文章编号:1000-5404(2010)15-1625-03

论著

增强型绿色荧光蛋白与 Rb94 基因共表达载体的构建和表达

郑敏明,周希瑗,王丽萍 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院眼科,眼科学重庆市市级重点实验室)

【摘要】 目的 构建增强型绿色荧光蛋白与 Rb94 基因的真核共表达载体并鉴定其在真核细胞中的表达。方法 用 PCR 技术对 cDNA-Rb 质粒中的目的基因片段进行扩增,使用 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ进行双酶切,切胶回收 DNA 片段。将其连接入 pEGFP-C1,构建 pEGFP-C1/Rb94 真核表达载体并再进行酶切鉴定。将重组质粒用脂质体转染法转染至人视网膜母细胞瘤细胞(HXO-Rb44)中,荧光显微镜下观察 EGFP 在细胞内的表达,Western blot 检测 Rb 蛋白的表达情况,流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果 重组克隆载体内的目的片段序列与 Rb94 基因序列完全一致。pEGFP-C1/Rb94 酶切鉴定结果与预期结果一致。荧光显微镜下观察可见转染后的细胞有荧光出现。Western blot 检测结果表明 Rb94 基因得到了有效表达。流式细胞仪检测结果显示,含 Rb94 基因的细胞凋亡率为(21.17 ± 0.45)%,明显高于其他组($P < 0.05$)。结论 成功构建 EGFP 和 Rb94 真核共表达载体,并可在真核细胞中有效表达,Rb94 对视网膜母细胞瘤细胞有明显抑制生长作用。

【关键词】 Rb94 基因;真核表达载体;人视网膜母细胞瘤细胞
【中图法分类号】 R394-33;R394.3;R739.72 【文献标志码】 A

Construction of enhanced green fluorescent protein and Rb94 co-expression vector and its expression

Zheng Minming, Zhou Xiyuan, Wang Liping (Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To construct the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and Rb94 co-expression vector and identify its expression in cultured eukaryocytes. **Methods** PCR was performed to amplify Rb94 gene fragments from cDNA-Rb plasmids. Rb94 gene fragments, digested with *Bam*H Ⅰ and *Sal* Ⅰ, were harvested and inserted into pEGFP-C1 to construct the pEGFP-C1/Rb94 expression vector. Recombinant plasmid pEGFP-C1/Rb94 was transfected into human retinoblastoma (HXO-Rb44) cells with liposome. Its expression was observed under a fluorescence microscope. Expression of Rb protein was detected by Western blotting. Apoptotic rate of HXO-Rb44 cells was detected by flow cytometry. **Results** The sequence of cloned DNA fragments was fully consistent with that of the Rb94 gene. The Rb94 gene was inserted into the eukaryotic expression vector, pEGFP-C1. The recombinant expression plasmid was successfully transfected into HXO-Rb44 cells. Fluorescent microscopy showed that fluorescence occurred in HXO-Rb44 cells. Western blotting demonstrated the expression of Rb protein. Flow cytometry revealed that the apoptotic rate of HXO-Rb44 cells containing the Rb94 gene was significantly higher than that of other cells. **Conclusion** A recombinant eukaryotic co-expression vector of EGFP and Rb94 can be successfully constructed, which is effectively expressed in HXO-Rb44 cells. The Rb94 gene can effectively inhibit the growth of HXO-Rb44 cells.

【**Key words**】 Rb94 gene; eukaryotic expression vector; human retinoblastoma cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872826). Corresponding author: Zhou Xiyuan, E-mail: zhouxiyuan2002@yahoo.com.cn

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma,Rb)基因是一种重要的抑癌基因,与视网膜母细胞瘤形成关系最为密切的基因,定位于人 13 号染色体的长臂 1 区 4 带(13q14)。当 Rb 基因发生缺失或突变,细胞增殖活跃,导致肿瘤的发生。Rb94 基因是 Rb 基因的一部分(野生型全长 pRb110 的 NH2 末端缺失 112 个氨基酸残基)。最近有一些研究发现在头颈部癌[1]、膀胱癌[2]、前列腺癌[3]细胞系及体内肿瘤中 Rb94 具有比 Rb 更强的肿瘤抑制效应。国外近几年才开始 Rb94 基因的抑癌研究,为了能有效表达目的基因并利于转基因细胞的筛选,我们选择了 pEGFP-C1 为真核表达

