

研究报告

牛 pAcGFP-FADD 融合蛋白真核表达载体构建及在 CHO-K1 细胞中的表达

杨润军^{1,2}, 许尚忠^{1,2}, 张路培², 李俊雅², 高雪²

1 西北农林科技大学 动物科技学院, 杨凌 712100

2 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要: FADD 是 Fas/FasL 系统的一个信号连接蛋白, 通过传递凋亡信号, 介导细胞凋亡。为了揭示 FADD 在牛卵泡发育过程中的调控作用, 采用 RT-PCR 从牛卵巢组织中扩增 FADD 基因, 将其 cDNA 终止密码子删除, 采用定向克隆技术连接到带有水母绿色荧光蛋白(AcGFP)报告基因的真核表达载体 pAcGFP-N1 中, 构建融合蛋白重组质粒, 经 *Bgl* II/*Eco*R I 酶切、测序鉴定后, 用脂质体介导质粒转染 CHO-K1 细胞, 观察有无荧光的表达及用 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测基因转录、表达情况。结果表明, 成功克隆牛 FADD 基因, 通过 PCR 方法在 FADD 阅读框两端引入了 *Bgl* II 和 *Eco*R I 克隆位点, 并于起始位点前加入 Kozak 序列, 成功构建 pAcGFP-bFADD 融合蛋白真核表达载体, 重组质粒转染 CHO-K1 24 h 后在荧光显微镜下观察到绿色荧光, 转染效率可达 65%, 通过 RT-PCR 扩增出 654 bp 的转录产物, 并用 Western blotting 检测到 51.4 kD 目的蛋白的表达。

关键词: FADD, pAcGFP-N1, 重组质粒, CHO-K1 细胞

Construction of Mammalian Cell Expression Vector for pAcGFP-bFADD Fusion Protein and Its Expression in CHO-K1 Cell

Runjun Yang^{1,2}, Shangzhong Xu^{1,2}, Lupei Zhang², Junya Li², and Xue Gao²

1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

2 Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Fas-associated death domain (FADD) is a signal connection protein in Fas/FasL apoptotic path which might play a key role on apoptosis by transferring apoptotic signal. To reveal the intracellular signal transduction molecules involved in the procedure of follicular development in bovine ovary, we cloned FADD gene in bovine ovary tissue with RT-PCR, deleted the termination codon in its cDNA and directionally cloned the amplified FADD gene into eukaryotic expression vector pAcGFP-N1 including AcGFP, successfully constructed the fusion protein recombinant plasmid. After identifying by restrictive enzyme *Bgl* II/*Eco*R I and sequencing, transfected pAcGFP-bFADD into CHO-K1 cell mediated by Lipofectamine 2000, observed the expression of AcGFP and

Received: May 26, 2008; **Accepted:** August 25, 2008

Supported by: the National High Technology Research and Development Program (863 Program)(No. 2006AA107Z 197) and National Technology Supporting Scheme "Breeding Project of Animals and Plants" during the 11th Five Year Plan Period (No. 2006BAD01A10).

Corresponding author: Shangzhong Xu. Tel: +86-10-62816065; Fax: +86-10-62817806; E-mail: simmenta@vip.sina.com

“十一五”国家高技术研究发展计划(“863 计划”, No. 2006AA107Z197), “十一五”国家科技支撑计划重大项目“农林动植物育种工程”(No. 2006BAD01A10)资助。

detected the transcription and expression of FADD by RT-PCR and Western blotting. The results showed that the cattle FADD was successfully cloned, the pAcGFP-bFADD fusion protein recombinant plasmid was successfully constructed by introducing *Bgl* II, *Eco*R I cloning site at two ends of FADD open reading frame and inserting a Kozak sequence before start codon. AcGFP expression was detected as early as 24 h after transfection. The percentage of AcGFP positive cells reached about 65% after 24 h. A 654 bp transcription was amplified by RT-PCR, and 51.4 kD target protein was detected by Western blotting. Construction of pAcGFP-bFADD recombinant plasmid should be helpful for further understanding the mechanism of regulation of FADD on bovine oocytes formation and development.

Keywords: FADD, pAcGFP-NI, recombinant plasmid, CHO-K1 cell

FADD 是于 1995 年由 Ural 等^[1]用酵母双杂交系统克隆出的一种能与 Fas 相互作用诱导细胞凋亡的蛋白, 因其包含一个与 Fas 同源的死亡结构域(Death domain), 因而命名为 Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD)。随后, 研究人员对 FADD 进行了大量的研究, 发现 FADD 不仅在凋亡信号传导通路中起作用, 而且在 T 细胞的增殖、精卵发生, 胚胎的发育及基因治疗的应用上也有重要作用^[2-4]。

牛 FADD 基因位于 29 号染色体上, 包含 2 个外显子, 编码 DED 和 DD 蛋白结构域。FADD mRNA 和蛋白广泛表达于淋巴样和非淋巴样组织(如肝、睾丸、胰腺、卵巢等), 特别在卵巢、睾丸、淋巴组织中高表达^[5]。

