

# 脂质体包裹人促甲状腺激素受体胞外段基因真核表达质粒的构建

杨于力<sup>1</sup>, 罗清礼<sup>2</sup>, 吕红彬<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(400038)中国重庆市,第三军医大学西南医院 西南眼科医院;<sup>2</sup>(610041)中国四川省成都市,四川大学华西医院眼科;<sup>3</sup>(646000)中国四川省泸州市,泸州医学院附属医院眼科  
作者简介:杨于力,毕业于四川大学,博士,副主任医师,研究方向:角膜及屈光手术。

通讯作者:杨于力. yangyl0415@hotmail.com

收稿日期:2014-05-15 修回日期:2014-11-04

## Construction of recombinant eukaryotic expression plasmid of human thyrotropin receptor extracellular domain encapsulated with cationic liposomes

Yu-Li Yang<sup>1</sup>, Qing-Li Luo<sup>2</sup>, Hong-Bin Lü<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Southwest Eye Hospital, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

**Correspondence to:** Yu - Li Yang. Southwest Eye Hospital, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. yangyl0415@hotmail.com

Received:2014-05-15 Accepted:2014-11-04

### Abstract

• **AIM:** To construct recombination eukaryotic expression plasmid of human thyrotropin receptor extracellular domain encapsulated with cationic liposomes.

• **METHODS:** We amplified the target gene of shuttle vector PHMCMVTSHR289, conjugated the target gene and eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1+, and accredited whether pcDNA3.1+/TSHR289 was connected or not by enzymatic digestion and sequencing. Cationic liposomes encapsulated the recombination plasmid pcDNA3.1+/TSHR289.

• **RESULTS:** Recombination plasmid pcDNA3.1+/TSHR289 digested with enzyme HindIII and the fragment through 0.8% gel electrophoresis showed 512bp strip. Recombination plasmid pcDNA3.1+/TSHR289 were found synonymous mutation through forward (AAC to AAT) and reverse sequencing (GCG to GCT). The volume ratio of cationic liposomes and recombinant plasmid was 3:1.

• **CONCLUSION:** It is successful to construct the recombination plasmid pcDNA3.1+/TSHR289 by accredit it through enzymatic digestion and sequencing.

• **KEYWORDS:** human thyrotropin receptor extracellular domain gene; shuttle vector PHMCMVTSHR289; eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1+; recombination plasmid pcDNA3.1+/TSHR289; cationic liposomes

**Citation:** Yang YL, Luo QL, Lü HB. Construction of recombinant eukaryotic expression plasmid of human thyrotropin receptor extracellular domain encapsulated with cationic liposomes. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(12):2151-2154

### 摘要

**目的:**构建阳离子脂质体包裹的人促甲状腺激素受体胞外段基因真核表达质粒。

**方法:**PCR扩增穿梭质粒 PHMCMVTSHR289 目的基因并连接于真核表达质粒 pcDNA3.1+上,重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289 采用酶切及测序法鉴定。阳离子脂质体包裹重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289。

**结果:**重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289 用 HindIII 酶切后产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测显示出现 512bp 条带。正向测序发现 AAC 突变为 AAT,为同义突变。反向测序发现 GCG 突变为 GCT,亦为同义突变。阳离子脂质体与重组质粒的体积质量比例为 3:1。

**结论:**酶切及测序鉴定重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289 构建成功。

**关键词:**人促甲状腺激素受体胞外段基因;穿梭质粒 PHMCMVTSHR289;真核表达质粒 pcDNA3.1+;重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289;阳离子脂质体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.11

