

人类胞内氯离子通道蛋白 3 在原核细胞及真核细胞内的表达

李春雨, 潘林鑫, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 研究人类胞内氯离子通道蛋白 3 (CLIC3) 在真核细胞中的定位和表达, 及其 GST 融合蛋白在原核细胞中的表达。方法 以含人 CLIC3 的全长 cDNA 序列的质粒为模板, PCR 扩增 CLIC3 片段, 构建真核表达载体 pcDNA3.1-CLIC3-FLAG, 检测其定位及表达; 构建原核表达载体 pGEX-5X-3-CLIC3, 转化到大肠杆菌 BL21 菌株, IPTG 诱导融合蛋白 GST-CLIC3 表达。结果 细胞免疫荧光结果表明 CLIC3 在 COS7 细胞质和细胞核中均有分布; Western blot 结果显示 CLIC3 在 HEK-293T 细胞中能表达; 考马斯亮蓝染色结果表明融合蛋白 GST-CLIC3 在 BL21 菌株中能表达。结论 人类的 CLIC3 蛋白在 COS7、HEK-293T 及大肠杆菌 BL21 菌株均能有效表达, 为进一步了解 CLIC3 的功能奠定了一定的基础。

关键词 CLIC3; 细胞定位; 蛋白表达

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1202-04

胞内氯离子通道 (chloride intracellular channels, CLIC) 蛋白家族是一个相对较新的离子通道蛋白类家族, 其在主要结构上 (三级结构的跨膜区) 不同于其他通道^[1]。在脊椎动物中目前已知 CLIC 蛋白家族有 6 个成员, 分别是 CLIC1~6, 并且 CLIC 蛋白具有高度保守性^[2]。在无脊椎动物中有 3 个成员。CLIC 家族成员和谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 超家族成员共同分享结构同源^[2-3]。CLIC 蛋白区别于其他离子通道蛋白的一个独特特点是它们拥有以两种不同形式存在的能力: 一种是可溶球状形式, 另一种是完整的膜蛋白^[4]。

人类 CLIC3 基因定位于 9q34.3, 由 236 个氨基酸组成, 其编码蛋白大小为 26.6 ku。CLIC3 分布于多种组织, 如胎盘、肺、心脏、肾、胰腺, 少量存在于骨骼肌中^[5]。目前研究^[6]已经证实了 CLIC3 的可溶性结构, 但大量的生化分析和细胞定位研究还尚无定论。该研究通过构建 CLIC3 的真核表达载体, 通过质粒转染、免疫荧光、免疫印记等方法研究外源性

2014-05-05 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点科研项目 (编号: KJ2010A187); 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81201368); 安徽省自然科学基金 (编号: 11040606M170、11040606M164); 安徽医科大学博士基金 (编号: XJ201009)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学系, 合肥 230032

作者简介: 李春雨, 女, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: xyz2848@sohu.com;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

Research on undetection of non-EV71 and non-CoxA16 related HFMD pathogens identified by using VP4 gene

Mu Chaoyu, Zhuang Xiaoliang, Zhao Jun, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the accuracy of PCR for detection of non-EV71 and non-CoxA16 by using universal primers with VP4 gene of HEV. **Methods** When identified by VP4 gene of EV71 and CoxA16 unrelated HFMD, two isolates of Sabin-1 were found (such as Fy-01 and Fy-02). They were identified by co-primers such as EVP4/Q8 and specific primers of VP1 gene. **Results** Fy-01 isolates were appeared with an unusual fragment and identified as CoxA10 after being sequenced and the selected independent clones were sequenced and blasted in GenBank. It proved that both Sabin-1 and CoxA10 existed. **Conclusion** Clinical diagnosis of EV71 and CoxA16 unrelated HFMD, when identifying the type of HFMD pathogen only by using the amplification product of VP4 gene after being sequenced directly is not enough, especially HFMD with mixed infections caused by enterovirus.

