技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)08-1060-03

人类 pEGFP/H2B 真核表达质粒的构建及表达

徐远久[1],熊异平[1],吴建敏[2],陈仕银[1],夏洪安[1],郑爱华[1],徐海波[1]
(1.四川省广安市人民医院检验科,广安 638000;2.重庆市合川区中医院检验科,合川 401520)

【摘 要】目的:构建人 H2B 基因与 GFP 融合的绿色荧光蛋白真核表达质粒,并在 HEK293 细胞中表达。方法:通过 RT-PCR 从 HEK293 细胞总 RNA 中扩增获得 H2B 基因的部分 cDNA 序列,与载体 pEGFP-C1 连接构建 H2B 基因与 GFP 融合表达的真核表达质粒 pEGFP/H2B,经酶切和测序鉴定;应用脂质体转染技术将重组质粒转染 HEK293 细胞观察融合蛋白的表达。结果:成功构建 H2B 基因与 GFP 融合的绿色荧光蛋白真核表达载体,与对照组中转染空载体 pEGFP-C1 的 HEK293 细胞中的弥漫荧光相比,转染重组质粒的细胞中可观察到绿色荧光蛋白集中表达在细胞核内,分裂期细胞中可见与染色体形态一致的绿色荧光。结论:该载体的成功构建为研究染色体的分离机制建立了有效的观察体系。

【关键词】H2B 基因;绿色荧光蛋白;HEK293 细胞;染色体分离
【中国图书分类法分类号】R44 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-17

Construction and expression of the eukaryotic expression plasmid of Human pEGFP/H2B

XU Yuan-jiu, et al
(*Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Guang'an*)

【Abstract】*Objective*: To construct the eukaryotic expression plasmid of EGFP/H2B and express it in the Human embryo kidney cells (HEK293). *Methods*: Part H2B gene was obtained by RT-PCR from cultured HEK293 cell's whole RNA. The sequence encoding H2B was cloned into pEGFP-C1 to construct the eukaryotic expression vector. After confirmed by enzymatic digestion and sequencing, the recombination plasmid was transfected to HEK293 cells by lipofectamine technology for observation of the fusion protein's expression. *Results*: The recombination plasmid of pEGFP/H2B was constructed successfully. Compared with the dispersing green fluorescence among the whole cells in the control cells transfected with the mock plasmid (pEGFP-C1), the green fluorescence was concentrated in the nuclei of HEK293 cells transfected with pEGFP/H2B and distributed with the chromosomes in the mitotic cells. *Conclusions*: The successful construction of pEGFP/H2B recombination plasmids establishes an available survey system to study the chromosome segregation mechanism.

【Key words】H2B *gene*; *Green fluorescence protein*; HEK293 *cell*; *Chromosome segregation*

肿瘤作为威胁人类生命的杀手,其发生和发展与染色体异常有关,许多恶性肿瘤常表现为染色体数目异常,分裂期细胞中染色体的不等分离是导致染色体数目异常的重要原因[1]。故研究染色体分离机制可能有助于探讨肿瘤的发生、发展规律,并在肿瘤的治疗新方法方面提供新的靶点。该方面研究常涉及到对染色体数目进行分析,传统染色体制备方法可能因为人为因素等造成染色体丢失而得到假阴性或假阳性结果,DAPI 等荧光染料的使用虽然可以弥补这一不足,但与传统染色体制备方法一样是将染色体固定后进行分析,为一静态结果。本研究旨在通过用绿色荧光蛋白(Green fluorescence protein,GFP)标记人组蛋白 H2B,构建人 H2B 真核荧光表达载体,为研究染色体的分离机制建立一个有效的动态观察体系。

作者介绍:徐远久(1970-),男,主管检验师,硕士,研究方向:染色体的移动与肿瘤的发生。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pEGFP-C1、菌株 *E.coli* DH5α、HEK293 细胞(人胚肾细胞)由本室保存。

1.1.2 主要试剂和酶 总 RNA 提取试剂盒、Prime STAR Taq 酶、快速连接试剂盒、*Kpn* Ⅰ、*Sac* Ⅰ购自 TaKaRa;小牛血清购

自杭州四季青，1640 培养基由 GIBCO 生产；lipofectamine 2000（脂质体）购自上海英骏；胶回收试剂盒购自上海华舜。

1.1.3 引物设计与合成 根据 Genbank 中的 H2B 基因编码序列（序列号：NM_003528），设计表达部分 H2B/mRNA 序列（第 368～743 位碱基）并带酶切位点的引物，PCR 产物为 392 bp。

P1 5'-CG*GAGCTC*CTATGCCAGAGCCAGCGAAGTC- 3' 为上游引物，其中斜体部分为 *Sac* Ⅰ 酶切位点 。

P2 5'-CG*GGTACC*TTAGCGCTGGTGTACTTGGTGAC-3' 为下游引物，其中斜体部分为 *Kpn* Ⅰ 酶切位点。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞培养 HEK293 细胞用含 5%小牛血清的 1640 培养基于 5%CO_2、37℃培养。