**引用:**杨于力,罗清礼,吕红彬.脂质体包裹人促甲状腺激素受体胞外段基因真核表达质粒的构建.国际眼科杂志 2014;14(12):2151-2154

### 0 引言

甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)是眼科常见的眼眶疾病之一,目前普遍认为该病为一种自身免疫性疾病,推测在患者的甲状腺和眼眶组织中存在共同的自身抗原,如促甲状腺激素受体(thyrotropin stimulating hormone receptor, TSHR)、甲状腺过氧化物酶(thyroid peroxidase, TPO)、甲状腺球蛋白(thyroglobulin, Tg)以及各种眼外肌抗原,其抗原分子量范围(23~120kD)很广。目前,所有发现的自身抗原中仍以 TSHR 最为重要,对其研究也最多,进一步研究发现 TSHR 的胞外区域是引起 TAO 的自身抗原,也是与 TSH 阻断性抗体(TSH-binding antibody, TSAb)以及甲状腺结合抑制性免疫球蛋白(thyroid stimulating antibody, TBII)

结合的位点<sup>[1-6]</sup>,并开始被用于甲状腺相关眼病动物模型的建立。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

穿梭质粒 pHMCMVTSHR289 (由 Sandra M. McLachlan, Ph. D Professor of medicine CSMC&UCLA 馈赠);真核表达质粒 pcDNA3.1+ (华西医学中心眼科实验室提供);dNTPs、TaqDNA 聚合酶(大连宝生物公司,中国);PmeI 酶, Hind III 酶( Fermentas 公司,前苏联立陶宛);KpnI 酶,XbaI 酶(大连宝生物公司,中国);DNA 连接酶(大连宝生物公司,中国);Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker,3(Fermentas 公司,前苏联立陶宛);引物及荧光探针(上海英俊生物技术有限公司合成,中国);DH5 $\alpha$  感受态细胞(TIANGEN 公司,中国);质粒小量抽提试剂盒(TIANGEN 公司,中国);普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIANGEN 公司,中国);阳离子脂质体(获赠于四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 质粒 DNA 的抽提与鉴定

真核质粒 pcDNA3.1+ 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,用质粒抽提试剂盒抽提真核质粒 pcDNA3.1+,采用紫外分光光度计检测抽提得到的质粒 pcDNA3.1+DNA 的浓度与纯度。用同样的方法得到穿梭质粒 PHMCMVTSHR289,两种质粒均送至公司测序,序列正确,说明转化成功。

#### 1.2.2 构建重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289 与鉴定

PCR 扩增穿梭质粒 PHMCMVTSHR289 目的基因,扩增产物与真核质粒 pcDNA3.1+采用 KpnI 和 XbaI 双酶切后,产物纯化回收用 T4DNA 连接酶完成连接反应,得到 pcDNA3.1+/TSHR289 重组质粒,用琼脂糖凝胶电泳、Hind III 酶切以及正反向测序的方法进行鉴定。

#### 1.2.3 DNA/阳离子脂质体复合物的制备

精密称取一定量 DOTAP 和 Chol (mol/mol = 1:1) 于 100mL 旋蒸瓶中,加入 20mL 氯仿溶解,置于旋转蒸发仪上,40 $^{\circ}$ C 水浴下旋转蒸发 1h。取下旋蒸瓶,放入真空干燥器中,真空干燥 12h。往旋蒸瓶中加入 5% 葡萄糖溶液 18mL,并将其置于旋转蒸发仪上,在 55 $^{\circ}$ C 水浴温度下,关闭水泵,旋转 1h,得到乳白色黏稠状液体。取下旋蒸瓶,向瓶中插入超声探头,在 55 $^{\circ}$ C 水浴下超声 10min,即得 DOTAP/Chol 阳离子脂质体(5mg/mL)。pcDNA3.1+/TSHR289 重组质粒与 DOTAP/Chol 阳离子脂质体按照质量体积比 1:3 混合。

## 2 结果

### 2.1 穿梭质粒 PHMCMVTSHR289PCR 产物和真核质粒 pcDNA3.1+KpnI 和 XbaI 双酶切产物鉴定

两种质粒双酶切的产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测显示(图 1),穿梭质粒 PHMCMVTSHR289PCR 产物双酶切后的条带大小为 867bp,真核质粒 pcDNA3.1+ 双酶切后条带大小为 4459bp。

