

基于萤火虫荧光素酶报告基因检测凋亡的系统构建及鉴定

车路平^{1,2}, 栗永华^{1,2}, 杨斌^{1,2}, 徐智凯^{1,2}, 廖瑛², 仇旭升², 谭磊², 孙英杰², 宋翠萍², 丁铲², 姚刚¹, 王金泉¹, 孟春春²

1 新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 中国农业科学院 上海兽医研究所, 上海 200241

车路平, 栗永华, 杨斌, 等. 基于萤火虫荧光素酶报告基因检测凋亡的系统构建及鉴定. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1557–1565.

Che LP, Li YH, Yang B, et al. Construction and identification of an apoptosis detection system based on firefly luciferase reporter gene. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1557–1565.

摘要: 为构建一个能够快速检测凋亡的含荧光素酶报告基因 (Fluc) 的真核表达质粒, 采用 PCR 的方法将 Caspase-3 的识别基序 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) 四个氨基酸引入至 Fluc 基因的 C 端和 N 端之间; 同时选取 Asp-Glu-Val-Gly (DEVG) 四个氨基酸作为阴性对照。随后重组片段分别克隆至分离型内含肽的 N 端和 C 端之间, 并命名为 pFluc-DEVD 和 pFluc-DEVG。将该表达质粒与海肾荧光素酶报告质粒 (RLUC) 同时转染至 HeLa 细胞, 通过双荧光素酶报告基因和 Western blotting 实验检测细胞凋亡水平。双荧光素酶报告基因系统实验结果显示, 当发生凋亡时, pFluc-DEVD 质粒组表达的萤火虫荧光素酶的含量高出 pFluc-DEVG 质粒组约 3 倍。Western blotting 检测结果显示, 转染 pFluc-DEVD 质粒的细胞在凋亡药物刺激后, Fluc 活化的蛋白显著增多, 且 Caspase-3 的活化程度与 Fluc 的表达呈正相关, 并有显著的统计学差异。以上结果表明, pFluc-DEVD 真核表达质粒表达的萤火虫荧光素酶蛋白能被细胞内的 Caspase-3 酶裂解, 且该质粒能够精确地反映出细胞的凋亡水平, 为后续进行凋亡定量检测提供了一个可借鉴的方法。

关键词: 萤火虫荧光素酶, 凋亡, Caspase-3

Received: July 2, 2018; **Accepted:** September 17, 2018

Supported by: Open Project Fund of Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology (No. KLAB201702), Waterfowl Viral Infectious Diseases Innovation Research Group Funding by Chinese Academy of Agricultural Sciences.

Corresponding authors: Chunhui Meng, Tel: +86-21-34293428; E-mail: mengcc@shvri.ac.cn

Jinquan Wang, Tel: +86-991-8763012; E-mail: wangjinquan4555@sina.com

上海市兽医生物技术重点实验室开放课题 (No. KLAB201702), 中国农业科学院上海兽医研究所水禽病毒病团队创新工程经费资助。

Construction and identification of an apoptosis detection system based on firefly luciferase reporter gene

Luping Che^{1,2}, Yonghua Li^{1,2}, Bin Yang^{1,2}, Zhikai Xu^{1,2}, Ying Liao², Xusheng Qiu², Lei Tan², Yingjie Sun², Cuiping Song², Chan Ding², Gang Yao¹, Jinquan Wang¹, and Chunchun Meng²

1 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: To construct a eukaryotic expression plasmid containing the luciferase reporter gene (Fluc) to quickly detect apoptosis. Four amino acids, Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), the recognize motif of Caspase-3, were introduced into the middle of the Fluc-C and N fragment. Meanwhile, four amino acids, Asp-Glu-Val-Gly (DEVG), were selected as a negative control. Subsequently, the recombinant gene was cloned into the N and C terminal end of the split intein, and named as pFluc-DEVD and pFluc-DEVG. Then the plasmids were transfected into cells and renilla luciferase was co-transfected in each sample as an internal control for transfection efficiency. Then the apoptosis level was detected by the double luciferase reporter gene and the Western blotting analysis. The results showed that when apoptosis occurred, the content of firefly luciferase expressed in the pFluc-DEVD plasmid transfected group was about 3 times higher than pFluc-DEVG plasmid transfected group. Furthermore, Western blotting detection indicated that the Fluc level was significantly increased in pFluc-DEVD transfected group when pre-treated by apoptosis stimulants. The activation degree of Caspase-3 was closely related to the expression of Fluc, and had a significant statistical difference. These results confirmed that firefly luciferase protein expressed by pFluc-DEVD plasmid can be cleaved by the intracellular Caspase-3 enzyme, and this plasmid can accurately reflect the cell apoptosis level, which provides a useful method for quantitative detection of apoptosis.

