



大鼠膜联蛋白 A₂ 真核表达载体的构建及表达*

刘庆梅¹ 怀娟¹ 张杨¹ 姜虹² 岳寿伟^{1,3}

摘要

目的:克隆大鼠背根神经节膜联蛋白 A₂(annexin II)的基因,构建真核表达载体并检测其表达。

方法:以 RT-PCR 法扩增大鼠背根神经节(DRG)细胞中膜联蛋白 A₂(annexin II)的基因,构建 pGMT-Anxa2 克隆载体,以此为模板插入 flag 标签扩增 Anxa2-flag 序列,将其定向插入真核表达载体 pcDNA3.1(+),获得表达载体 pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag。以 PCR、双酶切及序列测定法鉴定该质粒。以脂质体法将表达载体转染到 HEK293 细胞中,Western 印迹和细胞免疫荧光检测 annexin II 蛋白表达及细胞内定位。

结果:PCR 扩增 Anxa2-flag 片段大小与预期相同。通过 PCR、HindⅢ和 Not I 双酶切及测序鉴定,证明构建出了含大鼠 annexin II 基因的真核表达载体。Western 印迹和细胞免疫荧光的检测表明大鼠 annexin II 基因稳定表达,并可在胞膜和胞质中广泛表达。

结论:成功构建 pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag 真核表达载体,并稳定表达蛋白,为研究 annexin II 调控 DRG 伤害性感受传导的分子机制奠定基础。

关键词 背根神经节;膜联蛋白 A₂;真核表达载体;Western 印迹;免疫荧光

中图分类号:R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-10-0937-05

Construction and expression of eukaryotic expression vector for rat annexin II/LIU Qingmei, HUAI Juan, ZHANG Yang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(10): 937—941

Abstract

Objective: To obtain annexin II gene, construct it's eukaryotic expression vector and observe it's expression.

Method: According to the Genbank, the coding sequence of rat annexin II gene Anxa2 was cloned by RT-PCR method from rat dorsal root ganglion(DRG) cells, and pGMT-Anxa2 was constructed, according to which, Anxa2-flag was amplified by inserting the flag-tagged sequences to the C-terminal. Then Anxa2-flag was ligated into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The vector was evaluated by HindⅢ and Not I double enzyme incision, PCR and sequence analysis. Recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-Anxa2 was transfected into HEK293 cells by using lipofectamine 2000, while Western blot and immunofluorescence were used to detect the expression and localization of rat annexin II protein in the transfected cells in vitro.

Result: The size of PCR amplified product of Anxa2-flag was consistent with the expected fragment. Recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag was proved to be correct by HindⅢ and Not I double enzyme incision, PCR and sequence analysis. Western blot and immunofluorescence results indicated that rat annexin II protein expressed stably in HEK293 cell, and diffusely distributed throughout plasma membrane and cytoplasm.

Conclusion: The eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag was constructed successfully, which could effectively expressed in HEK293. This will facilitate the further study of molecular mechanism of annexin II in DRG's nociceptive pain conduction.

Author's address Qilu Hospital, Shandong University, Jinan, 250012

Key words dorsal root ganglia; annexin II; eukaryotic expression vector; Western blot; immunofluorescence

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.10.004

* 基金项目:国家自然科学基金资助课题(30872732,81071597);山东省自然科学基金资助课题(Z2007C04)

1 山东大学齐鲁医院康复理疗科,济南,250012; 2 山东大学齐鲁医院教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室; 3 通讯作者
作者简介:刘庆梅,女,硕士研究生在读; 收稿日期:2010-08-02

