

pB2R-Venus 重组真核载体的构建 及在 HEK293T 细胞中的表达^{*}

季丙元^{1,2} 程葆华¹ 王春梅¹ 陈 京^{1△} 白 波^{1△}

(¹ 济宁医学院神经生物学研究所, 山东 济宁 272067; ² 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 272018)

摘 要 **目的** 构建带有黄色荧光蛋白突变体 Venus 标签的人缓激肽 2 型受体 (bradykinin receptor 2, B2R) 真核表达载体, 用于 B2R 与相关受体及蛋白的相互作用、B2R 受体介导的信号转导机制的研究等。**方法** 根据人 B2R 基因序列设计引物, 以质粒 pcDNA3.1-B2R 为模板, PCR 扩增目的基因人 B2R。EcoR I 和 BamH I 双酶切扩增产物及质粒 pVenus-N1, 经回收、连接、转化, 获取重组质粒。对重组质粒进行酶切、测序鉴定。转染重组质粒至 HEK293T 细胞, 荧光显微镜观察受体 B2R 的细胞定位, 蛋白印迹法检测目的蛋白人 B2R 蛋白的表达。**结果** PCR 扩增出了 1 条长度为 1176 bp 的基因片段, 测序结果与 GenBank (AY275465) 相同。荧光显示 B2R 表达于质膜。Western blot 结果显示, 实验组蛋白印迹条带与目的蛋白大小相同, 为 44kDa。**结论** 成功构建了 pB2R-Venus 重组真核表达载体, 瞬时转染成功, 获得了转染有重组质粒的 HEK293T 细胞。成功构建的重组质粒 pB2R-Venus 可用于后续 BRET、FRET 等实验研究, 有助于 B2R 介导的信号转导机制的探讨和药物靶点的寻找。

关键词 Venus; B2R; 真核表达载体; HEK293T 细胞

中图分类号: R346 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)10-309-04

Construction of pB2R-Venus eukaryotic expression vectors and its expression in HEK293T cells

Ji Bing-yuan, CHENG Bao-hua, WANG Chun-mei, et al

(Neurobiology Institute, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract; Objective To investigate the interaction between B2R and other receptors, and signal transduction mechanism, human eukaryotic expression vector that bradykinin receptor 2 fused with Venus was constructed. **Methods** The primer was designed based on human B2R gene sequence, and B2R gene was then amplified by PCR using plasmid pcDNA3.1-B2R as template. The PCR product was digested by enzyme EcoR I and BamH, and cloned into plasmid pVenus-N1. The construct was identified by DNA sequencing. The recombinant plasmid was transiently transfected into HEK293T cells. Cell location and protein expression was detected by confocal microscopy and Western blot, respectively. **Results** The fragment of 1176bp was amplified by PCR, and its sequence was identical with the gene in Genbank (AY275465). It is shown that the B2R expressed on the membrane by confocal microscopy, and protein band was 44 kd which was identical to target band through Western blot. **Conclusion** The plasmid pB2R-Venus was successfully constructed and transfected into HEK293T cells. The recombinant plasmid can be used to BRET and FRET experiments, which contribute to investigate the signal transduction mechanism and explore pharmacological targets.

Key words: Venus; Bradykinin receptor 2; Eukaryotic expression vector; HEK293T cells

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 31271243; No. 81070961), 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2011CM027; No. ZR2009DZ004), 泰山学者建设专项资金

[△] [通信作者] 白波, E-mail: bbai@mail.jnmc.edu.cn;
陈京, E-mail: jing.chen@mail.jnmc.edu.cn

激肽是重要的促炎症多肽,由激肽释放酶作用于激肽原产生,酶解产物缓激肽和胰激肽主要通过缓激肽 2 型受体(bradykinin receptor 2, B2R)起作用。B2R 是一种 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs),能调节心血管平衡、增加血管通透性^[1]和 NO 的释放^[2],同时还能促进炎症反应和伤害性效应,B2R 目前已成为重要的药物靶标。近年来,有关 GPCR 二聚化或寡聚化的研究日益增多^[3-4],本实验构建的 pB2R-Venus 真核表达载体可通过生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)或双分子荧光互补等研究技术发挥作用,用来研究 BDKRB2 同其他受体或蛋白间的相互作用,也可用于研究受体的脱敏、内化、泛素化等过程,阐明受体作用的机制,从而有助于进一步探讨其作为药物靶标的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

