

真核表达载体 pIRES2-EGFP-Axin的构建及其在神经胶质瘤细胞内的表达

张丽英¹, 李青¹, 陈广生¹, 林圣彩², 叶菁¹, 司少艳¹, 张丰¹

(¹第四军医大学西京医院病理科, 陕西 西安 710032; ²厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361000)

Construction of the eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-Axin and its expression in glioma cells

ZHANG Li-ying¹, LI Qing¹, CHEN Guang-sheng¹, LIN Sheng-cai², YE Jing¹, SI Shao-yan¹, ZHANG Feng¹

¹Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; ²School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361000, China

[Abstract] **AM:** To construct the eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-Axin, and to express Axin in C6 glioma cells. **METHODS:** The Axin gene was amplified by PCR using pCMV5-HA-Axin as a template, and confirmed by DNA sequencing. The eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-Axin was constructed by introducing Axin DNA fragment into the sites of Nhe I and Sal I of pIRES2-EGFP vector. The plasmid was transfected into the C6 cells using lipofectamine. The expressed EGFP was observed under fluorescent microscope and the Axin protein expression was detected by immunostaining using anti-Axin antibody. **RESULTS:** The eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-Axin was constructed and transfected successfully into C6 glioma cells. The green fluorescence of EGFP was observed in the plasma and nuclei of transfected cells, and Axin protein was only found in the plasma. **CONCLUSION:** The recombinant expression vector pIRES2-EGFP-Axin was constructed, and the EGFP and Axin gene could be co-expressed in the C6 cells. This study laid a foundation for the further research of the function of Axin in cell differentiation, growth and tumorigenesis.

[Keywords] Axin; EGFP; eukaryotic expression vector; C6 glioma cell

[摘要] 目的: 构建真核表达载体 pIRES2-EGFP-Axin, 并在神经胶质瘤细胞系 C6 中进行表达。方法: 用 PCR 的方法扩增 Axin 基因, 构建真核表达载体 pIRES2-EGFP-Axin, 经 Nhe I 及 Sal I 双酶切鉴定并测序。通过脂质体法转染 C6 细胞, 用荧光显微镜检测细胞中增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的表达, 用免疫组化染色的方法检测细胞中 Axin 的表达。结果: 构建了真核表达载体 pIRES2-EGFP-Axin, 用脂质体法转染神经胶质瘤细胞 C6 后, 经荧光显微镜和免疫组化染色法检测, 可见细胞内有 EGFP 及 Axin 的表达。结论: 成功地构建真核表达载体 pIRES2-EGFP-Axin, 并在神经胶质瘤细胞 C6 中表达, 为研究 Axin 对肿瘤的生物学作用以及 Axin 在肿瘤基因治疗中的应用奠定了基础。

[关键词] Axin; EGFP; 真核表达载体; 神经胶质瘤细胞 C6

[中图分类号] R739.264 **[文献标识码]** A

Axin (axis inhibition) 是在 1997 年对天然突变系小鼠基因分析中发现的^[1], 含有 832 个氨基酸。研究表明, Axin 不仅在胚胎发育过程中体轴的形成和神经系统的发育起着至关重要的作用, 而且与许多人类肿瘤的发生发展有着密切的关系。本实验室研究发现 21% 人胶质瘤组织中 Axin 基因的第 10 个外显子共有 3 处 6 例样本发生了错义突变, 提示其与胶质瘤的发生发展有一定关系^[2]。本研究旨在建立 Axin 基因的真核表达载体, 并将其转染神经胶质瘤细胞 C6, 使其稳定表达, 为研究 Axin 对胶质瘤细胞的生物学作用提供实验依据, 也为进一步动物实验奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 神经胶质瘤细胞 C6 及质粒 pIRES2-EGFP, 均由本实验室保存。质粒 pCMV5-HA-Axin 由厦门大学林圣彩教授惠赠。各种内切酶为 TaKaRa 公司产品。质粒快速提取试剂盒为 Omega 公司产品。胶回收试剂盒为上海华舜公司产品。测序由上海博亚公司完成。真核转染试剂 LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品。G418 为 Promega 公司产品。兔抗 Axin 抗体为 Santa Cruz 公司产品。SABC 试剂盒为博士德公司产品。DAB 显色液为华美公司产品。