神经病理性疼痛是神经系统损伤引起的一种慢性状态,国际疼痛研究协会称之为“来源于或者由神经系统的功能紊乱引起”^[1]。背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 作为痛觉传入的第一级神经元,在神经病理性疼痛的外周机制中起着重要作用。目前研究表明细胞骨架及其相关蛋白,如膜联蛋白 A₂ (annexin II, annexin A₂) 与 DRG 伤害性感受传导过程关系密切,但分子机制尚不明确。annexin II 是膜联蛋白超家族成员,聚集在肌动蛋白富集的地方,与肌动蛋白直接相连,是细胞骨架相关蛋白^[2],它受 Ca²⁺ 调节,在生物膜的形成、胞吞胞吐、离子转运等方面起重要作用^[3]。本实验提取大鼠 DRG 中 annexin II 的基因 Anxa2,构建其真核表达载体,并对其在哺乳动物细胞中的表达通过 Western blot 和细胞免疫荧光的方法作了初步鉴定,为深入研究 annexin II 在调控 DRG 伤害性感受传导过程中的分子机制及明确与其相互作用的蛋白奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞

质粒 pcDNA3.1 (+) (美国 Invitrogen 公司)、Top 10 感受态细胞 (北京天根生化科技有限公司)、人胚胎肾 HEK293 细胞 (山东大学齐鲁医院心血管实验室保存)。

1.2 工具酶和试剂

Primescript 1st Strand cDNA Synthesis Kit、高保真聚合酶 PrimeSTARTTM HS DNA Polymerase、200bpDNA ladder marker、限制性内切酶 HindIII、NotI、T4 连接酶 (Takara 公司); pGM-T 克隆试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、小量质粒抽提试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); 总 RNA 提取试剂、Lipofectamine2000 (Lip2000) (美国 Invitrogen 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)、DAPI 染色液、抗荧光淬灭封片液 (碧云天生物技术研究); DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司); 胎牛血清 (TBD); 鼠源 anti-Flag 单克隆抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); 山羊血清 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司); 琼脂糖 (美国 Cambrex 公司); 蛋白

marker (Fermentas 公司); 显影试剂盒 (美国 Millipore 公司); 其余为国产或进口分析纯试剂。

1.3 基因的制备

参照 Invitrogen 公司的总 RNA 提取试剂盒操作说明书进行,提取大鼠腰部背根神经节组织总 RNA,所有试验用器皿和试剂均经二乙基焦碳酸乙酯 (DEPC) 处理。采用 Takara Primescript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒,按照说明书提供的方法逆转录成 cDNA 第一条链。以此链为模板,加入引物及高保真聚合酶,PCR 扩增 Anxa2 基因的完整编码区。引物由上海博尚生物技术有限公司合成。

引物序列如下:

Anxa2:

F: 5'-TTCAAAATGTCTACTGTCCACGA-3'

R: 5'-GTCATCTTCACAGGGAGGAGTTC-3'

PCR 反应条件: 98℃ 预变性 30s; 98℃ 变性 10s, 55℃ 退火 15s, 72℃ 延伸 1min10s, 扩增 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 8min。扩增后行 1% 琼脂糖凝胶鉴定。

1.4 构建 pGMT-Anxa2 克隆载体并测序

参照天根 pGM-T 克隆反应试剂盒操作说明书,将上述所得 PCR 产物,用琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化,并在 3' 末端加 A 后,与 pGM-T 克隆载体连接。连接产物转化 Top10 感受态细胞后,在 Amp 琼脂平板上挑选克隆后抽提质粒。而后行 PCR 鉴定,将鉴定正确的质粒送上海博尚生物技术有限公司进行测序。

1.5 pcDNA3.1-Anxa2-flag 表达载体的构建

以 pGMT-Anxa2 克隆载体为模板,设计含有 flag 标签序列的引物序列,上下游分别插入 Hind III、Not I 酶切位点,扩增 Anxa2-flag 序列。引物序列如下:

Anxa2:

F: 5' TAA AAGCTT ATGTCTACTGTCCACGAAATCCTG 3'

R: 5' AT GCGGCCGC TTA *CTATCGTCGTCATCCTTG-TAATC* GTCGTCCCCACACACAG 3'