### 2.2 重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289 Hind III 酶切鉴定

重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289 用 Hind III 酶切后产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测显示(图 2),出现 512bp 小条带。

### 2.3 重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289 公司测序鉴定

重组质粒送至上海英俊生物技术有限公司进行正向和反向测序,吻合度均达到 99%。正向测序发现 AAC 突变为

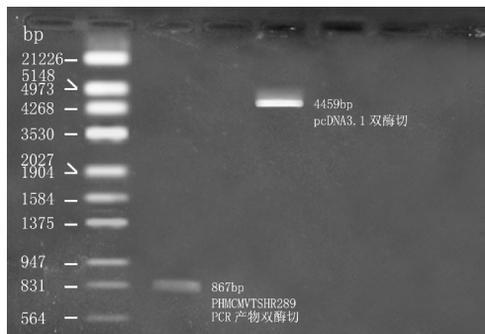


图 1 pcDNA3.1+和 PHMCMVTSHR289PCR 产物双酶切后 0.8% 琼脂糖凝胶电泳图 注:Marker 为 Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker,3。

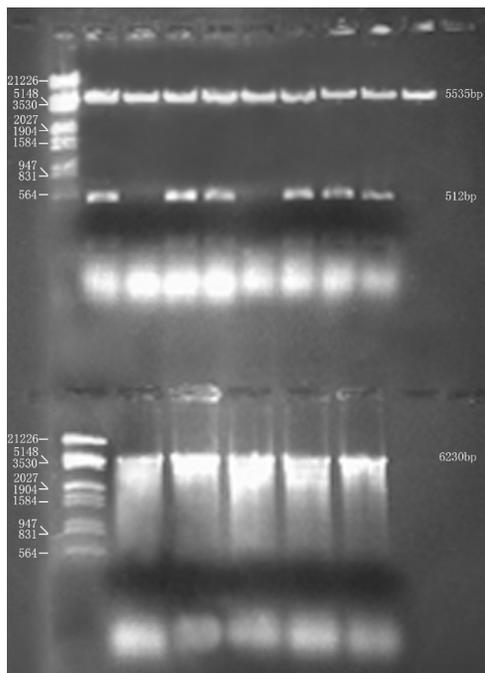


图 2 连接产物 Hind III 酶切后重组质粒出现 512bp 小条带 注:Marker 为 Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker,3。

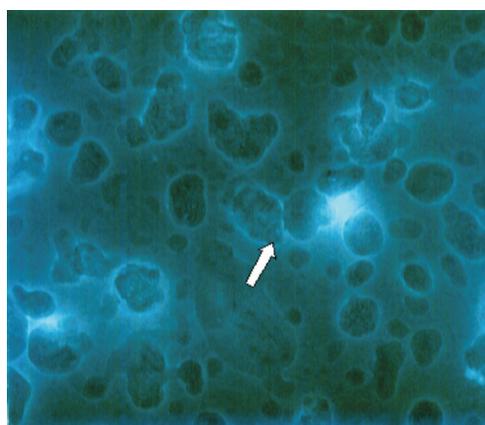


图 3 阳离子脂质体(箭头)。

AAT,为同义突变。反向测序发现 GCG 突变为 GCT,亦为同义突变。

### 2.4 阳离子脂质体包裹重组质粒 pcDNA3.1+/TSHR289

制作出的 DOTAP/Chol 阳离子脂质体用 ZETASIZER 激光粒径分析仪(英国 Malvern Instruments 公司)测得粒径平均值为 92.3nm,测得最高峰值为 126.0nm(图 3)。阳离子脂质体与质粒 DNA 的体积质量比例为 3:1。