【基金项目】 国家自然科学基金(30872826)
【通信作者】 周希瑗,E-mail:zhouxiyuan2002@yahoo.com.cn

载体,作为构建 EGFP 与 Rb94 基因的共表达载体。并观察其在人视网膜母细胞瘤细胞(HXO-Rb44)内表达情况,为视网膜母细胞瘤的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

cDNA-Rb 质粒由重庆医科大学检验系罗进勇博士惠赠,含 EGFP 的真核表达质粒 pEGFP-C1(Invitrogen 公司)、HXO-Rb44 细胞株(湖南医科大学)、感受态细菌 DH5α 为本实验室保存。*Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅱ等限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、KOD-Plus 酶、10×Buffer H、标准Ⅲ、DNA 标准(DL 15000)(天根公司)。阳离子脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)。Rb 单克隆抗体购自 Abcam 公司。

1.2 引物设计、合成及 PCR 扩增、质粒构建

上海生工生物技术公司合成引物用于扩增全长 Rb94 基因的编码序列。正向引物 P1:5′-ATGTCGTTCACTTTTACTGAGC-TACA-3′及反向引物 P2:5′-TCATTTCTCTTCCTTGTTTGAGGTA-3′。Rb94 基因的全长为 2 774 bp。将合成的引物 P1 和 P2 用 KOD-Plus 酶对 cDNA-Rb 质粒中的目的基因进行扩增。94 ℃预变性 5 min,然后进入循环 94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 120 s,共循环 35 次最后 72 ℃ 10 min。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。将阳性克隆质粒使用 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ进行双酶切,切胶回收 DNA 片段(Insert DNA);将 pGEFP-C1 质粒转化扩增提取质粒 DNA 后,使用 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ进行双酶切,切胶回收载体部分 DNA 片段(Vector DNA)。将 2 μl pEGFP-C1、6 μl Rb94、1 μl T_4 DNA Ligase、1 μl 10×Buffer 在 16 ℃连接过夜,再转化入感受态细菌 DH5α,涂片平板过夜培养菌体。从转化平板上挑选单菌落提取质粒 DNA 后,用 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ进行酶切鉴定并进行测序。

1.3 脂质体介导 Rb94 转染人视网膜母细胞瘤细胞

1.3.1 质粒转染 转染前 24 h 将人视网膜母细胞瘤细胞(Rb)以 1×10^5/孔接种到 24 孔板上,培养液为含双抗及 10% 胎牛血清的 1640 培养基。待细胞生长 70% ~80% 时,按照转染试剂盒说明书,加入适量重组质粒进行转染,以空质粒 pEGFP-C1 和未转染的细胞作为空白对照。

1.3.2 转染细胞中 EGFP 和 Rb94 蛋白表达的检测 转染后 48 h,在暗室中使用荧光显微镜观察细胞中增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达情况。收集各组细胞,使用细胞及组织总蛋白抽提试剂盒,按说明书进行操作:洗涤沉淀的细胞,弃去上清液;加入预冷的蛋白质抽提试剂(10^7个细胞中加入 1 ml 抽提试剂,内含 5 μl 蛋白酶抑制剂,5 μl PMSF 和 5 μl 磷酸酶抑制剂);裂解离心后弃去沉淀,上清液立即转移入新的离心管中,-80 ℃冰箱保存用于 Western blot 检测。在蛋白提取上清液中加入等体积的 SDS 上样缓冲液,行 SDS-PAGE 后电转硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封存,与兔抗人 Rb 单克隆抗体和酶标二抗反应后,ECL 化学发光试剂盒检测 Rb94 蛋白的表达。

1.3.3 流式细胞仪检测 HXO-Rb44 细胞凋亡率 检测 3 组细胞,按试剂盒说明书进行。

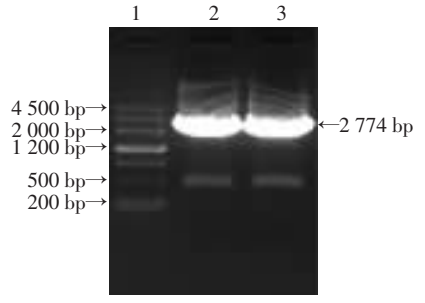
1.4 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件对各组细胞凋亡率进行 t 检验。