下划线为酶切位点,上游为 Hind III,下游为 Not I 酶切位点,斜体部分为 flag 标签编码序列的反向互补序列。PCR 后切胶回收目的片段,回收产物与 pcDNA3.1(+) 空载体行 Hind III 和 Not I 双酶切,并切

胶回收。将载体与目的基因以 1:5 的比率连接,16℃ 水浴过夜后,转化 Top10 感受态细胞,在 Amp 琼脂平板上挑选克隆,抽提质粒后行 PCR 及酶切鉴定,鉴定为阳性克隆者用 T7、BGH 引物对其进行全序列测定分析,由上海博尚生物技术有限公司完成。

1.6 重组质粒转染 HEK293 细胞

HEK293 细胞使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37℃、5%CO₂ 条件下常规培养,并以每孔内 2×10⁵ 个细胞的密度接种 6 孔板(行细胞免疫荧光需预先置 14mm×14mm 盖玻片于 6 孔板中,制成细胞爬片)。常规培养 6 孔板 24—48h 细胞处于指数生长期,行重组质粒 pcDNA3.1 (+)-Anxa2-flag 和 pcDNA3.1(+)-空载体的脂质体转染,具体步骤参照脂质体 Lipo2000 说明书进行,每孔质粒 2μg,脂质体 5μl,无血清 DMEM 培养基铺板、稀释质粒和脂质体,实验中设 pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag 表达载体组和 pcDNA3.1(+)-空载体对照,并以空转的 HEK293 细胞做为阴性对照组。

1.7 细胞免疫荧光检测 annexin II 蛋白表达及细胞内定位

制成细胞爬片的 6 孔板转染 48h,去除细胞培养上清后,置入 4%多聚甲醛室温固定 15min,PBS 洗涤 3 次,加入 0.2%TritonX-100 的 PBS(PBST)室温作用 5min,之后给予 5%山羊血清的 PBS 室温封闭 1h,随后加入小鼠源性 anti-flag 抗体(1:200)4℃ 孵育过夜,PBST 洗涤 3 次后,避光加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:200)室温孵育 1h,再次 PBST 洗涤 4 次,随后 DAPI 染核 5min,最后用抗荧光淬灭封片液封片并避光待检,于倒置荧光显微镜下观察结果并照相。FITC 激发后可产生绿色荧光,指示目的蛋白 annexin II 的分布;DAPI 激发后可产生蓝色荧光,指示细胞核的分布。

1.8 行 Western blot 检测蛋白表达情况

转染 48—72h 后,蛋白表达最高,收集细胞,细胞裂解液裂解细胞后用蛋白定量测定试剂盒进行总蛋白测定。将提取的蛋白上样约 10μg,经 10%SDS-PAGE 电泳分离后,恒流 200mA 90min 转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉常温封闭 2h 后,以小鼠源性 anti-flag 抗体为一抗(1:500)4℃ 孵育过夜,辣根过氧化物标记的 IgG-HRP 为二抗(1:5000)37℃ 孵育 1h,

最后按照显影底物试剂盒(美国 Millipore 公司)的说明进行放射自显影。

2 结果

2.1 PCR 扩增 Anxa2-flag 片段

以 pGMT-Anxa2 克隆载体为模板扩增 Anxa2 序列,并在终止密码子之前插入 flag 标签,行 1%琼脂糖凝胶电泳,可见 Anxa2-flag 条带约为 1020bp,与预期结果相同,PCR 扩增成功(图 1)。

2.2 重组质粒的鉴定

将重组质粒 pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag 的阳性克隆扩增后提取质粒,进行 PCR 反应,也产生约为 1020bp 的区带。质粒经 Hind III 和 Not I 双酶切鉴定,可切开一 1020bp 的小片段(图 2)。挑取经酶切鉴定的重组克隆进行序列测定,测序结果与 Genbank 中公布的序列进行 blast 比对,显示插入片段的序列与 Anxa2 基因序列完全一致,插入方向和读码框架正确,获得的重组质粒 pcDNA3.1 (+)-Anxa2-flag 构建正确(图 3)。

