

人 *NOD8* 基因启动子绿色荧光蛋白 表达载体的构建与鉴定

曾 琪, 胡巢凤, 孙丽萍, 陆大祥

(暨南大学医学院病理生理学教研室, 发热研究室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 构建人 *NOD8* 基因启动子的绿色荧光蛋白表达载体。方法: 用特定的限制性内切酶位点, 以人基因组 DNA 为模板, PCR 扩增含有人 *NOD8* 基因启动子不同长度 2 段序列, 并进行酶切以切除启动子的 *pEGFP-C2* 作框架结构, 插入表达载体 *pEGFP-C2* 中, 构建含有人 *NOD8* 基因启动子驱动的绿色荧光蛋白载体 *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp)、*pEGFP-C2-NOD8* (760 bp), 用 *Vsp* I 和 *Nhe* I 双酶切和 PCR 鉴定重组质粒, 再将重组质粒进行 DNA 序列分析。构建的重组质粒经脂质体 (lipofectamine)TM2000 介导转染 HEK293、K562 和 HeLa 细胞, 转染 48 h 后在倒置荧光显微镜下观察。结果: *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp)、*pEGFP-C2-NOD8* (760 bp) 分别经酶切鉴定和序列测定证实目的基因已插入重组质粒; 细胞转染结果表明, 构建的 2 段重组质粒转染 HEK293、K562 及 HeLa 细胞均能表达绿色荧光, 其中构建的 *pEGFP-C2-NOD8* (760 bp) 重组质粒绿色荧光表达强于 *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp)。结论: 成功构建 2 段不同长度的人 *NOD8* 基因启动子绿色荧光蛋白表达载体。

[关键词] 核苷酸结合寡聚化结构域 8 启动子 (*NOD8* 启动子); 载体; 绿色荧光蛋白; 基因表达

[中图分类号] R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)02-0128-05

Construction of GFP expression vector driven by promoter of human *NOD8* gene

ZENG Qi, HU Chao-feng, SUN Li-ping, LU Da-xiang

(Department of Pathophysiology, Institute of Fever Research, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To construct a specific GFP expression vector driven by promoter of human *NOD8* gene. **Methods:** Two DNA segments of *NOD8* gene promoter were amplified by PCR from human genome DNA and correctly connected to the vector *pEGFP-C2* which had cut out promoter by restriction enzyme. Two sequences of constructed *pEGFP-C2-NOD8* plasmids were analysed after identified by *Vsp* I and *Nhe* I restriction digestion, PCR and sequence analysis. Recombinant plasmids were transferred into cell line HEK293, K562 and HeLa by lipofectamineTM2000. The transfection 48 hours later under the inverted fluorescence microscope to observe. **Results:** Two constructed *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp)、*pEGFP-C2-NOD8* (760 bp) plasmids were the same as the design confirmed by restriction digestion and sequence analysis. The results of cell transient transfection indicated that the GFP could be observed in HEK293, K562 and HeLa by two plasmids transfection. The GFP expression of constructed *pEGFP-C2-NOD8* (760 bp) is stronger than that of *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp). **Conclusion:** The GFP expression vector driven by human *NOD8* gene promoter is successfully constructed, which establishes favourable bases for further

[收稿日期] 2008-09-26

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(06025159); 广东省教育厅自然科学基金项目(粤财教2005-126)

[作者简介] 曾 琪(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 疾病的神经免疫调控

通讯作者: 胡巢凤, 女, 教授, 硕士生导师, Tel: 020-85228079; E-mail: thcf@jnu.edu.cn

study on the mechanism of *NOD8* gene expression and regulation.

[Key words] nucleotide-binding oligomerization domain-8 (*NOD8*) promoter; vector; green fluorescent protein (GFP); gene expression

目前的研究认为,哺乳动物具有两个微生物识别系统,一个系统是由称为 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 的膜结合受体家族组成,TLRs 是病原微生物跨膜信号转导的重要受体,主要参与机体抗感染的防御反应^[1-2]。另一个识别系统是核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) 样受体 (NOD-like receptors, NLRs), 也称为 NOD 蛋白, NLRs 位于胞浆,参与对细胞内病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的识别并诱导炎症反应^[3-5]。

研究发现人类基因组中有 20 多个 NLRs 成员^[6-7], *NOD8* 是 NLRs 的一个成员,可能是一种新型的炎症和凋亡信号转导的负调节蛋白^[6]。 *NOD8* 可以与 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 相互作用,并抑制其多种作用, ASC 可激活 NF- κ B 和 caspase-1, 诱导炎症及凋亡^[6]。 *NOD8* 的 mRNA 表达于所有器官,其中高表达于心脏,脑,骨骼肌。而研究表明 ASC 在这些组织中表达的相对较少^[7]。 *NOD8* 突变所引发的疾病为家族性地中海热和寒冷诱导自发炎症综合症^[8]。

