论著

文章编号:1000-5404(2005)15-1544-04

胚胎细胞MAD2基因表达对染色体分离的影响

施 琼,翁亚光,蔡 燕,刘青松,刘子杰 (重庆医科大学临床检验诊断学实验室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨MAD2基因表达对染色体分离的影响。**方法** 用定量RT-PCR比较RNA干扰前后的胚胎细胞内源性基因MAD2 mRNA表达水平,同时对染色体数目异常率进行比较分析。**结果** 干扰后MAD2基因mRNA拷贝数/GAPDH基因mRNA拷贝数的均值为干扰前的20%,染色体数目异常率均值由干扰前的4.702%上升到28.498%。经统计学分析,RNA干扰后MAD2基因mRNA水平显著下降,染色体数目异常率显著增高。**结论** MAD2基因表达的降低会导致染色体分离的异常,本研究为染色体分离相关蛋白功能研究建立了新的研究手段和实验评价体系。

关键词: MAD2基因;RNA干扰;定量RT-PCR

中图法分类号: R394.2;Q343.2 **文献标识码:** A

Effects of MAD2 expression in embryonic cells on chromosome segregation

SHI Qiong, WENG Ya-guang, CAI Yan, LIU Qing-song, LIU Zi-jie (Laboratory of Clinical Diagnostics, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of MAD2 expression in embryonic cells on chromosome segregation. **Methods** Endogenous MAD2 mRNA level was compared by using quantitative RT-PCR and the rate of chromosome number aberration were evaluated in embryonic cells before and after RNA interference. **Results** The ratio of MAD2 mRNA/GAPDH mRNA after RNA interference decreased to 20% of the ratio before RNA interference ($P<0.01$). The rate of chromosome number aberration increased from 4.702% before RNA interference to 28.498% after interference. **Conclusion** The decreased MAD2 expression might lead to abnormality of chromosome segregation.

Key words: MAD2; RNA interference; quantitive RT-PCR

染色体数目异常胚胎的发生机制至今为止尚不清楚。染色体着丝粒是纺锤丝微管与染色体的连接部位,在细胞分裂过程中,人们已发现只有在细胞分裂的中期所有的染色体着丝粒点与纺锤丝连接并排列在细胞的赤道面时,细胞中的染色体才能正常地向细胞的两极移动并进入两个子细胞,否则,细胞将停留在细胞分裂的中期。近年来,有学者认为在细胞分裂的整个过程中,细胞内有一个监控体系(surveillance system)保证细胞分裂的正常进行,它对DNA的损伤、纺锤丝的完整性及染色体最终是否正常分离起着重要的监控作用。Rieder等[1,2]认为,细胞内的着丝粒相关蛋白-关卡蛋白(checkpoint protein,CP)能够准确的识别纺锤丝微管与染色体着丝粒点的连接,是细胞分裂监控体系中的一个重要组成部分。其中MAD2(mitotic arrest deficient)基因编码的CP的功能尤其引人注目。本研究利用Real-time (RT) PCR、Western blot等方法比较分析干扰前后MAD2基因mRNA、胚胎细胞染色体数目的变化,探讨MAD2在染色体分离过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒及菌种:质粒为PTZU6+1,菌种为JM109,均来自重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室。

主要试剂和仪器:核酸内切酶购自Promega公司,脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen, Life technologies。DMEM和RPMI1640培养基由本实验室供应室自行配制。CK抗体和波形蛋白抗体购自北京中山公司。质粒大抽试剂盒EndoFree Plasmid Maxi Kit购自QIAGEN公司。定量PCR所用探针由上

基金项目: 国家自然科学基金资助面上项目(30371485)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371485)

作者简介: 施 琼(1969-),女,四川省成都市人,博士研究生,讲师,主要从事细胞周期和染色体分离方面的研究。电话:(023)66806316

通讯作者: 翁亚光,E-mail: wengyg@sina.com

收稿日期: 2005-06-09;**修回日期:** 2005-07-05

海 Genecore 合成。特优级血清购自 Hyclon 公司。MAD2 蛋白一抗购自 Santa cruz 公司(抗体编号 SC-1720)。SP9003 鼠抗羊免疫化学试剂盒购自北京中山生物试剂公司。Omniscript™ Reverse Transcriptase 试剂盒购自 QIAGEN。Platinum Taq polymerase 购自 Invitrogen, Life technologies。T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司。Biorad. 电转仪 RT-PCR 仪为美国 MJ 公司生产的 opticon monitor2。

