

凋亡诱导因子 AIF 基因真核表达载体的构建及表达*

邓雯文¹, 刘蜀坤^{1,2}, 张遵真^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 环境卫生学教研室(成都 610041);
2. 成都中医药大学公共卫生学院 卫生毒理学教研室(成都 611137)

【摘要】 目的 利用 TA 克隆法构建凋亡诱导因子(AIF)的真核表达载体 AIF-pcDNA3.1(+),并研究其在人肺腺癌 A549 细胞中的表达。方法 根据 GenBank 上 AIF 的 mRNA 序列设计特异性引物,以 A549 细胞总 RNA 为模板,RT-PCR 扩增 AIF 基因。并用 TA 克隆法,将 AIF 目的基因连接到 pUC-T 载体,行双酶切和 DNA 测序鉴定;回收目的片段并将其插入真核表达载体 pcDNA3.1(+),构建重组质粒 AIF-pcDNA3.1(+).最后,将 AIF-pcDNA3.1(+),转染 A549 细胞,RT-PCR 和 Western blot 检测转染细胞 AIF 基因的表达。结果 成功扩增 617 bp 的 AIF 目的基因片段并连接 pUC-T 载体,测序后回收目的片段并与真核表达载体 pcDNA3.1(+),连接,DNA 序列分析显示,连接在真核表达载体上的基因片段与 GenBank 中的 AIF 序列完全吻合。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,转染了 AIF-pcDNA3.1(+),的 A549 细胞 AIF mRNA 和蛋白表达水平均高于未转染细胞($P < 0.05$)。结论 成功构建了真核表达载体 AIF-pcDNA3.1(+),转染后能够在 A549 细胞中表达。

【关键词】 凋亡诱导因子 真核表达载体 TA 克隆 转染

Construction and Expression of the Eukaryotic Expression Vector Containing AIF Gene DENG Wen-wen¹, LIU Shu-kun², ZHANG Zun-zhen^{1△}. 1. Department of Environmental Health, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Hygiene Toxicology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

△ Corresponding author, E-mail: zhangzunzhen@163.com

【Abstract】 Objective To construct the eukaryotic express vector containing apoptosis-inducing factor (AIF) gene and to study its expression in A549 cells. Methods According to the GenBank AIF mRNA sequence, specific primers to amplify AIF gene from lung carcinoma cell line A549 by RT-PCR was designed. The amplified AIF gene fragment was cloned into plasmid pUC-T by TA cloning, then double enzyme digestion and DNA sequencing were used to identifying the positive recombinant AIF-pUC-T. The target fragment was retrieved and cloned into the eukaryotic express vector pcDNA3.1(+). The positive recombinant AIF-pcDNA3.1(+), was transfected into A549 cells, and expression of AIF gene was verified by RT-PCR and Western blot. Results AIF target gene was successfully amplified and cloned into the pUC-T. The target fragment was retrieved and cloned into the eukaryotic express vector pcDNA3.1(+), and it was completely coincided with the AIF sequence in GenBank suggested by the result of DNA sequencing. Showed by the results of RT-PCR and Western blot, AIF gene expression in A549 cells transfected with AIF-pcDNA3.1(+), was much higher than that of control cells which was not transfected with AIF-pcDNA3.1(+). Conclusion The AIF eukaryotic expression vector AIF-pcDNA3.1(+), is successfully constructed in A549 cells and it could be experimental foundations for further study of AIF gene.

【Key words】 Apoptosis-inducing factor Eukaryotic expression vector TA cloning Transfection

凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)是一种广泛存在于正常组织和癌细胞中、与细胞凋亡发生密切相关的黄素蛋白,于1999年首次被 Susin 等^[1]克隆与鉴定。研究显示,当细胞受到凋亡信号刺激时,AIF 从线粒体中释放,核转位进入细胞核,通过其黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)结合域的

DNA 连接活性,直接作用于细胞 DNA,引起染色质固缩和 DNA 的片段化,诱导细胞凋亡。早期研究指出 AIF 诱导细胞凋亡仅通过非 caspase 依赖途径^[2-4],随后发现,AIF 除了诱导非 caspase 依赖途径的细胞凋亡外,还可与细胞色素 C(Cyt-c)、caspase 等产生协同作用,共同参与 caspase 依赖的细胞凋亡途径^[5]。此外,在正常细胞中,AIF 还能够通过 N 端的 FAD 结合域和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)氧化还原的活性,发挥氧化还原酶的作