目前国内外 *NOD8* 蛋白的研究主要集中在其功能、信号转导方面,而对其基因调控却知之甚少。本研究将不同长度 *NOD8* 启动子构建到切除启动子的 *pEGFP-C2* 质粒中,构建人 *NOD8* 基因启动子绿色荧光蛋白表达载体,并转染 HEK293、K562 和 HeLa 细胞,为进一步深入探索 *NOD8* 启动子中不同反式因子作用结合位点对 *NOD8* 的基因调控提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒 *pEGFP-C2*、大肠杆菌 *E. coli*. DH5a 为本室保存; DNA 多聚酶 pyobest、dNTP 及相关的 buffer 购自大连 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Vsp* I、*Nhe* I 为 MBI 公司产品;T4 DNA 连接酶购自美国 promega 公司;DNA Marker 等为北京普博公司产品。质粒小量抽提试剂盒,PCR 产物纯化及胶回收试剂盒购自 Omega 公司;细胞转染所用脂质体 lipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品;HEK293 (人胚肾上皮细胞)、K562 (人慢性髓源白血病细胞) 及 HeLa (子

宫颈癌细胞) 细胞株购自中科院上海细胞所。细胞培养基 DMEM 为 Hyclone 公司产品,胎牛血清为杭州四季青公司产品。常用试剂中电泳及分离试剂均为分析纯试剂配制。

1.2 实验方法

(1) 引物设计及合成 *NOD8* 基因启动子不同结构域 DNA 片段的制备 根据 GenBank 提供的 *NOD8* 基因组序列 (序列号 NM_176821) 和所选用的质粒 *pEGFP-C2* 设计合成两对引物。所扩增的片段大小为 520 bp 与 760 bp;其中 520 bp 片段中包含人转录因子 COUP-TF2 结合位点,760 bp 片段中包含 COUP-TF2 和 AIRE (auto immune regulator) 结合位点。引物均由上海生工合成。两条上游引物分别为:

U1 (-50 ~ -569 bp): 5'GGCGGCATTAATACT-AAAAATACAAAAGTGAGCTG 3';

U2 (-50 ~ -759 bp): 5' GGCGGCATTAATCAATGGGTGAGTGTAG 3';

共同的下游引物为: D: 5'CATGCTAGCCCCA-AGTTATAGAGCGGAGG 3'在上游引物和下游引物的 5'端分别引入 *Vsp* I 和 *Nhe* I 的酶切位点(下划线序列)。

(2) PCR 扩增目的基因片段 以人基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出相应片段,反应体系如下:模版 1 μ L、10 \times PCR 缓冲液 2 μ L、引物 (10 mmol/L) 各 1 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L 及 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 加 H₂O 至 50 μ L 混匀。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变形 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物长度分别为 520 bp、760 bp。扩增产物在含 0.5 mg/L 溴化乙锭 (EB) 的 10 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳分析,用紫外观测仪观察结果。

(3) *NOD8* 基因启动子目的片段的酶切与回收 *NOD8* 基因启动子不同结构域 DNA 片段 PCR 扩增后经 10g/L 的琼脂糖凝胶电泳分离目的片断,用 Omega Agarose Gel DNA Purification Kit 胶回收试剂盒切胶回收目的 DNA 片断,按说明书操作。经 *Vsp* I 和 *Nhe* I 双酶切后经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离目的片断,切胶回收目的 DNA 片断,方法同前。

(4) 载体的酶切与回收 含有质粒 *pEGFP-C2*

的菌液复苏后,用小量质粒抽提试剂盒提取质粒。将其用 *Vsp* I 和 *Nhe* I 双酶切,酶切产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离载体 DNA 片段,方法同前。

(5) 真核表达载体 *pEGFP-C2-NOD8* 的构建及鉴定 分别用经限制性内切酶 *Vsp* I 和 *Nhe* I 双酶切并经凝胶电泳鉴定回收后的 PCR 产物和切除启动子的质粒 *pEGFP-C2*,在 T4 DNA 连接酶作用下

16℃ 连接过夜。用氯化钙法制备感受态,连接产物转化大肠杆菌 DH5a,将转化的菌液涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,37℃ 培养 16 h,挑取阳性克隆,扩大培养后小量提取质粒,进行 *Vsp* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定。经上述方法鉴定后的重组质粒进行 DNA 序列分析,由大连 TaKaRa 公司测序,序列确证无误后,再大量扩增(图 1)。

