基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-0988-04

MafA 真核表达载体的构建及在人肝癌细胞中的表达

黄 栋,任 伟,张素华,邵 伟
(重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建肌腱膜纤维肉瘤肿瘤基因同系物 A(MafA)真核表达载体 pEGFP-N2/MafA,pEGFP-C1/MafA,观察 MafA 在人肝癌细胞 HepG-2 细胞内的表达。为研究 Mafa 基因功能和作用机制奠定基础。方法:提取胰腺总 RNA,经 RT-PCR 获得 MafA 基因片段,在两端分别引入 *Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ 的酶切位点,重组至有增强绿色荧光蛋白标记的真核表达载体 pEGFP-N2,pEGFP-C1 中,用脂质体方法转染至人肝癌细胞 HepG-2 细胞中,通过荧光显微镜观察荧光蛋白的表达,通过 RT-PCR 检测 MafA 基因和 insulin Ⅱ基因的表达。结果:通过 RT-PCR 获取了 MafA 基因并成功克隆入载体,转染的细胞有绿色荧光蛋白表达及 MafA 基因表达,但没检测到 insulin Ⅱ基因表达。结论:成功构建质粒 pEGFP-N2/MafA 和 pEGFP-C1/MafA,并成功表达 MafA 基因,但没有 insulin Ⅱ基因的表达。

【关键词】pEGFP-N2;pEGFP-C1;肌腱膜纤维肉瘤肿瘤基因同系物 A
【中国图书分类法分类号】R589.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-27

Construction of eukaryotic expression vectorinsertedby MafA and its expression in HepG-2 cells

HUANG Dong, et al
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct eukaryotic expression vectors pEGFP-N2/MafA and pEGFP-C1/MafA, encoding the mouse musculus v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (MafA) gene, for the further research of its expression in HepG-2 cells. *Methods*: pRNA of the mouse MafA gene was distilled by RT-PCR from the mouse, and inserted into *Hind* Ⅲ and *Sal* Ⅰ restriction sites by PCR, then cloned into pEGFP-N2 and pEGFP-C1 vectors to obtain plasmids pEGFP-N2/MafA and pEGFP-C1/MafA. Human liver cancer cells (HepG-2) were transfected with formed plasmids by means of lipidosome. The MafA-EGFP fused protein was viewed directly with fluorensce microscope, and expression of MafA and insulin Ⅱ was detected by RT-PCR. *Results*: The mouse MafA gene was amplified through RT-PCR and successfully cloned into transfer vectors. The favorite gene sequence could be expressed and was completely consistent with that reported in genebank, but the insulin Ⅱ gene expression was not detected. *Conclusion*: The recombinant plasmids pEGFP-N2/MafA and pEGFP-C1/MafA were successfully constructed. But the insulin Ⅱ gene was not expressed.

【Key words】pEGFP-N2;pEGFP-C1;Mus musculus v-maf musculoaponeuro- tic fibrosarcoma oncogene family, protein A(MafA)

2 型糖尿病是由于胰岛素分泌缺失(β 细胞功能受损)和胰岛素利用障碍(肝脏和肌肉等组织胰岛素抵抗)而引起的以高血糖为主要特征的疾病,β 细胞功能紊乱导致胰岛素分泌受损并进行性恶化。近年来,利用基因工程方法建立分泌胰岛素的细胞系是糖尿病治疗研究的一个热点,并取得了可喜的进步。胰岛素基因转录由胰岛素启动子引发,在这个过程中有许多启动子参与,通过提高体内启动子的产量,以提高胰岛素基因转录是一个可能有效的途径。MafA 又称肌腱膜纤维肉瘤肿瘤基因同系物 A (Mus musculus v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A)是最近分离出来的胰岛素启动子,具有胰腺 β 细胞特异性[1]对于胰腺生长和 β 细胞(产生胰岛素的细胞)的分化及维持正常的 β 细胞功能至关重要[2],本研究拟构建表达小鼠 MafA 基因的真核表达质粒,研究 MafA 在人肝癌细胞 HepG-2 中的表达,为进一步研究 MafA 功能及其作用机制奠定实验基础。