* 国家自然科学基金(No. 81172632)资助

△ 通讯作者, E-mail: zhangzunzhen@163.com

用,清除细胞内的自由基,维持细胞正常的生理功能^[6]。最新研究提示,AIF 基因在人体不同细胞中的表达与肿瘤细胞的分化程度、神经细胞退化病变过程以及骨骼肌干细胞的数目和表型等密切相关^[7-9]。因此,AIF 基因的表达及其生物学功能受到广泛关注,已成为近年靶向治疗研究的热点^[10]。然而,AIF 的各项功能及其作用机制尚不完全清楚,本研究拟构建 AIF 基因的真核表达载体并检测其在 A549 细胞中的表达,为进一步研究 AIF 基因的作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒小提试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司;pUC-T TA 克隆试剂盒(pUC-T Ligasing Kit, 02222011)、逆转录试剂盒购自康为世纪生物科技(北京)有限公司;E. Z. N. A 琼脂糖凝胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)购自 OMEGA 公司;限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、T4 DNA 连接酶以及蛋白低分子预染 marker 均购自 Fermentas;pcDNA3.1(+) 真核表达载体由四川大学华西第二附属医院屈艺研究员惠赠;TRIzol 总 RNA 提取试剂、脂质体转染试剂 lipo2000 购自 Invitrogen 公司;异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-Gal)购自成都硕博精英科技有限公司;AIF PolyClonal Antibody(兔抗人)、ACTB MonoClonal Antibody(鼠抗人)以及辣根酶标记山羊抗鼠 IgG(H+L)购自 Proteintech 公司;AIF 二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L))为美国进口分装,购自中杉金桥;增强型化学发光(ECL)显影试剂盒购自 Thermo 公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 AIF 引物的合成

根据 GenBank 上 AIF mRNA 序列 AF100928.1,用 Primer 引物设计软件 5.0 进行设计,为了便于回收扩增片段,在基因序列 5'端分别加上 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点(下划线处),扩增产物长度为 617 bp。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。Forward Primer: 5'-GAATTCGCAATCCGTTGGAGTC-3'; Reverse Primer: 5'-GGATCCCACGACCACTTTGTC-3'。

1.3 细胞培养及 AIF 基因扩增

A549 细胞贴壁生长于含体积分数为 10%小牛血清的 DMEM 培养基中,在 37 °C,5%CO₂,饱和湿

度下常规传代培养。取状态良好的处于对数生长期的 A549 细胞,采用 TRIzol 试剂裂解法提取细胞总 RNA,并将其溶于焦碳酸二乙酯(DEPC)水。

按逆转录试剂盒说明操作,以提取的 A549 细胞总 RNA 为模版进行逆转录反应得到 cDNA,再以 cDNA 为模板,扩增 AIF 目的基因。PCR 反应条件:95 °C,预变性 5 min→95 °C,变性 45 s→57 °C 退火 30 s→72 °C 延伸 90 s→72 °C,延伸 10 min→10 °C,8 min→4 °C,10 min,盖温 100 °C,循环 33 次。反应结束后取 PCR 产物 10 μ L 行 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳;UVI 凝胶成像系统拍照并确定目的片段位置,按 E. Z. N. A 琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书操作,回收目的片段,-20 °C 保存备用。

1.4 TA 克隆

利用 TA 克隆方法(可将任意含有 3'-A 末端的 DNA 片段与含有 3'-T 末端的载体通过 T-A 碱基互补配对的原则将外源基因克隆入载体)进行 AIF 基因克隆。按照 pUC-T TA 连接试剂盒的说明,将 0.3 pmol 的目的片段与 1 μ L pUC-T 载体 16 °C 连接过夜,取 10 μ L 连接产物热击转化 100 μ L 感受态大肠杆菌 DH5 α ,取 20~30 μ L 转化后感受态菌涂布于含有氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的选择性培养基上,37 °C 孵箱培养 16 h。挑选培养皿中饱满、独立的白色菌落提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定。将含有阳性重组质粒的菌落保种,并取 1 mL 新鲜菌液进行 DNA 测序鉴定,将鉴定正确的重组质粒命名为 AIF-pUC-T。