2 结果

2.1 Rb94 的 PCR 电泳结果

Rb94 基因的长度为 2 774 bp。用特异引物扩增所得的 Rb94 PCR 产物经电泳鉴定在 2 000 ~3 000 bp,与预期一致(图 1)。

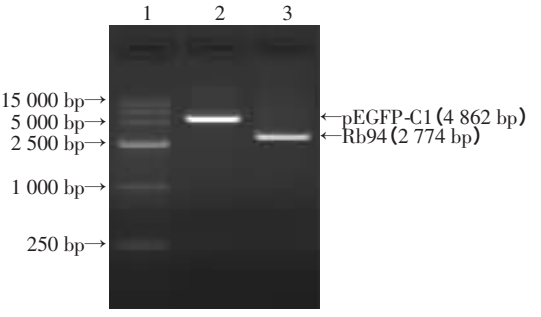


1:标准Ⅲ;2,3:Rb94 PCR 产物

图 1 Rb94 基因的 PCR 电泳结果

2.2 pEGFP-C1 与 Rb94 的酶切结果

从图 2 可以看到用 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ酶切后 pEGFP-C1 与 Rb94 得到了预期的酶切片段。

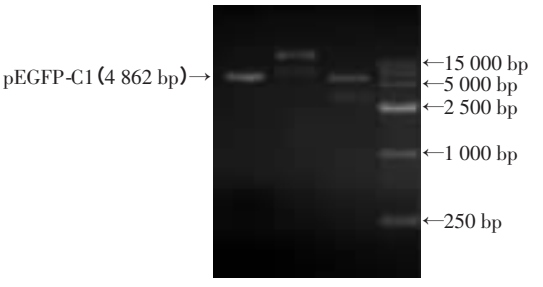


1:DNA 标准(DL 15000);2:pEGFP-C1 酶切产物;3:Rb94 酶切产物

图 2 pEGFP-C1 与 Rb94 酶切产物电泳结果

2.3 pEGFP-C1/Rb94 的 PCR 鉴定结果

经过一系列连接、转化、酶切反应过程,Rb94 基因的 DNA 片段被定向克隆入载体 pEGFP-C1 的两酶切位点之间(图 3)。



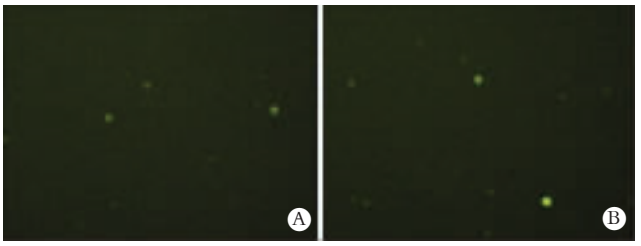
1:pEGFP-C1 空质粒;2:pEGFP-C1/Rb94 质粒;3:pEGFP-C1/Rb94 酶切产物;4:DNA 标准(DL 15000)

图 3 pEGFP-C1/Rb94 的 PCR 鉴定电泳结果

2.4 HXO-Rb44 细胞中 PEGFP 和 Rb94 蛋白的表达

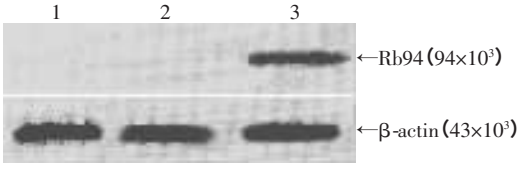
转染 pEGFP-C1 和 pEGFP-C1/Rb94 质粒 48 h 后,在荧光显微镜下 HXO-Rb44 细胞质中可观察到特异性的绿色荧光(图 4),但两组绿色荧光的强度无明显差异。这说明目的基因的表达对 EGFP 表达无明显影响。Western blot 检测结果显示

pEGFP-C1/Rb94 组在 94×10^3 处有单一条带，而空载体及空白对照组未出现（图 5）。说明导入的基因在蛋白水平得到表达。



A：pEGFP-C1 组；B：pEGFP-C1/Rb94 组

图 4　pEGFP 在 HXO-Rb44 中的表达　（荧光显微镜 ×200）



1：空白对照组；2：pEGFP-C1 组；3：pEGFP-C1/Rb94 组

图 5　Western blot 检测 HXO-Rb44 中 Rb94 蛋白的表达

2.5　HXO-Rb44 细胞的凋亡率

流式细胞仪检测显示，转染 pEGFP-C1/Rb94 质粒的细胞组具有较高的凋亡率（21.17 ± 0.45）%，而转染 pEGFP-C1 的细胞组（6.01 ± 0.21）% 与空白对照组的凋亡率（5.87 ± 0.32）% 较低（$P<0.05$），pEGFP-C1 组与空白对照组的差异不具有统计学意义（$P>0.05$）。

3　讨论

Rb 是婴幼儿常见的眼内恶性肿瘤，恶性程度高，对视功能损害大，甚至威胁生命，发病率逐渐升高。传统采用患眼眼球摘除术，但这种治疗未能提高患儿的 5 年生存率，且严重影响患者生存质量[4]。而局部保守治疗存在着应用的局限性和远期的副作用等缺陷[5]。对机体损伤极小的基因治疗已成为一种良好的选择[6]。肿瘤的发生往往与人体内基因的变异或表达异常密切相关，基因治疗的目的就在于从基因水平上对这些异常予以纠正[7]。基因治疗给 Rb 的治疗带来了新的希望。