FADD 不仅传导凋亡信号, 而且传导细胞的生长信号, 通过促进有丝分裂诱导细胞增殖^[6]。在卵母细胞发育的不同阶段, FADD 既通过 Fas/FasL 途径参与卵泡闭锁, 又通过细胞周期中与不同的胞浆蛋白相互作用诱导卵巢颗粒细胞增殖, 进而促进卵母细胞发育, 来维持卵泡发育的平衡状态。揭示 FADD 在卵母细胞发生调控过程具有重要作用。

为了研究 FADD 的生物学功能, 本试验将克隆的牛 FADD 基因定向插入真核表达载体 pAcGFP-NI 中, 构建 pAcGFP-bFADD 融合蛋白哺乳动物细胞表达载体, 并在 CHO-K1 细胞中进行表达, 以期为进一步揭示 FADD 在牛卵母细胞发育中的调控作用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种, 克隆载体、表达载体质粒及细胞

DH5 α 感受态大肠杆菌、PMD19-T Simple vector、cDNA 合成反转录试剂盒(TaKaRa 公司),

pAcGFP-NI 质粒(Clontech 公司), Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司), CHO-K1 细胞(中国医学科学院细胞中心)。

1.1.2 酶及主要试剂

Bgl II、*Eco*R I 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司), 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒、DNA marker(天根生化科技公司), DMEM 培养基、胎牛血清、G418(Gibco), 脂质体 Lipofectamine 2000、Opti-MEM 无血清培养基(Invitrogen 公司), 兔抗牛 FADD 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), HRP 标记的抗兔二抗(北京中衫金桥公司), 超敏型 ECL 化学发光显影试剂盒、显影液、定影液(普利莱公司)。

1.2 方法

1.2.1 牛卵巢总 RNA 提取及 cDNA 合成

无菌摘取健康母牛的卵巢, 迅速置于液氮中带回实验室, 用 Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定其 OD 值, 将 $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ 的 RNA 置于 -70°C 备用。按照 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA。

1.2.2 PCR 体外扩增 FADD 基因及 TA 克隆与序列分析

根据 GenBank 检索到的牛 FADD 基因全长 cDNA 序列(登录号: NM_001007816), 设计一对特异性引物: 上游引物: 5'-CATGGACCCGTTCTCCTGG TGC-3'; 下游引物: 5'-CACAGCCACCTCCCTGAG TCTTC-3'。PCR 扩增采用 20 μL 体系, 反应程序: 94°C 90 s; 94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。取 3 μL PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收 PCR 产物。

将纯化的 FADD 基因克隆到 pMD19-T 载体, 转化 DH5 α 宿主菌, 挑取阳性克隆, 进行菌液 PCR, 并

送北京诺赛基因组研究中心测序。

1.2.3 牛 FADD 与 AcGFP 融合蛋白哺乳动物细胞表达载体的构建

根据牛 FADD 基因的酶切图谱和 pAcGFP-N1 的多克隆酶切位点, 选用 *Bgl* II 和 *Eco*R I 作为克隆位点。在 FADD 基因的完整阅读框序列的两端设计引物: 上游引物在 ATG 前加入 *Bgl* II 酶切位点和 4 个保护性碱基, 同时加入 Kozak 序列以提高插入基因在真核细胞中转录起始和表达的效率, 设计为: S: 5'-ACTAAGATCT GGCACCATGGACCCGTTCTG GT-3'; 反向引物设计时删除终止密码子 TGA, 并在其后加入一个 C 碱基和 *Eco*R I 酶切位点, 使 FADD 阅读框与下游的 AcGFP 基因序列保持一致, 与融合蛋白基因同时进行表达, 设计为:

AS: 5'-ACTAGAATTCCGGAGGCTCCCGGGG CAGCG-3'(下划线分别为酶切位点, 波浪线为 Kozak 序列)。

为了提高扩增效率, 以上面 TA 克隆的 pT-bFADD 质粒为模板, 采用降落 PCR 方法扩增 FADD 基因编码区全长序列, 反应程序: 94°C 90 s; 94°C 30 s, 退火温度分别为 70°C、68°C、66°C 各 30 s, 72°C 1 min, 最后 28 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经凝胶回收试剂盒纯化回收后克隆到 pMD19-T Simple vector, 转化 DH5 α 宿主菌, 提取质粒, 用 *Bgl* II /*Eco*R I 双酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶纯化回收酶切片段。同样 pAcGFP-N1 质粒用 *Bgl* II /*Eco*R I 双酶切, 纯化回收酶切片段。将 FADD 和 pAcGFP-N1 酶切片段用 T4 DNA 连接酶连接、转化 DH5 α 宿主菌后、筛选阳性克隆。

1.2.4 重组质粒 pAcGFP-bFADD 的鉴定

挑取阳性克隆, 摇菌, 进行菌液 PCR 扩增。同时用小量质粒抽提试剂盒提取质粒进行 *Bgl* II /*Eco*R I 双酶切, 并将酶切鉴定后的质粒送北京诺赛测序公司进行测序。经鉴定正确的 pAcGFP-bFADD 质粒在 DH5 α 中扩增, 以无内毒素超纯质粒抽提试剂盒制备不含内毒素的 pAcGFP-bFADD 表达载体, 于 -20°C 保存备用。

1.2.5 G418 对 CHO-K1 细胞的毒性试验

取生长状态良好的 CHO-K1 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液, 以 5000 个/孔接种于 24 孔细胞培养板中, 37°C、5% CO₂ 培养箱静置培养