1.2　方法

1.2.1　胚胎细胞的培养及鉴定　　由重庆医科大学两附属医院妇产科收集妊娠 10 周以内的人工流产胚胎,夫妇双方均无有毒有害物质接触史,家族中无遗传病史,女方无自然流产史和先兆流产的症状,年龄 23 ~ 32 岁,染色体核型分析正常。

胚胎组织的所有器械均进行无菌处理,专人将胚胎组织及时送达细胞培养室,立即对胚胎组织进行洗涤和分选,获取其绒毛组织。

基础培养液是 DMEM,胎牛血清浓度为 20%,原代细胞培养 7 ~ 10 d 进行传代,以后每次传代细胞的时间为 4 ~ 6 d。

用鉴定绒毛滋养层细胞为阳性,而非滋养层细胞为阴性;相反作为阴性对照,鉴定绒毛滋养层细胞为阴性,而非滋养层细胞为阳性,鉴定细胞为 3 ~ 5 代的细胞。

1.2.2　shRNA 表达质粒的构建　　使用武汉晶赛公司提供网上 RAN 干扰序列设计软件,并参照 Kops 等[3] 的方法,选取 3 个与 MAD2 基因编码区完全互补的 shRNA 序列,其中茎环结构为 7 个碱基 TTAAGAG。BLAST(basic local alignment search tool)分析,shRNA 序列与其它基因没有同源性。MAD2 基因的 shRNA 序列交由上海生工合成,将其溶于三蒸水,使其终浓度为 25 μmol/L。将正反链按等摩尔数加入退火缓冲液,95 ℃孵育 5 min,然后水浴缓慢使其降至室温,使其形成双链。

克隆所用的两个核酸内切酶位点是 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ,鉴定所用酶切位点 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ,克隆质粒交由博亚测序,测序结果与合成序列完全吻合。

设计的 MAD2 基因的 shRNAs 序列如下:

PshRNA-MAD2-1 序列:

正义链:5′-TCGAGGAGTCGGGACCACAGTTTATTAAGAGTAACTGTGGTCCCGACTCTTTTT-3′

反义链:5′-CTAGAAAAAGAGTCGGGACCACAGTTTACTCTTAATAAACTGTGGTCCCGACTCC-3′

PshRNA-MAD2-2 序列:

正义链:5′-TCGAGGCTATCCAGGATGAAATCCTTAAGAGGGAT TTCATCCTGGATAGCTTTTT-3′

反义链:5′-CTAGAAAAAGCTATCCAGGATGAAATCCCTCTTAAGGATTTCATCCTGGATAGCC-3′

PshRNA-MAD2-3 序列:

正义链:5′-TCGAGGCTATCCAGGATGAAATCCTTAAGAGGGATTTCATCCTGGATAGCTTTTT-3′

反义链:5′-CTAGAAAAAGTGTTCAGTTCAGAAACTGCTCTTAACAGTTTCTGAACTGAACACC-3′

1.2.3　转染胚胎细胞　　测序鉴定后质粒抽提保存于 -80 ℃。将培养 3 ~ 5 代的绒毛细胞计数后传至培养板中进行培养,24 h 后,细胞完全贴壁,使用 Lipofectamine 2000 转染细胞,操作方法照说明书。

1.2.4　筛选有干扰效果的 shRNA　　将 PTZU6 + 1 空质粒和 3 个 shRNA 分别转染 6 孔板中培养的胚胎细胞,各转染 3 孔,继续培养 48 h 后,不同转染质粒各收集 2 孔,加蛋白裂解缓冲液煮沸 5 min,对总蛋白质定量后作 Western blotting。各种转染质粒剩下的 1 孔用于作免疫细胞化学。

细胞免疫化学:一抗浓度为 1∶300。操作步骤按说明书,显色剂 DAB。用 PTZU6 + 1 空质粒对照。初步筛选出有干扰效果的 shRNA。为了提高筛选的有效性和准确性,我们又选用 MAD2 基因表达很高的 HepG2 细胞转染相应质粒后,做免疫细胞化学。

Western blotting:一抗浓度为 1∶500;二抗为化学发光标记的鼠抗羊(购自北京中山公司),滴度 1∶10 000。北京鼎国的预染 marker,将组化筛选出的干扰序列作 Western blotting。

