

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )06-0578-04

· 短篇论著 ·

## CXCL16 基因与红色荧光蛋白 pDsRed2-N1 融合基因表达载体的构建

### Construction of CXCL16/RFP fusion gene expression vector

刘厚佳<sup>1</sup>, 郭献灵<sup>2</sup>, 杨 阳<sup>2</sup>, 芮耀诚<sup>3</sup>, 卫立辛<sup>2</sup>, 吴孟超<sup>2</sup>, 张 黎<sup>2\*</sup> ( 1. 第二军医大学 附属长海医院, 200433; 2. 第二军医大学 附属东方肝胆外科医院, 200438; 3. 第二军医大学 药学院 药理学教研室, 200433 )

**[ 摘要 ]** 目的: 构建人趋化因子配体 16( CXC ligand 16, CXCL16 )与增强型红色荧光蛋白( red fluorescent protein, RFP )的融合基因表达载体 pDsRed2-N1/CXCL16, 使 CXCL16-RFP 融合蛋白在人 293T 细胞中稳定表达。方法: 针对 CXCL16 基因设计引物, 扩增人 CXCL16 cDNA, 退火后插入含有 RFP 的表达载体 pDsRed2-N1。测序正确的 CXCL16 和 RFP 的融合基因表达载体 pDsRed2-N1/CXCL16, 经脂质体转染人 293T 细胞株, G418 筛选获得稳定转染的细胞株。荧光显微镜观察细胞转染情况, Western blotting 比较转染前后 293T 细胞中 CXCL16 蛋白的表达变化。结果: 经转化细菌、抽提质粒、酶切鉴定和 DNA 序列分析证实, CXCL16 基因已正确插入 pDsRed2-N1 中 RFP 基因的上游, 获得融合基因表达载体 pDsRed2-N1/CXCL16。空载体 pDsRed2-N1 和融合基因表达载体 pDsRed2-N1/CXCL16 经脂质体转染人 293T 细胞后, 在荧光显微镜下可观察到表达 RFP 的细胞发出红色荧光, 转染效率分别可达 95% 和 85% 。pDsRed2-N1/CXCL16 转染 293T 细胞后, CXCL16 蛋白的表达水平显著上调。结论: 成功构建的 pDsRed2-N1/CXCL16 融合基因表达载体可在 293T 细胞中稳定表达 CXCL16 蛋白, 为进一步研究 CXCL16 在细胞增殖调控中的作用奠定了基础。

**[ 关键词 ]** 趋化因子配体 16; 清道夫受体; 重组融合基因; 表达载体

**[ 中图分类号 ]** Q782 **[ 文献标志码 ]** A

人趋化因子配体 16( CXC ligand 16, CXCL16 )是新近发现的一种 G 蛋白偶联受体 CXC 趋化受体 6( CXC receptor 6, CXCR6 )的趋化配体<sup>[1-2]</sup>, 同时又是结合磷脂酰丝氨酸和氧化脂蛋白的细胞表面受体, 是氧化低密度脂蛋白( Ox-LDL )的特异性清道夫受体<sup>[3]</sup>, 由于其同时兼备清道夫受体及趋化因子的作用, 提示其可能在炎症及免疫系统中具有重要作用。

为进一步探讨 CXCL16 在细胞中的作用, 本研究在克隆人 CXCL16 基因的基础上, 构建增强型红色荧光蛋白( red fluorescent protein, RFP )与 CXCL16 的融合基因表达载体( pDsRed2-N1/CXCL16 )。pDsRed2-N1 表达载体中带有 RFP 序列, 克隆在 pDsRed2-N1 中的 CXCL16 基因, 以 CXCL16-RFP 融合蛋白的形式在 293T 细胞中得以表达, 可以非常简便地通过荧光显微镜和流式细胞术检测, 对 CXCL16 在细胞中的表达与定位进行观察和分析, 为进一步研究 CXCL16 的生物学功能奠定实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人 293T 细胞由本室提供, 真核表达载体 pDsRed2-N1 为 ClonTech 公司产品。限制性内切酶 EcoR I、BamH I 为 Promega 公司产品, T4 DNA 连