24 h 待细胞贴壁后, 更换含有 G418 浓度分别为 100 μ g/mL、200 μ g/mL、300 μ g/mL、400 μ g/mL、500 μ g/mL、600 μ g/mL、700 μ g/mL、800 μ g/mL、900 μ g/mL 和 1000 μ g/mL DMEM 培养基, 每个浓度做 2 个平行孔, 每 3 d 换液 1 次, 连续观察 15 d, 取给药后 10 d~14 d 左右全部杀死细胞的最低浓度组为 G418 对 CHO-K1 细胞的最佳筛选浓度。

1.2.6 脂质体介导 pAcGFP-bFADD 转染 CHO-K1 细胞及融合蛋白的荧光观察

转染前 1 d, 将 CHO-K1 细胞以 5×10^5 /mL 的密度加入无抗生素的 DMEM 培养基中, 接种于 12 孔板。待细胞 90% 融合时, 将 DMEM 培养基换为 Opti-MEM I Reduced Serum Medium 培养基, 准备进行转染。取 LipofectamiTM 2000 4 μ L, 加入 100 μ L Opti-MEM I Reduced Serum Medium 培养基中, 室温孵育 5 min; 取 pAcGFP-bFADD 质粒 3.2 μ L 加入 100 μ L Opti-MEM I Reduced Serum Medium 培养基中摇匀; 将 2 种溶液温和混合并于室温孵育 20 min。把 200 μ L 复合物加入含有细胞和 Opti-MEM 培养基的孔中, 于 37°C、5% CO₂, 完全适度条件下培养 4 h~6 h 后, 更换含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养。并于转染 24 h 后加入 G418, 以最佳筛选浓度 (600 μ g/mL) 进行筛选, 当出现克隆后改用低浓度 G418 进行维持筛选, 待细胞铺满时再恢复 G418 至最佳筛选浓度, 进行复选。

转染后从 12 h 开始, 每隔 24 h 在荧光显微镜下观察细胞形态及细胞中水母绿色荧光蛋白(AcGFP) 的表达情况。

1.2.7 细胞中 FADD 基因的 RT-PCR 分析及融合蛋白的 Western blotting 检测

细胞经筛选 10 d 后, 收集 CHO-K1 细胞, 一部分用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR 检测; 另一部分按照 RIPA 裂解液使用说明进行操作, 加入 1 mL RIPA buffer 和 10 μ L PMSF(10 mg/mL) 裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 用 Bradford 比色法测定蛋白浓度。表达产物进行 SDS-PAGE 后电转硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 与兔抗 FADD 多克隆抗体和 HRP 酶标二抗反应后, 将膜蛋白面朝下与 ECL 试剂盒 A、B 混合液充分接触 3 min, 弃残液, 放入 X-光片夹中, 在暗室中, 将 X-光片放在膜上, 关上 X-光片夹, 曝光 1 min~5 min, 取出 X-光片, 迅速浸

入显影液, 显影时间一般为 1 min~2 min(20°C~25°C), 接着浸入定影液中, 定影 5 min~10 min, 自来水冲洗, 室温晾干, 拍照。

2 结果与分析

2.1 牛 FADD 基因的 RT-PCR 扩增及 TA 克隆与序列分析

从牛卵巢中提取 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.96。电泳检测结果表明: 5S mRNA 较小, 跑到了凝胶的边界, 条带较弱但可见, 18S rRNA 和 28S rRNA 条带明亮, 且 28S 条带约为 18S 条带的 2 倍。说明提取的 RNA 没有发生降解, 纯度好(图 1)。

经 RT-PCR 扩增, 得到一条约 730 bp 的 DNA 片段, 与预计大小相符(图 2, 泳道 F), 该片段包含 630 bp 的 CDS 区编码序列。

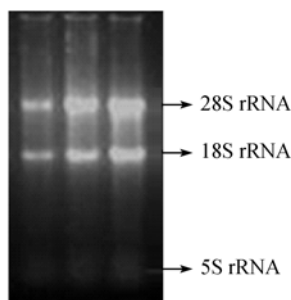


图 1 从牛卵巢中提取的总 RNA

Fig. 1 Result of total RNA from bovin ovary

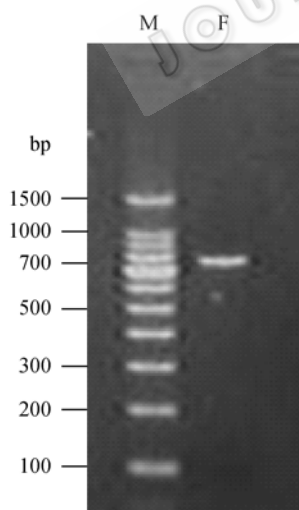


图 2 牛 FADD RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Product of bovin FADD gene by RT-PCR

The cDNA from bovin ovary acted as templet, FADD-s and FADD-as primers were used to amplify the FADD fragment. Total volume of the reaction was 20 μ L. A 730 bp fragment was detected by electrophoresis on 1.2% agarose gel. M: DNA marker DL 1500; F: cDNA of bovin FADD

纯化、回收后的基因片段克隆到 pMD19-T 载体, 阳性克隆菌液经 PCR 扩增后电泳检测出现 730 bp 的目的条带, 表明基因克隆成功。测序结果显示, 牛 FADD 基因 ORF 共 630 bp, 编码 209 aa, 与 NCBI 上公布的序列进行比对, 同源率为 100%。

