技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1831-05

TK6 人类淋巴母细胞 TK 突变体生长慢相关基因分离和鉴定

张 勇,赵 勇,练雪梅,李继斌,王应雄
(重庆医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:分离 TK6 人类淋巴母细胞慢生长突变体中与慢生长表型相关的基因并进行初步功能鉴定。方法:根据目标基因与胸苷激酶(Thymicline kinase,TK)基因连锁的特性,采用人类全基因组表达芯片检测全基因的表达情况,由此确定慢生长相关基因的位置和表达性质,以缩小筛选范围,最后通过基因功能检索,确定目标基因,并通过 RT-PCR 对目标基因进行初步验证。结果:慢生长细胞整体表达水平下调,但少数染色体尤其以 17 号染色体局部区域呈高表达状态。而在 TK 位点到端粒这一区域,TK 以及毗邻的染色盒同源物(Chromobox homoloy,CBX2),CBX4,CBX8 均呈高表达状态,功能检索发现 CBX 与转录抑制有关,功能验证实验中 CBX4 表达水平与细胞倍增时间呈正向相关。结论:TK6 慢生长表型与 17 号染色体 q 臂近端粒位置的 CBX 基因相关,但仍需更多证据确认 CBX 是慢生长表现最直接相关的基因。

【关键词】人类淋巴母细胞;慢生长;染色盒同源物
【中国图书分类法分类号】Q253 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-14

Isolation and identification of the slow growth TK mutants related genes of TK6 human lymphoblastoid cells

ZHANG Yong, et al
(*Department of Nutrition of Food Hygiene, School of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To isolate and identify the genes related to slow growth mutants of human lymphoblastoid cell TK6. *Methods*: Human genome expression microarray was used to measure gene expression at different levels, thereby narrowing candidate gene locations and expression properties. Target genes were identified by retrieving candidate gene functions and verified by RT-PCR.

作者介绍:张 勇(1974-),男,讲师,博士,研究方向:营养与食品卫生。
通讯作者:王应雄,男,教授,E-mail:wyx61221@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市科委自然科学基金项目(编号:CSTC,2007 BB5286)。

确性两方面的基础上对多种特殊实验波形加以研究和判断,不断完善程序设计思路,才能减少漏判误判,达到实验结果信息利用的最大化和最优化。

参 考 文 献

[1] Goldman-Rakic P S.Cellular basis of working memory[J].Neuron,1995,14(3):477-485.
[2] Christian K M,Thompson R F.Naural substrates of eyeblink conditioning: Acquisition and retention[J]. Learn Mem,2003,10(5):427-455.
[3] McLaughlin J,Skaggs H,Powell D A. Medial prefrontal cortex and pavlovian conditioning: trace versus delay conditioning[J].Behav Neurosci,2002,116(1):37-47.
[4] Narawut P,Soyun K,Richard F T.The role of the cerebellar interpositus nucleus in short and long term memory for trace eyeblink conditioning[J]. Behav Neurosci,2009,123(1):54-61.
[5] 林 曦,胡 波,杨 丽,等.蝇蕈醇小脑齿状-中位核微注射对豚鼠经典眨眼条件反射建立的影响[J].第三军医大学学报,2008,30(6):499-502.
[6] Kaori T N,Shigenori K,Yutaka K.NMDA receptor-dependent processes in the medial prefrontal cortex are important for acquisition and the early stage of consolidation during trace,but not delay eyeblink conditioning[J].Learn Mem,2005,12:606-614.
[7] Derick H, Lind Q,Richard W V,et al.Associative and non-associative blinking in classically conditioned adult rats[J]. Physio Behav,2009,96(3):399-411.
[8] Weiss C,Disterhoft J F. Evoking blinks with natural stimulation and detecting them with a noninvasive optical device:A simple,inexpensive method for use with freely moving animals[J].J Neurosci Method,2008,173(1):108-113.
[9] Glocker F X,Laukb M,Lückinga F,et al. Classical conditioning of the electrically elicited blink response in humans:a new method of data analysis[J].J Neurosci *Method*,1999,89(2):133-140.
[10] Taekwan L,KIM Jeansok J.Differential effects of cerebellar,amygdalar,and hippocampal lesions on classical eyeblink conditioning in rats[J].J Neurosci,2004,24(13):3242-3250.
[11] Weible A P,Oh M M, Lee G,et al.Galantamine facilitates acquisition of hippocampus-dependent trace eyeblink conditioning in aged rabbits[J].Learn Mem,2004,11(1):108-115.
[12] Morgane P J,Galler J R,Mokler D J.A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain[J]. Prog Neurobiol,2005,75(2):143-160.
[13] Halverson H E,Freeman J H.Medial auditory thalamic nuclei are necessary for eyeblink conditioning[J].Behavi Neurosci,2006,120(4):880-887.
[14] Weible A P,Weiss C,Disterhoft J F.Connections of the caudal anterior cingulate cortex in rabbit: naural circuitry participating in the acquisition of trace eyeblink conditioning[J]. Neuroscience,2007,145(45):288-302.