接酶、DNA Marker<sup>DI</sup> 2 000 为 Takara 公司产品, 质粒抽提纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品, DMEM、OPTI-MEM 培养液、胎牛血清为 Gibco 公司产品, Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 为 Invitrogen 公司产品, 细胞总蛋白提取试剂盒为 Pierce 公司产品, ECL + plus<sup>TM</sup> Western blotting system 试剂盒为 Amersham 公司产品。小鼠抗人 Actin 单克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记驴抗小鼠二抗为 Santa Cruz 公司产品, 倒置荧光显微镜为 Olympus 公司产品。PCR 引物由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。其余试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 CXCL16 目的基因片段的获得

根据人 CXCL16 cDNA 全长序列, 运用 DNA 分析软件系统设计引物, 上游引物 CXCL-F-Eco R I: CGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGATGTCTGGGAGTCA

**[ 基金项目 ]** 国家自然科学基金资助项目( No. 30500615 ); 军队“十五”医学科研课题资助项目( No. 04A-8 ); 上海市卫生局青年课题资助项目( No. 2004-55-94 )。Supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 3050615 ); the “Tenth Five-year Plan” of PLA ( No. 04A-8 ); the Young Scholars Foundation of Medical Bureau of Shanghai ( No. 2004-55-94 )

**[ 作者简介 ]** 刘厚佳( 1976- ), 男, 安徽省淮南市人, 药理学博士, 主管药师, 主要从事肿瘤分子药理方面的研究。

\* Corresponding autor. E-mail: lizhang@smmu.edu.cn

GAGCG; 下游引物 *CXCL-R-BamH I*: TGGTG-GCGACCGGTGGATCCCGGTATTAGAGTCAGGTGCC AC. 以 THP-1 细胞总 RNA 为模板,用 *CXCL-F-Eco R I* 和 *CXCL-R-BamH I* 进行 PCR 获得目的基因片段,PCR 产物经含 EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,产物长度为 863 bp。

### 1.3 pDsRed2-N1/CXCL16 融合基因表达载体的构建及鉴定

将 PCR 扩增得到的全长 *CXCL16* 基因片段与 pDsRed2-N1 空载体分别用 *EcoR I* 和 *BamH I* 双酶切线性化,T4 DNA 连接酶将酶切回收纯化后的 DNA 片段在 16 °C 连接 18 h,连接产物转化 DH 5 $\alpha$  感受态细胞,涂于 50 mg/L 氨苄西林抗性的 LB 琼脂平板,37 °C 培养过夜。挑取单克隆进行酶切、PCR 鉴定及测序。PCR 鉴定引物的上游引物设计在插入的 *CXCL16* 片段内,*CXCL-SEQF1*: GAAAC-CACCATTACACTGC; 下游引物设计在载体上 *DsRed1-N*: GTACTGGAAGTGGGGGACAG, 产物长度为 428 bp。

细胞转染条件参考 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书。转染前 1 d 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液调整 293T 细胞数为  $1 \times 10^5$ /ml,接种到 6 孔板内,每孔加入 2 ml 细胞悬液,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。转染前 2 h,换无血清培养液。转染时,分别用 245  $\mu$ l 的 Opti-MEM(不含 FBS 和抗生素)稀释 2  $\mu$ g 的质粒和 5  $\mu$ l 的 Lipofectamine™ 2000 脂质体,两者混匀后放置 20 min,于细胞内加入 500  $\mu$ l 混合液,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,转染 4 h 后更换新鲜完全培养液 2 ml,继续培养 24 ~ 48 h 后用荧光显微镜和流式细胞术观察细胞 RFP 表达情况。转染后的细胞在含有 500  $\mu$ g/ml G418 完全培养液中培养,进行后续的细胞实验。

### 1.4 荧光显微镜观察 RFP 的表达

将转染 pDsRed2-N1 或 pDsRed2-N1/CXCL16 的 293T 细胞用 PBS 洗涤 2 次,自然风干后,滴加 500 ml/L 甘油缓冲液封片。置荧光显微镜下观察 RFP 阳性细胞。