Keywords: luciferase, apoptosis, Caspase-3

细胞凋亡, 又称细胞程序性死亡 (Programmed cell death, PCD), 由病理学家 Kerr 于 1972 年提出, 是指细胞为了更好地适应生存环境而采取的主动死亡过程^[1]。细胞凋亡受基因调控, 贯穿于生物体生命活动的全部过程, 它不仅在胚胎和大脑的发育及机体免疫等过程中扮演重要角色, 而且在心血管疾病、神经性病变及肿瘤的发生发展过程中起到至关重要的作用^[4]。比如, 当凋亡受到抑制, 会导致肿瘤的发生和病毒感染, 而不适当的细胞凋亡激活, 是中风、心肌梗死、早老性痴呆、帕金森病、艾滋病、造血系统疾病等发生的重要原因。

研究表明, Caspase 家族在细胞凋亡的调节与执行过程中的作用至关重要^[2-3]。因此建立一个快速检测 Caspase 蛋白酶活性的方法, 有利于尽早判断细胞的凋亡状态, 且可以为筛选干预细胞凋亡状态来治疗疾病的药物提供方便快捷的途径。

细胞凋亡主要分为: 内源性凋亡途径 (Intrinsic

pathway), 主要由诸多应激条件、化学治疗试剂和药物所导致; 外源性凋亡途径 (Extrinsic pathway), 由死亡受体如 TNF、FasL 等介导^[1]。其中 Caspase-3 蛋白是内源性凋亡途径与外源性凋亡途径的汇集点, 且在凋亡早期被激活, 晚期细胞和死亡细胞中 Caspase-3 的活性下降, 因此 Caspase-3 可被作为细胞凋亡的早期判断指标之一^[4]。而通过定量检测 Caspase-3 活性, 从而监测细胞凋亡的水平, 最终为筛选适宜的抗肿瘤药物提供最佳途径。为建立一种快速高效检测鉴定细胞凋亡的方法, 之前已有研究者将 Caspase-3 作用的底物与荧光共振能量转移肽对^[5]或 D-荧光素^[6]进行连接用以检测 Caspase-3 的活性, 但是这种检测方法的灵敏度较差且实验过程较为繁琐。本研究选用萤火虫荧光素酶作为报告基因用以构建含有 Caspase-3 识别基序的真核表达质粒, 当凋亡现象发生, Caspase-3 激活后将质粒中的 DEVD 剪切

出来,之后萤火虫荧光素酶基因 (Fluc) 的 N 端和 C 端相互靠近激活发出荧光,最后通过检测萤火虫荧光素酶基因的表达情况进而判定细胞的凋亡情况。该方法可在 96 孔板中进行,灵敏度高、操作简便且省时高效,有望成为筛选抗肿瘤药物的新方法。

1 材料与方法

1.1 细胞、载体及主要试剂

真核表达载体 pCI-neo、HeLa 及 A549 细胞由本实验室保存。限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 以及 *Mlu* I, In-Fusion HD Cloning Plus (638909) 购自 TaKaRa 公司;脂质体转染试剂 Eugene、Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自普洛麦格 (Promega) 公司;大肠杆菌 DH5 α 、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小提中量试剂盒及无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司;Phanta EVO Super-Fidelity DNA Polymerase 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;DMEM 培养基和胎牛血清购自西格玛奥德里奇 (Sigma) 公司;Anti-Luciferase mAb (货号 M095-3) 购自北京博尔迈生物技术有限公司;Caspase-3 (货号 9665, 单抗) 和 PARP (货号 9542, 多抗) 购自 Cell Signaling Technology 公司;二抗鼠抗 (货号 115-035-003) 和兔抗 (货号 111-035-003) 购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories 公司;其他试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成

应用 Primer Premier 5.0 基因分析软件,根据 GenBank 上公布的萤火虫荧光素酶基因 (Firefly luciferase gene) 序列 (GenBank 登录号: DS235862.1) 设计两对引物 (图 1), 第一对引物的上游引物 Fluc-NF-VD, 下游引物 Fluc-NR (表 1), 扩增萤火虫荧光素酶基因 N 端 (2–416 aa), 并在上游引物的 5'端引入 4 个氨基酸 DEVD (Caspase-3

