

• 基础实验研究论著 •

DKK1 真核表达质粒的构建及表达产物鉴定*

徐 亮, 陆奎英, 崔素芬, 包广宇[△]

(江苏省扬州市第一人民医院检验科, 江苏扬州 225001)

摘要:目的 构建人 DKK1 基因的真核表达质粒, 表达、纯化、鉴定其表达产物。方法 自宫颈癌组织提取癌细胞, 抽提 mRNA, RT-PCR 获得人 DKK1 基因片断, 构建重组质粒 pCMV-HA2/DKK1, EcoR I 酶切、测序鉴定重组质粒; 借助脂质体将载体瞬时转染入 Free-Style 293-F 细胞(无血清培养)蛋白印迹法检测 DKK1 蛋白。结果 RT-PCR 获得片断与预期结果相符, 酶切鉴定、测序鉴定证实 pCMV-HA2/DKK1 重组质粒构建成功; DKK1 蛋白分泌表达在 Free-Style 293-F 细胞培养液中, Western Blot 鉴定表达产物为 DKK1 蛋白。结论 成功构建了人 DKK1 的真核表达质粒, 并对该基因的真核表达产物进行鉴定, 为下一步的 DKK1 蛋白对肿瘤发生中的生物学活性研究奠定基础。

关键词: 蛋白质类; 细胞, 培养的; 哺乳动物; 基因表达

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 23. 002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)23-2819-03

Construction of human dickkopf1 eukaryotic expression plasmid and identification the product of expression*

Xu Liang, Lu Kuiying, Cui Sufen, Bao Guangyu[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yangzhou, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

Abstract: Objective To clone, express, purify and verify human Dickkopf1 (DKK1). **Methods** The cervical cancer cells from cervical cancer tissue were cultured, and mRNA was harvested from the fifth generation. The DKK1 gene was acquired via RT-PCR and cloned in pCMV-HA2 plasmid containing the HA tag to construct the recombinant plasmid pCMV-HA2/DKK1. The recombinant plasmid was identified by restriction enzyme cutting and sequence analysis. The recombined plasmid was transiently transfected by lipofectin reagent into Free-Style 293-F cells, which were grown in a serum-free suspension culture. The expression of DKK1 protein was measured by Western blotting. **Results** The product of RT-PCR was coincide with what we preconceived. Restriction enzyme EcoR I cutting and sequence analysis proved the recombinant plasmid to be pCMV-HA2/DKK1. The product of expression was verified properly via Western Blot with special anti-DKK1 antibody. **Conclusion** The successful cloning of DKK1 gene and expression of DKK1 protein lay a basis for studying the effects on the biologic activity of tumorigenesis.

Key words: proteins; cells, cultured; mammals; gene expression

DKK1 是分泌型糖蛋白, 属于 DKK 家族, 含有 2 个富含半胱氨酸的保守区域 Cys1 和 Cys2, 能够抑制经典的 Wnt 信号通路^[1-2]。已有的国内外研究结果显示, DKK1 是 1 种肿瘤特异性蛋白, 在肝癌、肺癌等肿瘤中均有高表达, 且与肝癌的转移和预后相关^[3-6]。由于 DKK1 蛋白富含二硫键, 翻译后折叠过程复杂, 且有糖基化修饰, 采用非哺乳动物细胞表达系统较难获得天然状态活性蛋白, 因而本研究旨在构建 DKK1 真核表达系统, 用哺乳动物细胞 Free-Style 293-F 表达人 DKK1 蛋白, 为高效大量制备其重组蛋白为进一步研究 DKK1 在肿瘤中的生物学作用提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 宫颈癌组织为经病理诊断确诊的宫颈鳞状上皮细胞癌组织, 由本院病理科提供。

1.2 仪器与试剂 上海肯强实业有限公司提供美国 GIBCOL/BRL 生产的 DMEM 培养基, 胎牛血清, RNA 提取试剂; 上海博亚生物技术有限公司提供美国 Invitrogen 生产的脂质体转染试剂, Free-Style 293-F 细胞及转染试剂、培养液, 美国 Santa Cruz 生产的 HA 抗体, 美国 Pierce 抗小鼠抗体; 上海华

舜公司提供小剂量质粒抽提试剂盒, 北京鼎国公司提供 DGL2000 标记物; 上海文乐生物科技有限公司提供美国 Clontech Top10F' 感受态细胞; LB 培养基 (Decent Biotech), 北京碧云天生物技术研究所提供 pCMV-HA2 质粒; 福州迈新生物技术宝生物公司提供质粒抽提及凝胶回收试剂盒、RT-PCR 试剂盒、T4DNA 连接酶及限制性内切酶 EcoR I, 引物合成及基因测序均由上海博亚公司执行。