Key words HFMD; VP4 gene; Sabin-1; CoxA10

的 CLIC3 在细胞内的定位与表达;在大肠杆菌中诱导表达融合蛋白 GST-CLIC3,为研究 CLIC3 蛋白功能提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和菌株 人类 CLIC3 的全长 cDNA (NM 004669) 由购买于上海吉凯基因公司的含有 CLIC3 全长 cDNA 的菌液抽提获得,载体 pcDNA3.1、pGEX-5X-3,细胞株 HEK-293T、COS7,大肠杆菌感受态细胞 TG1、BL21 菌株系安徽医科大学生物学实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器 pfu 酶(生工生物(上海)有限公司);PrimeSTAR 酶(日本 TaKaRa 公司);T4 DNA 连接酶及 Xho I、BamH I、EcoR I 限制性内切酶(美国 Fermentas 公司);D2000 DNA Marker(北京 GenStar 公司);蛋白 Marker(美国 Bio-Rad 公司);Unstained Protein Marker(美国 Thermo Fisher Scientific);质粒小量抽提试剂盒及 DNA 胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司);胎牛血清及 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);脂质体 2000、Opti-MEM 培养基(美国 Invitrogen 公司);细胞裂解液与一抗稀释液(上海碧云天公司);FLAG 一抗(美国 Sigma 公司);山羊抗小鼠 IgG/TRITC 及辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);ECL 显色试剂盒(美国 Pierce 公司);荧光显微镜 DMI6000 型(德国 Leica 公司);引物合成及重组质粒测序由生工生物(上海)有限公司承担。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建 使用含 CLIC3 全长 cDNA 的菌液抽提质粒作为模板(稀释 1:500),用 PCR 法扩增 CLIC3 全长序列,正向引物:5'-CGG GAT CCC GCC ACC ATG GCG GAG ACC A-3';反向引物:5'-GGA ATT CCC TAC TTG TCG TCA TCG TCT TTG TAG TCG CGG GGG TGC A-3',PCR 产物经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后连接到 pcDNA3.1 载体。PCR 扩增 CLIC3 全长序列,正向引物:5'-CGG GAT CCC GAT GGC GGA GAC CA-3';反向引物:5'-GGA ATT CCC TAG CGG GGG TGC A-3',PCR 产物经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后连接至 pGEX-5X-3 载体。连接产物经转化、摇菌、质粒抽提,酶切鉴定成功后将阳性样品测序。

1.3.2 细胞培养和瞬时转染 COS7 细胞和 HEK-293T 细胞接种于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基

的培养皿中,37 °C、5% CO₂ 恒温培养。将质粒(μg):脂质体(μl)按 1:2 的比例分别转染上述两种细胞,加入转染液于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 后换新鲜培养液培养。

1.3.3 免疫荧光 细胞染色方法参照文献^[7],转染 24 h 后取出培养皿,预冷的 PBS 洗 3 次。-20 °C 预冷的甲醇固定 5 min;70% 乙醇固定 5 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min。1% 脱脂奶粉封闭 30 min;FLAG 一抗(1:100)室温孵育 2 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min。TRITC 标记的二抗(1:100)室温孵育 1 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min。0.15 g/L DAPI 溶液室温孵育 2 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。尽可能去除 PBS,用荧光封片胶将盖玻片封于载玻片上,4 °C 储存过夜后荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.4 Western blot 法检测 细胞裂解及 Western blot 法参照文献^[8]。待 HEK-293T 细胞转染 48 h 后,取出培养皿置冰上;预冷的 PBS 洗 2 次;尽量弃尽 PBS,加入细胞裂解液,冰上裂解 20~30 min;4 °C、14 000 r/min 离心 15 min;取部分样品,加等体积的 2×SDS 上样缓冲液,100 °C 煮沸 5 min,SDS-PAGE 电泳;100 V 恒压转膜 1 h,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h;FLAG 一抗(1:500)4 °C 孵育过夜;TBST 清洗;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000)室温作用 1 h;TBST 清洗;ECL 显色,在暗室中用 X 线片显影。

1.3.5 GST 融合蛋白的制备 BL21 感受态细胞转化 GST 重组质粒,挑取单克隆菌落接入含氨苄(50 μg/ml)的 LB 培养基中,37 °C 过夜培养。取 1 ml 上述培养物,接入 100 ml 含氨苄(50 μg/ml)的 LB 培养基中。加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导剂,在 250 ml 的三角烧瓶中 30 °C 振荡培养 6 h。4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集沉淀,PBS 洗 2 次。将细胞沉淀物重悬于裂解缓冲液中,超声破碎,收集混合物。4 °C、14 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,与谷胱甘肽琼脂糖球珠于 4 °C 以 10 r/min 混旋 1~2 h,测定蛋白含量。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-CLIC3-FLAG 和 pGEX-5X-CLIC3 表达载体构建及鉴定 重组质粒测序结果与 CLIC3 的全长序列完全一致。重组质粒的酶切鉴定结果见图 1。

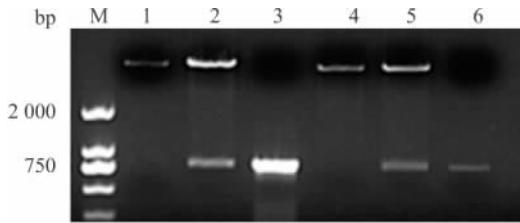


图1 重组质粒 pcDNA3.1-CLIC3-FLAG 和 pGEX-5X-3-CLIC3 的酶切鉴定

M: D2000 DNA Marker; 1: 酶切载体 pcDNA3.1; 2: 酶切的 pcDNA3.1-CLIC3-FLAG; 3: CLIC3 的 PCR 产物; 4: 酶切载体 pGEX-5X-3; 5: 酶切的 pGEX-5X-3-CLIC3; 6: CLIC3 的 PCR 产物