根据细胞免疫化学和 Western blot 结果筛选出对 MAD2 基因干扰有效的 shRNA 序列。

1.2.5　用 RT-PCR 测定干扰前后 MAD2 基因的 mRNA 水平

1.2.5.1　实验组别设计　　选择 5 例原代培养 3 ~ 5 代的胚胎细胞,每例按 1×10^6 个细胞数种于 6 孔板中,待其长满后,3 孔转染 1.0 μg PTZU6 + 1 空质粒即对照组,3 孔转染 1.0 μg 有干扰效果的 shRNA 即干扰质粒组;转染 48 h 后,收集每组 1 孔细胞提取总 RNA,操作按说明书,紫外分光光度计对总 RNA 定量。应用一步法,即逆转录和扩增在同一体系内完成的聚合酶链反应。反应体积为 25 μl。反应条件:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min, 1 个循环; 95 ℃ 30 s,60 ℃ 1 min, 40 个循环。每组的其余 2 孔用于制备染色体标本。

1.2.5.2　MAD2 基因特异的引物和探针序列　　MAD2-FAM: CGAGTTCTTCTCATTCGG; MAD2-FP: GAGCAGGGAATCACCCTGC;MAD2-RP:CCACGCTGATATAAAATGCTGTTG

1.2.5.3　标准品　　用 T 载体构建,克隆序列如下:TGTGGTTGCTGTCCGCGGAGTGGAAGCGCGTGCTTTTGTTTGTGTCCCTGGCCATGGCGCTGCAGCTCTCCCGGGAGCAGGGAATCACCCTGCGCGGGAGCGCCGAAATCGTGGCCGAGTTCTTCTCATTCGGCATCAACAGCATTTTATATCAGCGTGGCATATATCCATCTGAAACCTTTACTCGAGTGCAGAAATACGGACTCACCTTGCTT。

1.2.5.4　内参照　　选用人的 GAPDH 基因,其探针和引物购自 genecore 公司。

1.2.6　染色体标本制备　　培养 3 ~ 5 代的细胞收获前 6 ~ 9 h 加入秋水仙碱,按常规方法制备染色体标本,对每个标本计数分析 50 ~ 100 个分裂相,计算染色体数目异常核型的比率。

1.2.7　染色体分析标准　　分析 50 ~ 100 个分裂相,在进行核型分析时,当出现染色体数目异常,但未见 2 个相同异常核型的标本,根据染色体分析的国际标准,这种异常主要由制片时引起而非组织细胞自身异常,该胚胎组织细胞视为染色体正常。RNA 干扰后,胚胎染色体数目异常的种类较多,无法区分