Rb94 蛋白在 $Rb^{-/-}$ 肿瘤细胞中的半衰期为12 h，比 Rb110 长 3 倍，故 Rb94 比 Rb110 有更强的肿瘤抑制效应[8]。Rb 基因的主要功能是参与细胞周期调控，稳定染色体，促进细胞分化和控制细胞增殖等[9]。由于 Rb94 基因的缺失及突变广泛存在于多重肿瘤细胞中，因此 Rb94 基因已成为基因治疗的良好靶基因。

绿色荧光蛋白基因是目前唯一的能在细胞内表达且不需要其他外源底物参与的报告基因[10]。本实验采用的 pEGFP-C1 真核表达载体含有 EGFP 的编码序列，其荧光强度比普通 GFP 高约 35 倍[11]。pEGFP-C1 含有巨细胞病毒（CMV）即刻早期增强子/启动子，可使基因在哺乳动物细胞内持续、高效表达。含有 Neo R 和 Kan R 位点，能用于筛选重组菌落和转染细胞[12]。基于以上理论依据，本课题采用 pEGFP-C1 质粒作为载体，成功构建了 pEGFP-C1/Rb94 重组质粒，经测序鉴定后成功地用脂质体转染法转染入人视网膜母细胞瘤细胞株。转染 24 h 后观察到荧光的出现与蛋白水平的高效表达即证明真核表达载体已成功导入靶细胞并开始转录和表达。

本实验将含 Rb94 基因的质粒转染 HXO-Rb44 细胞，观察 Rb94 对视网膜母细胞瘤是否有抑制作用，并通过流式细胞仪检测了 HXO-Rb44 细胞的凋亡情况，发现脂质体介导 Rb94 基因转染对 HXO-Rb44 细胞造成的凋亡率高于其他两组，提示 Rb94 基因对视网膜母细胞瘤细胞具有较明显的抑制生长作用，可为视网膜母细胞瘤等疾病的基因治疗的相关研究奠定了很好的实验基础。

参考文献：

[1] Li D, Day K V, Yu S, *et al*. The role of adenovirus-mediated retinoblastoma 94 in the treatment of head and neck cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(16): 4637 - 4644.

[2] Zhang X, Multani A S, Zhou J H, *et al*. Adenoviral-mediated retinoblastoma 94 produces rapid telomere erosion, chromosomal crisis, and caspase-dependent apoptosis in bladder cancer and immortalized human urothelial cells but not in normal urothelial cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(4): 760 - 765.

[3] Roig J M, Molina M A, Cascante A, *et al*. Adenovirus-mediated retinoblastoma 94 gene transfer induces human pancreatic tumor regression in a mouse xenograft model[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(4): 1456 - 1462.

[4] 陈大年. 二十一世纪视网膜母细胞瘤研究：希望和挑战[J]. 中华眼底病杂志, 2007, 23(5): 310 - 313.

[5] 季迅达, 黄倩. 视网膜母细胞瘤基因治疗的研究进展[J]. 中华眼底病杂志, 2007, 23(5): 378 - 380.

[6] 宋爽, 张军军. 视网膜母细胞瘤的治疗进展[J]. 四川医学, 2004, 25(5): 597 - 598.

[7] 伊远学, 李宝金, 刘晓平, 等. T-bet 和 c-FLIP 双基因共表达质粒的构建及生物学活性检测[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2272 - 2275.

[8] Xu H J, Xu K, Zhou Y, *et al*. Enhanced tumor cell growth suppression by an N-terminal truncated retinoblastoma protein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(21): 9837 - 9841.

[9] 王芹, 李进, 赵艳芝, 等. 腺病毒介导人 Rb94 基因对食管癌细胞的生长作用观察[J]. 山东医药, 2008, 48(18): 9 - 10.

[10] 谢娜, 王晓燕, 张琼, 等. 乙型肝炎病毒启动子调控的增强型绿色荧光蛋白真核表达载体的构建与表达[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(4): 268 - 271.

[11] Heim R, Tsien R Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer[J]. Curr Biol, 1996, 6(2): 178 - 182.

[12] 邹冰, 涂水平, 谭继宏, 等. pEGFP-C1-反义生存素重组质粒的构建和转染[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(12): 711 - 714.

（收稿 2010-02-23 修回 2010-04-05）
（编辑　王小宴）