1.5 AIF-pcDNA3.1(+)真核表达载体的构建

将带 AIF-pUC-T 质粒的细菌扩大培养并提取质粒,*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切细菌质粒后回收目的片段。取适量 pcDNA3.1(+) 空载体,按同样方法双酶切,回收大于 5 000 bp 的载体片段。取适量目的片段与酶切后的 pcDNA3.1(+) 空载体 16 °C 连接过夜,转化 DH5 α 后取适量菌液涂于氨苄青霉素抗性培养基上,37 °C 过夜培养。挑取单菌落抽提质粒并双酶切,酶切阳性的克隆行 DNA 测序分析,将测序正确的重组质粒命名为 AIF-pcDNA3.1(+)。

1.6 A549 细胞的瞬时转染

根据 6 孔板的面积,将转染试剂 lipo2000 (μ L) 与重组质粒 DNA (μ g) 按 2.5 : 1 的比例对 A549 细胞进行转染,根据 lipo2000 转染试剂说明书操作,以未转染的 A549 细胞为空白对照,于转染后 72 h 收获细胞。

1.7 RT-PCR 检测 AIF mRNA 的表达

将转染后的 A549 细胞和未转染细胞在同一条件下抽提总 RNA, 运用相应引物对 AIF 目的基因进行扩增, 以内参基因 β -actin 作为对照。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后 UVI 凝胶成像系统照相并用 Image J 图像分析软件分析结果, 以 AIF mRNA 和内参的电泳条带的绝对积分光密度值 (integrated optical density, IOD) 之比 rIOD 反映 AIF mRNA 的相对表达量。

AIF 引物同 1.2, β -actin 引物 Forward primer: 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3', Reverse primer: 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'。

1.8 Western blot 检测 AIF 蛋白表达

取状态良好的 A549 细胞和转染了 AIF 重组质粒的 A549 细胞, 按相同方法提取细胞总蛋白。取样品蛋白 30 μ g, 以 5 μ L 的低分子量预染 marker 为对照, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 后将蛋白条带电转到硝酸纤维素膜上, 经封闭液封闭后, 以 AIF 兔抗人为一抗, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 为二抗进行抗体孵育, ECL 显色, 于暗室内行 X 片曝光, ImageJ 图像分析软件分析结果, 测定蛋白条带的绝对积分灰度值 (integrated gray-scale value, IGV)。以 AIF 和内参 β -actin 蛋白条带的 IGV 比值反映各细胞株 AIF 蛋白相对表达量。

1.9 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 A549 细胞总 RNA 提取及 AIF 基因扩增

AIF 目的基因扩增结果见图 1, 在 500 bp 与 750 bp 之间出现了明显的条带, 与目的片段 (617 bp) 大小相符。

2.2 TA 克隆

将蓝白斑筛选平皿放到 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30 min 低温显色后, 随机挑选 9 个白斑扩大培养后提取质粒进行双酶切鉴定, 凝胶电泳结果见图 2, 1、2、8 和 9 号菌出现了大小接近目的基因片段 (617 bp) 的电泳条带。送 2 号和 8 号菌测序, 图 3 结果显示插入的基因片段与 AIF 目的基因序列完全相符。将带有 AIF 目的基因的 T 载体命名为 AIF-pUC-T。

