论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1178-03

BC023882基因克隆及其对细胞周期的影响

秦茂林[1],蔡文琴[2],刘运来[1],刘建军[2] (第三军医大学基础医学部:[1]组织学与胚胎学教研室,[2]神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 获得基因BC023882全长真核表达载体及检测该基因对培养细胞生长的影响。**方法** 利用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)扩增基因BC023882的编码区序列,克隆到pcDNA3.1(-)/Myc-His(+)/lac Z真核表达载体中,构建基因BC023882的真核表达载体;脂质体法转染小鼠胚胎成纤维细胞和COS-7细胞,并且通过细胞生长曲线测定和流式细胞仪观察该基因对细胞生长的影响。**结果** 酶切并测序鉴定证明获得的重组子符合基因BC023882的编码序列;转染该基因后细胞增殖减慢,细胞增殖指数减低。**结论** 成功构建了基因BC023882的真核表达载体,并且观察到该基因对细胞生长起到一定的抑制作用。

关键词:基因;克隆;细胞;Golgins相关蛋白家族

中图法分类号:R329.28;R394-33;R394.2 **文献标识码**:A

Cloning of mouse gene BC023882 and its effect on cell cycle

QIN Mao-lin[1], CAI Wen-qin[2], LIU Yun-lai[1], LIU Jian-jun[2] ([1]Department of Histology and Embryology, [2]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To obtain eukaryotic expression vectors containing coding region of the gene BC203882 and detect its effect on cell growth. **Methods** The coding region of the gene BC023882 was amplified by RT-PCR, then cloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(-)/Myc-His(+)/lacZ. The recombinant plasmid was transfected into embryonic fibroblast of mouse and COS-7 cells with liposome method. Its effects on cell proliferation were examined by FACS and growth curves. **Results** The eukaryotic expression vectors containing coding region of the gene BC203882 were constructed. The growth of the transfected cells was retarded, and the proliferation index of cells was significantly decreased. **Conclusion** The eukaryotic expression vectors of the gene BC023882 were constructed successfully and the inhibitory effect of the gene on cell growth was observed.

Key words: gene; clone; cell; Golgins-related family

基因BC023882是美国国立卫生研究院发起的哺乳动物基因收集计划[1](mammalian gene collection program,MGC)中发现的15 000个基因序列之一,编号MGC36997(GenBank登录号BC023882)。该基因位于小鼠5号染色体,cDNA全长1 980 bp。基因BC023882假想蛋白序列也含有卷曲螺旋样结构域(coiled-coil domain),类似golgins蛋白,因此分类为golgin相关蛋白基因家族。在过去的研究中我们利用高密度基因芯片筛选中枢神经系统发育相关的重要基因[2],其中基因BC023882属于中枢神经系统发育相关的过度表达基因(Ratio值>7),提示该基因可能在神经系统发育中起关键作用。

本实验拟采用RT-PCR方法扩增基因BC023882含完整开放阅读框的编码序列,克隆该基因序列到pcDNA3.1(-)/Myc-His(+)/lac Z真核表达载体;并且利用体外培养细胞,转染含BC023882基因编码序列的质粒,通过观察对该基因对细胞生长的影响,以期了解对基因BC023882的功能做初步了解。

1 材料与方法

1.1 实验动物及取材

胚鼠以观察到阴栓出现,记为胚胎1 d(embryo,E1d),出生后当日为生后1 d(postnatal,P1d)。取E19d,P1d昆明小鼠,每组5只,雌雄不拘,由本校实验动物中心提供。颈椎脱出法处死母鼠,取E19d鼠胚,去头、胸腹腔脏器及四肢后,余下皮肤用作胚胎成纤维细胞分离。P1d昆明小鼠,去头,小心拨开脑膜,取脑组织用作总RNA提取。

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z068)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA(01Z068)

作者简介:秦茂林(1974-),男,河南省洛阳市人,博士研究生,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)687522231