作者介绍:黄 栋(1983-),男,硕士,
研究方向:2 型糖尿病的发病机制和基因治疗。
通讯作者:任 伟,男,教授,E-mail:weiren67@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(CSTC.2007BB5281)。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

PCR 引物和测序由金思特公司合成,DNA Marker D2000,DL 15000 为 TIANGEN 公司产品,限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Sal* Ⅰ,T4 DNA 连接酶, 总RNA 提取剂 RNAiso Reagent, TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2、DNA 聚合酶 LA Taq 酶为 TaKaRa 公司产品,质粒提取试剂盒 plasmid mini kit 为 OMEGA 公司产品,胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,invitrogen Lipofectamine 购自 invitrogen 公司,清洁级 C57 小鼠购自重庆医科大学动物中心,真核表达载体 pEGFP-N2,pEGFP-C1 由徐璐璐硕士惠赠。所有操作均在重庆医科大学基础研究所完成,细胞株由该所保存,血清,1640 培养液,细菌培养基、抗生素及相应耗材购自该所。

1.2 主要的方法和步骤

1.2.1 提取总 RNA 所用吸头、EP 管均经过 DEPC 处理,剪刀、研钵等物品经 200℃高温干烤 4 h,灭活 RNAase。取小鼠活体胰腺组织约 100 mg 放入液氮中冷冻 30 min, 取出置入液氮预冷的研钵中,研磨致粉末后,加入 RNAiso Reagent 提取液 1 ml,按说明书步骤提取并清洗总 RNA。

1.2.2 RT-PCR 根据 GENEBANK 发表的小鼠 MafA 的序列,用 Premier 5 按照引物设计原则设计 PCR 引物,分别在两端引入 *Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ内切酶切位点。上游引物 5'-TTGTCGACATGGCCGCGGAGCTGGC-3' 引入 *Sal* Ⅰ酶切位点。下游引物 5'-CCAAGCTTTCACAGAAAGAAGTCGG-3' 引入 *Hind* Ⅲ酶切位点。将上一步获取的总 RNA 约 1 μg 和 0.2 μg 引物加入 DEPC 处理过的 0.2 ml EP 管中, 按照 TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 说明书的体系要求进行反应。反应条件:95℃,5 min;95℃,30 s;58℃,45 s;72℃,3 min;35 个循环。

1.2.3 克隆 将纯化的 PCR 产物和载体 pEGFP-N2, pEGFP-C1 分别用 *Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ双酶切, 酶切产物纯化后在 T4DNA 连接酶作用下,15℃过夜连接。转化到 E.coliDH5a 中, 涂布在含卡那抗生素的 LB 固体培养基上,37℃ 过夜培养。次日,挑选阳性克隆,用含卡那抗生素的 LB 液体培养基 37 ℃振摇过夜培养,提取重组质粒,用 PCR、*Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ双酶切鉴定, 初步鉴定正确的送公司测序, 分别命名为 pEGFP-N2/MafA,pEGFP-C1/MafA。

1.2.4 重组质粒分别转染人肝癌 HepG-2 细胞 人肝癌 HepG-2 细胞用含 10%小牛血清的 1640 培养液培养。转染前传代 6 孔板,用无抗生素培养基培养,共分 4 组,分别是重组质粒 pEGFP-N2/MafA 组, 重组质粒 pEGFP-C1/MafA 组、空载体 pEGFP-N2 组、空载体 pEGFP-C1 组,每组 3 孔。待细胞达 80%,用无抗生素、无血清培养基洗细胞 2~3 次。取去内毒素质粒 5 μg/孔,与 10 μl/孔 Lipofectamine 分别用无血清培养基稀释后混合,室温孵育 30 min,加入相应的孔中,培养 6 h 后换含 10%血清的培养基继续培养,24 h 开始观察。

1.2.5 用荧光显微镜观察荧光表达 用荧光倒置显微镜观察绿色荧光融合蛋白的表达。以 10 个视野内有绿色荧光的细胞和该视野的全部细胞比率的均值做为该时间段的转染率。