2.3 AIF-pcDNA3.1 真核表达载体构建

目的片段与双酶切后的真核表达载体

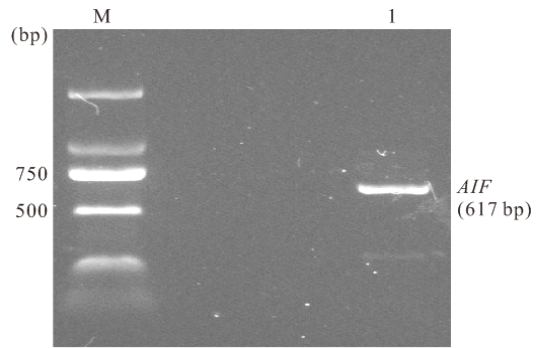


图 1 AIF 目的基因 PCR 扩增结果

Fig 1 Amplification of AIF target gene

1: AIF target gene; M: 2000 bp marker

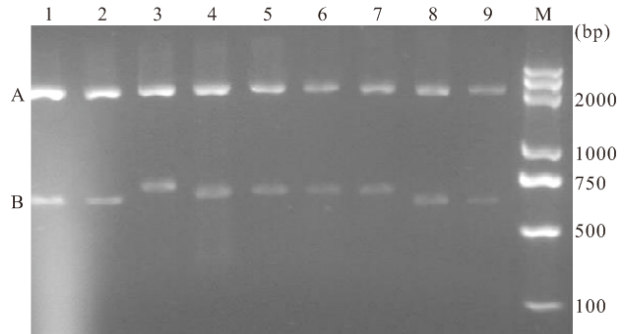


图 2 TA 克隆双酶切鉴定

Fig 2 Double enzyme digestion by *Bam*H I and *Eco*R I of TA cloning

A: The fragment of pUC-T vector; B: The fragment of target gene; M: 5000 bp marker

pcDNA3.1(+) 连接后转化感受态菌。选取 10 个白菌扩增抽提质粒, 双酶切后电泳结果见图 4, 除了 8 号菌外, 其余 9 号菌的质粒都能切下符合目的片段大小的清晰条带。送 4、5 号菌进行 DNA 序列分析, 结果显示插入真核表达载体的基因片段与 AIF 目的基因序列完全符合 (图 5), 提示 AIF-pcDNA3.1(+) 真核表达载体构建成功。

2.4 重组质粒转染后 AIF mRNA 表达量的检测

见图 6, 在 750 bp 与 500 bp 之间出现了清晰条带, 表明 AIF 基因与内参均扩增成功。转染细胞的 AIF mRNA 表达量 (1.34 ± 0.27) 高于未转染细胞 (0.40 ± 0.01), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 Western bolt 检测 AIF 蛋白表达

见图 7, 转染重组质粒 AIF-pcDNA3.1(+) 后的 A549 细胞 AIF 蛋白表达量 (10.31 ± 0.76) 高于未转染的对照组 (4.67 ± 0.52), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

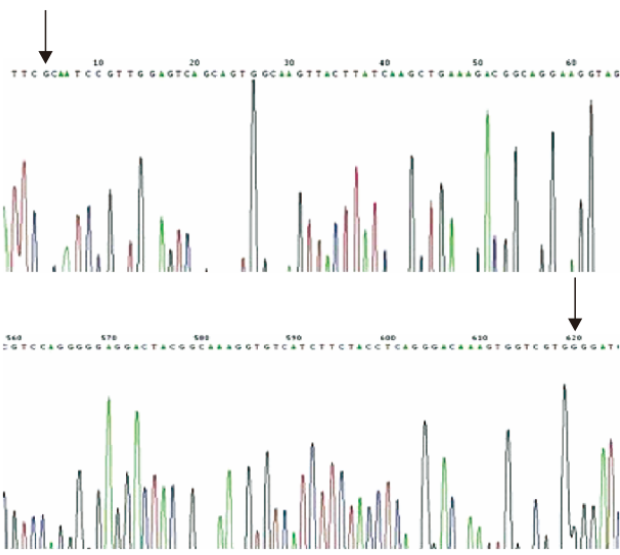


图 3 TA 克隆目的片段测序图谱

Fig 3 Target fragment DNA sequencing of TA cloning

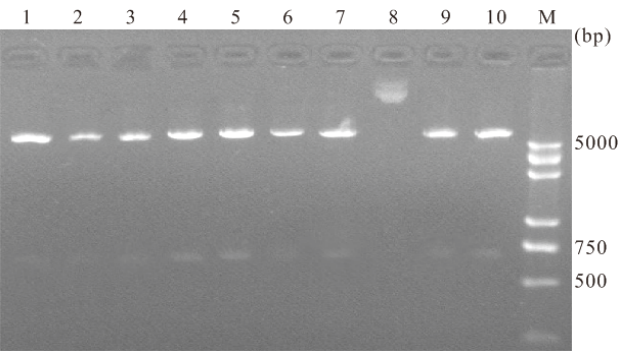


图 4 1~10 号重组质粒双酶切电泳

Fig 4 Recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Eco*R I (M: 5000 bp marker)