识别基序), 在下游引物的 5'端引入 *Mlu* I 酶切位点, 产物大小为 1 279 bp, 由于第一对引物扩增的是萤火虫荧光素酶基因的 N 端, 且在上游引物的 5'端引入了 DEVD 序列, 因而将其分别命名为 Fluc-NF-VD 及 Fluc-NR。第二对引物的上游引物 Fluc-CF, 下游引物 Fluc-CR-VD (表 1)。用以扩增萤火虫荧光素酶基因的 C 端 (399–550 aa), 并在上游引物的 5'端引入 *Mlu* I 酶切位点, 在下游引物的 5'端引入 4 个氨基酸 DEVD, 产物大小为 487 bp, 由于第二对引物扩增的是萤火虫荧光素酶基因的 C 端, 且在下游引物的 5'端引入了 DEVD 序列, 因而将其分别命名为 Fluc-CF 及 Fluc-CR-VD。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min; 16 °C 结束反应。以扩增出来的萤火虫荧光素酶基因的 N 端及 C 端基因为模板, Fluc-CF、Fluc-NR 为引物利用融合 PCR 的方法扩增完整的带有 DEVD 的 Fluc, 产物大小为 1 766 bp。同理扩增带有 DEVD (只与 DEVD 有 1 个氨基酸不同, 作为阴性对照) 的 Fluc 片段。

PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 64 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min; 16 °C 结束反应。

1.2.2 DnaEC-DnaEN-PEST 片段的合成

由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成带有 DnaEC-DnaEN-PEST 片段的 pUC 质粒, 并在片段两端预留 *EcoR* I、*Sal* I 酶切位点, DnaEC 与 DnaEN 之间预留 *Mlu* I 酶切位点。DnaEN 及 DnaEC 分别为分裂型内含肽的 N 端及 C 端, 其功能为使外源表达的 Fluc 的 N 端与 C 端重新连接形成成熟蛋白。PEST 为一段富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸的多肽, 它的作用是水解剪接不完全的萤火虫荧光素酶蛋白。

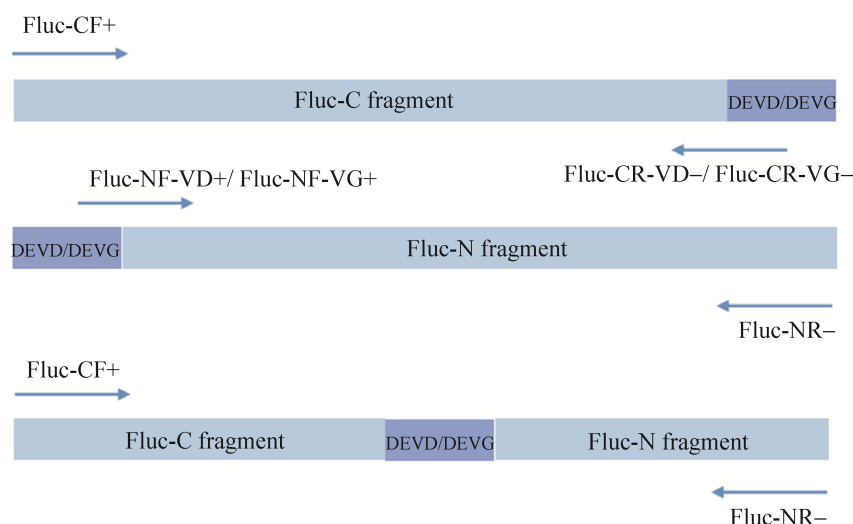


图 1 引物设计模式图

Fig. 1 Diagram of primer design.

表 1 扩增 Fluc 片段所需引物

Table1 Primer used for amplification of Fluc gene

Primer name	Sequence (5'–3')	Size (bp)
Fluc-NF-VD+	GCC GTG <u>GAT GAA GTT GAT</u> ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG	47
Fluc-NF-VG+	GCC GTG <u>GAT GAA GTT GGT</u> ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG	47
Fluc-NR–	CAG CAA ATT <u>TAC GCG TTC</u> CAT CCT TGT CAA TCA AGG CGT T	40
Fluc-CF+	TAA TAT TAG <u>TAC GCG TTC</u> CGG TTA TGT AAA CAA TCC GGA AG	41
Fluc-CR-VD–	CAT <u>ATC AAC TTC ATC</u> CAC GGC GAT CTT TCC GCC CTT CTT	39
Fluc-CR-VG–	CAT <u>AAC AAC TTC ATC</u> CAC GGC GAT CTT TCC GCC CTT CTT	39

Annotation: Single underscore, Amino acid DEVG; Waveline, Amino acid DEVG; Double underscore, *Mlu* I restriction site; Fluc, Firefly luciferase gene.