### 3 讨论

TSHR 属于 G 蛋白偶联受体家族的一员,由 764 个氨基酸组成,含有 7 个跨膜片段、3 个胞外环、3 个胞内环、1 个胞外的氨基末端和 1 个胞内的羧基末端。它是一种糖蛋白,其胞外区域是含有 418 个氨基酸的糖基化的 N 末端。Chazenbalk 等<sup>[7]</sup>尝试从 TSHR 的胞外段的碳末端把抗原截断,产生了三种胞外段片段。根据其切断处的密码子位置,分别命名为 TSHR-261, TSHR-289, TSHR-309。他们对 TSHR-261 用凝集素和镍螯合物进行色谱分析,从而直接量化 TSHR-261,结果发现使用极其微量的 TSHR-261 就可以中和 18 个 Graves 病患者的血清中 70%~100% 的自身抗体。Chazenbalk 等<sup>[8]</sup>还提出 TSHR 胞外段的空间构象是其产生自身免疫反应的重要前提条件。他们利用刀豆凝集素 a 和镍螯合物进行色谱分析,从而得到部分纯化的 TSHR-289,用极其微量的 TSHR-289 就可以中和 15 个 Graves 病患者血清中的 TBII。并且当他们用这种部分纯化的 TSHR-289 去免疫大鼠时,产生了针对这种抗原的单克隆抗体 3BD10,这种抗体只有在 TSHR 的氮末端富含半胱氨酸的区域具有空间构象时才能与其发生反应,从而说明 TSHR 胞外段的三级结构的保持对其产生自身免疫反应有着极其重要的作用。Bobovnikova 等<sup>[9]</sup>认为这种 TSHR 胞外段三级结构的维持依赖于二硫键的稳定作用。Seetharamaiah 等<sup>[10]</sup>又进一步发现没有糖基化的 TSHR 胞外段只能中和兔子血清中的 TBII 而不能中和 Graves 患者血清中的抗体,而糖基化后的 TSHR 胞外段既可以中和实验动物又可以中和 Graves 病患者血清中的 TBII 和 TSAb,从而说明 TSHR 胞外段的糖基化是产生自身免疫反应的关键条件。目前,TSHR 的胞外段区域已被公认为是甲状腺相关眼病的共同抗原,并被普遍用于甲状腺相关眼病动物模型的建立。

基因免疫是利用重组 DNA 技术将保护性抗原蛋白基因克隆到真核表达载体,并将其直接导入体内,使抗原蛋白经过内源性表达提呈给免疫系统,诱导机体产生特异性的体液免疫和细胞免疫反应,基因免疫又称为 DNA 免疫或核酸免疫。基因免疫的载体类型一般可分为病毒<sup>[11-16]</sup>和非病毒载体两大类。非病毒载体一般包括质粒(plasmid),人工染色体 RNA/DNA 嵌合寡核苷酸和肽核酸等载体,而质粒是非病毒载体中较常用和成熟的一类<sup>[17-21]</sup>。在基因治疗中以真核质粒载体为代表的非病毒载体由于外源基因整合率低,且具有制备方便、低成本、安全稳定、低免疫反应等优点广泛地被应用于临床与科研中<sup>[22]</sup>。但真核质粒载体携带的目的基因由于没有整合入细胞自身基因组,在经过细胞间质和细胞质的停留到转录过程中,大约 60%~100% 会被降解。

包裹 DNA 的脂质体能与组织细胞发生膜融合,而将 DNA 摄入,减少了核酸酶对目的基因的破坏。脂质体分为阳离子脂质体(cationic liposome, CL)、阴离子脂质体和 PH 敏感(PH sensitive)脂质体等。阳离子脂质体(CL)是最常用的脂质体,一般用阳离子脂质和中性脂质按一定比例混合制成,中性脂质一般采用磷脂酰乙醇胺(DOPE)或胆固醇,用以调控质粒从核内释放;常用的阳离子脂质有 DOTMA, DOTAP, DMR1E, DC-Chol 和 Lipid 等。阳离子脂质体可以中和质粒表面的负电,同时大大