1.3 真核表达质粒的构建方法

1.3.1 将获取的宫颈癌组织剪碎, 用 0.05% I 型胶原酶消化, 200 目滤网过滤, 细胞成分接种于含 10% FCS 的 DMEM 细胞培养基中, 5% CO₂, 37 °C, 孵箱中培养, 3 d 换液 1 次, 收集第 5 代细胞备用。

1.3.2 RT-PCR 获得 DKK1 cDNA 调整细胞 1 × 10⁷ 个/毫升, 常规方法抽提 mRNA, 抽提物保存于 -70 °C。使用 RT-PCR 试剂盒反转录制备 cDNA。RT-PCR 引物为正向引物: 5'-TCA CGC TAT GTG CTG CCC CG-3' 反向引物: 5'-TGA GGC ACA GTC TGA TGA CCG GA-3'。

1.3.3 目的 DKK1 片段的获得 取 cDNA 模板进行 PCR 扩

增,设计引物包括 DKK1 的整个开放阅读框架:正向引物:5'-GAA TTC ATG GCT CTG GGC GCA -3'反向引物:5'-GAA TTC GTG TCT CTG ACA AGT -3',根据真核表达载体 pCMV-HA2 的要求,设计引物用 PCR 的方法扩增 DKK1。在 5' 和 3' 端设计 EcoR I 的酶切位点。琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,在长波紫外线下观察,用刀片将 PCR 产物条带小心切割下来,放入收集管中。胶回收的具体步骤和操作可参见试剂盒的说明书。PCR 扩增以后,酶切 PCR 产物,胶回收酶切产物并定量。

1.3.4 pCMV-HA2/DKK1 重组质粒的构建 取 3.5 μ L 回收纯化的 PCR 产物,加入 0.5 μ L pCMV-HA2 载体,0.5 μ L T4 连接酶,0.5 μ L 10 倍的反应缓冲液,混匀,稍离心,使混合物集中于管底,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。第 2 天将连接产物转化新鲜制备的 Top10F' 感受态细胞后,将其涂布到氨苄青霉素抗性的 LB 板,过夜培养后挑取白色菌落,加入到有氨苄青霉素抗性的 3 mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒,操作按试剂盒说明。酶切鉴定后,送上海博亚公司进行测序。

1.4 DKK1 蛋白的表达及鉴定

1.4.1 重组 pCMV-HA2/DKK1 载体的转染 Free-Style 293-F 细胞置于 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 体积分数为 8% 的培养箱中,130 r/min 摇瓶培养。转染前将细胞密度调整为 1×10^6 个/毫升,且吹散使细胞无结团。转染步骤:分别将 100 μ g 重组质粒 pCMV-HA2/DKK1 及 200 μ L Free-Style 293-F 细胞脂质体转染试剂用 Opti-MEM 稀释至 3.33 mL,静置 5 min 后将质粒与转染试剂缓慢混合,室温反应 20 min,形成 DNA-fectin 混合物后加入 93.3 mL Free-Style 293-F 细胞(密度 1×10^6 个/毫升)中至终体积 100 mL,37 $^{\circ}$ C、8%CO₂,和 130 r/min 摇瓶培养。

1.4.2 蛋白质印迹法检测 DKK1 蛋白的表达细胞转染质粒后,收集培养上清液和细胞,用细胞裂解液处理细胞后离心取上清液,并用 BCA 蛋白定量法检测蛋白的浓度。细胞培养上清液或细胞抽提蛋白与上样缓冲液[Tris-HCl(0.35 mol/L, pH 6.8), 10.28% SDS, 36% 甘油, 0.6 mol/L 二硫苏糖醇, 0.012% 溴酚蓝]混合后,100 $^{\circ}$ C 水浴处理 5 min,随即行 12% SDS-PAGE(浓缩胶 80 V, 25 min; 分离胶 150 V, 1 h) 分离蛋白,随后将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上(300 mA, 1 h)。蛋白膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBST(5% Tween-20) 封闭 2~3 h,加入兔抗人 DKK1 多抗(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,用 PBST 洗膜 4 次,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:2 000 稀释),室温孵育 1 h,再用 PBST 洗膜 5 次,最后按化学发光试剂盒说明书发光显影。