含人 B2R 全长 cDNA 基因序列的重组载体 pcDNA3.1-B2R 和含 Venus 编码序列的重组载体(Clontech 公司)。DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和限制性核酸内切酶均购自 Fermentas 公司,PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒及无内毒素质粒大提及小提试剂盒均购自北京天根生物有限公司;HEK293T 细胞系为实验室保存;DMEM 培养基购自 Gibco 公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。引物由上海生工生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获取及引物设计 登录 Genebank 获取人 BDKRB2 (B2R) cDNA 序列 (AY275465),根据 B2R 序列特点和 pVenus-N1 的序列特点设计引物,并在引物末端引入酶切位点。由引物设计软件 Primer5.0 设计出引物,正向引物序列为:5'-CCCGAATTCACCATGT-TCTCTCCCTGGAAGATATCA-3' (含 EcoR I 酶切位点),反向引物序列为:5'-CGCGGATC-CGCCTGTCTGCTCCCTGCCCAGTC-3' (含 BamH I 酶切位点)。

1.2.2 重组真核表达载体 pB2R-Venus 的构建 以 pcDNA3.1-BDKRB2 为模板进行 PCR 反应,反应体系总体积为 50 μ l,其中模板 2 μ l,上下游引物

各 1 μ l,2 $\times$ EasyTaq superMix 25 μ l,余则用超纯水补足。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 1min,然后 95 $^{\circ}$ C 45s,65 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 90s,共 32 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,琼脂糖凝胶电泳,获得约 1.2Kb 大小的目的片段,胶回收试剂盒回收 PCR 产物。限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 双酶切 PCR 产物和表达载体 pVenus-N1。酶切后的 PCR 产物和 pVenus-N1 电泳、胶回收,T4DNA 连接酶室温连接 4h。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α ,37 $^{\circ}$ C LB 培养基培养过夜,挑取单克隆,摇菌过夜,质粒提取后用 EcoR I 和 BamH I 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳初步鉴定构建结果是否正确。将酶切正确的质粒送上海生工公司测序。

1.2.3 细胞转染 HEK293T 细胞常规(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,10%胎牛血清)培养、传代。将状态良好的、处于对数生长期的细胞按 1×10^6 个/孔接种至 6 孔板中,待细胞长至 90%融合时,将培养基换成不含血清的 DMEM 培养基,转染重组质粒。实验分为两组:对照组(仅转染对照质粒 pVenus-N1)和转染组(转染重组质粒 pB2R-Venus),具体转染方法参照转染试剂说明书进行。转染后 6 h,换成新鲜的含 10%血清的 DMEM 培养基,继续培养。

1.2.4 pB2R-Venus 重组表达载体在 HEK293T 细胞中的表达检测 1)荧光显微镜:转染后 36 h,将培养有转染质粒细胞的 6 孔培养板直接放在显微镜下观察。2)Western blot:转染后 48 h,收集各组细胞,加入适量 RIPA 裂解液,置冰上裂解 30 min,其他按常规方法操作^[5]。提取后的蛋白,进行 Western blot 检测。抗 B2R 一抗按 1:1000 稀释, β -actin 小鼠单克隆抗体作内参,1:1000 稀释。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 作二抗,1:5000 稀释,ECL 化学发光显影。

2 结果

2.1 pB2R-Venus 重组质粒的构建

以 pcDNA3.1-B2R 为模板,经 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳显示,扩增产物长度为 1176 bp,与人 B2R 基因长度相等。见图 1。重组表达载体 pB2R-Venus 经 EcoR I 和 BamH I 双酶切,电泳结果显示重组质粒被切成长度较大的载体片段和长度约为 1200 bp 的 DNA 片段,初步说明质粒构建正确。见图 2。重组质粒 pB2R-Venus 测序图谱和序列结果显示,重组质粒序列与人 B2R 全长 cDNA 完全一致,说明质粒构建正确。见图 3。