染色体数目异常是由于制片原因引起还是组织细胞自身异常所致，因此，无论对照组还是干扰组只要镜下观察到染色体数目异常分裂相均纳入统计分析。

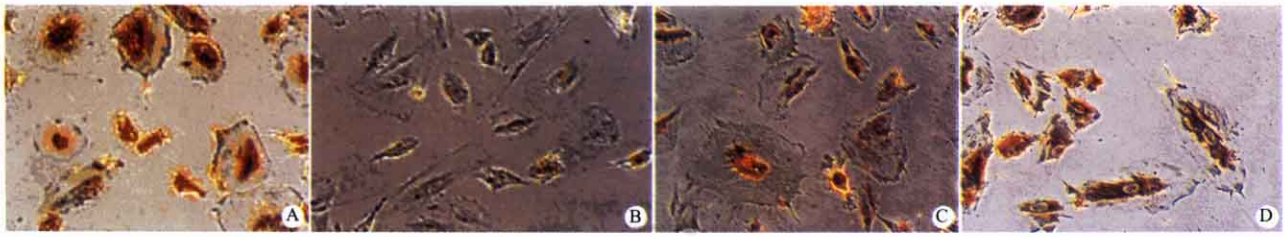
1.3 统计学处理

采用 SPSS 12.0 软件对两独立样本进行 t 检验；采用 SAS 软件行成组秩和检验。

2 结果

2.1 有效干扰效果的 shRNA

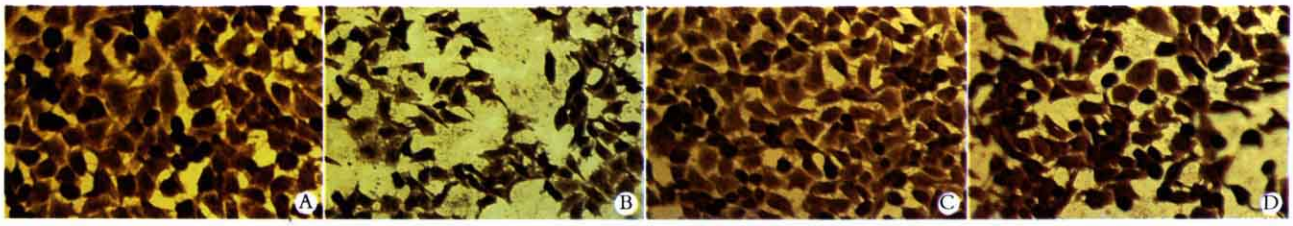
2.1.1 细胞免疫化学 细胞免疫化学检测原代培养的胚胎细胞和 HepG2 细胞中的 MAD2 基因的蛋白表达，均证实 PshRNA-MAD2-1 为有效干扰序列（图 1、2）。



A：1.0 μg PTZU6 +1；B：1.0 μg PshRNA-MAD2-1；C：1.0 μg PshRNA-MAD2-2；D：1.0 μg PshRNA-MAD2-3

图 1 shRNAs 转染胚胎细胞 48 h 后的细胞免疫化学 （S-P ×200）

Fig 1 Immunocytochemistry of embryonic cells transfected with shRNAs after 48 h （S-P ×200）



A：1.0 μg PTZU6 +1；B：1.0 μg PshRNA-MAD2-1；C：1.0 μg PshRNA-MAD2-2；D：1.0 μg PshRNA-MAD2-3

图 2 shRNAs 转染 HepG2 细胞 48 h 后的细胞免疫化学 （S-P ×200）

Fig 2 Immunocytochemistry of HepG2 cells transfected with shRNAs after 48 h （S-P ×200）

2.1.2 Western blot 胚胎细胞转染 48 h 后，Western blot 检测结果证实 PshRNA-MAD2-1 为有效干扰序列。

2.2 干扰前后 MAD2 基因的表达

2.2.1 Western blot 结果见图 3。



1：Without any treatment；2：1.0 μg PshRNA-MAD2-1 transfection for 48 h；3：At 48 h after 1.0 μg PTZU6 +1 transfection

图 3 RNA 干扰胚胎细胞 MAD2 基因的 Western blot 结果

Fig 3 Western blotting of MAD2 gene in embryonic cells after RNA interference

2.2.2 Real-time PCR 标准曲线为：$Y = 11.34 - 0.26X$（$r^2 = 0.999$）。每一样品做 5 个平行管。每例标本 MAD2 基因 mRNA 拷贝数与该标本 GAPDH 基因 mRNA 拷贝数之比值显示，转染干扰质粒组和对照组分别为（0.042 6 ± 0.006 2）和（0.196 0 ± 0.068 8），二者有显著性差异（$P < 0.01$），说明 PshRNA-MAD2-1 质粒能在 mRNA 水平抑制 MAD2 基因的表达。

2.3 干扰前后染色体核型变化

干扰质粒组染色体数目异常率为 28.498%，对照组为 4.702%，二者有显著性差异（$P = 0.009$）。说明 PshRNA-MAD2-1 质粒抑制 MAD2 基因表达后，染色体数目异常细胞比例显著性增加。

3 讨论

染色体数目异常在群体中发生率约 3%，在流产胚胎中发生率可高达 50%，它是由于细胞分裂时染色体分离异常所致。胚胎发育过程中细胞进行着旺盛的分裂，染色体正常分离是细胞分裂中一个十分重要的

过程。有学者[1,4]发现 MAD 目前分为 MAD1、MAD2 和 MAD3,其中 MAD2 在细胞分裂中期的早期附着到未与纺锤丝微管连接的着丝粒上,并向细胞内发出等待信号,在该信号的作用下,纺锤丝微管才逐渐附着到着丝粒上,在 MAD2 识别到染色体着丝粒点与纺锤丝微管已经连接后脱离着丝粒,染色体才会向细胞的两极移动。研究细胞内 MAD2 基因的表达,对探讨染色体不分离的分子机制具有十分重要的意义。