通讯作者:蔡文琴,电话:(023)68753460

收稿日期:2006-01-10;**修回日期**:2006-03-01

1.2　胚胎成纤维细胞的纯化培养及 COS-7 细胞的维持

所取皮肤经胰酶消化，常规培养传代纯化至第 2 代，该代胚胎成纤维细胞（embryonic fibroblast cell，EFC）备用基因转染。COS-7 细胞由临床微生物学教研室曾伟昆博士提供，按照常规方法复苏后用上述体系培养，备用基因转染。

1.3　总 RNA 的提取

采用 Tripure 裂解法（Roche 公司）提取组织总 RNA，按照说明书进行操作。全部 5 个样本的总 RNA 混合后，紫外分光光度计测定 $D(260)/D(280)$，换算 RNA 浓度，－80 ℃冰箱保存备用。

1.4　RT-PCR 扩增基因 BC023882 的读框序列

根据 GenBank 公布 BC023882 基因的 cDNA 序列，设计 2 对 PCR 引物，外侧引物 P1：5′-GCTGGCAGAGAGCAGTGACT-3′（2～21 bp），外侧引物 P2：5′-GAACTCTTCAGTCTTTTCTACAACATCT-3′（1 921～1 948 bp），内侧引物 P3：5′-TCGAATTCGATGAGTTGTGGAAATG-3′（165～181 bp），内侧引物 P4：5′-GCAAGCTTTTATCTTTCCACTTGATG-3′（1 861～1 878 bp），下划线分别为 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切位点。小鼠 P1d 脑组织总 RNA 为模板，利用外测引物进行第 1 轮 PCR 反应，普通 *Taq* 酶，94 ℃变性 3 min，30 个循环（94 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min），72 ℃延伸 5 min；第 1 轮 PCR 产物适当稀释后作为模板，内侧引物，高保真 *Taq* 酶，进行第 2 次 PCR，反应程序为，94 ℃ 1 min，58 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，共 35 个循环，最后 72 ℃延伸 5 min。扩增产物经 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ（新英格兰公司）双酶切，消化产物回收后装入 pMD18-T 载体（TaKaRa 公司），电泳初步鉴定、送公司测序。

1.5　基因 BC023882 真核表达载体的构建

pcDNA3.1(－)/Myc-His(＋)/lac Z 真核表达载体（分子遗传学教研室许雪青博士馈赠）和含目的片段的 T 载体同时分别用 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，电泳回收后经过连接、$DH_{5\alpha}$ 细菌转化、阳性重组子的筛选和鉴定，均按分子克隆实验指南[3]进行。重组的真核表达载体命名为 pcDNA3.1(－)-BC023882。

1.6　细胞转染

备用 EFC 细胞和 COS-7 细胞，采用上述培养体系，约 70% 长满，0.125% 胰酶消化后离心收集，调整细胞浓度 1×10^5/ml，种植于 24 孔培养板中。小量抽提的 pcDNA3.1(－)-BC023882 质粒纯化后调整浓度为 1 μg/μl。采用 Invitrogen 公司的 Lipofectamine™2000 试剂盒转染培养细胞，pcDNA3.1(－)/Myc-His(＋)/lac Z 载体为转染对照，详细操作按照说明书进行，G418（400 μg/ml）筛选 14 d，所得细胞命名为 COS-7-BC023882$^+$ 细胞和 EFC-BC023882$^+$ 细胞。所用分子生物学试剂未经说明均为 Promega 公司产品。

1.7　细胞生长曲线的绘制

分别将 EFC 细胞、COS-7 细胞、EMC-BC023882$^+$ 细胞和 COS-7-BC023882$^+$ 细胞按照 2.5×10^3/孔接种于 24 孔板，每 24 小时计数 1 次，取 5 孔平均值，共 5 d。根据细胞计数绘制生长曲线，具体方法参见文献[4]。

1.8　细胞周期的检测

将培养的 EFC 细胞、COS-7 细胞、EFC-BC023882$^+$ 细胞和 COS-7-BC023882$^+$ 细胞消化后加入 RNA 酶 200 U/ml，37 ℃处理 30 min，PBS 洗后重悬，调整细胞密度为 1×10^5/ml，碘化丙啶（propidium，PI）染色后用采用流式细胞仪检测，每组 3 个样本。