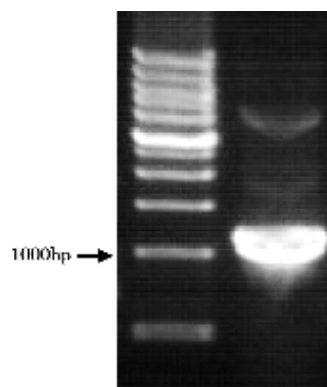


图 1 PCR 扩增人 B2R 基因片段

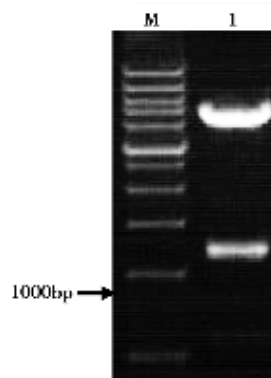


图 2 重组质粒 pB2R-Venus 被 EcoRI 和 BamHI 双酶切

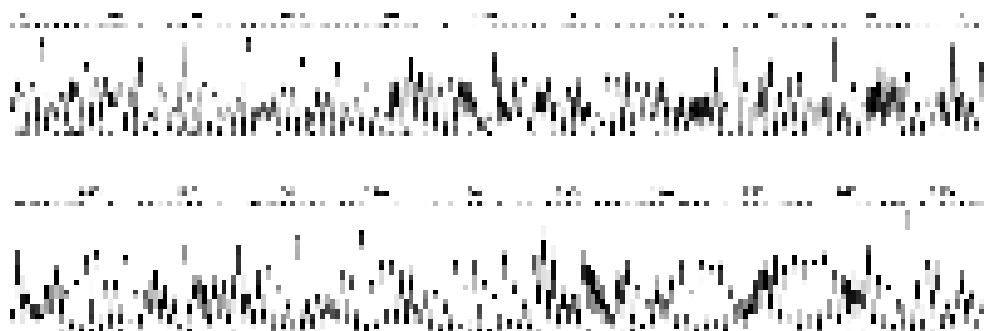
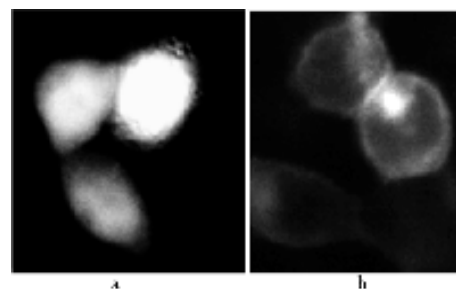


图 3 重组质粒 pBDKRB2-Venus 测序图谱

2.2 荧光显微镜检测重组质粒在 HEK293T 细胞中的表达

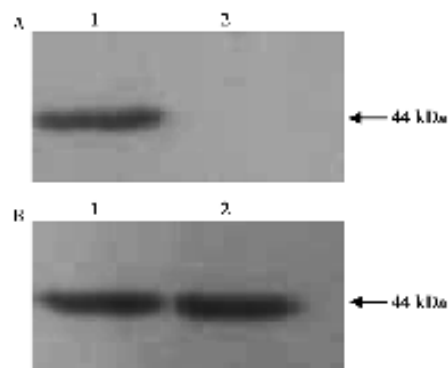
荧光显微镜观察重组质粒 pB2R-Venus 在 HEK293T 细胞中的表达情况,结果表明,对照组细胞,即只转染表达质粒 pVenus-N1 的细胞,细胞质内部呈现均匀的黄色(图 4a),而转染新构建重组质粒 pB2R-Venus 的细胞只在质膜部位发出黄色荧光(图 4b),说明在转染重组质粒 pB2R-Venus 的 HEK293T 细胞中,受体 B2R 表达较强烈,且仅表达于质膜。而在转染重组质粒的细胞中,没有受体 B2R 的表达,进一步说明载体构建正确且表达效率较高。

同样,蛋白印迹结果显示,在转染重组质粒 pB2R-Venus 的细胞中,出现两条带,其中一条分子量为 44 kDa,与受体 B2R 的大小相同;而在仅转染质粒 pVenus-N1 的对照细胞中,没有目的蛋白的表达(图 5),说明空白细胞或对照细胞中,不表达目的基因。



a: 转染 pVenus-N1 载体的细胞;
b: 转染重组质粒 pB2R-Venus 的细胞

图 4 质粒 pVenus-N1 和 pB2R-Venus 转染 HEK293T 细胞 36h 后荧光显微镜观察



A: pB2R-Venus 的表达 B: β -actin 的表达
Lane 1: 转染重组质粒 pB2R-Venus 的细胞
Lane 2: 仅转染对照质粒的细胞