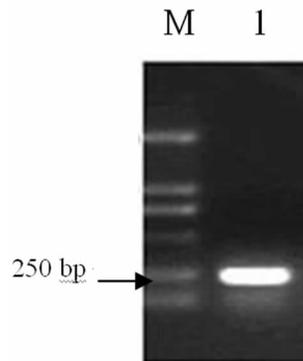
2 结 果

2.1 RT-PCR 结果 RT-PCR 结果:在宫颈癌组织中分离肿瘤细胞作 RT-PCR。结果显示肿瘤细胞 DKK1 的逆转录 cDNA 的扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中均有一条近 250 bp 的特异性条带。见图 1。

2.2 pCMV-HA2 载体表达克隆酶切鉴定 进行 DKK1 的 PCR 后,扩增出单一条带。将 PCR 产物纯化回收后连入 pCMV-HA2 载体,转化后,挑克隆进行酶切鉴定,结果显示酶切后在 756 bp 处有一条带,大小与预期相符,如图 2。取产物进行测序结果与 GenBank 中检索获得的人 DKK1 基因 cDNA 序

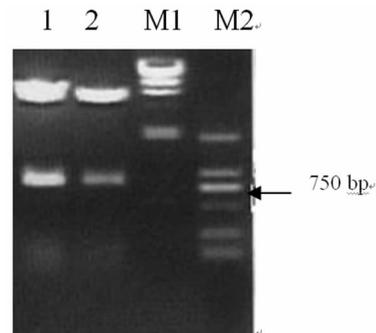
列(NM_012242.2)完全一致,初步证实 pCMV-HA2/DKK1 重组质粒构建成功。

2.3 重组人 DKK1 蛋白在 Free-Style 293-F 细胞培养系统中的分泌表达 为验证所构建的真核载体能够分泌表达 DKK1 蛋白,在转染重组质粒 pCMV-HA2/DKK1 和对照空载体 pCMV-HA2 入 Free-Style 293-F 细胞 48 h 后,收获上清液和细胞,行蛋白质印迹法检查检测。结果显示,在上清液和细胞质中均能检测到 DKK1 蛋白的表达。根据蛋白电泳分析,其相对分子质量约为 28×10^3 ,与预期相符。同时采用 HA 抗体检测验证了 DKK1-HA 融合蛋白的表达。见图 2~3。



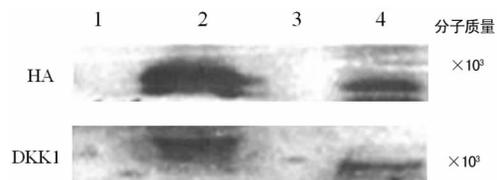
M: DGI2000; 1: 宫颈癌细胞 RT-PCR 结果

图 1 RT-PCR 检测肿瘤细胞株 Dkk1 基因的表达



M1: λ DNA; M2: DL2000; 1, 2: pCMV-HA2/Dkk1 两个表达克隆

图 2 pCMV-HA2/Dkk1 亚克隆 1, 2 号经 EcoR I 酶切后的电泳图



1: 转染 pCMV-HA2 细胞培养上清; 2: 转染 pCMV-HA2/DKK1 细胞培养上清; 3: 转染 pCMV-HA2 细胞裂解物; 4: 转染 pCMV-HA2/DKK1 细胞裂解物; 上图: 抗 HA 抗体反应结果; 下图: 抗 DKK1 抗体反应结果

图 3 蛋白印迹法检测 HA 标记的 DKK1 融合蛋白

3 讨 论

Wnt 信号通路在个体发育和多种肿瘤发生、发展中起到非常重要的作用。Wnt 通路有两个胞外抑制子^[7], 一个称为 Frizzled 相关蛋白, 另一个抑制 Wnt 信号通路的是 DKK1, 其

分子量约 35×10^3 , 是一种分泌性糖蛋白。它与细胞膜上的 wnt 受体 LRP5(或 LRP6)和 DKK1 共受体 Kremen1(或 Kremen2)结合, 形成内吞小体, 从而关闭 Wnt 信号通路。DKK1 是一类分泌性蛋白, 已有研究表明, DKK1 在正常成人组织中仅胎盘存在表达, 而在多种肿瘤中表达异常。在体外培养的 HeLa 细胞中导入 DKK1 表达缺失的质粒会导致肿瘤细胞异常增生^[8], 在宫颈癌 HeLa 细胞株中 DKK1 存在表达沉默现象^[9], 在宫颈癌 HeLa 细胞株培养中发现分离的非瘤性回复体中, 发现 DKK1 蛋白的高表达^[10], 提示 DKK1 在宫颈癌的发生中存在重要作用。种种研究结果表明 DKK1 蛋白很可能是 1 种肿瘤特异性蛋白, 可用于肿瘤的诊断或靶向治疗。因此。获得具有天然生物活性的人 DKK1 蛋白对于研究其生物学结构与功能及在肿瘤中的应用至关重要。