1.2.6 RT-PCR 检测 MafA 基因和 insulin Ⅱ基因在人肝癌细胞 HePG-2 细胞中 mRNA 的表达 转染后 48 h,收集重组质粒 pEGFP-N2/MafA 组,重组质粒 pEGFP-C1/MafA 组、空载体 pEGFP-N2 组、空载体 pEGFP-C1 组各 1 孔细胞,按照 RNAiso Reagent 说明书提取细胞总 RNA。使用 Premier 5 软件设计检测 MafA 基因表达的引物,上游引物: 5'-CTGCTCCTCGGTGCCCTCTT-3',下游:5'-CGTGGTGGTGATGGTGGTGAT-3',检测 insulin Ⅱ基因表达的上游引物: 5'-TGCTCTTCCTCTGGGAGTC-3',下游: 5'-CAGTGCCAAGGTCTGAAGG- 3'。按照 TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 说明书的体系要求将 1 μg 获得的总 RNA 、0.1 μg 引物和 0.1 μg β-acting 内参引物等加入 DEPC 处理过的 EP 管内进行反应。反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s;55℃ 退火 45 s;72℃ 延伸 1 min;28 个循环。最后 72℃延伸 5 min,然后进行琼脂糖凝胶电泳分析结果。

2 结 果

提取的总 RNA 经 2%琼脂糖凝胶电泳。见图 1。

重组质粒的 PCR 鉴定 1%琼脂糖凝胶电泳图;目的基因大小与预期结果一致。见图 2。

重组质粒进行双酶切鉴定,酶切产物 1%琼脂糖凝胶电泳图; 重组质粒经 *Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ双酶切,有预期大小的目的基因条带。见图 3。

初级鉴定正确的送公司测序, 测得序列和 GENEBANK 发表的小鼠 MafA 的序列一致,碱基无突变,缺失等。

转染的人肝癌细胞 HepG-2 细胞,转染后 48 h,在荧光显微镜下中观察融合蛋白表达, 重组质粒 pEGFP-N2/MafA 组, 重组质粒 pEGFP-C1/MafA 组表达相似,见图 4。空载体 pEGFP-N2 组、空载体 pEGFP-C1 组表达基本相似,见图 5。转染 24 h 已有绿色荧光蛋白的表达。细胞最高转染率为 40%。图片为转染后 48 h 荧光照片。

细胞转染 48 h 后,使用 RT-PCR 检测 MafA 基因在人肝癌细胞 HepG-2 细胞中 mRNA 的表达,2%琼脂糖凝胶电泳图。目的条带大小与预期结果一致(见图 6)。

细胞转染 48 h 后,使用 RT-PCR 检测insulin Ⅱ基因在 HepG-2 细胞中 mRNA 的表达,2%琼脂糖凝

胶电泳图。只有内参 300 bp 的条带出现，没有出现检测 insulin Ⅱ表达的相应条带（见图 7）。

3　讨　论

利用基因工程的方法建立分泌胰岛素的细胞系治疗糖尿病是目前研究的一个热点，并取得了可喜的进步。胰岛素基因表达由胰岛素启动子引发，在这个过程中有许多转录调节因子参与，通过提高体内转录因子的产量，促进胰岛素基因转录是一个可能有效的途径。cao 等[3]应用基因转染方法将表达 PDX1 的基因体外转染肝细胞，结果发现在高糖条

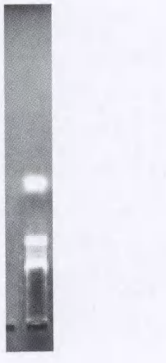
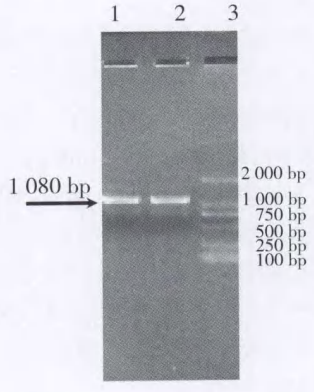
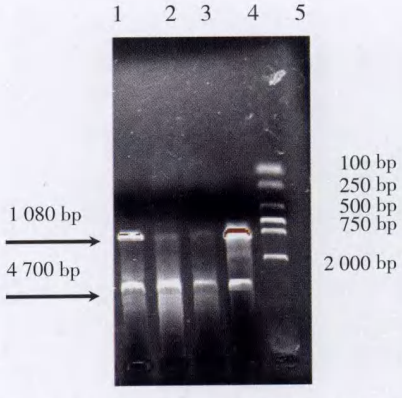