2.2 牛 FADD 与 AcGFP 融合蛋白哺乳动物细胞表达载体的构建

利用带有 Kozak 序列及删除终止密码子的特异性引物, 经降落 PCR 扩增出带有 *Bgl* II、*Eco* R I 酶切位点的牛 FADD 基因编码区全长序列, 约 654 bp (图 3A, 泳道 1, 2)。从阳性克隆中提取的 PMD19-T-FADD 质粒经 *Bgl* II/*Eco* R I 双酶切酶切下目的片段(图 3B, 泳道 1), 与预期片段相同, 并且两端带有内切酶黏性末端。

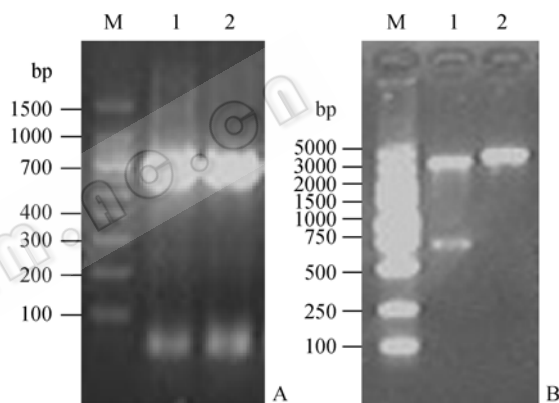


图 3 带有 *Bgl* II、*Eco* R I 克隆位点的牛 FADD 基因、pT-bFADD 质粒及酶切鉴定

Fig. 3 Construction and identification of pT-bFADD

The pMD19 T-FADD plasmid acted as templet, specificity primers were used to amplify the FADD coding region with *Bgl* II/*Eco* R I site. A 654 bp fragment was detected by electrophoresis. The FADD coding region was cloned into the pMD19-T Simple vector, then transformed into DH5 α , the plasmids were extracted from positive clones and digested with *Bgl* II and *Eco* R I enzyme (TaKaRa) for 6 hours at 37°C following the supplier's direction. A: Result of bovin FADD gene with *Bgl* II, *Eco* R I cloning sites by PCR (M: DNA marker DL 1500; 1, 2: cattle FADD); B: Identification of pT-bFADD (M: DNA marker DL 5000; 1: pT-bFADD plasmid digestion by restrictive enzyme *Bgl* II/*Eco* R I; 2: pT-bFADD plasmid)

将目的片段成功地克隆至 pAcGFP-N1 载体, 并连接于 AcGFP 序列的 5'端, 保证了 FADD 的阅读框与 AcGFP 一致, 从筛选的阳性克隆中选取 2 个菌落提取质粒, 经 *Bgl* II、*Eco* R I 双酶切均切下 654 bp 的目的基因片段(图 4, 泳道 2, 3)。

经测序分析进一步证实,牛 FADD 基因编码序列全部正确插入 pAcGFP-N1 载体,通过删除 TGA 添加 C 碱基,确保了 FADD 编码序列与 pAcGFP 基因具有相同的读码框,从而使目的基因与报告基因构成的融合蛋白基因能够同时表达(图 5)。将构建好的载体命名为 pAcGFP-bFADD。

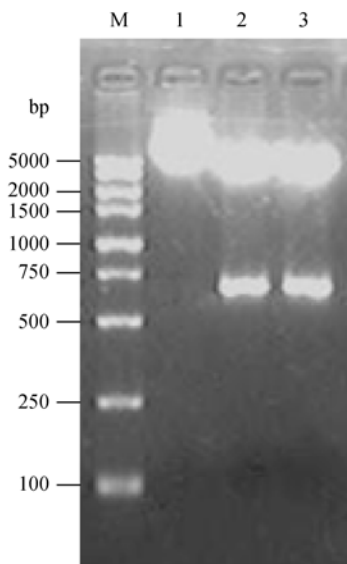


图 4 重组 pAcGFP-bFADD 质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pAcGFP-bFADD by restriction enzyme digestion

The restriction fragments of *BglII/EcoRI* was cloned into the pAcGFP-N1 vector then transformed into DH5 α , the plasmids were extracted from positive clones and digested with *BglII* and *EcoRI* enzyme (TaKaRa) for 6 hours at 37°C following the supplier's direction. M: DNA marker DL 5000; 1: pAcGFP-bFADD recombinant plasmid; 2, 3: pAcGFP-bFADD digestion by restrictive enzyme *BglII/EcoRI*

2.3 G418 对 CHO-K1 最佳浓度的筛选

加入 G418 筛选 3 d 后,各剂量组 CHO-K1 细胞均有不同程度的死亡,高于 600 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组悬浮、破碎的细胞相对较多。死亡高峰出现在第 8~10 天,其中 600 $\mu\text{g/mL}$ 以上剂量组在第 10 天全部死亡,600 $\mu\text{g/mL}$ 组第 12 天全部死亡。本实验选 600 $\mu\text{g/mL}$ 作为最佳筛选浓度(表 1)。