减小质粒的体积,从而减少质粒和细胞膜的静电斥力,有利于质粒跨膜进入细胞,使质粒 DNA 表达的效率提高数倍到数十倍。目前,CL 具有操作简便、转移效率高和无毒等特点,广泛应用于真核细胞基因转移<sup>[23,24]</sup>。阳离子脂质体介导的转染受到的影响因素有很多,主要参数有阳离子脂质体的组成脂质体与 DNA 的比率、脂质体的总量、细胞密度以及脂质体/DNA 复合物与细胞作用的时间等。其他影响表达的因素还有细胞、载体种类、转染时所用的培养液中是否含有血清等。张新秀等<sup>[25]</sup>将重组表达质粒色素上皮衍生因子-绿色荧光蛋白以脂质体介导转染 BN 大鼠视网膜组织时,将阳离子脂质体与质粒按 3:1 的比例混匀静置 30min,然后进行免疫注射。李劲松等<sup>[26]</sup>以绿色荧光蛋白为报告基因,利用流式细胞仪比较三种脂质体转染效果,并采用不同的脂质体与质粒比例优化转染条件,结果发现按照 DNA:脂质体为 1:1, 1:3, 1:6 三种比率进行细胞转染,发现脂质体:DNA 体积质量比为 3:1 时细胞的转染效率最高。毛晓春等<sup>[27]</sup>分别用体积为 0.6, 9, 12 $\mu$ L 的脂质体介导兔角膜内皮细胞基因转染,结果发现 3 $\mu$ g DNA 与 9 $\mu$ L 脂质体转染效率最高。Ausouy 等<sup>[28]</sup>推荐阳离子脂质体与质粒 DNA 的体积质量比例为 3:1 时为最适转染比例。本研究重组质粒 pcDNA3.1+/hTSHR 与阳离子脂质体参照以上文献推荐的比例混合后行 TAO 实验动物免疫。

#### 参考文献

- Chazenbalk GD, Wang Y, Guo J, *et al.* Identification of a novel epitope in the thyroid-stimulating hormone receptor ectodomain acting as intramolecular signaling interface. *J Biol Chem* 2004; 279 (49): 51590-51600
- Mizutori Y, Saitoh O, Eguchi K, *et al.* Adenovirus encoding the thyrotropin receptor A-subunit improves the efficacy of dendritic cell-induced Graves' hyperthyroidism in mice. *J Autoimmun* 2006; 26(1): 32-36
- Majumdar R, Raikar R, Dighe RR. Insights into differential modulation of receptor function by hinge region using novel agonistic lutropin receptor and inverse agonistic thyrotropin receptor antibodies. *FEBS Lett* 2012; 586(6): 810-817
- Iyer S, Bahn R. Immunopathogenesis of Graves' ophthalmopathy: The role of the TSH receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; 26(3): 281-289
- Hattori Y, Akamizu T, Saijo M, *et al.* Characterization of the secretable ectodomain of thyrotropin receptor produced by the recombinant baculovirus system. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 182(2): 165-174
- Miller TC, Jaques JT, Szkudlinski MW, *et al.* Thyrotropic activity of recombinant human glycoprotein hormone analogs and pituitary mammalian gonadotropins in goldfish (*Carassius auratus*): Insights into the evolution of thyrotropin receptor specificity. *Gen Comp Endocr* 2012; 177(1): 70-75
- Chazenbalk GD, Jaume JC, Mclachlan SM, *et al.* Engineering the human thyrotropin receptor ectodomain from a non-secreted form to a secreted, highly immunoreactive glycoprotein that neutralizes autoantibodies in Graves' patients' sera. *J Biol Chem* 1997; 272(30): 18959-18965
- Chazenbalk GD, Wang Y, Guo J, *et al.* A mouse monoclonal antibody to a thyrotropin receptor ectodomain variant provides insight into the exquisite antigenic conformational requirement, epitopes and vivo concentration of human autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab*