1.2.3 真核表达质粒 pFluc-DEVG 及 pFluc-DEVG 的构建

分别用限制性核酸内切酶 *Eco*R I、*Sal* I 酶切带有 DnaEC-DnaEN-PEST 片段的 pUC 质粒以及空载 pCI-neo 质粒，将 DnaEC-DnaEN-PEST 片段与 pCI-neo 进行连接，PCR 筛选获得阳性菌液并提取质粒。用限制性核酸内切酶 *Mlu* I 酶切带有 DnaEC-DnaEN-PEST 片段的 pCI-neo 重组阳性质粒，再采用 In-Fusion HD Cloning Plus 的方法将其与 Fluc-DEVG 或 Fluc-DEVG 片段进行融合，构建质粒 pFluc-DEVG 及 pFluc-DEVG。鉴定结果为阳性者提取质粒，并送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，测序结果正确后，按照无内毒素质粒大提试剂盒说明书提取质粒备用。

1.2.4 脂质体转染 HeLa 及 A549 细胞

将 HeLa 及 A549 细胞分为 pFluc-DEVG 质粒组（第一组）和 pFluc-DEVG 组（第二组），将细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种到 6 孔板内，37 °C 温箱中培养 12 至 18 h。待细胞生长密度达 70%–80% 时，弃掉培养基，PBS 清洗 2 遍后，每孔补加 900 μ L 的 Opti-MEM。按照普洛麦格公司 Fugene 试剂的使用说明书进行质粒转染，于 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 6 h 后弃掉转染混合物，加入 1 mL 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。

1.2.5 Western blotting 检测 Fluc、Caspase-3 及 PARP 的表达

脂质体转染 48 h 后，弃掉培养液。PBS 洗涤 2 次，使用 200 μ L 1 \times loading buffer 裂解细胞收取

样品, 100 °C金属浴 10 min。10% SDS-PAGE 分离蛋白, 转移至 PVDF 膜, 10%脱脂乳封闭 1 h, 以 1:1 000 稀释 Fluc 一抗, 4 °C孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 之后用 1:8 000 稀释的二抗于 37 °C孵育 1 h。最后再用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用化学发光法检测并拍照记录。

1.2.6 萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性检测

阳性质粒 pFluc-DEVD、阴性质粒 pFluc-DEVG 分别与 Rluc 质粒共转染 HeLa 及 A549 细胞 48 h, 每组设置 3 个重复孔, 弃掉培养液, PBS 洗涤 2 次后, 按照双荧光报告基因检测试剂盒说明书, 收集 6 孔板中的细胞裂解液。随后用 GloMax 发光仪检测 Fluc 和 Rluc 的活性, 即每 20 μ L 裂解液的上清加入 100 μ L 的 LAR II, 检测 Fluc 的活性。之后每孔加入 100 μ L Stop Buffer 检测 Rluc 的活性, 记录两次分别测得的数值。

2 结果与分析

2.1 质粒构建模式图

设计的凋亡检测质粒主要包括 DnaE-C 端、切割开的 Fluc-C、DEVD 片段、Fluc-N、DnaE-N 端、PEST 序列, 具体如图 2 所示。

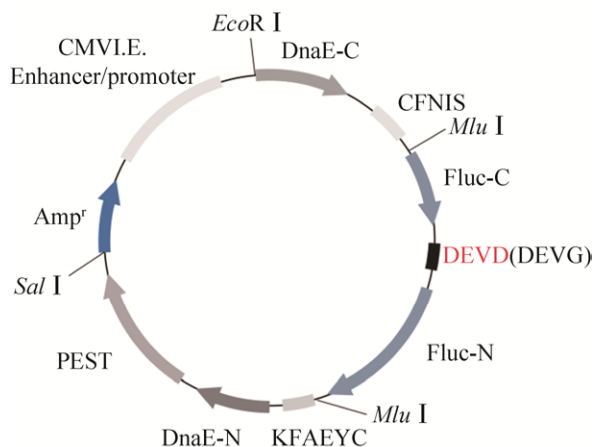


图 2 凋亡检测质粒的结构示意图

Fig. 2 The plasmid map of pFluc-DEVD/pFluc-DEVG.