2.4 重组质粒转染后绿色荧光观察

pAcGFP-bFADD 转染 CHO-K1 细胞 24 h 后即可观察到有绿色荧光的细胞,其中阳性细胞所占比例可达 65%(图 6)。经 G418 筛选 7 d 后,出现阳性细胞克隆。筛选 2 周后,细胞生长至 60%~70%汇合,消化传代后,荧光强度无明显改变。

在荧光显微镜下观察 AcGFP 在细胞内的分布,未转染 pAcGFP-bFADD 的细胞不能观察到任何绿色荧光;经 pAcGFP-N1 孔载体转染的 CHO-K1 细胞呈现很强的绿色荧光,并且均匀的分布于整个细胞内;转染 pAcGFP-bFADD 质粒细胞的绿色荧光大多数围绕细胞核外侧呈环状分布(图 7)。

2.5 外源基因转录产物的 RT-PCR 检测

转染后,CHO-K1 细胞中 FADD mRNA 的表达如图 8 所示,从转染 pAcGFP-bFADD 质粒的 CHO-K1 细胞中提取总 RNA,经 RT-PCR 扩增出 654 bp 的片段(图 8,泳道 3,4),与前期克隆得到的牛 FADD 基因一致,表明转染重组质粒后的 CHO-K1 细胞表达 FADD。而对照组和转染 pAcGFP-N1 组的细胞中则没有 FADD mRNA 表达(图 8,泳道 1,2)。

2.6 表达产物的 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 检测

SDS-PAGE 检测结果表明,转染重组质粒 pAcGFP-bFADD 的细胞总蛋白在 PAGE 胶上电泳产生大小约为 51.4 kD 的融合蛋白条带(图 9A,泳道 3,4),而转染空载体 pAcGFP-N1 的细胞和正常 CHO-K1 细胞裂解液均无此条带(图 9A,泳道 1,2),初步证实 FADD 融合蛋白基因已在 CHO-K1 细胞中得到表达。同时 Western blotting 检测结果表明,表达产物能与 FADD 抗体结合并在 NC 膜上产生特异性反应条带(图 9B,泳道 2),pAcGFP-N1 质粒对照组为阴性结果(图 9B,泳道 1)。进一步证实表达产物为具有免疫活性的 FADD 蛋白。

表 1 G418 细胞毒性试验(培养 12 d)

Table 1 Cytotoxicity test of G418 to cultured CHO-K1 cells for 12 d

| G418 concentration ($\mu\text{g/mL}$) | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 900 | 1000 |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Survival rate (%) | +++ | ++ | ++ | + | + | - | - | - | - | - |

Note: +++: survival rate of 80%; ++: survival rate of 50%; +: survival rate of 30%; -: survival rate of 0%

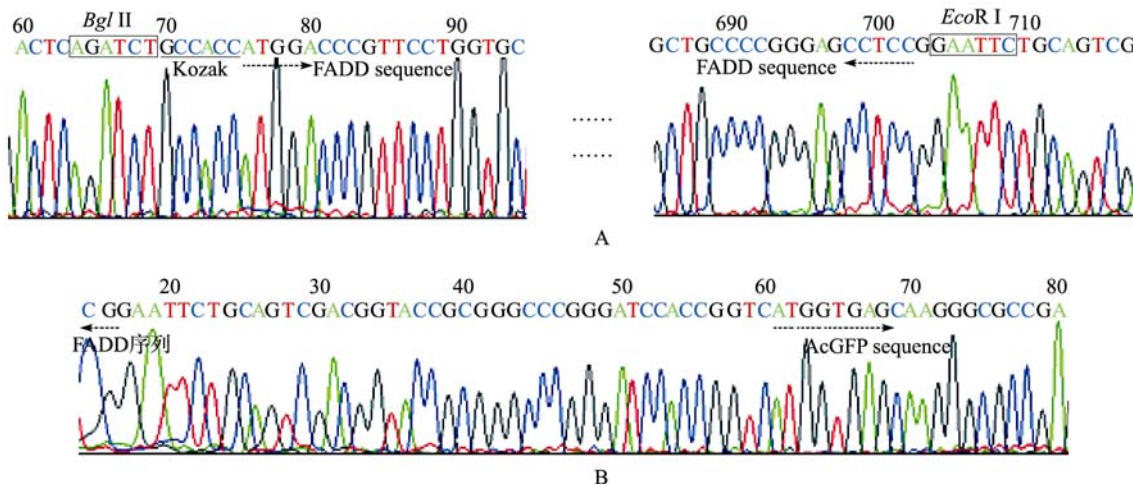


图 5 重组表达载体 pAcGFP-bFADD 部分序列

Fig. 5 Sequence of recombinant expression vector pAcGFP-bFADD

The pAcGFP-bFADD plasmids were extracted from positive clones and sequenced by SinoGeneMax Company Limited. A: FADD ORF sequence of pAcGFP-bFADD, digestion sites with *Bgl*II and *Eco*R I, Kozak sequence (digestion sites are in the box, underline part is Kozak Sequence, dotted line arrow direction is FADD ORF); B: AcGFP sequence of pAcGFP-bFADD recombinant (dotted line arrow direction on the right)