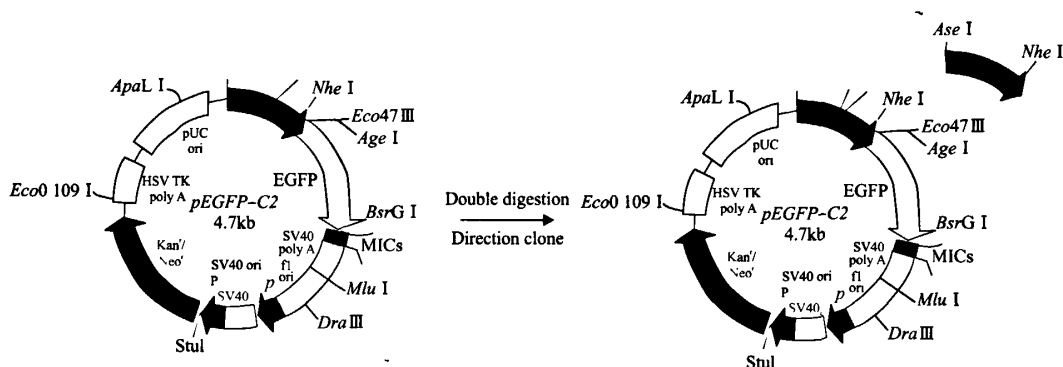


图 1 *pEGFP-C2-NOD8*(520 bp) wt、*pEGFP-C2-NOD8*(760 bp) wt 重组质粒的构建

(6) 细胞培养及细胞基因转染 采用 DMEM 培养液,按总溶液体积的 10% 添加胎牛血清及青霉素和链霉素各 100 μg/mL,在 37℃、体积分数为 5% CO₂ 条件下进行细胞培养及传代。转染前 1 d 将 HEK293、K562 及 HeLa 细胞按 5 × 10⁵ 细胞/mL 的密度分别接种于 6 孔板内,待细胞生长至 80% 融合时进行转染。将 2 μg 质粒 DNA 稀释于无血清 OPTI-DMEM 至终体积 500 μL,取 5 μL lipofectamine™2000,用 500 μL 无血清 OPTI-DMEM 稀释并混匀,室温静置 5 min。随后,将二者轻轻混匀,室温下孵育 20 min;转染前用无血清无抗生素的 DMEM 将待转染细胞洗 1 次后,再将 DNA/lipofectamine™2000 混合物加入 6 孔板,轻轻混匀,置于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中孵育。转染 5 h 后终止反应,并换成新鲜的体积分数为 10% FBS 新鲜 DMEM 培养基,置于 CO₂ 培养箱继续培养。

(7) 实验分组 实验分为:① *pEGFP-C2* 转染组;② 未转染质粒组;③ *pEGFP-C2-NOD8*(520 bp) wt 转染组;④ *pEGFP-C2-NOD8*(760 bp) wt 转染组;分别转染 K293、K562 及 HeLa 细胞。

(8) 荧光显微镜检测荧光表达 将转染的 HEK293、K562 和 HeLa 细胞置于倒置荧光显微镜(Olympus BX-51)下,观察细胞中绿色荧光的表达,用 488 nm 波长紫外光激发,发射光波长为 507 nm,转染后 24 h 以荧光倒置显微镜开始观察。

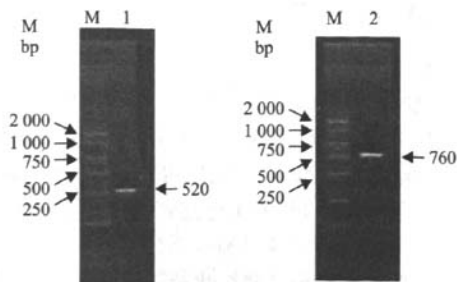
(9) 重组质粒转染真核细胞后荧光灰度值检测

每组细胞分别取不重叠的 20 个视野,通过 Leica Qwin 图像分析系统,在相同灰度阈值设定条件下测出整个背景视野的灰度值(GA),视野内荧光阳性细胞灰度值(Ca)。荧光强度灰度值 = (Ca - GA)。荧光强度越低荧光越弱,灰度值越高荧光越强。应用 SPSS 13.0 统计软件进行 F 检验分析各组实验数据,所有数据用(均数 ± 标准差)表示, *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 NOD8 基因启动子不同结构域 DNA 片段的 PCR 扩增