(责任编辑:冉明会)

Results: The overall expression level of slow growth mutant was down regulated, but with several chromosomal expressions up regulated. In the region of TK to telomere, TK gene and adjacent CBX2, CBX4, CBX8 were overexpressed; functional retrieving found that CBXs were inhibitors of transcription; CBXs functional verification experiment showed that CBX4 expression was positively associated with cell's doubling time. *Conclusion*: The target genes related to slow growth mutant are CBXs located on chromosome 17 q arm near the telomere, but still more evidence is needed to confirm that CBXs are the most directly related genes to slow growth mutant.

【Key words】TK6; Slow growth mutant; CBX

TK6 人类淋巴母细胞(Lyphomblast)是胸苷激酶(Thymidine kinase, TK)基因的杂合体(tk^+/tk^-),广泛用于致突变物质的检测。致突变物如果导致 tk^+ 基因失活,则可以通过三氟胸苷(Trifuorothymidine, TFT)选择得到突变体。值得注意的是突变体有两种明显不同的生长表型,即正常生长(Normal growth TK mutant, NT)和慢生长表型(Slow growth TK mutant, ST)。正常生长表型的倍增时间与未突变细胞一致,为 16~18 h。慢生长表型的倍增时间明显增加,为 40 h 左右[1]。慢生长表型接种效率正常,与受试物的迟发毒性无关;与选择剂 TFT 无关,在常规培养基中仍呈慢生长状态;慢生长表型表型稳定,连续培养 40 代仍保留慢生长特,是可遗传的突变性状[1]。

目前对 TK6 细胞慢生长表型的研究主要在慢生长表型在遗传毒性检测中的意义,遗传物质损伤和修复机制等[2]。关于 ST 的成因,一致看法是 tk^+ 损伤时殃及毗邻的某一与细胞生长相关基因所致,但是迄今为止,国内外均未见慢生长相关基因分离的报道。

细胞生长和增殖是一个复杂的生命过程,tk 突变体正常和慢生长两种表型为研究细胞生长调控相关机制提供有价值线索和便利条件。同时,基因芯片技术为这一复杂过程中基因表达谱的分析提供了有效的手段。本文通过对 tk 突变体不同生长速度的细胞基因的表达谱的差异进行初步分析,明确 ST、NT 在不同水平的表达强度差别,进而明确目标基因的在表达水平上的性质和范围, 分离出慢生长相关基因,并为后续该生长相关基因功能和作用通路研究提供必要基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

TK6 细胞由日本国立卫生研究所提供。37℃,5% CO_2,10% 马血清(Hyclone)的 RPMI1640(Hyclone)培养液为常规培养条件。tk 突变体选择方法参见文献[3]。细胞经甲磺酸甲酯[(Methyl methanesulfonate, MMS)Sigma 公司]处理 4 h 后表达培养 3 d,加选择剂 TFT,终浓度为 3 μg/ml,接种于 96 孔板。培养 12 d,采集正常生长突变集落,再向 96 孔板追加含 TFT 的培养基;继续培养 8 d,采集慢生长突变集落。共获得 10 个 NT 和 10 个ST。

1.2 RNA 制备

每个突变集落取 1×10^6 个细胞,混合制备成正常生长的细胞和慢生长细胞,用 Trizol(Invitrogen)法提取总 RNA,紫外吸收测定法和变性琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 纯度和完整度。

1.3 基因表达芯片检测

基因芯片选用 Phalanx human onearray,其中 α RNA 合成,标记,基因芯片杂交,数据处理以及相应的质量控制均按照 Phalanx human onearray 产品说明手册进行,以上工作在上海康城生物技术服务公司完成。