1.2.2 PCR 扩增 用培养的 HEK293 细胞提取总 RNA，RT-PCR 扩增 H2B 基因。PCR 循环条件：94℃ 5 min；1 个循环；98℃ 10 s，68℃ 4 min，30 个循环；72℃ 10 min，1 个循环。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。胶回收试剂盒回收 H2B PCR 产物。

1.2.3 重组质粒的构建 用 *Sac* Ⅰ 和 *Kpn* Ⅰ 双酶切 pEGFP-C1 质粒载体和胶回收纯化的 H2B/PCR 产物，胶回收目的片段，再用 T4DNA 连接酶连接，转化 *E.coli* DH5α，铺氨卞抗性平板，挑取阳性克隆扩增，抽提质粒 pEGFP/H2B，进行酶切鉴定，阳性者测序鉴定。

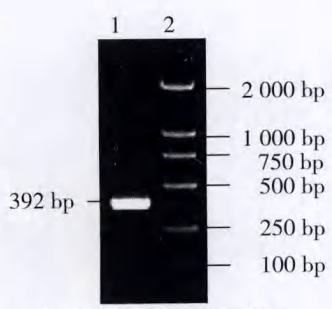
1.2.4 转染 HEK293 细胞 实验组：pEGFP/H2B+lipofectamine 2000；对照组：pEGFP-C1+lipofectamine 2000。转染前 1 d 将 HEK293 细胞以（1～2）×10^5 个接种到 24 孔板里，次日待细胞生长密度达 90%左右时转染按质粒 1 μg：lipofectamine 2000 2 μl 遵循脂质体转染试剂说明书进行操作。

1.2.5 观察绿色荧光蛋白的表达 24 h 后开始用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察细胞中重组蛋白的表达（绿色荧光的分布）情况。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

根据设计的引物，PCR 扩增得到 392 bp 的产物（包括酶切位点和保护性碱基），与设计序列一致（图 1）。

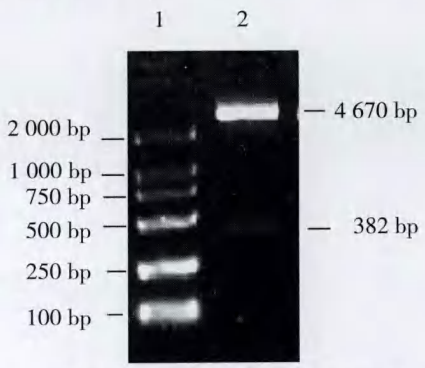


1. H2B PCR 产物；2. DL2000

图 1 PCR 扩增结果

2.2 酶切鉴定结果

重组质粒用 *Sac* Ⅰ 和 *Kpn* Ⅰ 双酶切得到 382 bp 的小片段和 4 670 bp 的大片段，初步说明该重组质粒构建成功（图 2）。



1. DL2000；2. *Sac* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ 双酶切产物

图 2 重组表达质粒双酶切结果

2.3 测序鉴定结果

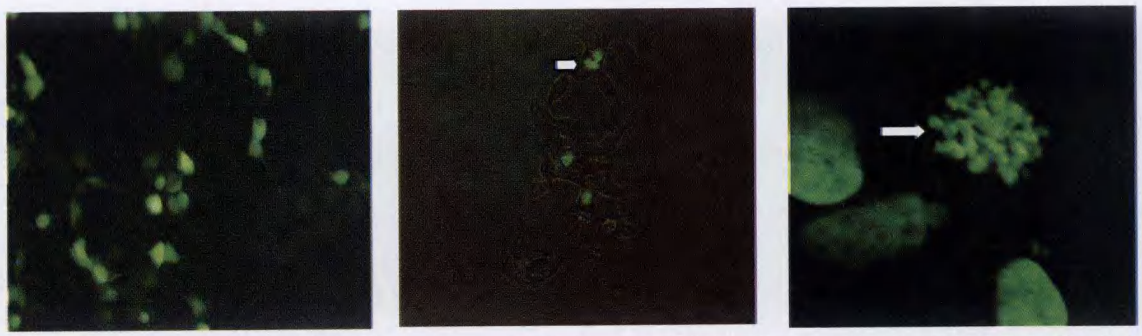
对重组质粒中插入的序列进行测序鉴定，测序结果见图 3。经 DNAssist1.02 序列分析软件比对结果表明，插入片段与预计插入序列具有 100%的同源性，插入位点及插入方向均正确无误，表明 H2B cDNA 正确地插入了 pEGFP-C1 表达载体中，成功构建 pEGFP/H2B 重组表达载体，可用于真核表达。