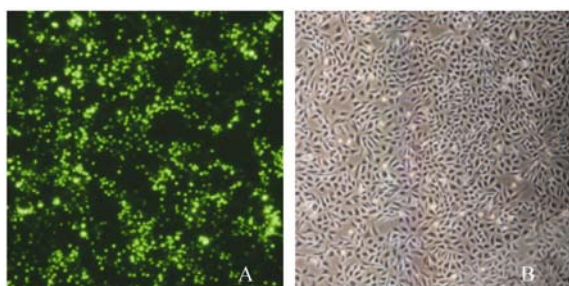


图 6 pAcGFP-bFADD 转染后表达绿色荧光的 CHO-K1 阳性细胞(×40)

Fig. 6 Green fluorescence positive cells after transfected with pAcGFP-bFADD plasmid (×40)

The pAcGFP-bFADD plasmid was transfected into CHO-K1 cell mediated by Lipofectamine 2000. After transfection, green fluorescent was observed by fluorescent microscopy. The expression rates of green fluorescence in CHO-K1 cell was 65% at 24 h after transfection. A: transfected CHO-K1 cell by pAcGFP-bFADD under fluorescent microscope; B: transfected CHO-K1 cell by pAcGFP-bFADD under visible light

3 讨论

凋亡作为一种维持机体自身内环境稳定所必需的生理性细胞主动死亡的过程, 在控制细胞增殖、分化、发育和应答等过程中发挥重要作用^[7]。

牛 FADD 的死亡结构域(Death domain, DD)是结合死亡受体 Fas 等死亡结构域的部位, 而其死亡效应结构域(Death effector domain, DED)则进行低聚化同时激活 caspase-8 前体, 形成死亡诱导信号复合体(Death-inducing signaling complex, DISC), 它包括

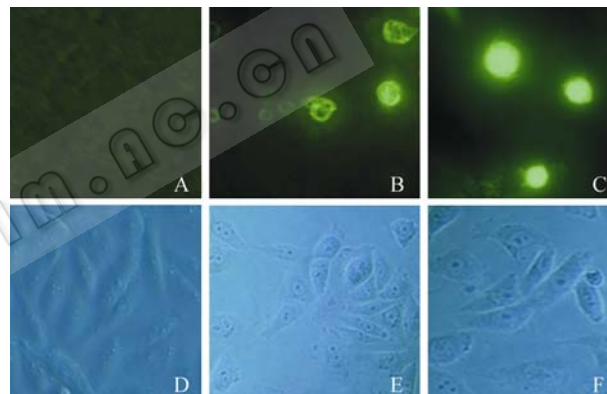


图 7 转染后 AcGFP-bFADD 融合蛋白和 AcGFP 蛋白在 CHO-K1 细胞中的表达(×200)

Fig. 7 Expression of AcGFP-bFADD fusion protein and AcGFP protein in CHO-K1 cell after transfection (×200)

After transfection, the green fluorescence could be detected in CHO-K1 cell transfected by pAcGFP-bFADD and pAcGFP-N1 plasmid, while there was no AcGFP expression in CHO-K1 cells untransfected by any plasmid. AcGFP could be observed around lateral region of nucleus in pAcGFP-bFADD transfection group and uniform distribution throughout on whole cell in pAcGFP-N1 transfection group. A, B, C: transfected CHO-K1 cell under fluorescent microscope; D, E, F: transfected CHO-K1 cell under visible light. A, D: control group; B, E: pAcGFP-bFADD transfection group; C, F: pAcGFP-N1 transfection group

Fas、FADD 和 caspase-8 前体。Caspase-8 前体经过加工, 以活性形式从 DISC 中释放出来, 进而使其他 caspase(caspase-3, caspase-6, caspase-7 等)前体裂解为活性亚单位, 激活了 caspase 级联反应, 从而导致细胞凋亡^[8,9]。

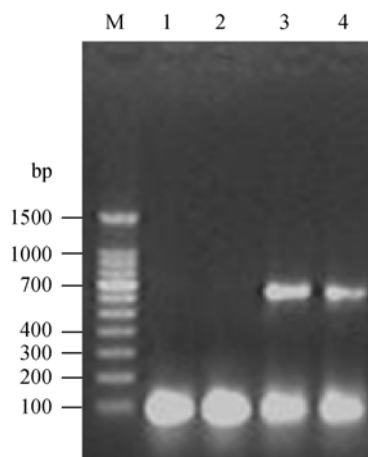


图 8 RT-PCR 检测牛 FADD mRNA 在 CHO-K1 细胞中的稳定表达

Fig. 8 Expression of bovine FADD mRNA on CHO-K1 cell determined RT-PCR

Total RNA was extracted from CHO-K1 cell and cDNA was prepared using universal primer. specificity primers were used to amplify the FADD sequence, a 654 bp fragment was detected by electrophoresis on 1.2% agarose gel in pAcGFP-bFADD transfection group. M: DNA marker DL 5000; 1: control group; 2: pAcGFP-N1 transfection group; 3, 4: pAcGFP- bFADD transfection group

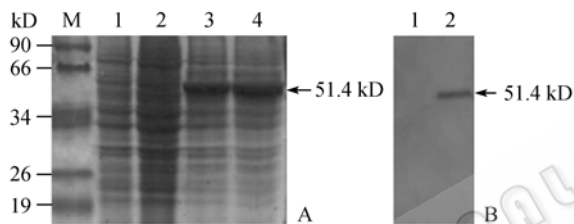


图 9 牛 FADD 融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

Fig. 9 SDS-PAGE analysis and Western blotting identification of expression in CHO-K1 cell of bovine FADD fusion protein