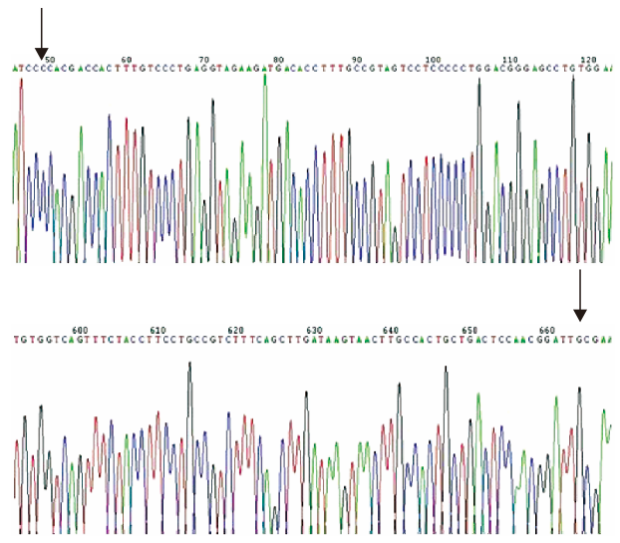


图 5 AIF 目的基因片段 DNA 测序图谱

Fig 5 DNA sequencing of target gene fragment

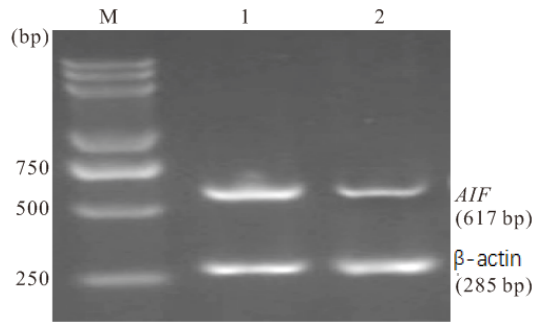


图 6 RT-PCR 检测重组质粒转染后 A549 细胞 AIF mRNA 表达

Fig 6 Expression of AIF mRNA in transfected A549 cells of checked with RT-PCR

1: Ttransfected A549 cells; 2: Non transfected A549 cells; M: 5000 bp DNA marker

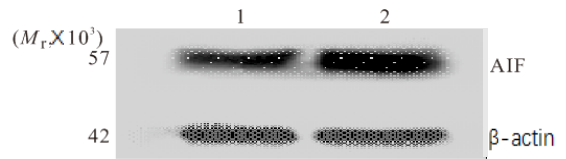


图 7 Western blot 检测转染后细胞 AIF 蛋白表达

Fig 7 Expression of AIF detected by Western blot

1: Non transfected A549 cells; 2: Transfected A549 cells

3 讨论

随着现代分子生物学技术的发展,基因功能的研究策略不断改进,目前,可以采用将目的基因导入细胞/生物体,或从细胞/生物体中敲出该基因或下调其表达,然后观察细胞生物学行为/生物体的表型等方法予以评价基因的功能。在下调基因表达方面,能够应用的方法有基因敲除、反义 RNA、mRNA 干扰以及核酶技术等^[11];而在上调基因表达方面则多采用构建表达质粒,转染细胞的策略。本研究采用载体构建的方法,将凋亡诱导因子基因与真核表达载体连接,并将含有 AIF 基因的真核表达载体导入 A549 细胞中检测表达,为研究 AIF 基因表达与细胞凋亡、肿瘤发生发展、神经元细胞退变等现象之间的关系奠定了基础。

真核表达载体构建是广泛应用于基因功能研究的一种重要实验方法,早期的构建通常是采用直接克隆法将目的基因插入载体,即运用限制性内切酶对目的基因片段的两端和真核表达载体进行双酶切,然后通过 T4 DNA 连接酶连接目的片段与载体断片,构建重组载体^[12,13]。直接克隆法构建过程比较简单,但构建效率较低且假阳性较高,为后续阳性克隆筛选带来了很大的困难^[14]。在本研究中,曾

采取直接克隆法构建 AIF 目的基因的真核表达载体,转化感受态菌后在氨苄青霉素抗性平皿上仅长出 2 个克隆,经鉴定,2 个克隆均为载体自连,反复多次仍未成功构建。为了提高重组载体构建的效率,我们采用 TA 克隆构建 AIF-pcDNA3.1(+)真核表达载体。首先,将扩增片段快速连接到 T 载体上,通过蓝白斑筛选、双酶切鉴定和 DNA 测序检测插入片段的基因序列,再将序列完全正确的插入片段回收并与真核表达载体连接,由于 TA 克隆的连接效率较高,在真核表达载体连接之前通过 TA 克隆可提高重组载体构建的成功率和准确性。