琼脂糖凝胶电泳显示,扩增的基因片段的大小分别为 520 bp、760 bp,结果与预期设计一致(图 2)。

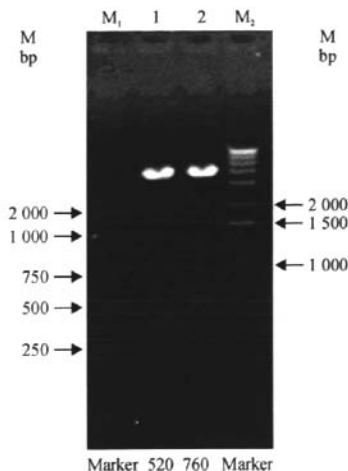


M: DGL 2000 DNA mark; 1: *pEGFP-C2-NOD8*(520 bp) wt; 2: *pEGFP-C2-NOD8*(760 bp) wt

图 2 NOD8 启动子不同片段的 PCR 扩增产物

2.2 重组表达载体的酶切鉴定

将构建的重组 DNA 用 *Vsp* I 和 *Nhe* I 双酶切, 分别获得大小为 520 bp、760 bp 的基因片段(图 3),



M₁: DGL2000 DNA mark; M₂: 1 kb mark; 1: *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp) wt; 2: *pEGFP-C2-NOD8* (760 bp) wt

图3 重组质粒用 *Vsp* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定

表明人 *NOD8* 基因启动子不同长度的 2 段序列已被插入到 *pEGFP-C2* 中。

2.3 PCR 产物的序列分析

所得序列的结果联网到 NCBI 进行同源性分析, 同源性为 100%。测序结果与 GenBank 数据库相应的 *NOD8* 基因启动子 DNA 序列完全一致, 表明成功构建含有 *NOD8* 基因启动子序列及基因的表达载体。

2.4 重组质粒在真核细胞中的表达

pEGFP-C2 转染组转染 HEK293 细胞后 24 h, 荧光倒置显微镜下可见绿色荧光蛋白表达, 且随培养时间的延长绿色荧光蛋白表达增多、亮度增强, 48 h 最高。转染组在 HEK293 细胞中表达绿色荧光较强(图 4), 在 K562 细胞绿色荧光较弱, HeLa 细胞内绿色荧光表达最弱(图未列出), 未转染质粒组镜下未观察到绿色荧光。重组质粒 *pEGFP-C2-NOD8* (760 bp) wt 表达的绿色荧光较 *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp) wt 强。实验重复 3 次以上, 结果均一致。

A: 阳性对照组 *pEGFP-C2*; B: *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp); C: *pEGFP-C2-NOD8* (760 bp); D: 阴性对照组

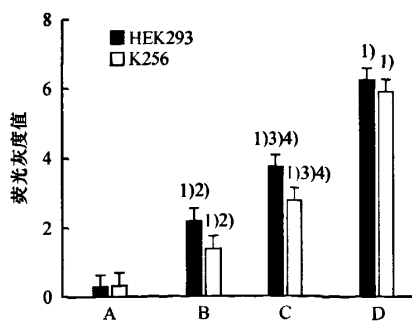
图4 质粒转入 HEK293 细胞后 48 h 绿色荧光表达情况(×200)

2.5 荧光灰度值检测结果

由于 HeLa 细胞内绿色荧光蛋白表达较弱, 因此只检测了 HEK293 和 K562 细胞荧光灰度值。转染的 HEK293 和 K562 细胞中, 对照 *pEGFP-C2* 转染组荧光灰度值高于 2 个重组质粒 *pEGFP-C2-NOD8* wt 组 ($P < 0.05$); 重组质粒 *pEGFP-C2-NOD8* (760 bp) wt 转染组灰度值高于 *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp) wt 转染组 ($P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

NOD 蛋白是一个胞浆蛋白家族, 广泛存在于植物、线虫、脊椎动物和人类的胞浆内, 在遗传上高度保守, 参与对细菌的识别及诱导炎症反应。*NOD8* 基因位于 16q12, 编码 *NOD8/NALP10* 蛋白, mRNA 可表达于各种组织细胞系中, *NOD8* 基因调控的研究将为防治各种感染性疾病提供依据。



A: 阴性对照组; B: *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp); C: *pEGFP-C2-NOD8* (760 bp); D: 阳性对照组 *pEGFP-C2*. 1) 与阴性对照组相比 $P < 0.05$; 2) 与阳性对照组 *pEGFP-C2* 相比 $P < 0.01$; 3) 与阳性对照组 *pEGFP-C2* 相比 $P < 0.05$; 4) 与转染组 *pEGFP-C2-NOD8* (520 bp) 相比 $P < 0.05$