收稿日期: 2004 - 09 - 08; 修回日期: 2004 - 11 - 08

基金项目: 国家杰出青年自然科学基金项目 (No. 30125012); 军队医药卫生科研基金项目 (No. 02ma04); 高等学校骨干教师及归国留学人员科研启动基金 (No. 1999-747)

作者简介: 张丽英 (1977 -), 女, 河北无极人, 硕士。

Tel: (029) 83374541-119; Email: zly79921@sohu.com

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体的构建 根据 GenBank 公布的小鼠 Axin 基因的序列, 设计了一对全长引物, 上游引物 AXN1 为: 5'-GCGGCTAGCATGCAAGTCCCAA-AATGAAT-3' 含有 *Nhe* I 的酶切位点 (划线部分) 和起始密码; 下游引物 AXS2 为: 5'-GCAGTCGACTCAG-TCCACCTTTTCCACCTT-3' 含有 *Sal* I 的酶切位点 (划线部分) 及终止密码子。采用 AXN1 和 AXS2 引物, 以质粒 pCMV5-HA-Axin 为模板进行 PCR 反应将所得目的片段插入 pRES2-EGFP 中的 *Nhe* I 与 *Sal* I 酶切位点之间, 构建重组质粒 pRES2-EGFP-Axin, 用 *Nhe* I 与 *Sal* I 双酶切鉴定并送测序。

1.2.2 C6 细胞的转染 收获细胞, 将 2×10^5 细胞重悬于 2 mL 培养液中, 接种于 6 孔板中, 于 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱中温育 8 h 细胞达到 50% 融合时, 分别用 50 μ L 无血清培养液稀释 5 μ g 的质粒和 3 μ L 的 Lipofectamine™ 2000 脂质体, 混合后放置 30 min。将 6 孔板中的培养液完全吸出, 用无血清培养液洗 2 遍, 洗去血清。在质粒和脂质体的混合液中, 加入 0.8 mL 无血清培养液, 轻轻混匀, 小心滴至 6 孔板中, 于 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱中温育 6 h。弃去转染液, 加 2 mL (含 200 mL/L 血清的 DMEM) 培养液继续培养。将 6 孔板中的细胞用 0.25 g/L 的胰酶消化 48 h 后, 移至玻璃培养瓶中, 加入 4 mL 培养液 (100 mL/L DMEM) 重悬, 用 2 g/L 的 G418 进行筛选。至阴性对照孔中的 C6 细胞完全死亡时, 更换培养液, 加入终浓度为 1.5 g/L 的 G418 培养。5 d 后, 用含有 1 g/L 的 G418 及含 120 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液以有限稀释法筛选阳性克隆。将所获阳性 C6 细胞克隆常规培养并制备细胞爬片。

1.2.3 EGFP 及 Axin 表达的检测 (1) EGFP 表达的检测: 将细胞爬片用 PBS 洗涤 2 次, 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 再以蒸馏水洗 3~4 次, 滴加 500 mL/L 甘油缓冲液封片, 于荧光显微镜下观察阳性细胞。(2) Axin 表达的检测: 将细胞爬片同上处理。PBS 洗涤后, 加 30 mL/L H₂O₂ 室温封闭 10 min, 再以蒸馏水洗涤 3 次, 每次 5 min。加 10 g/L Triton X-100, 室温放置 10 min, 用 PBS 洗 3 次, 每次 3 min。洗涤后, 加正常山羊血清室温封闭 40 min, 甩干, 依次滴加 1:200 的兔抗 Axin 抗体, 4 °C 过夜。次日复温 30 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加生物素标记的羊抗兔 IgG 于 37 °C 孵育 40 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加 SABC 复合

物, 同上孵育及洗涤后, 用 DAB 显色 5~10 min, 以苏木精衬染, 按常规脱水透明及 DPX 封片。结果判定: 标本中无阳性反应细胞或阳性反应细胞 < 5% 者为阴性; 标本阳性反应细胞数目 > 5% 者为阳性。