1.4 RT-PCR 验证芯片的结果。

对总 RNA 进行逆转录[RT reagent Kit (TAKARA)],条件为 37℃15 min,85℃ 5 s。所得终产物 cDNA 稀释至 10 倍。定量 PCR 使用 SYBR Premix Ex Taq(TAKARA)试剂盒,反应体系为 25 μl,引物序列见表 1,每个反应 3 个重复。反应在荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD, iCycler iQ)完成,反应程序依次为 95℃3 min 1 次;95℃10 s,55℃ 30 s 40 次;72℃3 min 30 s,95℃1 min,55℃1 min 1 次;55℃10 s,每 10 s 递增 0.5℃,直到 95℃结束。定量的结果用 CT(Cycle threshold)法进行处理,每一个基因的 CT 值用 GAPDH 的 CT 值进行标准化,计算 ΔCT 值,ΔCT 等于 $CT_{目标基因} - CT_{GAPDH}$,再以处理对照组为参考计算 ΔΔCT 值,ΔΔCT 等于 $\Delta\Delta CT_{处理} - \Delta\Delta CT_{对照}$[4],目标基因 mRNA 的表达水平相对于对照的改变均采用公式目标基因的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 对照基因的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

1.5 统计处理

本文中基因芯片结果表达差异分析采用配对 T 检验,RT-PCR 结果组间差别的比较采用 ANOVA 统计分析, 所采

表 1 引物列表

Gene 名称	顺式物引(5'-3')	原式物引(5'-3')
GAPDH	AACGTGTCAGTAGTGGACCTG	AGTGGGTGTCGCTGTFGAAGT
Tk	ATGAGCTGCATTAACCTGCC	CCTCAGTTGGCAGGGCTG
CBX2	GAGTACCTGGTCAAGTGGCG	GGACAGACTGTTGGCAGAAGTG
CBX4	CGCAAGGGCAGAGTGGAGT	GGAACGACGGGCAAAGGT
CBX8	GGTGCCCTAGATCCCAATG	CGTGACCACCACCTTCTCC

用的软件为 SPSS11.0，假设检验的显著性水平 α =0.05。

2 结 果

2.1 细胞总 RNA 抽提和质量控制

总 RNA 用紫外分光检测，NT 和 ST 的 RNA 浓度分别为 1.61 μg/μl 和 1.53 μg/μl，$A_{260/280}$ 达到 1.93，RNA 纯度较好；琼脂糖凝胶电泳显示，28 s rRNA 和 18 s rRNA 电泳条带清晰，

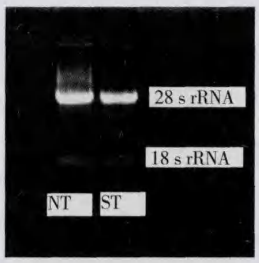


图 1 细胞 RNA 电泳图

亮度之比约 2:1，RNA 完整性良好(图 1)。

2.2 全基因组表达情况分析

Phalanx human onearray 基因芯片上共有 32 050 个基因探针。剔除芯片结果中各参考点样点和无效数据点，NT 细胞基因芯片中全部检测点荧光强度合计为 26 655 435，ST 的荧光强度合计为 25 988 945，ST 和 NT 荧光强度占两者合计荧光强度的 49%和 51%，ST 基因表达总体上低于 NT(t=2.207，P=0.024)，表达强度相差 2%，ST 的表达在细胞水平上整体被抑制。

在全部所检测的基因中，ST 相对于 NT 高表达的基因约 10 214 个，占全部基因数的 41.2%，可以认为 ST 细胞 40%的基因的高表达导致超过半数的基因低表达，使 ST 表达的整体水平低于 NT。反过来，我们也可以这样认为，对于 NT 细胞而言，41.2%的基因低表达，使得另外超过半数的基因表达增加，使得 NT 的整体表达水平高于 ST。

这初步说明，ST 细胞的慢生长状态，或者生长抑制状态，或者细胞水平转录降低可能由于部分基因高度表达抑制了其它多数基因的表达。

2.3 ST 和 NT 细胞中各染色体表达水平的比较

根据基因的在染色体上的定位，统计芯片结果中 NT、ST 各染色体上基因检测的荧光总强度，并计算不同表达水平基因的数量和比例。结果发现，第 1、6、7、11、15、16、17、y 染色体表达明显高于 NT 中各对应的染色体，属于高表达染色体(见图 2)，这种现象与 ST 整体上低表达相矛盾。如果把染色体看成一个基因的综合体，可以认为上述 8 个基因综合体高表达，导致了另外 38 个基因综合体(染色体)的整体上低表达。

