10 min后,用PBS冲洗,依次滴加过氧化酶阻断剂,正常动物非免疫血清封闭,与鼠抗人PDX1抗体反应后,用HRP标记的抗鼠二抗再进行反应,DAB显色,显微镜下检测,呈棕黄色者为阳性,苏木素复染。

### 1.8 间接免疫荧光检测

待pEGFP-N1/Pdx1质粒转染细胞48 h后,细胞

固定后,滴加鼠抗人 PDX1 抗体液,孵育 30 min 后 PBS 洗,再分别用 CY3-抗鼠 IgG 孵育 35 min,PBS 洗后 Hoechst 复染核,PBS 洗后在荧光下检测。

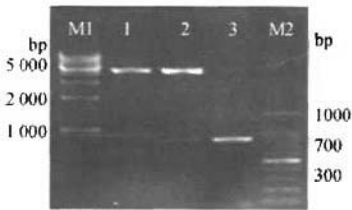
1.9 Western Blot 检测

胰酶消化离心收集重组质粒 pEGFP-N1/Pdx1 转染的目的细胞,蛋白抽提试剂裂解细胞核并收集裂解物冰浴,离心取 20  $\mu$ L 上清上样于质量分数为 15% 的 SDS-PAGE 胶,恒压 120 V,泳动 2 h 后用湿转移法,电转印到 0.22  $\mu$ m 孔径的 PVDF 膜上,在质量分数为 5% 脱脂牛奶 TBST 的封闭液中,室温 1 h。TBST 漂洗 1 次;加入鼠抗人 PDX1 一抗,4  $^{\circ}$ C 振荡过夜。TBST 液漂洗 3 次,每次 15 min,加入 HRP 标记的抗鼠二抗识别,室温振荡 1 h 后漂洗 3 次,ECL 显色。

2 结果

2.1 限制性内切酶酶切、PCR 结果与序列分析鉴定

融合质粒 pEGFP-N1/Pdx1 经 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切后,电泳可见大小约为 4.7 与 0.87 kb 两片段,载体 pEGFP-N1 经上述两个酶双酶切后,仅见一条 4.7 kb 的片段(见图 1)。以 P3、P4 为引物,以融合质粒 pEGFP-N1/Pdx1 为模板,可分别扩增出约 0.88 kb 的产物。对质粒 pEGFP-N1/Pdx1 多克隆位点(multiple cloning sites, MCS)内的 DNA 序列进行序列分析鉴定,测序结果与人 Pdx1 的序列完全相同。



M1:1kb 的 DNA marker;M2:100 bp DNA marker;1,2,3 泳道分别为经 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切的 pEGFP-N1,pEGFP-N1/Pdx1 和 Pdx1 的 PCR 产物。

图 1 Pdx1 PCR 及 pEGFP-N1/Pdx1 相应双酶切结果

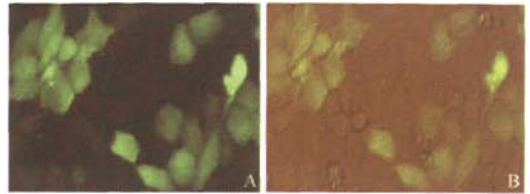
2.2 荧光观测

pEGFP-N1/Pdx1 转染的细胞在 37  $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 含体积分数 10% 新生牛血清,100 IU/mL 青霉素和 100 IU/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基中培养,48 h 后荧光显微镜下观察可观测到转染细胞内有较强的绿色荧光,细胞阳性率较高,通过读数阳性细胞率约 60% (见图 2)。

2.3 RT-PCR 检测

收集 pEGFP-N1/Pdx1 转染后 1、4 和 8 d 的 L02

细胞,提取 mRNA 进行反转录后,RT-PCR 检测结果有目的基因 Pdx1 表达,具体见图 3。



A. 荧光镜下图( $\times 200$ ), B. 光镜下与荧光镜下复合图( $\times 200$ )

图 2 荧光显微镜下的转染 pEGFP-N1/Pdx1 的 L02 细胞

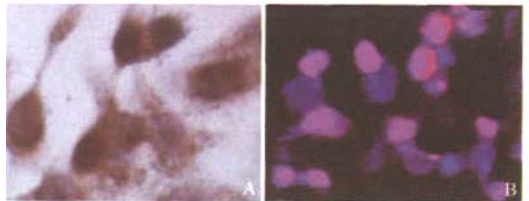


M1:100 bp DNA marker; 1, 2, 3 泳道分别为转染后 1、4 和 8 d 的 L02 细胞中 Pdx1 的表达情况; 4 泳道为对照组

图 3 pEGFP-N1/Pdx1 转染的 L02 细胞中 Pdx1 基因表达

2.4 Pdx1 转录因子在 L02 细胞中表达

采用未转染细胞为空白对照和转染了空质粒 pEGFP-N1 的细胞为阴性对照。免疫组化染色检测显示, pEGFP-N1/Pdx1 转染的 L02 细胞中 Pdx1 高表达,棕黄色阳性信号主要位于胞核,而胞质中相对较少,见图 4A。间接荧光检测显示, pEGFP-N1/Pdx1 转染后的第 2 天开始在 L02 细胞中 PDX1 表达呈阳性,其中 PDX1 主要位于胞核,极少部分位于胞质中,见图 4B。