2.2 CLIC3 蛋白在 COS7 细胞中的定位 CLIC3 蛋白在 COS7 细胞的细胞核和细胞质中均有明显的表达。见图 2。

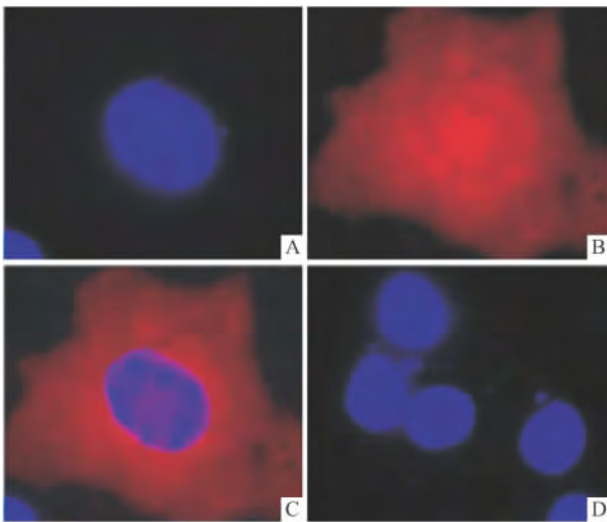


图2 CLIC3 蛋白在 COS7 细胞中的定位 ×1 000

A: DAPI 染色的细胞核; B: pcDNA3.1-CLIC3-FLAG 在 COS7 细胞的定位; C: A、B 两图像的叠加; D: 未转染过质粒的细胞经 DAPI 染色的细胞核

2.3 CLIC3 蛋白在 HEK-293T 细胞中的表达

Western blot 结果显示 转染 pcDNA3.1-CLIC3-FLAG 的细胞裂解液检测到约 27 ku 的条带。CLIC3 蛋白的分子量约为 27 ku 符合 CLIC3-FLAG 融合蛋白的大小。见图 3。

2.4 CLIC3 的 GST 融合蛋白在 BL21 感受态细胞中的表达 GST-CLIC3 融合蛋白经 SDS-PAEG 电泳 用考马斯亮蓝染液染色 凝胶成像仪拍照。第 2 泳道在约 27 ku 的位置出现的条带即 GST 蛋白(27 ku) 第 3 泳道在 45 ku 与 66.2 ku 之间的位置出现的条带即 GST-CLIC3 蛋白(53 ku) 表明 GST-CLIC3 融合蛋白的表达成功。见图 4。



图3 Western blot 检测 CLIC3 蛋白表达

1: 未转染质粒的 HEK-293T 细胞裂解液; 2: 转染 pcDNA3.1-CLIC3-FLAG 的 HEK-293T 细胞裂解液

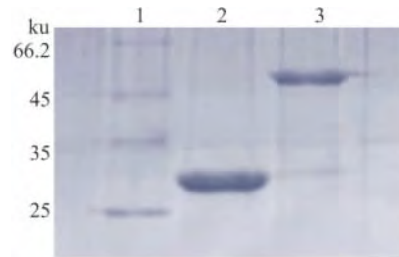


图4 GST-CLIC3 融合蛋白表达

1: 未预染蛋白 Marker; 2: GST 空载体转化 BL21 细胞的细菌裂解液; 3: GST-CLIC3 转化 BL21 细胞的细菌裂解液

3 讨论

CLIC 蛋白家族是一种新型的氯离子通道蛋白家族 在上世纪 80 年代末其分子身份才被破译 在 90 年代 CLIC 蛋白被克隆和鉴定出来^[9]。在过去的二十年中 涉及 CLIC 蛋白的大量的工作已经完成。CLIC 蛋白不包含在大的氯离子通道家族中 是由于在结构功能研究方面 它缺乏与改变生物物理学特性相关的突变 以及缺乏稳定的离子通道特性。虽然 CLIC 蛋白家族初级结构缺少跨膜结构域 但先前的报道^[10] 认为 他们可以形成离子通道。CLIC 蛋白的功能可能是作为四聚体或更高的低聚体及存在 N 末端区域通道孔^[11]。例如, CLIC1 已被证明可形成通道的磷脂囊泡和人工脂质双分子层^[11] 而且 CLIC1 的二聚化作用增加囊泡^[12] 的稳定性。尽管 CLIC3 的 GST 结构域在其 C-末端^[10] ,CLIC3 仍然有可能插入到脂质双层膜和囊泡。CLIC 蛋白也在不同进程中发挥重大作用 如骨吸收 细胞运动的调节 小管生成 血管生成 骨骼肌和脑的形成 β-淀粉样蛋白诱导神经毒性和 p53 介导的细胞凋亡。