NT 和 ST 都是通过选择培养得到的 17 号染色体上 TK 基因发生突变的细胞，因此慢生长表型与 TK 突变表型连锁，慢生长相关基因必然位于 17 号染色体。而对于 17 号染色体，ST 高表达基因比例(39.43%)较 NT(60.57%)低，但总体表达水平高于 NT，只能说明 ST 中 17 号染色体中的高表达基因的表达水平较 NT 升高明显。这些表达明显改变的基因

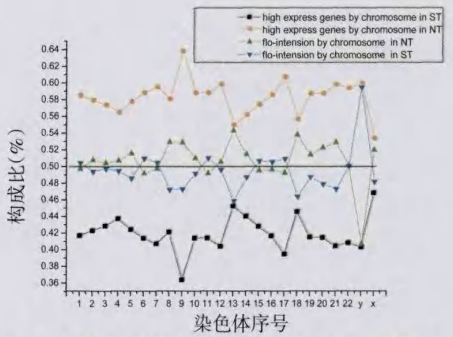


图 2 不同染色体基因表达水平和高表达基因的构成

与慢生长表型关系密切。另外，Y 染色体也存在类似的情况，且更加明显，值得关注。

2.4 17 号染色体 q 臂不同区段荧光强度的比较

根据 NCBI 的 gene map 中 17 号染色体 q 臂上基因的定位，把芯片结果中属于 17 号染色体 q 臂上的基因从近端到远端进行排序，并根据基因数目大致分为 4 个相等片段，统计各个区段基因荧光强度和不同表达水平的基因个数。结果显示，ST 细胞 17q 上高表达基因的比例大于 NT。对于大于 70 Mbp 染色体区段，ST 的表达强度超过 NT，高表达基因的比例进一步增加(见图 3)。

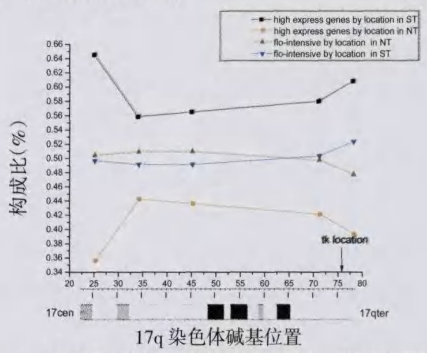


图 3 17q 臂上不同区段基因表达水平和高表达基因构成

TK 基因位于约 76 Mbp 的位置，NT 和 ST 又都是 TK 突变体。因此，该结果进一步证实 NT 和 ST 两种因 TK 突变而被选出，但 TK 基因突变对 TK 毗邻的基因影响并不一致，ST 突变体生长受到抑制可能与 TK 毗邻的其它基因高表达有关。

依据 tk 基因到端粒(17qter)段杂合性丢失的情况，通常认为 ST 生长受到抑制与 TK 基因位点到端粒(17qter)间某个与 TK 连锁的基因同时发生改变有关。因此，在下一步的慢生长相关基因定位中，我们将重点寻找该片段中高表达的基因。

2.4 TK-17qter 间高表达基因的功能检索和注释

根据前述结果和以往文献报道，我们认为 ST 突变体多是由于同源重组，TK 位点到端粒(17qter)间部分或者全部基因杂合性丢失，导致 tk^+ 基因丢失的同时，tk^- 基因拷贝加倍，也包括 TK 毗邻的部分有转录活性的基因拷贝数加倍。

为此，我们通过对 NCBI 中的 GENE BANK 相关文献链接对 tk 至 17qter 间的基因高表达的 25 个基因(不包括 TK)