2.2 Fluc 基因的融合

将 Fluc 的 N 端及 C 端进行融合 PCR, 并使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 结果显示在 1 700 bp 大小的位置有清晰的条带, 与预期结果一致 (图 3)。

2.3 pFluc-DEVD 及 pFluc-DEVG 质粒的构建及鉴定

使用限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 酶切带有 pUC 质粒以及空载 pCI-neo 质粒, 并进行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 回收小片段即 DnaEC-DnaEN-PEST 片段, 并将其与 pCI-neo 载体连接, 构建的质粒进行菌液 PCR 鉴定, 条带大小正确。

使用限制性内切酶 *Mlu* I 酶切构建好带有 DnaEC-DnaEN-PEST 片段的 pCI-neo 质粒, 并使用 1%琼脂糖凝胶电泳进行回收, 与扩增好的 Fluc-DEVD 或 Fluc-DEVG 片段进行重组。挑选重组质粒的菌液进行菌液 PCR 鉴定及质粒的酶切鉴定。由图 4 可知, 构建的 pFluc-DEVD 及 pFluc-DEVG 质粒经菌液 PCR 扩增得到大小为 2 301 bp 的目的片段, 经 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切鉴定可获得大小为 2 301 bp 的目的条带, 测序结果与预期一致。

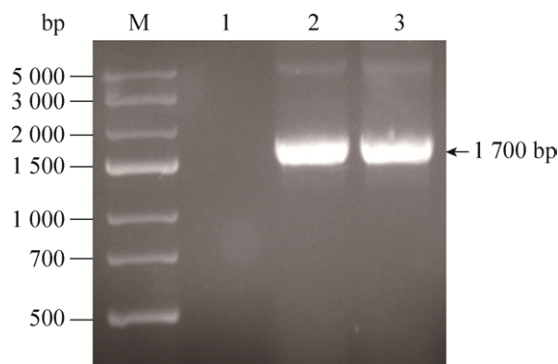


图 3 Fluc 全长基因融合 PCR 扩增结果

Fig. 3 Amplification of full length of firefly luciferase gene. M: DNA marker; 1: no sample; 2: full length of firefly luciferase gene with DEVD; 3: full length of firefly luciferase gene with DEVG.

2.4 Western blotting 检测 Fluc 的表达

在 HeLa 细胞中转染阴性对照质粒 pFluc-DEVG、阳性质粒 pFluc-DEVD 以及空载质粒 pCI-neo, 48 h 后加入促凋亡试剂 STS 作用 2 h, 收集细胞蛋白进行 Western blotting 检测。由图 5 可见, 转染 pFluc-DEVD 组能够产生活化的 Fluc 蛋白, 条带大约为 61 kDa, 与预期结果一致。而 pFluc-DEVG 组分裂的 N 端及 C 端 Fluc 蛋白相互靠近时能形成少量活化的 Fluc 蛋白, 但总体上明显少于 pFluc-DEVD 组, 空白组及转染空载质粒组均没有条带产生。

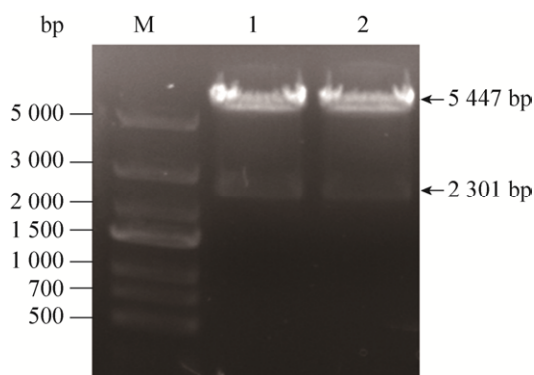


图 4 pFluc-DEVD 及 pFluc-DEVG 质粒的双酶切鉴定
Fig. 4 Identification of pFluc-DEVD and pFluc-DEVG plasmid using restriction endonuclease digestion. M: DNA marker; 1: pFluc-DEVD plasmid; 2: pFluc-DEVG plasmid.

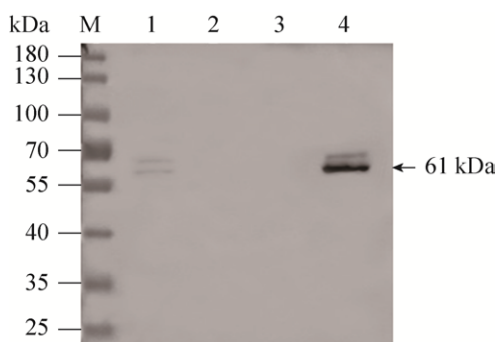


图 5 Western blotting 检测萤火虫荧光素酶在 HeLa 细胞中的表达

Fig. 5 Western blotting analysis detected the expression of Fluc protein in HeLa cells. M: protein marker; 1: pFluc-DEVG plasmid; 2: pCI-neo vector; 3: blank control; 4: pFluc-DEVD plasmid.