Ouyang 等利用荧光免疫技术发现在细胞分裂的过程中,MAD2 蛋白在未与纺锤丝连接的着丝粒点上的浓度较高,在纺锤丝连接的着丝粒点上的浓度较低,即 MAD2 主要附着在未与纺锤丝连接的着丝粒点上,当纺锤丝与着丝粒点连接后将与着丝粒点分离,说明 CP 在识别着丝粒点是否与纺锤丝连接过程中具有一定的作用。Steuerwald 等[5]利用定量 RT-PCR 的方法对不同年龄妇女卵细胞内 MAD2 基因的表达进行了研究,发现随着妇女年龄的增加,MAD2 基因的表达水平有所下降,MAD2 基因的表达水平降低,可引起细胞内 CP 的减少,这可能是导致高龄妇女卵细胞分裂时染色体不分离或丢失风险较高的原因之一。我们利用荧光实时定量 RT-PCR 技术,对正常胚胎细胞 MAD2 基因 RNA 干扰前后 mRNA 表达水平进行比较分析,发现 MAD2 基因表达受到抑制后可引起 MAD2 基因 mRNA 表达水平和蛋白质表达水平显著降低,同时胚胎细胞染色体异常比率明显增加。RNA 干扰和荧光实时定量 RT-PCR 是近年来发展起来的新技术,前者对基因功能研究具有极高的特异性[6,7],后者是目前对 mRNA 表达水平精确定量的最佳方法之一。本研究将 RNA 干扰技术、定量 RT-PCR、Western blot、染色体数目异常分析等技术有机结合起来,对染色体分离相关蛋白的功能评价更加准确、客观,为深入开展染色体分离机制研究建立了新的研究手段和良好的实验评价体系。

MAD2 在染色体分离过程中的作用机制目前尚不完全清楚。Johnson 等[8]认为 MAD2 结合到着丝点上需要 MAD1,MAD1 的羧基端与 MAD2 结合,氨基端与着丝点结合。一个含有 MAD2 结合位点但缺乏氨基端结构域的 MAD1 突变体使 MAD2 无法与着丝点正常连接,其关卡机制不能正常运行。Schaar 等[9]研究发现,MAD2 与着丝点附着还将依赖 CENPs(Centromere Protien)蛋白家族中的 CENP-E,它们使用 CENP-E 的抗体注射入哺乳动物细胞使其灭活或对蟾蜍卵细胞提取液采用免疫消减的方法去掉 CENP-E 后,细胞中 MAD2 不能与着丝点结合,细胞不能形成正确的着丝点与微管的连接。

MAD2 是保证染色体向两极移动的重要的物质基础。MAD2 基因表达量不足,可能导致部分染色体分离迟滞,严重不足或缺乏可能导致染色体数目的严重紊乱,乃至细胞分裂减缓或停止[10],但 MAD2 作用的分子机制尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Rieder C L, Cole R W, Khodjakov A, *et al*. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores[J]. J Cell Biol, 1995, 130(4): 941 - 948.

[2] DeAntoni A, Sala V, Musacchio A. Explaining the oligomerization properties of the spindle assembly checkpoint protein Mad2[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1455): 637 - 648.

[3] Kops G J, Foltz DR, Cleveland D W. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(23): 8699 - 8704.

[4] Homer H A, McDougall A, Levasseur M, *et al*. Restaging the spindle assembly checkpoint in female mammalian meiosis I[J]. Cell Cycle, 2005, 4(5): 650 - 653.

[5] Steuerwald N, Cohen J, Herrera R J, *et al*. Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes [J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(1): 49 - 55.

[6] Qin Z L, Zhao P, Zhang X L, *et al*. Silencing of SARS-CoV spike gene by small interfering RNA in HEK 293T cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(4): 1186 - 1193.

[7] Machuy N, Thiede B, Rajalingam K, *et al*. A global approach combining proteome analysis and phenotypic screening with RNA interference yields novel apoptosis regulators[J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4 (1): 44 - 55.

[8] Johnson V L, Scott M I, Holt S V, *et al*. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 8): 1577 - 1589.

[9] Schaar B T, Chan G K, Maddox P, *et al*. CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment[J]. J Cell Biol, 1997, 139(6): 1373 - 1382.

[10] Meraldi P, Draviam V M, Sorger P K. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression[J]. Dev Cell, 2004, 7(1): 45 - 60.

(编辑　陈聪连)