图 1　总 MRNA 电泳结果



1. pEGFP-N2/MafA 组；2. pEGFP-C1/MafA 组；3. DL2000 Marker

图 2　重组质粒的 PCR 鉴定凝胶电泳图



1. pEGFP-N2/MafA 组；2. pEGFP-N2 组；3. pEGFP-C1 组；4. pEGFP-C1/MafA 组；5. DL 2000 Marker

图 3　重组质粒进行双酶切产物凝胶电泳图

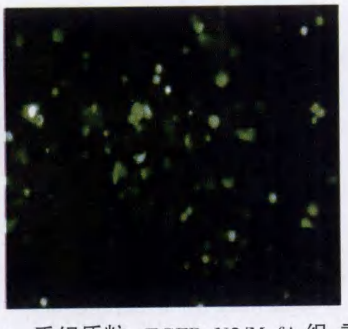
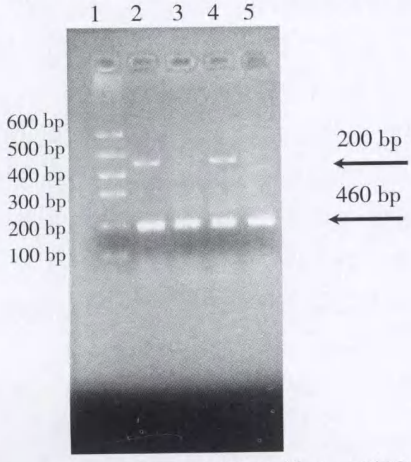


图 4　重组质粒 pEGFP-N2/MafA 组，重组质粒 pEGFP-C1/MafA 组荧光显微镜图像（200×）



图 5　空质粒 pEGFP-N2 组，空质粒 pEGFP-C1 组荧光显微镜图像（200×）



1. DL 600 Marker；2. pEGFP-N2/MafA 组；3. pEGFP-N2 组；4. pEGFP-C1/MafA 组；5. pEGFP-C1 组

图 6　RT-PCR 检测 MafA 基因 mRNA 的表达，凝胶电泳图

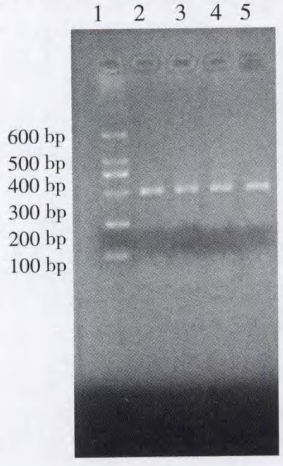


图 7　用 RT-PCR 检测 insulin Ⅱ基因 mRNA 的表达，凝胶电泳图

件下肝细胞被诱导分泌胰岛素。这就提示,在一定条件下,胰岛素可以实现在肝脏的异位表达。MafA 是最近分离出来的转录因子,人类 MafA 基因位于 8q24.3,它具有胰腺 β 细胞特异性。MafA 对于胰腺生长和 β 细胞(产生胰岛素的细胞)的分化及维持正常的 β 细胞功能至关重要。MafA 基因敲除小鼠随年龄增长发展成糖尿病[4]。有实验显示[5],过度表达 MafA 可以加强胰岛素启动子的活性,这个作用要比过度表达 PDX-1 或 NeuroD 效果显著得多。

pEGFP-N2,pEGFP-C1 载体具有易转染真核细胞的特点,且以 EGFP 为报告基因的表达载体具有检测方便、荧光稳定、对宿主细胞无任何毒害、不影响目的蛋白的生物活性等优点[6]。将 MafA 克隆到启动子 CMV 和加尾信号 SV40 poly 间的 EGFP 基因 n 末端或者 c 末端,并与其融合,以确保将 MafA 在宿主细胞内的有效表达及其产物特定调节功能的发挥。该载体是一个可在哺乳动物细胞中高效表达的载体。