2.5 Western blotting 检测 Caspase-3 和 PARP 的表达

将 pFluc-DEVD 或 pFluc-DEVG 质粒转染 HeLa 细胞 48 h, 加入 STS 促凋亡试剂作用 2 h 后, 收集细胞蛋白进行 Western blotting 检测。由图 6 可知, 只加入 pFluc-DEVG 质粒或 pFluc-DEVD 质粒, 并不能引起细胞发生凋亡, 排除了质粒及转染试剂的干扰。而加入 1:1 000 稀释的 STS 试剂后, pFluc-DEVD 质粒组及 pFluc-DEVG 质粒组均产生 PARP 的裂解及 Caspase-3 的活化现象, 与预期结果一致。该结果表明, 促凋亡试剂 STS 进行 1 000 倍稀释时能够诱导细胞发生凋亡, 且不会受到转染质粒的影响, 因而该试剂可作为用于后续实验中细胞凋亡的诱导剂。

2.6 萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性检测

将 pFluc-DEVD 或 pFluc-DEVG 质粒与 Rluc 质粒共转染 HeLa 及 A549 细胞 48 h 后, STS 促凋亡试剂以 1:1 000 稀释加入培养基中, 37 °C 培养箱放置 2 h, 检测 Rluc 和 Fluc 的活性。结果发现, 当细胞发生凋亡时, pFluc-DEVD 质粒的 RLU 值 (即 relative light unit, $RLU = LF/LR$) 是 pFluc-DEVG 质粒的 3 倍 (图 7), 差异显著; 而未加凋亡刺激药物的两组质粒的 RLU 值无统计学差异。

3 讨论

凋亡 (Apoptosis) 又被称作细胞程序性死亡, 是指为了维持内环境的稳定, 由基因控制的

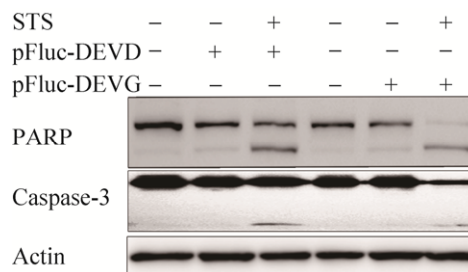


图 6 Western blotting 检测 Caspase-3 和 PARP 的表达
Fig. 6 Western blotting analysis of Caspase-3 and PARP expression in HeLa cells.

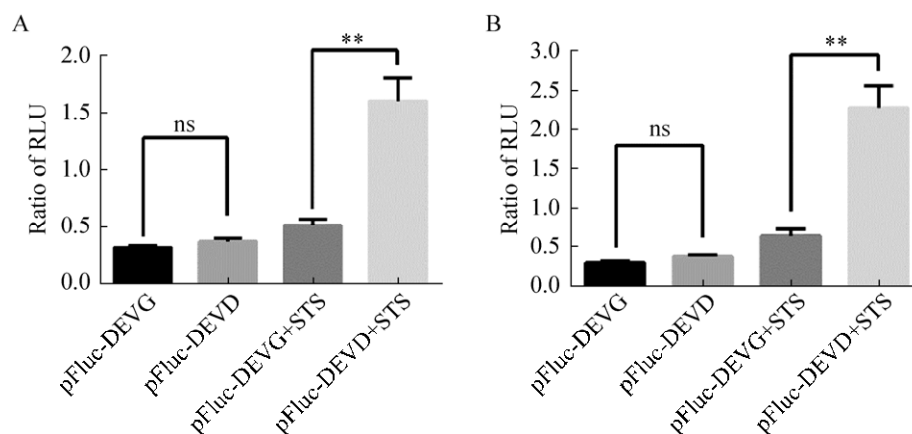


图7 萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性检测结果

Fig. 7 Detection the activity of firefly luciferase and sea kidney luciferase. ns: no significantly different; **: $P < 0.05$. (A) HeLa cell. (B) A549 cell.

细胞自主有序的死亡^[1,7]。目前已经发现凋亡在许多疾病的发生和发展过程中扮演着重要的角色^[8-10]。而随着分子生物学技术的发展及人们对于细胞凋亡的过程和分子机制的了解逐渐加深,用于检测细胞凋亡的一系列实验方法也应运而生,例如镜下观察细胞形态的变化、细胞活力检测、DNA片段检测等^[11-12]。但是这些方法大多数只能用于数量较少的样本的检测且操作过程繁琐,做不到快速高效地进行大批量样本的检测。目前已知有通过微流控芯片技术^[13]以及荧光共振能量转移技术^[14]进行细胞凋亡的高通量检测。而本实验通过构建Luciferase基底的质粒(生物传感器),将其转染特定细胞系并结合双荧光素酶报告基因的实验方法,使得检测可在96孔板中进行,操作简便且快速可行,有望成为新型高通量检测细胞凋亡的方法。