表 2 ST 细胞 tk-17qter 区段上高表达基因功能注释

开始位置	结束位置	基因名称	芯片结果(ST /NT)	基因功能注释
76352859	76356158	PGS1	2.6	磷脂酰甘油磷酸合成酶
76967335	76976061	LGALS3BP	2.2	调节细胞间的相互作用
76987799	77005838	CANT1	1.3	钙依赖的核苷酸酶,UDP 为主
77020251	77045870	C1QTNF1	3.1	脂肪因子
77751993	77761379	FLJ21865	2.6	细胞质游离寡糖的加工
77768176	77770890	CBX2	2.1	调节多个基因转录,转录抑制
77806955	77813213	CBX8	2.0	调节多个基因转录,转录抑制
78152281	78182851	CBX4	5.7	调节多个基因转录,转录抑制
78194237	78227297	CARD14	4.0	间接促凋亡和炎症
78234667	78295263	SLC26A11	2.0	维持细胞稳态和电解质平衡
79163393	79196751	KIAA1618	2.0	激活核苷 3 磷酸化酶
79495417	79504156	AZI1	4.6	5- 氮杂胞苷诱导酶,细胞分化
79218799	79269096	MGC15523	3.4	膜载体
79218799	79269096	MGC15523*	1.9	膜载体
79849599	79858363	FSCN2	11.1	肌动蛋白(Actin)交联蛋白
79869815	79876040	HGS	1.4	肝生长因子调节的酪氨酸激酶底物
79876146	79885588	SLC25A10	1.3	维持细胞稳态和电解质平衡
79976579	79980773	ANAPC11	6.9	正/负性调控泛素配体活性
80009763	80015346	SIRT7	1.0	基因表观调控,抑制表达和核糖体 DNA 重组
80036214	80056106	MAFG	7.1	与特定序列绑定,调节转录
80186293	80197369	STRA13	1.2	与细胞转录因子有关
80202238	80231573	GPS1	2.2	抑制 G 蛋白和有丝分裂
80332201	80333370	FASN	1.2	脂肪代谢,可与 ER 结合
76170160	76183285	SLC16A3	2.0	可溶性载体
76170160	76183285	CSNK1D	2.1	酪蛋白激酶,DNA 复制和修复
76352859	76356158	UTS2R	3.8	血压调节,信号转导

*:重复现状数据。

功能进行了检索和注释,结果见表 2。

通过 tk 至 17qter 片段上高表达基因功能的检索，加上与 TK 位置远近(与连锁强度有关,越近的基因连锁强度越高)的关系,我们推测染色盒同源物(Chromobox homoloy,CBX)基因,包括 CBX2,CBX4,CBX8 与 ST 相关的可能性最大。

2.5 TK 和 CBX 基因芯片结果的验证

为了进一步验证基因芯片的结果，使用 ST 和 NT 多集落各自混合 RNA,通过 RT-PCR 实验,对 TK 基因,3 个 CBX 基因的表达情况做了进一步验证,结果见图 4,RT-PCR 的结果与芯片结果各个基因的表达变化趋势一致。

2.6 CBX4 表达与细胞的倍增时间的关系

为了进一步明确 CBX 基因与细胞生长快慢的关系,我们观察了已经筛选出的 10 个 ST 突变体的生长速度与 CBX4 表达水平的关系,结果如图。NT 细胞的倍增时间(细胞数量增加 1 倍所需要的培养时间)通常为 16 个小时,ST 的倍增时间并不相同,随着倍增时间增加,意味着生长更慢,与之伴随,CBX4 的表达量有进一步增加的趋势。

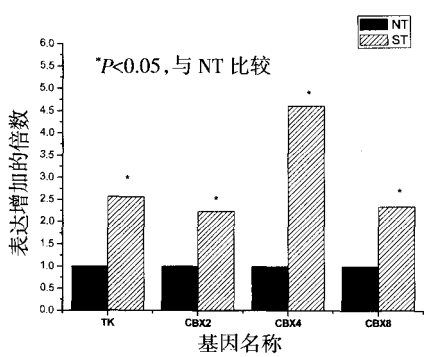


图 4 NT 和 ST 中 TK 基因和目标基因表达水平的比较

3 讨 论

通过表型差异研究相关生物机制或者是基因功能是重要的一个非常有效的途径,其中很关键的工作就是分离表型相关基因。如果能够通过性状连锁确定基因的位置,则会大大减少基因筛选的工作量和提高分离的有效性。

在 TK6 细胞 tk 突变体的选择中,同时选择出了慢生长

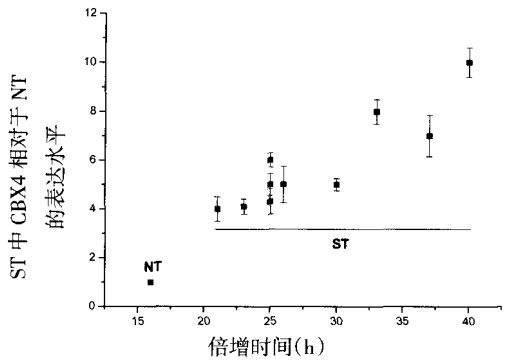


图 5 ST 突变体的倍增时间和 CBX 表达水平的比较

的 TK 突变体,说明与生长调控相关的某基因在一定程度上和 17 号染色体上的 tk 基因连锁存在[5,6]。现在关于 ST 的研究发现 ST 细胞 17q 杂合性丢失是普遍现象,多由于染色体断裂/缺失后同源重组造成,绝大多数 ST 的杂合性丢失从端粒开始,至少抵达到 tk 位点,而对于 NT,杂合性丢失局限在 tk 和中心粒之间[7-9]。因此有理由认为 ST 慢生长与 tk 到端粒之间的某个基因的异常表达有关。