### 1.5 Western blotting 检测 CXCL16 蛋白的表达

293T 细胞转染 pDsRed2-N1 和 pDsRed2-N1/CXCL16 表达载体后,经 G418 筛选得到稳定转染的细胞株。Extract Reagent 抽提细胞总蛋白,取 50  $\mu$ g 总蛋白进行 12% SDS-PAGE。电泳结束后,使用转移电泳装置(Bio-Rad),在 4 °C、400 mA 恒流条件下电转移 120 min,将蛋白样品转移到 PVDF 膜上。用 TBST(TBS + 0.05% Tween20)加 5% 脱脂奶粉配制

成封闭液,室温封闭 PVDF 膜 1 h。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 分别稀释 RFP 目的蛋白或内参照小鼠抗人 Actin 单克隆抗体,4 °C 过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释辣根过氧化物酶标记驴抗小鼠二抗,于室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。采用 ECL + plus™ Western blotting system 试剂盒进行显色反应,于暗房中曝光、显影、过水、定影,X 线片(柯达)晾干待分析。所有实验重复 3 次,选择其中最具有代表性的结果图片。

## 2 结果

### 2.1 CXCL16 全长基因扩增

根据人 *CXCL16* 基因序列设计一对特异性引物,以 THP-1 细胞的总 RNA 为模板,用 RT-PCR 技术扩增 *CXCL16* cDNA。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示约 863 bp 的特异性条带,与目的基因相符(图 1)。

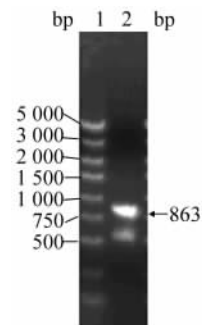


图 1 PCR 扩增 *CXCL16* 基因

1:Marker;2:*CXCL16*

### 2.2 重组融合基因表达载体 pDsRed2-N1/CXCL16 的构建与鉴定

回收的 *CXCL16* cDNA 全长片段经 *EcoR I* 和 *BamH I* 双酶切线性化片段,与 *EcoR I* 和 *BamH I* 双酶切回收后的载体经 T4 DNA 连接酶连接,并转化 DH5 $\alpha$ ,挑取菌落进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定的引物上游引物设计在插入的 *CXCL16* 片段内,下游引物则设计在载体 *DsRed1-N* 上,产物长度为 428 bp,可以确保目的基因准确连接到载体上。经 PCR 鉴定阳性克隆内已插入预计大小的外源 *CXCL16* 基因片段(图 2)。DNA 序列分析证实,*CXCL16* 基因已正确插入 pDsRed2-N1 中 *RFP* 基因的上游,其阅读框与 *RFP* 基因相同,得到重组融合基因表达载体 pDsRed2-N1/CXCL16。

### 2.3 细胞内重组融合基因载体的表达

将转染 pDsRed2-N1 和 pDsRed2-N1/CXCL16 的 293T 细胞,置荧光显微镜下观察。可见转染 pDsRed2-N1 和 pDsRed2-N1/CXCL16 的 293T 细胞呈现表达 RFP 的红色荧光(图 3),转染效率分别为 95% 和 85%,转染空载体的荧光强度要强于转染 pDsRed2-N1/CXCL16 的 293T 细胞。

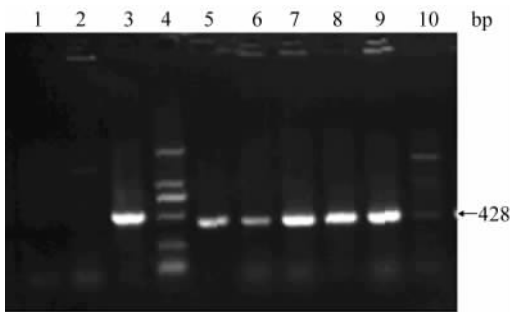


图 2 PCR 鉴定重组融合基因表达载体 pDsRed2-N1/CXCL16  
1: 阴性对照( $H_2O$ ); 2: 空载体; 3: 阳性对照;  
4: Marker; 5-10: pDsRed2-N1/CXCL16 克隆