研究表明^[15],Caspase-3能够特异性识别DEVD-x,并水解D-x之间的肽段。针对这一特性,我们建立了pFluc-DEVD Luciferase和双荧光素酶报告基因系统的检测方法。将Caspase-3的酶切底物DEVD插入萤火虫荧光素酶基因(Firefly luciferase, Fluc)的N端和C端之间,并将两者进行偶联。为确保DEVD被切割之后,Fluc

基因能够顺利激活,在Fluc基因的N端和C端分别添加一段内含肽(Intein)序列。内含肽是一段宿主蛋白的氨基酸序列,与宿主蛋白基因存在于同一个开放阅读框内,具有自我剪接的功能。本实验使用的是分离型内含肽DnaE,来自于集胞蓝细菌属的DNA聚合酶III的 α 亚单位,编码的基因包括DnaE-N和DnaE-C^[16]。有研究表明^[17],通过将分裂型内含肽的N端与C端前后颠倒,可以用于外源表达蛋白的连接且内含肽自身可以从成熟的蛋白中自我剪切出来。利用内含肽这一特性,将DnaE的N端与C端前后颠倒后分别连接于Fluc-N端的末端及C端的开端,从而使其利于Fluc的N端与C端外显肽连接起来形成成熟蛋白。同时,为了提高内含肽的蛋白剪接效率,在DnaE-C端与Fluc-C端之间插入CFNIS,以及在DnaE-N端与Fluc-N端之间插入了KFAEYC氨基酸序列。此外,质粒中还插入了一段PEST序列。PEST是指一段富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的多肽,它的作用是使未剪接完全的萤火虫荧光素酶蛋白序列水解,从而减少未切割的Fluc蛋白带来的干扰^[18]。

当细胞处于正常状态时,因为细胞内的

Caspase-3 处于非活性状态, 萤火虫荧光素酶报告基因的 N 端与 C 端蛋白被 DEVD 间隔开, 所以萤火虫荧光素酶报告基因不具备活性, 因而无法发出荧光; 而当使用 STS 试剂诱导细胞发生凋亡时, 内含肽 DnaE-C 与 DnaE-N 相互连接形成完整的 DnaE, 之后 DnaE 将萤火虫荧光素酶报告基因 N 端和 C 端相连接, 并将自身剪切下来, 紧接着细胞内活化的 Caspase-3 能够特异性剪切 DEVD, 最终使得萤火虫荧光素酶基因恢复活性, 从而发出荧光 (图 8)。从 Western blotting 检测 Fluc 的结果来看, pFluc-DEVD 质粒正常工作, 能够明显检测到激活后的线性 Fluc 蛋白 (下方条带较粗的), 以及少量未激活的环状 Fluc 蛋白 (上方颜色较浅的)。而转染 pFluc-DEVG 质粒组也检测到少量的线性 Fluc 蛋白, 后期可以通过对 PEST 序列进行

优化以及插入其他序列, 确保未活化的 Fluc 序列被彻底降解, 从而将干扰降到最低。而后检测 PARP 及 Caspase-3 蛋白, 进一步证实了在加入 STS 后, 转染两种质粒后都发生了凋亡现象。之后通过双荧光素酶报告实验来印证质粒检测凋亡的能力, 结果发现转染 pFluc-DEVD 质粒的 HeLa 及 A549 细胞的 RLU 值比阴性对照 (转染 pFluc-DEVG 质粒) 要高出近 3 倍, 再次表明 Fluc 基因成功激活, 萤火虫荧光素酶能够发出较高的荧光值。

综上所述, 本研究建立的 pFluc-DEVD Luciferase 和双荧光素酶报告基因检测细胞凋亡的方法, 能够准确有效地检测细胞内 Caspase-3 的活化从而了解细胞的凋亡情况, 为将来进行凋亡的高通量检测, 进而筛选适宜的凋亡干预药物提供了一个便利条件。