1999;84(2):702-710

9 Bobovnikova Y, Graves PN, Vlase H, *et al.* Characterization of soluble, disulfide bond-stabilized, prokaryotically expressed human thyrotropin receptor ectodomain. *Endocrinol* 1997;138(2):588-593

10 Seetharamaiah GS, Dallas JS, Patibandla SA, *et al.* Requirement of glycosylation of the human thyrotropin receptor ectodomain for its reactivity with autoantibodies in patients' sera. *J Immunol* 1997;158(6):2798-2804

11 张克克,张小芳,王福利,等. PDCD4 重组慢病毒载体的构建、包装及其对前列腺癌细胞增殖的影响. *细胞与分子免疫学杂志* 2013;29(6):609-612

12 周菁,张峰,庞海林. 慢病毒载体介导的 RNA 干扰下调膜联蛋白 A1 对小细胞肺癌细胞生物学行为的影响. *现代肿瘤医学* 2013;21(5):917-921

13 王顺娟,夏海滨. 双表达人 Arid5a 及报告基因 eGFP 的重组腺病毒载体的构建及鉴定. *现代肿瘤医学* 2013;21(5):938-941

14 张志人,安铁涿,王子竹,等. 小鼠 miR367 逆转录病毒载体的构建与检测. *中国畜牧兽医* 2013;40(5):49-53

15 任先越,杨立群,梁玄,等. 阳离子聚合物在非病毒基因转染中的研究进展. *生物工程学报* 2013;5:568-577

16 谭文鹏,杨侃,孙明,等. 腺相关病毒载体介导 Zs Green 基因在体转染大鼠心肌组织的实验研究. *中国现代医学杂志* 2013;23(5):35-38

17 张艳君,贾秀红,李建厂,等. 病毒及非病毒载体对 U937 单核细胞的转染效果. *重庆医科大学学报* 2013;38(2):161-164

18 王利伟,李文建,郑颖,等. 细胞因子 IL-23p19 不同长度 3'UTR

质粒的构建. *河北医药* 2013;35(9):1288-1291

19 冯鑫,杨静,张春燕,等. CFP10-ESAT6-PPE68 融合基因原核表达质粒的构建和表达. *重庆医科大学学报* 2013;38(4):408-412

20 张劲丰,吴英,苏荣,等. 脂质体包裹反义寡核苷酸逆转产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌耐药性研究. *现代医药卫生* 2013;29(8):1121-1123

21 刘雪萍,贺斌峰,陈华萍,等. 新型纳米载体 Ac- $\alpha$ CD 携带的 Bcl-x1 反义寡核苷酸对肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡的作用. *第三军医大学学报* 2013;35(9):846-849

22 宗莉,陈伶俐,张淑芸,等. 壳聚糖纳米粒作为基因载体的研究:制备,特征和对 DNA 的保护. *中国药科大学学报* 2005;36(6):526-530

23 Nakase M, Inui M, Okumura K, *et al.* p53 gene therapy of human osteosarcoma using a transferrin-modified cationic liposome. *Mol Ther* 2005;4:625-631

24 Smith JG, Walzem RL, German JB. Liposome as agents of DNA gene transfer. *BBA* 1993;1154(3-4):327-340

25 张新秀,何守志,郭维维,等. PEDF-GFP 基因转染大鼠视网膜的实验研究. *眼科新进展* 2006;26(4):265-267

26 李劲松,叶展,赵涵芳,等. 阳离子脂质体介导的基因转染真核细胞的研究. *上海第二医科大学学报* 2005;5(10):1025-1029

27 毛晓春,张虹,李贵刚. 脂质体介导兔角膜上皮细胞基因转染的观察. *眼科新进展* 2007;27(7):485-488

28 Ausouy SA, de Leij LF, Hoekstra D, *et al.* *In vivo* characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm Res* 2002;19(11):1599-1605