目前有多种表达系统应用于蛋白的制备, 主要包括大肠埃希杆菌, 酵母菌, 植物、昆虫和哺乳动物细胞表达系统。其中以哺乳动物细胞表达系统在蛋白可溶性、蛋白折叠和翻译后修饰等方面更接近天然活性蛋白, 因而应用越来越广泛^[1]。人胚肾 (HEK)293 细胞及其衍生细胞是常用的用于蛋白制备的哺乳动物细胞^[11]。

本研究采用真核表达载体 pCMV-HA2 和哺乳动物细胞 Free-Style 293-F 表达系统, 可获得大量更接近天然活性的人 DKK1 重组蛋白。通过宫颈癌组织提取癌细胞, 常规抽提细胞总 mRNA, 通过 RT-PCR、PCR 获得人 DKK1 基因片断, 构建重组质粒 pCMV-HA2/DKK1, 经细菌扩增后提取重组质粒, 酶切后电泳获得的插入片段长度大约 750 bp 与预期片段长度一致。测序结果与 GenBank 中检索获得的人 DKK1 基因 cDNA 序列 (NM_012242. 2) 完全一致, 初步证实 pCMV-HA2/DKK1 重组质粒构建成功。借助脂质体将载体瞬时转染入 Free-Style 293-F 细胞 (无血清培养), 经培养后对上清和细胞裂解物进行蛋白印迹法检测 DKK1 蛋白。Western Blot 鉴定表达产物为 DKK1 蛋白。本研究成功构建了人 DKK1 的真核表达质粒, 并对该基因的真核表达产物进行鉴定, 为下一步的 DKK1 蛋白对肿瘤发生中的生物学活性研究奠定基础^[12]。

参考文献

[1] Fedi P, Bafico A, Nieto Soria A, et al. Isolation and biochemical

characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling[J]. J Biol Chem, 1999. 274 (27): 19465-19472.

[2] Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators[J]. Oncogene, 2006, 25(57): 7469-7481.

[3] 余艳军, 万晓桢, 于彬, 等. Dickkopf(DKK1) 在肝癌组织及多种人肿瘤细胞系中的表达分析[J]. 肿瘤, 2006, 26(12): 1109-1112.

[4] Yu B, Yang X, Xu Y, et al. Elevated expression of DKK1 is associated with cytoplasmic/nuclear beta-catenin accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas[J]. J Hepatol, 2009, 50(5): 948-957.

[5] Sheng SL, Huang G, Yu B, et al. Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer[J]. Clin Chem, 2009, 55(9): 1656-1664.

[6] 徐吟亚. 血清 Dickkopf-1 水平在诊断肺癌及其骨转移中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 379-380.

[7] Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 13): 2627-2634.

[8] Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, et al. A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes; Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(1): 47-59.

[9] Lee J, Yoon YS, Chung JH. Epigenetic silencing of the WNT antagonist DICKKOPF-1 in cervical cancer cell lines[J]. Gynecol Oncol, 2008, 109(2): 270-274.

[10] Tsai JF, Jeng JE, Chuang WL. Dickkopf-1 and hepatocellular carcinoma[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(10): e410.

[11] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(11): 1393-1398.

[12] 朱建坤, 李道堂. Dickkopf-1 与肿瘤[J]. 国际肿瘤学杂志, 2010, 37(8): 565-567.

(收稿日期: 2012-06-20)

(上接第 2818 页)

Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(9): 2053-2056.

[6] Luo L, Jiang X, Wu Q, et al. Efflux pump overexpression in conjunction with alternation of outer membrane protein may induce *Acinetobacter baumannii* resistant to imipenem[J]. Chemotherapy, 2011, 57(1): 77-84.

[7] Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, et al. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(4): 821-823.

[8] 陈敏, 王跃, 刘明方. 主动外排机制在鲍曼不动杆菌耐药性中的作用[J]. 中国微生物学杂志, 2008, 20(2): 150-153.

[9] 史利宁, 张慧, 邵海枫, 等. 泛耐型鲍曼不动杆菌耐药机制的探讨[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(5): 327-330.

[10] 王辉, 郭萍, 孙宏莉, 等. 碳青霉烯类耐药的不动杆菌分子流行病学及其泛耐药的分子机制[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(12): 1066-1073.

[11] Lee Y, Kim CK, Lee H, et al. A novel insertion sequence, ISAba10, inserted into ISAba1 adjacent to the bla(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrobiob Agents Chemother, 2011, 55(1): 361-363.

[12] 陈鹏, 丁进亚. 鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(15): 2463-2466.

(收稿日期: 2012-07-22)