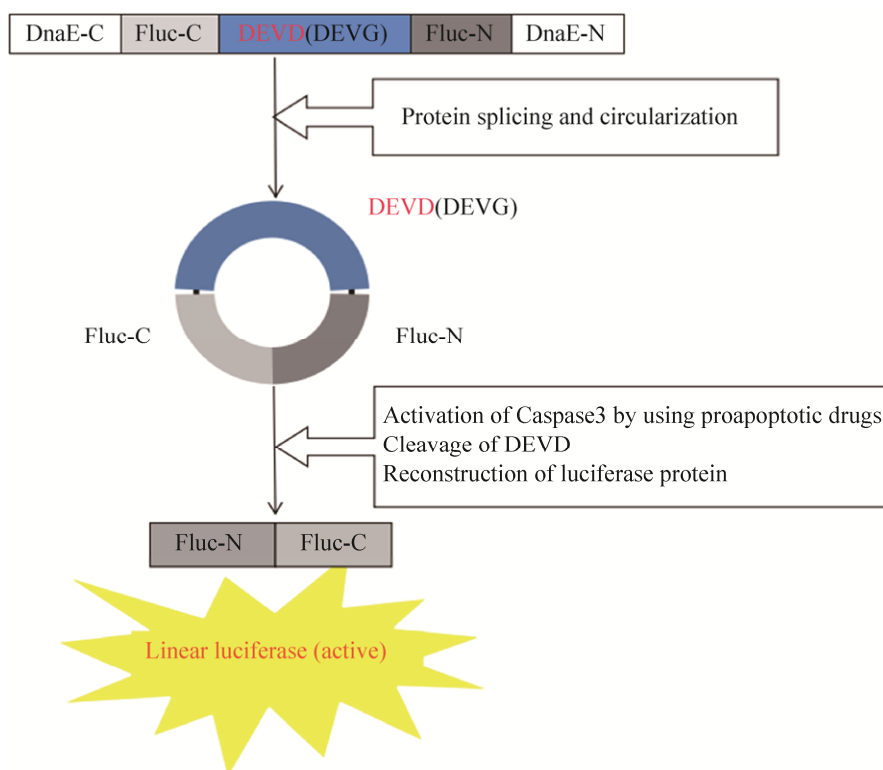


图 8 凋亡质粒工作原理示意图

Fig. 8 Schematic illustration of working principle of apoptosis detection plasmid.

REFERENCES

- [1] Martinez MM, Reif RD, Pappas D. Detection of apoptosis: a review of conventional and novel techniques. *Anal Methods*, 2010, 2(8): 996–1004.
- [2] Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(1): 1–9.
- [3] Mcstay GP, Green DR. Measuring apoptosis: caspase inhibitors and activity assays. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014, 2014(8): 799–806.
- [4] Didonna A, Sussman J, Benetti F, et al. The role of Bax and caspase-3 in doppel-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Prion*, 2012, 6(3): 309–316.
- [5] Spencer SL, Sorger PK. Measuring and modeling apoptosis in single cells. *Cell*, 2011, 144(6): 926–939.
- [6] Godinat A, Budin G, Morales AR, et al. A biocompatible “Split Luciferin” reaction and its application for non-invasive bioluminescent imaging of protease activity in living animals. *Curr Protoc Chem Biol*, 2014, 6(3): 169–189.
- [7] Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recep Signal Transduct*, 2015, 35(6): 600–604.
- [8] Cerella C, Grandjenette C, Dicato M, et al. Roles of apoptosis and cellular senescence in cancer and aging. *Curr Drug Targets*, 2016, 17(4): 405–415.
- [9] Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 2942–2955.
- [10] Zhang X, Li CF, Zhang L, et al. TRAF6 restricts p53 mitochondrial translocation, apoptosis, and tumor suppression. *Mol Cell*, 2016, 64(4): 803–814.
- [11] Blankenberg FG. *In vivo* detection of apoptosis. *J Nucl Med*, 2008, 49 Suppl 2: 81S–95S.
- [12] Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol*, 2012, 34(3): 255–262.
- [13] Kilianski A, Mielech AM, Deng XF, et al. Assessing activity and inhibition of Middle East respiratory syndrome coronavirus papain-like and 3C-like proteases using luciferase-based biosensors. *J Virol*, 2013, 87(21): 11955–11962.
- [14] Dai W, Zheng YZ, Luo KQ, et al. A prototypic microfluidic platform generating stepwise concentration gradients for real-time study of cell apoptosis. *Biomicrofluidics*, 2010, 4(2): 024101.
- [15] Yun NR, Kim C, Cha H, et al. Caspase-3-mediated cleavage of PICOT in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(3): 533–538.
- [16] Zettler J, Schutz V, Mootz HD. The naturally split *Npu* DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein *trans*-splicing reaction. *FEBS Lett*, 2009, 583(5): 909–914.
- [17] Muralidharan V, Muir TW. Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nat Methods*, 2006, 3(6): 429–438.
- [18] Uversky VN, Dunker AK. Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(6): 1231–1264.

(本文责编 郝丽芳)