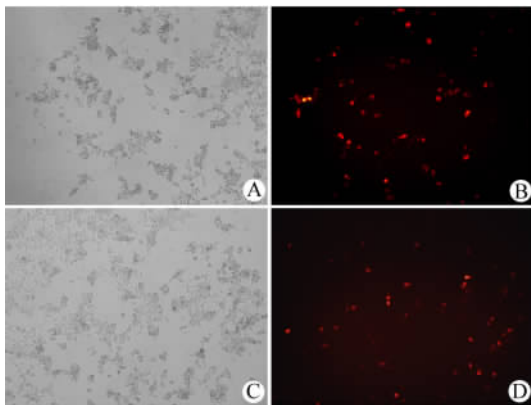


图 3 荧光显微镜观察质粒转染的 293T 细胞( $\times 100$ )  
A, B: 转染 pDsRed2-N1 的 293T 细胞; C, D: 转染  
pDsRed2-N1/CXCL16 的 293T 细胞

#### 2.4 Western blotting 检测 CXCL16 蛋白的表达

293T 细胞转染 pDsRed2-N1 和 pDsRed2-N1/CXCL16 表达载体后,经 G418 筛选得到稳定转染的细胞株,Western blotting 检测细胞 CXCL16 蛋白的表达(图 4)。结果发现正常 293T 细胞内及转染空载体 pDsRed2-N1 的 293T 细胞内没有检测到 CXCL16 蛋白的表达,转染 pDsRed2-N1/CXCL16 后的 293T 细胞内可以检测到 CXCL16 蛋白表达,提示构建的 pDsRed2-N1/CXCL16 载体可以在 293T 细胞内稳定表达。

### 3 讨论

趋化因子是一组具有趋化作用的细胞因子,能

吸引免疫细胞到免疫应答局部,参与免疫调节和免疫病理反应。CXCL16 不仅仅是趋化因子 CXC 家族的一员,同时也是继血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)<sup>[4]</sup>后新发现的一种结合磷脂酰丝氨酸和氧化脂蛋白的细胞表面受体,是氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)的特异性清道夫受体,在人动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)损伤部位大量表达<sup>[5]</sup>,也被称为 SR-PSOX<sup>[1]</sup>。

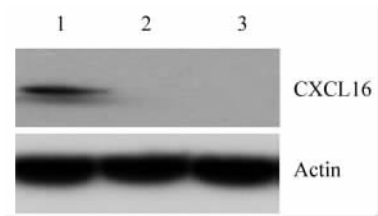


图 4 Western blotting 检测 CXCL16 蛋白在 293 细胞的表达  
1: 转染 pDsRed2-N1/CXCL16 的 293T 细胞;  
2: 转染 pDsRed2-N1 的 293T 细胞; 3: 293T 细胞

近年来研究发现, CXCL16 可以参与炎症反应的趋化与黏附,不仅仅参与了 AS 的发生发展<sup>[6-10]</sup>,还可以直接作为一种趋化因子,在免疫系统疾病如类风湿性关节炎及多种肿瘤组织中高表达<sup>[11-14]</sup>,提示 CXCL16 具有广泛而重要的生物学功能。为了更好地阐明 CXCL16 的作用,本研究将 CXCL16 基因克隆到 RFP 载体 pDsRed2-N1 中,与 DsRed2 编码序列形成融合蛋白,这种 N 端融合蛋白并不改变天然 RFP 的荧光性质,使 RFP 成为一种在蛋白定位、转基因及转录标志物研究中的有效工具。

本实验将成功构建的 CXCL16 与 RFP 融合基因表达载体 pDsRed2-N1/CXCL16 转染 293T 细胞,转染 12~48 h 后, RFP 阳性细胞率一直保持较高水平,36 h 后可以在细胞膜及细胞质内达到最高,48 h 后开始转染率明显下降,至 96 h 已基本检测不到 RFP 的表达,所以有必要建立稳定表达 CXCL16 的细胞株。而 pDsRed2-N1 转染组有较长的持续表达时间,可以维持较高表达 4~5 d。