图5 质粒转染 HEK293 细胞和 K562 细胞荧光灰度值检测结果

在外源基因转录活性的研究中,应用报告基因技术,可研究启动子和增强子对基因表达的调控作用^[9-10]。目前,对于基因转录调控的研究多采用瞬时转染及检测报告基因的表达来分析启动子活性。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因本身就是一个生物发光系统,其发光过程不需要其它外源性底物参与,是一种接受紫外或蓝光辐射时就能引发生物发光反应(bioluminescence reaction)的报告基因。GFP对寄主细胞不存在毒性,并且所克隆转染细胞有稳定性好,可连续传代,高水平表达GFP基因及活细胞直接观察等优点。所以GFP作为一种新型报告基因来研究细胞基因表达,调控,转基因动物,细胞分化及蛋白定位的检测等较其它报告基因有明显优势^[11],被广泛用于研究某特定基因在活体条件下的表达情况,细胞内的定位及功能分析。

本实验中将载体的CMV立早启动子/增强子通过限制性内切酶换成NOD8基因的启动子,并通过脂质体介导将重组质粒转染HEK293、K562和HeLa细胞进行瞬时表达;并选用在大多哺乳动物细胞均表达的强效启动子CMV作为阳性对照,以示GFP表达的有效性,并比较包含不同顺式作用元件的启动子的启动效率。酶切和DNA测序的结果均证实所构建的NOD8启动子驱动的绿色荧光蛋白报告基因载体是正确的。在细胞内的转染实验发现,转染不同细胞株的NOD8启动子片段驱动的绿色荧光蛋白的表达的强度由强至弱依次为转染HEK293细胞、K562细胞、HeLa细胞;此结果表明含NOD8启动子的质粒在HEK293细胞中转染效率最高。转染包含不同反式作用因子结合位点的NOD8启动子片段驱动的绿色荧光蛋白的表达的强度由强至弱依次为CMV启动子、pEGFP-C2-NOD8(760 bp)启动子与pEGFP-C2-NOD8(520 bp)启动子;pEGFP-C2-NOD8(520 bp)启动子中有COUP-TFII的结合位点,pEGFP-C2-NOD8(760 bp)启动子中有COUP-TFII和AIRE的结合位点。COUP-TFII与其在NOD8基因启动子上的结合位点结合可抑制相关基因的表达;AIRE是一种具有转录活化潜能的DNA结合蛋白,具有很强的转录活性,与NOD8基因启动子上的结合位点结合可增强转录活性。故此,本研究所构建的不同长度的NOD8启动子因包含的反式作用因子结合位点不同,驱动的绿色荧光蛋白报告基因表达的荧光强度也不相同,且与反式作用因子的正负调节功能有相一致的变化关系,对研究NOD8基因

表达的调控机制具有重要意义。

[参考文献]

- [1] BECKER C E, O'NEILL L A. Inflammasomes in inflammatory disorders; the role of TLRs and their interactions with NLRs [J]. *Semin Immunopathol*, 2007, 29(3): 239-248.
- [2] UNDERHILL D M. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods [J]. *Immunol Rev*, 2007, 21(9): 75-87.
- [3] CHURCH L D, COOK G P, MCDERMOTT M F. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008, 4(1): 34-42.
- [4] FRITZ J H, FERRERO R L, PHILPOTT D J, et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease [J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(12): 1250-1257.
- [5] 胡巢凤. 参与免疫及炎症反应调控的胞浆蛋白NODs [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(7): 1304-1307.
- [6] WANG Y, Hasegawa M, Imamura R, et al. PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1 [J]. *International Immunology*, 2004, 16(6): 777-786.
- [7] MASUMOTO J, TANIGUCHI S, AYUKAWA K, et al. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(4): 33835-33838.
- [8] HOFFMAN H M, MUELLER J L, BROIDE D H, et al. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome [J]. *Nature Genet*, 2001, 29(3): 301-305.
- [9] LEE C M, LO H W, SHAO R P, et al. Selective activation of ceruloplasmin promoter in ovarian tumors: potential use for gene therapy [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1788-1793.
- [10] HANKE P, SERWE M, DOMBROWSKI F, et al. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(3): 346-355.
- [11] VADEZB C, PERLAKYL, CAI Z J, et al. Green fluorescent protein tag for studies of drug-induced translocation of nucleolar protein R H-II/Gu [J]. *Biotechniques*, 1998, 24(6): 1032-1036.

[责任编辑:朱颖嫒]