为了探讨 MafA 高表达对肝细胞胰岛素启动子、胰岛素等表达的影响及需要条件以及 MafA 诱导肝细胞胰岛素表达的分子机理,本研究以 GFP 作为报告基因,构建了 pEGFP-N2/MafA 和 pEGFP-C1/MafA 重组质粒载体,并体外转染人肝癌细胞 HepG-2 细胞。结果显示,成功提取了 MafA 的mRNA,逆转录成 cDNA,克隆到质粒中。转染 HepG-2 细胞后可检测到 MafA 的 mRNA 表达,证明表达载体可以在 HepG-2 中可以表达 MafA 基因。荧光显微镜下观察到 MafA-EGFP 融合蛋白发出的绿色荧光,可见成功表达出融合蛋白。实验结果证实,本实验成功构建了真核重组表达质粒 pEGFP-N2/MafA 和 pEGFP-C1/MafA。该质粒的构建可为研究 MafA 在对于胰腺生长和 β 细胞(产生胰岛素的细胞)的分化及维持正常的 β 细胞功能中的作用、以及研究 MafA 与其他转录因子相互之间的协同作用提供实验基础。目前国内尚未发现将 MafA 基因克隆进 pEGFP-N2 和 pEGFP-C1 载体的报道。

虽然成功表达出融合蛋白,但是没有检测到 insulin Ⅱ基因的表达。可能是多方面的原因,鉴于一个 MafA、PDX-1 和 Beta2 协同作用实验显示,胰岛素基因在 β 细胞特异的表达很有可能是因为有效的转录因子协调的动态的有序结合的结果。ChIP 测定 MIN6 β 细胞显示 PDX-1,MafA,E47,和 β2 循环结合在小鼠胰岛素 2 启动子大约 10~15 min[7]。可以推测胰岛素基因转录需要一定数量的转录因子刺激,或者需要多种转录因子的刺激,而本实验重组质粒在 HepG-2 细胞的拷贝数太少,翻译的 MafA 蛋白浓度太低,可能没有达到起作用的浓度。另外,本实验只涉及到 MafA 的融合蛋白,融合蛋白是否能和原蛋白起相同的作用?有待证明。今后将继续完善实验,比如增加转染的时间,进行 G418 稳定筛选;构建腺病毒,以增加 MafA 的拷贝数,提高 MafA 蛋白翻译量;构建多种转录因子的基因表达载体,协同转染。

参 考 文 献

[1] Matsuoka T A, Artner I, Henderson E, et al. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 2930-2933.

[2] Coolen M, Sii-Felice K, Bronchain O, et al. Phylogenomic analysis and expression pattern of large Maf genes in Xenopus tropicalis provide new insights into the functional evolution of the gene family in osteichthyans[J]. Dev Genes Evol, 2005, 215(7): 327-339.

[3] Cao L Z, Tang D Q, Marko E, et al. High glucose is necessary for complete maturation of Pdx1-VP16-expressing hepatic cells into functional insulin-producing cells[J]. Diabetes, 2004, 53(12): 3168-3178.

[4] Zhao L, Gao M, Matsuoka T A, et al. The islet beta cell-enrich MafA cativator is a key regulator of sisulin gene transcription [J]. Biol Chem, 2005, 280(12): 11887-11894.

[5] H. Kaneto, T. Matsuoka, Y. Nakatani, et al. A crucial role of MafA as a novel therapeutic target for diabetes [J]. Biol Chem, 2005, 280 (15): 15047-15052.

[6] Waido G S, Standish B M, Berendzen J, et al. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein [J]. Nat Bioteehnol, 1999, 17 (7): 691-695.

[7] Barrow J, Hay C W, Ferguson LA, et al. Transcription factor cycling on the insulin promoter[J]. FEBS Lett, 2006, 580(2): 711-715.

(责任编辑:关蕴良)