Protein sample were loaded onto 12% SDS-PAGE to separate protein and transferred to nylon cellulose membrane. The membrane was probed with anti-FADD polyclonal antibody and then was probed with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody as the second antibody. Bound antibodies were detected with the ECL

A: M: protein molecular weight marker (MW marker); 1: cell lysate of CHO-K1 cell of control group; 2: cell lysate of CHO-K1 cell of pAcGFP-N1 transfection group; 3, 4: cell lysate of CHO-K1 cell of pAcGFP- bFADD transfection group; B: 1: Western blotting analysis of pAcGFP-N1 transfection group; 2: Western blotting analysis of pAcGFP-bFADD transfection group

本实验室曾经通过表达谱分析, 牛的 FADD mRNA 高表达于淋巴组织和卵巢、睾丸组织, 在其他组织器官中的表达量则相对较少。这表明表达于淋巴细胞的 FADD 通过 Fas/FasL 系统在维持牛机体免疫内环境的自稳方面具有重要作用; 表达于睾丸生殖细胞和卵巢卵母细胞的 Fas 与睾丸支持细胞、

卵泡颗粒细胞表达的 FasL 相互作用, 通过调节 FADD 表达水平的高低、作用的强弱来调控精子的发生和卵母细胞发育, 使精、卵发生维持在一个生理上的平衡状态。如果生殖系统的 FADD 基因发生突变或表达异常, 则会使生殖内环境紊乱, 导致精卵发生异常, 造成公牛少精或无精、母牛排卵率及受胎率降低^[10]。

在构建 AcGFP 融合蛋白真核表达载体时, 本研究充分利用定向克隆的优势, 在分析牛 FADD 全长序列和 AcGFP 载体图谱的基础上, 在 PCR 上下游引物中分别引入 *Bgl* II (AGATCT) 和 *Eco* R I (GAATTC) 酶切位点。这 2 种内切酶酶切产生不同的 3'黏性末端, 使目的基因和载体实现定向连接克隆, 该方法具有如下优点: 1) 由于载体的 2 个黏性末端不互补, 因而载体片段不能环化, 假阳性重组克隆少; 2) 外源牛 FADD 基因只以一个方向插入至重组质粒中, 减少了正、反向连接的筛选问题; 3) 目的基因和载体连接处的限制性酶切位点得以保留, 便于进一步鉴定。

Kozak^[11]曾系统的分析了真核表达基因 mRNA 5'端序列与翻译效率的关系, 发现 5'G/N-C/N-C/N-ANNATGG3'序列能够提高基因转录和翻译效率, 特别是-3 位的 A 和+4 位的 G 对翻译效率非常重要。因此在引物设计时, 本试验在上游引物的 *Bgl* II 酶切位点后添加了 Kozak 序列 GCCACCATGG, 以保证牛 FADD 在重组质粒中高效表达。

另外, 在连接时按 FADD 与载体 pAcGFP-N1 摩尔数 8:1 的比例, 于 16°C 进行连接, 不但提高了连接效率, 而且进一步减少了载体自身环化的机率。

G418 是一种氨基糖苷类抗生素, 它对原核细胞和真核细胞均具有毒性, 是稳定转染最常用的抗性筛选试剂。当 *neo* 基因被整合进真核细胞基因组后, 则能启动 *neo* 基因编码的序列转录为 mRNA 从而获得抗性产物氨基糖苷磷酸转移酶的高效表达, 使细胞获得抗性而能在含有 G418 的选择性培养基中生长^[12]。由于每种细胞对 G418 的敏感性不同, 而且不同厂家生产的相同浓度的 G418 的活性不尽相同, 所以在筛选前, 必须先确定 G418 的最佳筛选浓度。本试验中, 600 μ g/mL 剂量组在第 12 天时细胞全部死亡, 因此选择 600 μ g/mL 作为最佳筛选浓度。筛选过程中先用 600 μ g/mL G418 进行筛选, 当出现克隆后, 再改用 200 μ g/mL G418 进行维持筛选, 使细胞克隆在 G418 压力下迅速生长, 待细胞铺满时再改用 600 μ g/mL G418 进行复选。最终成功获得了能