TACGAGCTGGTTTAGTGACCGTCAGATCCGCTAGCGCT
ACCGGACTCAGATCTC*GAGCTC*CTATGCCAGAGCCAGCGAA
GTCCG CTCCCGCGCCCAAGAAGGGCTCGAAGAAAGCCGTG
A CTAAGGCGCAGAAGAAGGACGGCAAGAAGCGCAAGCGC
AGCCGCAAGGAGAGCTACTCCGTATACGTGTACAAGGTGCT
GAAGCAGGTCCACCCCGACACCGGCATCTCCTCTAAGGCCA
TGGGAATCATGAACTCCTTCGTCAACGACATCTTCGAACGC
ATCGCGGGTGAGGCTTCCCGCCTGGCGCATTACAACAAGC
GCTCGACCATCACCTCCAGGGAGATCCAGACGGCCGTGCG
CCTGCTGCTGCCCGGGGAGTTGGCCAAGCACGCCGTGTCC
GAGGGCACCAAGGCCGTCACCAAGTACACCAGCGCTAA*G*
*GTACC*GCGGGCCCGGGA

图 3 重组质粒测序鉴定结果（其中下划线部分为插入片段；斜体部分为酶切位点）

2.4 质粒转染 HEK293 细胞结果

将重组质粒和空载体转染 293 细胞后用激光共聚焦显微镜和倒置荧光显微镜观察，对照组细胞的细胞质和细胞核中均可见到弥散分布的绿色荧光，与细胞形态一致（图 4A）而实验组细胞中可见重组蛋白集中表达在细胞核内，细胞质中无重组蛋白的表达（图 4B），尤其分裂期细胞中可见分散的与染色体形态一致的绿色荧光（图 4C）。



A. pEGFP-C1 转染细胞后的荧光图像（×100）　B. pEGFP/H2B 转染细胞后的荧光图像（×100）箭头所指为细胞核　C. pEGFP/H2B 转染细胞后的荧光图像（分裂期，×1000）箭头所指为分裂期细胞

图 4　质粒转染 HEK293 细胞后的荧光图像

3　讨　论

染色体数目异常（如非整倍体）是肿瘤细胞的一个标志[2]，但染色体异常分离的机制和分子基础还不是很清楚，国内外研究发现纺锤体关卡点功能异常、染色体着丝粒的组装和功能行驶异常、纺锤体微管组装和功能异常等与之有关。pEGFP/H2B 真核表达载体的构建可能为这些研究提供便利。

绿色荧光蛋白[3]作为一种新型的定位标记物，具有稳定、分子量小、大量表达对细胞没有毒性等优点，已广泛用于分子生物学研究；组蛋白是构成染色体基本结构单位核小体的蛋白质[4,5]，包括 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 5 种亚单位[6,7]，在细胞的其它部位不表达，而且它们在细胞核内的分布与染色体或染色质一致，故组蛋白的表达可间接反映出染色体的形态、数目变化。Kanda[8]、Kimura[9]、Foltz[10]等均利用 GFP 标记 H2B 来研究染色体的分离情况，国内孙文清[11]等也利用 GFP 标记小鼠 H2B 来研究小鼠耐药细胞中双微体（DMs）的形成情况。

本实验参照 Kanda[8]等的方法成功构建人pEGFP/H2B 真核表达载体，转染 HEK293 细胞后，发现绿色荧光集中表达在细胞核内，细胞质中无绿色荧光分布，尤其分裂期细胞中可见到与染色体形态一致的绿色荧光，与 Kanda 等的结果一致，说明该载体能用于动态观察染色体的分离情况及染色体数目的变化的分析，为探讨染色体的分离和肿瘤的发生机制奠定基础。

参　考　文　献

[1] Simpson ans Elias 著.朗景和，边旭明，向　阳（译）.妇产科遗传学[M]. 北京：人民卫生出版社，2005.32-33.

[2] Chi Y H, Jeang K T.Aneuploidy and cancer[J].Cell Bio, 2007, 102(5): 531-538.

[3] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al.Green fluorescent protein as a flarker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(9): 802-805.

[4] 凌诒萍.细胞生物学[M].北京：人民卫生出版社，2001.80-81.

[5] 闫国和，栗永萍，王军平，等.重组真核表达载体 pEGFP-N1/PDGF-A 的构建及真皮干细胞的转染[J].第三军医大学学报，2005，27(20)：2005-2008.

[6] Wolffe A. Chromatin structure and function[J]. San Diego: Academic Press, 1998, 5(3): 23-24.

[7] Thomas J O.HistoneH1: location and role [J]. Curt Opin Cell Biol, 1999, 11(6): 312-317.

[8] Kanda T, Sullivan K F, Wahl G M. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells[J]. Current Biology, 1998, 8(7): 377-385.

[9] Kimura H, Cook P.Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B[J]. Cell Biol, 2001, 153(7): 1341-1353.

[10] Foltz D R, Jansen L E T, Black B, et al.The human CENP-A centromeric mucleosome associated complex[J].Nat Cell Biol, 2006, 8(5): 458-469.

[11] 孙文清，马琳琳.小鼠 H2B-GFP 真核表达载体的构建和鉴定[J].国际遗传学杂志，2006，29(1)：15-19.

（责任编辑：冉明会）