本实验将瞬时转染 36 h 后的细胞经 G418 筛选,2 周后得到稳定转染的细胞株。采用 Western blotting 检测稳转细胞株内 CXCL16 基因的表达,结果发现稳定转染 pDsRed2-N1/CXCL16 融合基因表达载体的细胞内, CXCL16 蛋白的表达显著增加,提示本实验构建的 pDsRed2-N1/CXCL16 融合基因表达载体可以在 293T 细胞内稳定表达,可以作为进一步研究 CXCL16 的生物学效应的有利工具。

到目前为止,尚无将 RFP 应用 CXCL16 细胞内

定位的报道。本研究成功构建 RFP 融合的 CXCL16 表达载体,建立了稳定表达 pDsRed2-N1/CXCL16 的 293T 细胞株,为进一步阐明 CXCL16 的细胞定位及生物学作用,探讨 CXCL16 在某些疾病(如炎症、自身免疫病及肿瘤等)的发生及诊治中的作用奠定了实验基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Matloubian M, David A, Engel S, *et al.* A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo[ J ]. *Nat Immunol*, 2000, 1( 4 ): 298-304.
- [ 2 ] Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, *et al.* Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines[ J ]. *J Immunol*, 2001, 166( 8 ): 5145-5154.
- [ 3 ] Shimaoka T, Kume N, Minami M, *et al.* Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages[ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275( 52 ): 40663-40666.
- [ 4 ] Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, *et al.* Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein[ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18( 10 ): 1541-1547.
- [ 5 ] Minami M, Kume N, Shimaoka T, *et al.* Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions[ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21( 11 ): 1796-1800.
- [ 6 ] Lundberg GA, Kellin A, Samnægård A, *et al.* Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR-PSOX gene[ J ]. *J Intern Med*, 2005, 257( 5 ): 415-422.
- [ 7 ] Aslanian AM, Charo IF. Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis[ J ]. *Circulation*, 2006, 114( 6 ): 583-590.
- [ 8 ] Wagsater D, Olofsson PS, Norgren L, *et al.* The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325( 4 ): 1187-1193.
- [ 9 ] Lehrke M, Millington SC, Lefterova M, *et al.* CXCL16 is a marker of inflammation, atherosclerosis, and acute coronary syndromes in humans[ J ]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49( 4 ): 442-449.
- [ 10 ] Sheikine Y, Bang CS, Nilsson L, *et al.* Decreased plasma CXCL16/SR-PSOX concentration is associated with coronary artery disease[ J ]. *Atherosclerosis*, 2006, 188( 2 ): 462-466.
- [ 11 ] Hojo S, Koizumi K, Tsuneyama K, *et al.* High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 10 ): 4725-4731.
- [ 12 ] Ruth JH, Haas CS, Park CC, *et al.* CXCL16-mediated cell recruitment to rheumatoid arthritis synovial tissue and murine lymph nodes is dependent upon the MAPK pathway[ J ]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54( 3 ): 765-778.
- [ 13 ] Hara T, Katakai T, Lee JH, *et al.* A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion[ J ]. *Int Immunol*, 2006, 18( 2 ): 301-311.
- [ 14 ] Mikhak Z, Fleming CM, Medoff BD, *et al.* STAT1 in peripheral tissue differentially regulates homing of antigen-specific Th1 and Th2 cells[ J ]. *J Immunol*, 2006, 176( 8 ): 4959-4967.

[ 收稿日期 ] 2007 - 10 - 20

[ 修回日期 ] 2007 - 11 - 03

[ 本文编辑 ] 郁晓路

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

- ( 1 )生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。( 2 )各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。( 3 )限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam*H I、*Sal* I 等。( 4 )各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。( 5 )各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *L*、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。( 6 )化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。( 7 )数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。( 8 )英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *et al.*、*vs.*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)