2.3 细胞免疫荧光检测 annexin II 蛋白及细胞内定位

pcDNA3.1 (+)-Anxa2-flag 重组质粒转染 HEK293 细胞 48h 后,细胞免疫荧光检测到外源 Anxa2 在 HEK293 细胞中有表达。过表达的蛋白广泛定位于胞质和胞膜,与文献报道一致^[4],基本呈均匀分布,而转染 pcDNA3.1(+)-空载体组和阴性对照组的 HEK293 细胞内未检测到标记的蛋白荧光信号(图 4)。

2.4 Western blot 法检测 annexin II 蛋白的表达

转染 HEK293 细胞 72h 后,提取蛋白行 Western blot 示,pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag 表达载体组在相对分子质量约为 36kD 处出现单一蛋白条带,pcDNA3.1(+)-空载体对照组和阴性对照组无特异条带出现,三组的内参 β-actin 表达较均一(图 5)。

3 讨论

目前普遍认为神经病理性疼痛的外周机制主要是外周神经损伤后,DRG 中初级感觉神经元产生大量异位放电,持续刺激脊髓,引起脊髓水平的敏化进而导致神经痛症状的产生^[5]。DRG 又称脊神经节,

图1 PCR扩增出的
anxa2-flag 电泳图

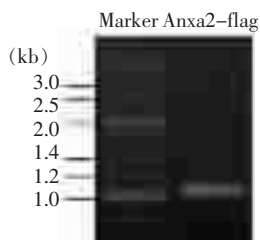


图2 重组质粒 pcDNA3.1
(+)-anxa2-flag 经
HindIII/Not I 双酶切产物

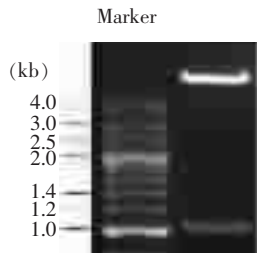


图3 重组质粒 pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag 的
T7 引物基因测序图

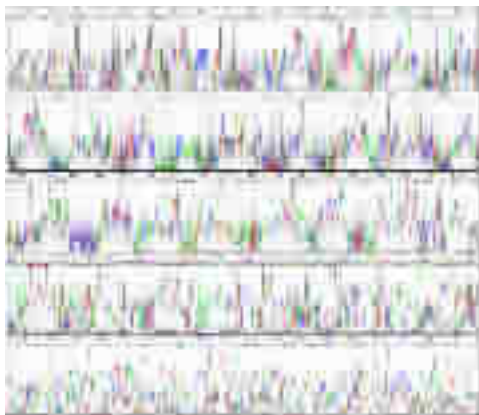
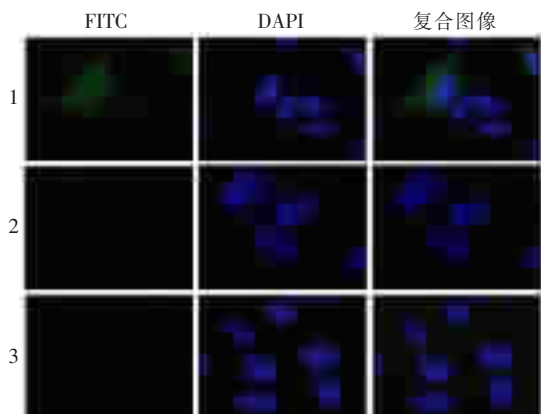


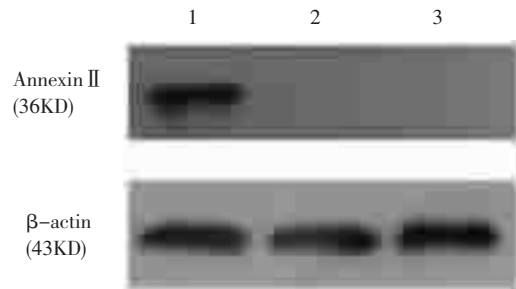
图4 细胞免疫荧光检测 HEK293 细胞中
annexin II 的表达 (×400)



1. pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag 表达载体组;
2. pcDNA3.1(+)空载体对照组; 3. 阴性对照组

是脊髓两侧脊神经背根上的膨大部分,是躯体初级感觉神经元细胞体的聚集处,由大小不同、电生理特征各异的大、中和小神经元组成。DRG 不仅含有多种传递伤害性感觉的神经递质、调质以及疼痛相关

图5 Western blot 检测 HEK293 细胞中 annexin II 的表达



1. pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag 表达载体组; 2. pcDNA3.1(+)空载体对照组; 3. 阴性对照组

的受体,如阿片、 γ 氨基丁酸等受体,还含有特有的或主要在其中表达的、与疼痛密切相关的离子通道,如电压门控性钠通道包括 Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9;瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)家族包括 TRPV1、TRPA1 及 TRPM8 等。这些离子通道的变化与 DRG 的异位放电关系密切,是导致神经病理性疼痛的重要原因^[6]。而目前对神经病理性疼痛机制的研究开始了以蛋白质组学为重点的后基因组时代^[7]。人们发现在神经病理性疼痛病变的神经组织和神经中枢中,细胞骨架及其相关蛋白发生了改变。细胞骨架是位于细胞核和细胞膜内侧面的一种纤维状蛋白基质,在细胞内呈网状、束状或带状等不同形态,由微管、微丝(主要为肌动蛋白)和中间纤维组成。Komori 等发现,脊神经结扎后大鼠 DRG 中 WD 重复蛋白、肌动蛋白、原肌球蛋白和弹性蛋白显著增加,而神经纤丝蛋白明显减少^[8]。本课题组 Zhang 等的研究对持续受压 28d 的大鼠 DRG 进行质谱分析,发现与细胞骨架有关的 annexin II 的表达明显增高^[9]。Komori 等也有此发现^[8]。

annexin II,又名 P36,最早是在劳氏肉瘤病毒/鸡胚成纤维细胞中作为酪氨酸蛋白激酶的作用底物而被发现的^[10]。人的 annexin II 基因定位于 15q21-q22,包括 13 个外显子, mRNA 为 1644bp,编码的蛋白有 339 个氨基酸,分子量 36kDa,结构上具有保守的 C 端结构域,有结合 Ca^{2+} 和磷脂的功能,还含有 F-actin 的结合位点^[11],证明其与肌动蛋白直接相连,可以影响肌动蛋白的组装^[12];N 端结构域较为灵活,是 annexin II 分子的调节区,可与多种离子通道结合,如 TRPV5、TRPV6、TASK-1、ASIC1a 等,促使这



些通道转运到细胞膜上,从而调控这些通道的功能。annexin II 主要有单体、二聚体和异四聚体三种存在形式,其中四聚体是由两个 annexin II 亚基和 S100A10(p11)二聚体结合而成。annexin II 在生物膜的形成、胞吞胞吐、离子转运、成骨细胞的形成和骨的重吸收、DNA 合成及细胞增殖等方面起重要作用^[12]。annexin II 在人体内皮细胞、单核/巨噬细胞、骨髓细胞和某些肿瘤细胞中表达丰富,与人类许多疾病的发生发展相关,如肿瘤、心血管疾病、肾脏疾病等^[13]。近年来有研究表明 annexin II 与 DRG 伤害性感受传导过程有关。Naciff JM 对大鼠背根神经节和脊髓中 annexins I-VI 的差异表达进行研究,发现大鼠 DRG 中大部分感觉神经元表达 annexin II^[14]。Okuse K 的研究发现 annexin II 四聚体形式中的 p11 亚基可调节感觉神经元特异性的 Na 通道(Nav1.8)的表达^[15],而 Nav1.8 通道主要分布在 DRG 上^[16],此通道的变化与 DRG 的异位放电关系密切,被认为是 DRG 神经元刺激后反复放电的基础^[17]。Thomas Foulkes 通过 Cre-loxP 重组酶系统,条件性敲除小鼠 DRG 上伤害性感受神经元中的 p11 基因,可引起小鼠躯体感觉编码及疼痛行为的异常^[18]。