由于外源性 DNA 片段与载体连接及转化感受态菌都存在一定的效率,重组质粒中不一定都含有目的基因。为了避免阳性克隆筛选的盲目性,在 TA 克隆中,我们采用了蓝白斑筛选、双酶切电泳、DNA 测序三种方法对结果进行分析鉴定。首先,可以根据菌落颜色来判断载体中有无外源基因的插入,通过 α -互补原理可知,白色菌落为含有重组载体的阳性克隆,蓝色菌落为阴性克隆^[15]。值得注意的,在挑选白色克隆菌落时应尽量选择蓝菌周边的白菌,可能更利于得到阳性克隆。其次,我们对挑选出的多个白色菌落进行扩大培养,提取质粒后进行扩增双酶切鉴定,再将酶切阳性的菌落送去 DNA 测序分析。值得一提的,在实验条件完全一致的情况下,本研究在 DNA 测序时曾获得过两次与目的基因不相符的测序结果:与目的基因比较一次是缺失了 27 个碱基,另一次则在两个非相邻碱基发生了点突变。由于碱基缺失和突变较小,双酶切鉴定并不能提示碱基的这些改变,只有通过 DNA 序列分析才能发现,该结果说明:DNA 测序是判定基因片段是否正确的金标准,运用 TA 克隆可以有效避免扩增过程中产生个别碱基的突变和缺失造成的真核表达载体构建失败。

本研究结果显示,转染重组质粒的细胞 AIF 表达水平高于未转染的对照组细胞,说明 AIF 真核表达载体已构建成功并能够在细胞中正常表达。

综上所述,本研究成功构建了 AIF 基因的真核表达载体 AIF-pcDNA3.1(+),为进一步研究 AIF 基因的各项功能奠定了实验基础。

参 考 文 献

1 Susin SA, Leornzo HK, Zamzami N, *et al.* Molecular

- characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*,1999;397(6718):441-446.
- 2 Cande C, Cecconi F, Dessen P, *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death. *J Cell Sci*,2002;115(24):4727-4734.
- 3 Van Loo G, Saelens X, Van Gorp M, *et al.* The role of mitochondrial factors in apoptosis;a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Difference*, 2002; 9 (10): 1031-1042.
- 4 Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, *et al.* Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J*,2005;24(7):1375-1386.
- 5 Van Gorp M, Festjens N, Van Loo G, *et al.* Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*,2003;04(3):487-497.
- 6 Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, *et al.* The harlequin mouse mutation down regulates apoptosis-inducing factor. *Nature*,2002;419(6905):367-374.
- 7 宋 越, 李 俊, 彭广福. HSP70 与 AIF 在大肠癌中的表达及其临床意义. *细胞与分子免疫学杂志*,2010;26(12):1266-1269.
- 8 Reix S, Mechawar N, Susin SA, *et al.* Expression of cortical and hippocampal apoptosis-inducing factor (AIF) in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*,2007;28(3):351-356.
- 9 Anne-Sophie A, Iman L, Dounia D, *et al.* Apoptosis-inducing factor regulates skeletal muscle progenitor cell number and muscle phenotype. *PLoS ONE*,2011;6(11):1-15.
- 10 Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, *et al.* AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life*,2011;63(4):221-232.
- 11 杜玉梅, 左正宏. 基因功能研究方法的新进展. *生命科学*, 2008;20(4):589-592.
- 12 李 宇, 崔长琮, 黄 辰等. 先天性长 QT 综合征相关 HERG 基因 A561V 突变体及其真核表达载体的构建及表达. *中华遗传学杂志*,2006;23(6):627-630.
- 13 杨丽华, 张学光, 王如兴等. 大鼠成纤维细胞生长因子 2 分子克隆及其真核表达载体的构建. *中国组织工程研究与临床康复*,2008;12(15):2875-2878.
- 14 李 超, 杨 丹, 石芳琼等. MHC-I 类链相关基因 A 真核表达载体的构建及稳定转染舌鳞癌细胞的实验研究. *华西口腔医学杂志*,2011;29(4):437-441.
- 15 Sambrook J, Russell DW. *分子克隆实验指南*. 北京:科学出版社,2002:96-99.

(2012-07-19 收稿,2012-10-25 修回)

编辑 沈 进