稳定表达牛 FADD 基因的细胞克隆。

用脂质体 LipofectamiTM 2000 介导 pAcGFP-bFADD 重组质粒转染 CHO-K1 细胞, 转染效率可达 65%, 经 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 筛选 2 周后, 获得的阳性克隆细胞能够稳定地发出荧光, 表明牛 FADD 基因已经完全整合到 CHO-K1 细胞的基因组中, 并且能够稳定表达融合蛋白。在高倍荧光镜下可见, 转染 pAcGFP-bFADD 重组质粒的 CHO-K1 细胞表达的 AcGFP-bFADD 绿色荧光融合蛋白大部分围绕细胞核呈环状分布于胞质中, 这与国外学者报道 FADD 主要定位于细胞质, 作为连接死亡受体与胞浆成分之间的信号蛋白可将胞外凋亡信号传递到胞浆中激活凋亡相关的终末酶, 从而诱导细胞凋亡的结果相近^[13], 但由于本研究所用载体 AcGFP-N1 的启动子是广泛性表达的 CMV, 并不能完全确认 FADD 定位于细胞质, 还需要通过进一步的研究来印证 FADD 在细胞中的定位。绿色荧光蛋白分子量为 28 kD, 而牛 FADD 蛋白的分子量为 23 kD, 因此重组质粒中融合蛋白的大小约为 51 kD, 这与本试验通过 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 检测产生约 51.4 kD 蛋白条带的结果相同, 同时 FADD 抗体能够结合到 NC 膜上与融合蛋白发生特异性反应, 表明转染 pAcGFP-bFADD 的 CHO-K1 细胞能够高表达具有免疫活性的 FADD 蛋白。另外, 蛋白免疫印迹 ECL 显色背景较深, 主要是由于辣根过氧化物酶标记二抗的浓度过高, 漂洗不充分及曝光时间较长所致。适当降低二抗浓度, 增加漂洗时间和缓冲液体积, 缩短曝光时间能够降低背景颜色, 获得好的显影效果。

本研究是探讨牛卵原细胞增殖和分化机制的前期工作。FADD 插入 pAcGFP-N1 的 N 末端, 在 pAcGFP-N1 CMV 启动子的作用下与 AcGFP 表达形成融合蛋白, 提高 FADD 在真核细胞中的表达, 同时不影响其目的蛋白的结构和功能。另一方面, 报告基因 AcGFP 是从水母 (*Aequorea coerulescens*) 中分离出来的荧光蛋白, 作为 EGFP 的替代品, 具有优化了密码子的开放阅读框, 与 EGFP 相比不仅提高了 AcGFP mRNA 的转化效率, 而且提高了它在高等哺乳动物细胞中的表达水平, 转染后 8 h~12 h 就可以进行观测(最大激发波长 475 nm, 发射波长 505 nm), 并且可以在长时间范围内进行荧光检测^[14,15]。pAcGFP-bFADD 以 AcGFP 作为报告基因, 不仅便于原代细胞水平上的快速筛选, 提高转染效率, 减小细胞损伤; 而且有利于模拟体内卵母细胞发育的基因层次性表达调控环境, 从基因水平研究 FADD 对

卵原细胞的增殖和分化的调控作用。

本试验通过将牛 FADD 与 AcGFP 基因融合, 成功构建 pAcGFP-bFADD 融合蛋白哺乳动物细胞表达载体, 并在 CHO-K1 细胞得到较高水平表达。为 FADD 基因在牛卵母细胞发育调控中的基础研究提供了技术依据, 对于进一步深入研究具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Arul MC, Karen OR, Muneesh T, *et al.* FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell*, 1995, **4**(81): 505-512.
- [2] Werner M, Wu C, Walsh C. Emerging roles for the death adaptor FADD in death receptor avidity and cell cycle regulation. *Cell Cycle*, 2006, **5**(20): 2332-2328.
- [3] Ferguson B, Esposito D, Jovanovic J, *et al.* Biophysical and cell-based evidence for differential interactions between the death domains of CD95/Fas and FADD. *Cell Death Differ*, 2007, **14**(9): 1717-1719.
- [4] Tomoki T, Manabu N. Modifications enhance the apoptosis-inducing activity of FADD. *Mol Cancer Ther*, 2007, **6**(6): 1793-1803.
- [5] Carrington P, Sandu C, We Y, *et al.* The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell*, 2006, **22**(5): 599-610.
- [6] Imtiyaz HZ, Zhang Y, Zhang J. Structural requirements for signal-induced target binding of FADD determined by functional reconstitution of FADD deficiency. *J Biol Chem*, 2005, **280**(36): 31360-31367.
- [7] Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, **407**(6805): 770-776.
- [8] Margalit KA, Cowan RG, Harman RM, *et al.* Apoptosis of bovine ovarian surface epithelial cells by Fas antigen/ Fas ligand signaling. *Reproduction*, 2005, **130**(5): 751-758.
- [9] Skarzynski D, Shibaya M, Tasaki Y, *et al.* Fas-mediated apoptosis is suppressed by calf serum in cultured bovine luteal cells. *Reprod Biol*, 2007, **7**(1): 3-15.
- [10] Porcelli F, Meggiolaro D, Carnevali A. Fas ligand in bull ejaculated spermatozoa: a quantitative immunocytochemical study. *Acta Histochem*, 2006, **108**(4): 287-292.
- [11] Marilyn Kozak. Binding of wheat germ ribosomes to bisulfite-modified reovirus messenger RNA: Evidence for a scanning mechanism. *J Mol Biol*, 1980, **144**(3): 291-304.
- [12] Magin LC, Kotzamanis G, Daiuto L, *et al.* Retrofitting BACs with G418 resistance, luciferase, and oriP and EBNA-1-new vectors for *in vitro* and *in vivo* delivery. *BMC Biotechnol*, 2003, **3**(1): 2-10.
- [13] Sprick M, Weigand M, Rieser E, *et al.* FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 2000, **12**(6): 599-609.
- [14] BD Living Colors Fluorescent Protein. *Clontechiques XX*, 2005, **2**: 18-20.
- [15] Jakobs S, Subramaniam V, Schonle A, *et al.* EFGP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett*, 2000, **479**: 131-135.