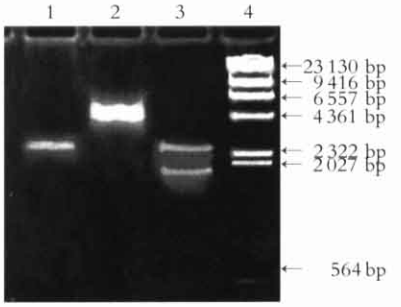
1.9　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　基因 BC023882 编码区扩增及鉴定

以 P1d 脑组织提取总 RNA 为模板，逆转录后进行巢式 PCR。两轮 PCR 扩增，得到未含非特异条带大小约为 1.7 kb 的 PCR 产物，符合预计分子量，经 *Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切，和 pMD18-T 载体连接，得到 BC023882-pMD18T 载体，双酶切后，琼脂糖电泳观察到释放出大小 1.7 kb 和 2.7 kb 大小的条带（图 1），送公司测序，结果符合目的片段。

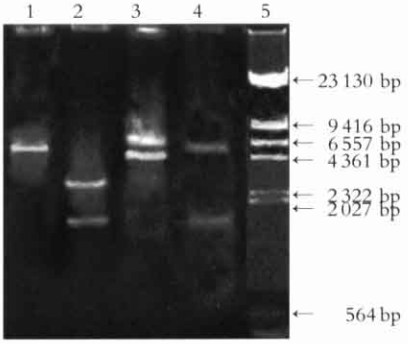


1：pMD18 -T 载体；2：BC023882-pMD18-T 载体；3：重组质粒酶切（*Eco*R Ⅰ＋*Hind* Ⅲ）；4：标准

图 1　BC023882-pMD18-T 载体的酶切鉴定

2.2　基因 BC023882 真核表达载体的构建

BC023882-pMD18-T 和 pcDNA3.1(－)/Myc-His(＋)/lac Z真核表达载体同时双酶切，电泳后回收目的片段，经连接、重组子 pcDNA3.1(－)-BC023882 转化、小量提取质粒后酶切鉴定，琼脂糖电泳观察到释放出大小 1.7 kb 的目的片段和 5.4 kb大小的载体条带（图 2）。



1：pcDNA3.1(－)/Myc-His(＋)/lac Z 质粒酶切（*Eco*R Ⅰ＋*Hind* Ⅲ）；2：BC023882-pMD18-T 载体酶切（*Eco*R Ⅰ＋*Hind* Ⅲ）；3：重组质粒；4：重组质粒酶切 *Eco*R Ⅰ＋*Hind* Ⅲ；5：标准

图 2　pcDNA3.1(－)-BC023882 质粒的酶切鉴定

2.3 转染基因 BC023882 对细胞生长的影响

通过绘制细胞生长曲线，我们观察到 EFC-BC023882$^+$细胞和 COS-7-BC023882$^+$较转染前的 EFC 细胞和 COS-7 细胞形态无明显变化，增殖速度有所减慢，EFC-BC023882$^+$细胞生长明显减慢（图3）。

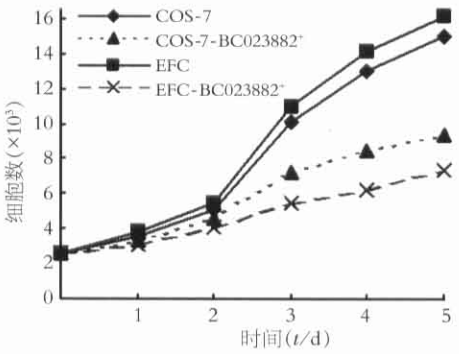


图3 转染基因 BC023882 对细胞生长曲线的影响

流式细胞仪对 EFC 细胞、COS-7 细胞、EFC-BC023882$^+$细胞和 COS7-BC023882$^+$细胞周期测定结果见表1。和对照组比较，转染基因 BC023882 对 EFC 细胞和 COS-7 细胞具有相似的影响，即 G_0+G_1期细胞增多，S 期和 G_2+M 期细胞减少，细胞增殖受到抑制。