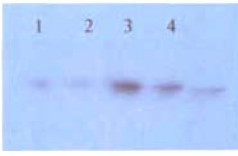


A. PDX1 表达的阳性细胞核呈棕褐色( $\times 200$ );B. 蓝色荧光为细胞核,红色荧光为核内的 PDX1( $\times 200$ )

图 4 PDX1 在 L02 细胞的细胞核中表达

2.5 Western blot 检测

采用细胞质和核蛋白提取试剂盒,分别提取 pEGFP-N1/Pdx1 转染 2、4、8 和 16 d 后 L02 细胞的细胞质和细胞核蛋白进行 Western blot 检测,结果表明 pEGFP-N1/Pdx1 转染组可检测到 PDX1 蛋白(相对分子质量约 48 000),见图 5。



1、2、3、4 分别为转染 2、4、8 和 16 d 后 L02 细胞中 PDX1 蛋白的表达情况

图5 PDX1 蛋白 Western blot 分析结果

### 3 讨论

Pdx1 是胰岛内分泌细胞群发育的关键性调控基因之一<sup>[1-3]</sup>, 该基因的 5' 侧翼区 (5'-flanking region) 含有 3 个核高敏感位点 (nuclease hypersensitive site, HSS)<sup>[4]</sup>, 许多转录调控因子如 HNF3 $\beta$ 、HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$  及 PDX1 蛋白与核高敏感位点相结合, 调控其下游靶基因 (如 Nkx6.1、GLUT2、GK) 的表达<sup>[5-6]</sup>。研究显示 Pdx1 具有促进早期胰腺发育和晚期  $\beta$  细胞分化, 维持成熟  $\beta$  细胞形态和功能, 以及调控胰岛素分泌相关基因等多方面的重要作用, 但 Pdx1 的转录因子相互作用能否协同影响对细胞向内分泌  $\beta$  细胞分化进程中某些关键转录因子的是通过何种途径来活化下游基因, 上游相关因子如何调控 Pdx1 的转录与表达, 以及与相关表达, 进一步通过调控网络如何影响胰岛素分泌等诸多问题尚不清楚, 因此, 建立一个具有生物学功能的 PDX1 蛋白表达系统, 对深入研究 Pdx1 的生物学功能及分子机制有着十分重要的作用。

在本研究中, 利用人胚胎胰腺组织的 mRNA 为模板, 反转录为 cDNA; 在 Pdx1 引物序列中分别设计特异性酶切位点 (*Nhe* I 和 *Xho* I), 进行 PCR 成功获得目的基因 Pdx1, 进一步通过酶切与酶连作用后, 使两基因按照正确的方向克隆到 pEGFP-N1 的 MCS 位点, 成功构建了真核表达载体 pEGFP-N1/Pdx1, 通过测序与 Genebank 检索得到的人类 Pdx1 cDNA 序列符合程度达到 100%。为进一步研究载体中目的基因 Pdx1 是否可以在人肝细胞中有效表达, 应用载体 pEGFP-N1/Pdx1 通过阳离子聚合物转染试剂 JetPEI<sup>TM</sup> 成功地转染靶细胞 L02 肝细胞株, RT-PCR 证实 L02 细胞高表达目的基因 Pdx1; 在转染 2 d 后 Western Blot 即可检测到 PDX1 蛋白; 免疫细胞化学与间接荧光也都证实 Pdx1 在 L02 细胞中有效表达, 且目的基因主要在靶细胞的细胞核中表达, 提示目的基因可通过自身信号肽可进入细胞核内; 同时 pEGFP-N1/Pdx1 成功转染 L02 细胞持续作

用后, 免疫细胞化学与间接荧光阳性细胞形态渐变圆, 并有聚集趋势, 这些结果有力地证实本研究克隆的目的基因 Pdx1 虽是插入 pEGFP-N1 的 C-末端, 在 pEGFP-N1 启动子的作用下与下游 EGFP 表达形成融合蛋白<sup>[7]</sup>, 但并未影响其目的蛋白的生物学功能; 另一方面, pEGFP-N1/Pdx1 以 EGFP 作为报告基因, 便于检测细胞水平上的快速筛选, 优化与提高转染效率, 降低细胞损伤, 进一步有利于模拟胰腺体内发生、发育的基因时序表达调控环境, 以从基因水平探讨 Pdx1 在靶细胞定向分化为胰岛素分泌细胞中的调控作用。因此, pEGFP-N1/Pdx1 真核表达质粒的构建对深入研究下游有关靶细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞提供了实验基础, 进而为推动  $\beta$  细胞工程治疗糖尿病提供一个新的研究工具。

#### [参考文献]

- [1] HABENER J F, KEMP D M, THOMAS M K. Transcriptional regulation in pancreatic development[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(3): 1025 - 1034.
- [2] FUJITANI Y, FUJITANI S, BOYER D F, et al. Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation [J]. *Genes & Dev*, 2006, 20(2): 253 - 266.
- [3] WANG A Y, EHRHARDT A, XU H, et al. Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using Pdx-1 or neurogenin-3 in the liver[J]. *Mol Ther*. 2007, 15(2): 255 - 263.
- [4] LAVON N, YANUKA O, BENVENISTY N. The effect of overexpression of Pdx1 and Foxa2 on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(8): 1923 - 1930.
- [5] ODOM D T, ZIZLSPERGER N, GORDON D B, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors [J]. *Science*, 2004, 303 (5662): 1378 - 1381.
- [6] FUJITANI Y, FUJITANI S, BOYER D F, et al. Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation [J]. *Genes & Dev*, 2006, 20(2): 253 - 266.
- [7] 肖希斌, 谢兆霞. pEGFP-C1/U6 质粒载体介导的表达 MDR1shRNA 的质粒构建[J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(2): 384 - 387.

[责任编辑: 李 弘, 朱颖嫒]