2 结果

2.1 Axin 基因片段的扩增 以质粒 pCMV5-HA-Axin 为模板, 采用 AXN1 和 AXS2 引物进行 PCR 扩增出约 2 499 bp 的基因片段 (图 1)。

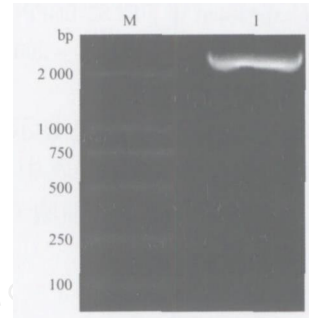


图 1 Axin 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig 1 Analysis of PCR product of Axin gene by agarose gel electrophoresis

M: DL 2 000 DNA marker; 1: PCR product

2.2 Axin 基因真核表达载体的构建 将 PCR 扩增出的约 2 499 bp 的基因片段与空载体 pRES2-EGFP 连接成功后, 用 *Nhe* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定 (图 2), 并送测序, 结果用 BLAST 软件进行分析, 与 GenBank 公布的序列一致。

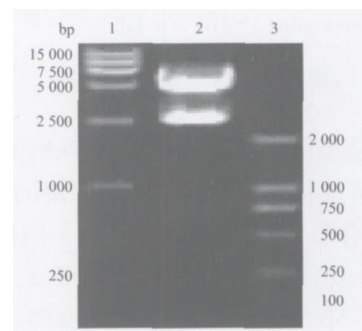


图 2 重组质粒 pRES2-EGFP-Axin 的酶切鉴定

Fig 2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pRES2-EGFP-Axin

1: DL 15 000 DNA marker; 2: pRES2-EGFP-Axin/*Nhe* I + *Sal* I; 3: DL 2 000 DNA marker

2.3 EGFP 在 C6 细胞中的表达 以 pRES2-EGFP-Axin 稳定转染 C6 细胞后, 在荧光显微镜下观察, 在 C6 细胞的胞质及胞核, 均可见特异性的 EGFP 表达 (图 3)。

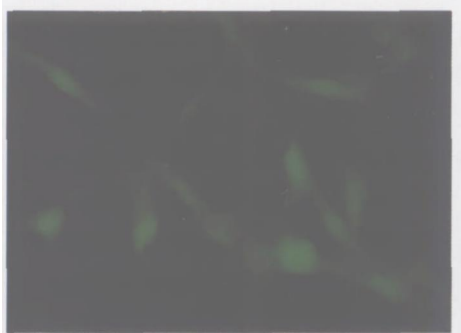


图 3 pRES2-EGFP-Axin在 C6细胞中表达的荧光检测

Fig 3 Detection of expression of pRES2-EGFP-Axin in the C6 cells under fluorescent microscope ($\times 200$)

2.4 Axin的表达 免疫组化染色显示, 稳定转染 pRES2-EGFP-Axin的 C6细胞的胞质中显示棕黄色的颗粒, 表明 Axin基因在胶质瘤细胞 C6中得到表达(图 4)。

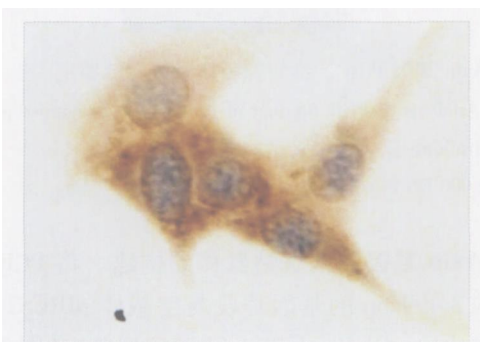


图 4 Axin在胶质瘤细胞 C6中表达的免疫组化染色检测

Fig 4 Detection of expression of Axin in the glioma C6 cells by immunostaining (SABC, $\times 400$)