表1 转染基因 BC023882 对细胞周期的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

细胞	G_0+G_1	S	G_2+M
EFC 细胞	73.24±3.56	8.53±2.05	20.17±1.33
EFC-BC023882$^+$细胞	90.25±3.07[a]	4.24±1.48[a]	4.58±0.72[a]
COS-7 细胞	58.12±3.27	22.67±4.62	19.39±0.88
COS-7-BC023882$^+$细胞	64.63±2.98[b]	17.24±5.57[b]	14.24±3.56[b]

a：$P<0.05$，与 EFC 细胞比较；b：$P<0.05$，与 COS-7 细胞比较

3 讨论

golgins 蛋白家族最利用免疫沉淀方法从自身免疫性疾病患者分离的一类定位于高尔基体，且具有不同分子量的蛋白质[5]。golgins 蛋白家族具有强大而且复杂的生物学功能，包括维持细胞骨架稳定和高尔基体囊泡的堆叠结构 、参与高尔基体基质代谢、并且能够调节细胞有丝分裂[6-8]。由于基因 BC023882 假想蛋白的结构和 golgins 蛋白有高度同源性，因此我们克隆并且构建了该基因真核表达载体 pcDNA3.1(-)-BC023882，采用脂质体法转染 EFC 和 COS-7 细胞，拟观察转染该基因对实验组细胞有丝分裂的影响。

EFC 细胞主要来源于胚胎时期的皮肤，是一种具有较强增殖活性的发育早期细胞，培养纯化方法简单，细胞生物学性状稳定，可以作为研究细胞早期发育的模型[9]；而 COS-7 细胞是一种常用作瞬时转染的工具细胞，用于比较基因 BC023882 转染 EFC 细胞的实验结果。通过细胞生长曲线绘制和细胞周期测定，我们观察到转染 BC023882 基因后2种细胞均呈现 G_0+G_1 期细胞增多，S 期和 G_2+M 期细胞减少，且细胞生长受到抑制的现象。其中 EFC 细胞生长速度更明显地被抑制；提示可能发育初期的细胞更容易受到 BC023882 基因的影响，使细胞滞留在有丝分裂前期，产生该现象的确切机制需进一步实验证明。基因 BC023882 的 mRNA 在小鼠发育早期的神经系统存在一过性的高表达，如何解释该基因的高表达和抑制细胞分裂之间的关系呢？众所周知，影响神经系统发育的基因通过多种模式调控着早期神经细胞的生长，因此，我们推测基因 BC023882 也可能参与执行了某种负调控作用，正是通过抑制某些区域的神经细胞生长，维持了神经系统的正常发育。

通过上述实验，我们证实基因 BC023882 转染 EFC 和 COS-7 细胞后，导致细胞生长受到一定程度抑制，推测基因 BC023882 可能参与调节细胞有丝分裂，进而影响细胞周期的改变。

参考文献：

[1] STRAUSBERG R L, FEINGOLD E A, GROUSE L H, *et al*. Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(26): 16899-16903.

[2] 刘运来，黄明辉，姚忠祥，等. 应用高密度基因芯片筛选中枢神经系统发育和损伤相关基因的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(24)：2218-2222.

[3] 萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁，黎孟枫，译. 第2版. 北京：科学出版社，1999：134-680.

[4] 张宇梅，隋延仿，李增山. B7.1 基因的表达对肝癌细胞生物学特性的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2000，16(3)：268-270.

[5] FRITZLER M J, HAMEL J C, OCHS R L, *et al*. Molecular characterization of two human autoantigens: unique cDNAs encoding 95- and 160-kD proteins of a putative family in the Golgi complex[J]. J Exp Med, 1993, 178(1): 49-62.

[6] SHORTER J, WATSON R, GIANNAKOU M E, *et al*. GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system[J]. EMBO J, 1999, 18(18): 4949-4960.

[7] PANIC B, PERISIC O, VEPRINTSEV D B, *et al*. Structural basis for Arl1-dependent targeting of homodimeric GRIP domains to the Golgi apparatus[J]. Mol Cell, 2003, 12(4): 863-874.

[8] LANE J D, LUCOCQ J, PRYDE J, *et al*. Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis[J]. J Cell Biol, 2002, 156(3): 495-509.

[9] BROWN J, GREAVES M F, MOLGAARD H V. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts[J]. Int Immunol, 1991, 3(2): 175-184.

（编辑 陈聪连）