人 CLIC3 与 CLIC 蛋白家族其他成员在结构和序列上具有高度同源, CLIC3 在正常人体胎盘和胎膜中高表达^[5]。在胎盘细胞中, CLIC3 除定位在细胞质膜和细胞质中, 也定位在细胞核中^[11] ,而在

COS、CV-1、A2780 人类卵巢癌细胞系中,过表达的 CLIC3 定位在细胞核、核内体和溶酶体^[13-14]。如 CLIC2 一样,CLIC3 活性半胱氨酸可以形成一个内部二硫键,从而可以和内部含有硫氧化还原 CxxC 模序的伴侣结合。此外,CLIC3 的脚环较氯离子通道蛋白家族中的其他成员脚环有高度灵活性,由于 CLIC3 脚环结构是独特有序的,因此这些差异可能影响 CLIC3 的行为^[6]。

参考文献

- [1] Ashley R H. Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins (Review) [J]. *Mol Membr Biol* 2003 20(1):1-11.
- [2] Littler DR, Harrop S J, Goodchild S C, et al. The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins? [J]. *FEBS Lett* 2010 584(10):2093-101.
- [3] Singh H, Ashley R H. CLIC4 (p64H1) and its putative transmembrane domain form poorly selective, redox-regulated ion channels [J]. *Mol Membr Biol* 2007 24(1):41-52.
- [4] Singh H. Two decades with dimorphic Chloride Intracellular Channels (CLICs) [J]. *FEBS Lett* 2010 584(10):2112-21.
- [5] Murthi P, Stevenson J L, Money T T, et al. Placental CLIC3 is increased in fetal growth restriction and pre-eclampsia affected human pregnancies [J]. *Placenta* 2012 33(9):741-4.
- [6] Littler D R, Brown L J, Breit S N, et al. Structure of human CLIC3 at 2Å resolution [J]. *Proteins* 2010 78(6):1594-600.
- [7] 徐南,耿慧武,范礼斌,等.细胞内氯离子通道蛋白2的定位与表达[J].安徽医科大学学报,2013,48(5):455-7.
- [8] 潘林鑫,李新颖,范礼斌,等.人RB1及其突变体的表达与定位[J].安徽医科大学学报,2013,48(8):853-7.
- [9] Redhead C R, Edelman A E, Brown D, et al. A ubiquitous 64-kDa protein is a component of a chloride channel of plasma and intracellular membranes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 89(9):3716-20.
- [10] Suh K S, Mutoh M, Nagashima K, et al. The organellar chloride channel protein CLIC4/mtCLIC translocates to the nucleus in response to cellular stress and accelerates apoptosis [J]. *Biol Chem* 2004 279(6):4632-41.
- [11] Littler D R, Harrop S J, Brown L J, et al. Comparison of vertebrate and invertebrate CLIC proteins: the crystal structures of *Caenorhabditis elegans* EXC-4 and *Drosophila melanogaster* DmCLIC [J]. *Proteins* 2008 71(1):364-78.
- [12] Suh K S, Mutoh M, Gerdes M, et al. CLIC4, an intracellular-chloride channel protein, is a novel molecular target for cancer therapy [J]. *Investig Dermatol Symp Proc* 2005 10(2):105-9.
- [13] Dozynkiewicz M A, Jamieson N B, Macpherson I, et al. Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression [J]. *Dev Cell* 2012 22(1):131-45.
- [14] Qian Z, Okuhara D, Abe M K, et al. Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel [J]. *Biol Chem* 1999 274(3):1621-7.

The expression of human intracellular chloride channel protein 3 in eukaryotic and prokaryotic cells

Li Chunyu, Pan Linxin, Liu Xiaoying, et al

(Dept of Biology Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression and localization of the human chloride channel protein 3 (CLIC3) in eukaryotic cells, and the expression of GST fusion protein in prokaryotic cells. **Methods** Plasmids containing full length of human CLIC3 cDNA was used as PCR template to construct the prokaryotic and eukaryotic expression vectors. The pcDNA3.1-CLIC3-FLAG was transfected into COS7 and HEK-293T cells respectively to detect the localization and expression of CLIC3. The pGEX-5X-3-CLIC3 was transformed into *E. coli* BL21 to investigate the expression of fusion protein GST-CLIC3. **Results** The immunofluorescence results indicated that CLIC3 was distributed in both cytoplasm and nucleus of COS7 cells; Western blot showed CLIC3 could be effectively expressed in HEK-293T cells; Coomassie blue staining proved GST-CLIC3 could be expressed in *E. coli* BL21. **Conclusion** Human CLIC3 protein can be expressed effectively both in eukaryotic and prokaryotic cells, which is important for further research on the function of human CLIC3.

Key words CLIC3; cellular localization; protein expression