图 5 Western Blot 检测重组质粒的表达

3 讨论

增强型黄色荧光蛋白(enhanced yellow fluorescent proteins, EYFP)是黄色荧光蛋白的突变体,由于其高灵敏性等优点,目前被广泛应用于众多实验研究。但 EYFP 的抗酸性差,且对卤化物敏感,因此其应用仍有诸多局限。在 EYFP 基础上改进的突变体 Venus^[6] 荧光更亮,耐酸性更强,更稳定,且成熟更快,其应用将更加广泛,可作为生物传感器应用在相应组织和器官上。基于以上优点, Venus 是目前应用最多的黄色荧光蛋白探针,可用于 FRET 实验,作为荧光蛋白配对、钙离子检测、双分子荧光互补等实验研究。本实验构建的 pB2R-Venus 融合蛋白, Venus 作为标签蛋白不影响目的蛋白的折叠和运输,直接通过荧光显微镜就可观察受体在活细胞中的表达、内吞等动态过程。同时 Venus 荧光性质稳定,荧光强度不易受到细胞内其他物质的干扰,从而使目的蛋白的检测更快、更简便、灵敏度更高、重现性更好。

激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)是重要的内源性调控途径,可参与血压调节、炎症、心血管内稳态、镇痛反应、疼痛传递、细胞因子释放、前列腺素和 NO 合成以及细胞增殖等生理过程^[7]。激肽释放酶作用于激肽原释放缓激肽(bradykinin, BK), BK 羧基末端的精氨酸水解后可生成 Des-Arg⁹BK。BK 与组成型表达的 B2R 亲和力较高,而 Des-Arg⁹BK 与诱导性表达的 B1R 亲和力较高^[8]。B2R 是 GPCRs 超家族的成员之一,而 GPCRs 是众多药物的作用靶点,是治疗疼痛、高血压、心血管疾病、帕金森等疾病的药物靶标。

实验选用的 HEK293T 细胞是永生化的细胞,转染效率高且本身不表达 B2R 蛋白,因此常用做转染的受体细胞检测转染质粒的表达。本实验构建的融合表达载体 pB2R-Venus 转染细胞后,荧光显微镜检测显示荧光蛋白表达于质膜,标签蛋白作为融合蛋白与受体 B2R 自内质网合成后转运至质膜。同时, Western blot 也显示在未转染的细胞中

没有受体的表达,而转染重组质粒的细胞中受体蛋白水平有较强的表达。实验构建的 pB2R-Venus 真核表达载体可用于后续的 BRET 或 FRET 实验,以研究受体间或受体与 G 蛋白、GRK 以及 arrestin 等的相互作用^[9-10],同时还能用于动态观察受体在膜表面的表达、内吞及胞内运输过程。

参考文献:

- [1] Roman-Campos D, Duarte HL, Gomes ER, et al. Investigation of the cardiomyocyte dysfunction in bradykinin type 2 receptor knockout mice[J]. Life Sci, 2010, 87(23-26): 715-723.
- [2] Bai B, Liu L, Zhang N, et al. Heterodimerization of human apelin and bradykinin 1 receptors: novel signal transduction characteristics[J]. Cell Signal, 2014, 26(7): 1549-1559.
- [3] Wang C, Pan Y, Zhang R, et al. Heterodimerization of mouse orexin type 2 receptor variants and the effects on signal transduction[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(3): 652-663.
- [4] Li Y, Chen J, Bai B, et al. Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction[J]. Cell Signal, 2012, 24(5): 991-1001.
- [5] 蔡欣, 陈京, 白波. pRluc-hNeurotensin1-R 重组真核表达载体的构建及在离体细胞中的表达[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 20(12): 1140-1143.
- [6] Nagai T, Ibata K, Park ES, et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(1): 87-90.
- [7] Naffah-Mazzacoratti Mda G, Gouveia TL, Simoes PS, et al. What have we learned about the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in neurological disorders? [J]. World J Biol Chem, 2014, 5(2): 130-140.
- [8] Albert-Weissenberger C, Siren AL, Kleinschnitz C. Ischemic stroke and traumatic brain injury: the role of the kallikrein-kinin system[J]. Prog Neurobiol, 2013, 101-102(65-82).
- [9] Vidi PA, Ejendal KF, Przybyla JA, et al. Fluorescent protein complementation assays: new tools to study G protein-coupled receptor oligomerization and GPCR-mediated signaling [J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 331(2): 185-193.
- [10] Kodama Y, Hu CD. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives[J]. Biotechniques, 2012, 53(5): 285-298.

(收稿日期 2014-07-22)