3 讨论

Axin是小鼠 Fused (Fu)基因编码的蛋白, 最初被鉴定为 Wnt信号转导通路的抑制因子^[1]。后来发现 Axin具有多个功能结构域可和不同的蛋白结合, 包括: Wnt复合受体 LRP、Dishevelled、结肠癌抑制因子、GSK-3 β 、 β -catenin、酪氨酸激酶、蛋白磷酸酶 2A、Diversin、Ccd1 和 Axam^[3]。Axin作为骨架蛋白与不同的蛋白结合后, 下调 β -catenin的水平而下调 Wnt信号通路。另外, Axin也同一些与 Wnt信号通路无密切关系的蛋白相互影响, 最近发现 Axin在 JNK信号通路中也发挥着重要的作用。

Axin具有多种生物学功能: 可调节体轴的形成, 对细胞骨架蛋白的重建起着重要作用^[4], Axin基因的突变会引起神经系统发育缺陷^[5], 近年来又发现 Axin是一种肿瘤抑制因子 (tumor suppressor)^[6], 由此可见, Axin不仅在胚胎生长发育过程中有重要的

作用, 而且与许多人类肿瘤的发生发展也密切相关。本实验室研究发现, 21%人胶质瘤组织中 Axin的第 10个外显子共有 3处 6例样本发生了错义突变, 提示它与胶质瘤的发生发展有一定关系^[2], 因此我们拟建立稳定表达 Axin基因的细胞株, 为研究 Axin基因对胶质瘤细胞生物学功能的影响奠定了基础。

本实验中, 我们应用真核荧光表达载体 pRES2-EGFP, 与其他真核表达载体不同之处是: 该载体含有报告基因即增强型绿色荧光蛋白, 该蛋白能在蓝色激光下发出绿色荧光, 由于其 Ser65用 Thr代替, Phe64用 Leu代替, 使 EGFP的荧光强度提高了 35倍, 用普通荧光显微镜即可观测其表达, 而且转染 16~24 h后仍可稳定表达^[7]; 该载体含有 SV40 ori复制元件, 在宿主细胞分裂时, 可随胞质遗传给子代细胞, 可以在一定程度上保证目的基因稳定传递; 含有 RES, 能够增强目的基因翻译水平的表达; 含有 neu基因, 可用 G418来筛选真核靶细胞。

我们以 PCR扩增获得的约 2 499 bp的特异性片段插入到载体 pRES2-EGFP中, 经测序证实无误, 将其转染到胶质瘤细胞 C6, 用 G418筛选出阳性克隆, 获得可稳定表达 Axin基因的 C6细胞。由于所用真核表达载体含有 EGFP, 可直接用荧光显微镜观察到其表达。本实验结果表明, 在荧光显微镜下可观察到稳定转染后的 C6细胞呈现明显的绿色荧光, 说明构建的重组载体已成功转进 C6细胞中。同时, 我们用免疫组化方法观察到重组质粒转染后的 C6细胞胞质中显示棕黄色颗粒, 表明 Axin蛋白在 C6细胞中获得表达。

参考文献:

- [1] Zeng L, Fagotto F, Zhang T, *et al*. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation[J]. *Cell*, 1997, 90: 181 - 192
- [2] 邵秋杰, 李青, 金利华, 等. 胶质瘤中 Axin基因点突变检测及表达研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2003, 2(4): 334 - 337.
- [3] Luo W, Lin SC. Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways[J]. *Neurosignals*, 2004, 13(3): 99 - 113.
- [4] Cowan CA, Henkemeyer M. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals[J]. *Nature*, 2001, 413: 174 - 178
- [5] Christian JL, Moon RT. Interactions between Xwnt8 and spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*[J]. *Genes Dev*, 1993, 7: 13 - 28.
- [6] Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis - a look outside the nucleus[J]. *Science*, 2000, 287: 1606 - 1609.
- [7] Marx JC, Allay JA, Persons DA, *et al*. High-efficiency transduction and long-term gene expression with a murine stem cell retroviral vector encoding the green fluorescent protein in human marrow stromal cells [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(7): 1163 - 1173.