为进一步探讨 annexin II 与 DRG 伤害性感受传导的关系,本实验提取大鼠 DRG 中 annexin II 的基因,构建真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-Anxa2-flag,脂质体介导转染 HEK293 细胞,使其高表达目的蛋白。真核表达载体 pcDNA3.1(+)是一种常用的穿梭载体,可在原核及真核细胞中复制扩增;它具有很强的复制能力,并可随宿主细胞的分裂传递给子代细胞,保证目的基因稳定表达;含有高效增强子 SV40,它是一类能促进基因转染活性的顺式调控元件,可促进高效转染;此载体还具有安全、低毒、低免疫反应等优势,避免了病毒性载体存在的插入突变等致瘤、致癌的风险。本实验中我们将目的基因克隆至 pcDNA3.1(+)载体,同时在 C 端插入 flag 标签。flag 为常用标签,具有纯化功能,通常不会与目的蛋白相互作用或影响目的蛋白的功能、性质,这样就有利用研究人员对融合蛋白进行下游研究;它可以被抗 flag 的抗体识别,这样就方便通过 Western Blot、细胞免疫荧光、ELISA 等方法对含有 flag 的融合蛋白进行检测、鉴定。本实验所采用的脂质体介导的细胞转染

方法,操作简单,效率高,重复性好。且脂质体与 DNA 的结合不受 DNA 片段大小限制,当脂质体/DNA 复合物被吞入细胞后,脂质体可快速降解,而不激活癌基因和免疫反应等特点,较其他基因转移技术相比有更大的优势。但脂质体对细胞有一定毒性,为达到最佳转染效果我们进行了条件优化。本实验通过对比发现:以六孔板为例,细胞密度 80%—90%,每孔脂质体的量为 5 μ l,DNA 与脂质体的质量体积比为 2:5 时,转染效率最高;转染 4h 后更换新鲜含血清培养基对细胞损伤较小。

4 结论

本实验成功构建了带有 annexin II 基因的真核表达质粒 pcDNA3.1 (+)-Anxa2-flag,高效转染 HEK293 细胞并检测到目的蛋白的表达,为下一步深入研究 annexin II 在调控 DRG 伤害性感受传导过程中的分子机制及明确与其相互作用的蛋白奠定了基础。

参考文献

- [1] de Novellis V, Siniscalco D, Galderisi U, et al. Blockade of glutamate mGlu5 receptors in a rat model of neuropathic pain prevents early over-expression of pro-apoptotic genes and morphological changes in dorsal horn lamina II [J]. *Neuropharmacology*, 2004, 46(4):468—479.
- [2] Hayes MJ, Shao D, Bailly M, et al. Regulation of actin dynamics by annexin 2[J]. *EMBO J*, 2006, 25(9):1816—1826.
- [3] Rescher U, Gerke V. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(13):2631—2639.
- [4] Eberhard DA, Karns LR, VandenBerg SR, et al. Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(17):3155—3166.
- [5] Devor M. Neuropathic pain and injured nerve: peripheral mechanisms[J]. *Br Med Bull*, 1991, 47(3):619—630.
- [6] 岳寿伟, 吴宗耀. 神经根损伤后慢性疼痛发生的分子机制[J]. *中国康复医学杂志*, 2004, 19(2):147—149.
- [7] 李玄英, 倪家骧. 神经病理性疼痛的蛋白质组学研究进展[J]. *中国康复理论与实践*, 2009, 15(4):341—344.
- [8] Komori N, Takemori N, Kim HK, et al. Proteomics study of neuropathic and nonneuropathic dorsal root ganglia: altered protein regulation following segmental spinal nerve ligation injury[J]. *Physiol Genomics*, 2007, 29(2):215—230.

(下转 页)