通过全基因表达芯片,我们发现 NT 细胞基因的整体表达水平高于 ST,这与 NT 和 ST 生长表型相一致,即生长慢的细胞整体表达水平相对低。如果缩小观察视野,以染色体为观察对象时发现 NT 和 ST 细胞不同的染色体上的基因总体表达水平并不一致,NT 细胞中部分染色体的整体表达水平竟然比 ST 要低,包括 17 号染色体。据此推测可能是这些染色体上分布有生长抑制的相关基因,其相对低表达使生长速度相对加快;高表达则使生长相对抑制。

在对 17q 的不同区段的表达水平进行了比较发现,tk 到端粒这个区段是 ST 细胞 17 染色体 q 臂上唯一高表达的片段,这进一步证实了前面的分析:即慢生长表型与部分基因高表达有关,且位于 tk 到端粒之间。通过对上述目标片段 ST 中 25 个高表达基因的功能进行检索,慢生长相关基因最终锁定在 CBX2,CBX4,CBX8 3 个基因上。

CBX 是 PcG(Polycomb group)蛋白家族中的一个重要成员,PcG 是在染色质水平调节基因表达的一组蛋白,是基因转录抑制因子[10]。CBX 也参与对多种蛋白的小类泛素修饰(Sumoylation)过程[11]。在本次研究发现 ST 细胞 CBX 表达较 NT 升高,ST 的基因的表达水平整体受到抑制,细胞的生长速度减慢可能与此有关,同时还发现不同的 ST 突变体的倍增时间和 CBX4 的表达水平呈正相关关系。

另外,鼠 L5178Y 细胞 tk 基因(11 号染色体,117 676 840 bp)和 CBX 基因的相对位置关系与人一致(CBX2:118 884 343 bp,CBX8:118 902 227 bp,CBX4:118 941 469 bp)。鼠 L5178Y 细胞 TK 基因突变体亦有两种不同的生长类型,进一步支持 CBX 是慢生长相关基因。

但 ST 与 CBX 的关系还有待更多的证据加以确认,ST 是否与其它基因,尤其是 Y 染色体上的基因,有直接关系也待进一步明确。

参 考 文 献

[1] 张 勇,张立实,WI-L2 家族人类淋巴母细胞 TK 基因突变研究[J].癌变·畸变·突变,2006,18(4):331-333.

[2] 张 勇,张立实.人类淋巴母细胞 TK 和 HPRT 基因突变比较研究[J].癌变·畸变·突变,2007,19(1):36-39.

[3] Masamitsu H,Toshio S. The mouse lymphoma assay(MLA) using the microwell method[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 2001.141-161.

[4] Livak K J,Schmittgen S T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. [J]. Methods,2001,25(4):402-408.

[5] Pongsaensook P,Smith L E,Grosovsky A J,et al. Isolation of an APRT heterozygote from TK6 human lymphoblasts[J].Mutat Res,1997,377(1):27-36.

[6] Morimoto S,Honma M,Yatagai F. Effect of p53 codon 237 mutation on X-ray induced HPRT mutations[J].Environ.Mutagen Res,2002,24(1):17-21.

[7] Morimoto S,Honma M,Yatagai F. Sensitive detection of LOH events in a human cell line after C-ion beam expose[J]. Radiat. Res,2002,43:163-167.

[8] Morimoto S,Kato T,Honma M,et al.Detection of genetic alternations induced by low-dose X rays[J]. Radiat Res,2002,157(5):533-558.

[9] Umebayashi Y,Honma M,Suzuki M,et al.Mutation induction in cultured human cells after low-dose and low-dose-rate gamma-ray irradiation detection by LOH analysis[J]. Radiat Res,2007,48(1):7-11.

[10] Dietrich N, Bracken AP, Trinh E, et al.Bypass of senescence by the polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4A-ARF locus[J]. EMBO J,2007,26(6):1637-1648.

[11] Merrill J C,Melhuish T A,Kagey M H,et al.A Role for Non-Covalent SUMO Interaction Motifs in Pc2 CBX4 E3 Activity[J]. PLOS One, 2010,5(1):879.

(责任编辑:关蕴良)