维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0180-03

细胞分裂调控基因 MAD2 与 GFP 融合的真核表达质粒的构建及表达

施 琼[1,3],翁亚光[1,2],徐远久[1],蒋洪彦[1],刘子杰[1],刘青松[1],蔡 燕[1]

(1. 重庆医科大学临床检验诊断学实验室;2. 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室;
3. 基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建 MAD2 基因与 GFP 融合的绿色荧光蛋白真核表达质粒,并在 HepG2 细胞中表达。方法:通过 RT-PCR 扩增,获得 MAD2 基因的完整序列。将此片断插入 pEGFP-N1 载体多克隆位点区,构建 MAD2 基因与 GFP 融合的绿色荧光蛋白真核表达质粒。应用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞并观察表达的绿色荧光。结果:成功构建 MAD2 基因与 GFP 融合的绿色荧光蛋白真核表达质粒,并在 HepG2 细胞中观察到绿色荧光蛋白的表达。结论:该载体的成功构建,为研究 MAD2 基因在细胞分裂中的功能及定位建立了有效的观察体系。

【关键词】MAD2 基因; 绿色荧光蛋白; HepG2 细胞

【中国图书分类法分类号】R44 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-09-28

Construction of the plasmid expressing gfp and MAD2 gene controlling separation of cell and its expression in HepG2 cell

SHI Qiong, et al

(*Laboratory of Clinical Diagnostics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To establish an in vitro screening system for testing effects of MAD2 gene of embryonic cell genome. *Methods:* In order to construct the plasmid expressing MAD2-GFP fusion plasmid, the target gene fragment was obtained by RT-PCR amplification and inserted into pEGFP-N1 reporter vector. The structure of constructed plasmid was confirmed by electrophoresis analysis and DNA sequencing. The function of construct was confirmed by lipofectamine-mediated transient expression in HepG2 cells. *Results:* DNA sequencing showed that the inserted fragment of the constructed plasmid was the same as the template MAD2 genome. The HepG2 cells transfected with the constructed plasmid could express reporter gene of gfp. *Conclusions:* the plasmid expressing gfp gene controlled by MAD2 gene is successfully constructed and an in vitro testing system for evaluating founction of MAD2 gene in separation of cell is established.

【Key words】MAD2 gene; Green fluorescence protein; HepG2 cell

自然流产在育龄妇女中的发生率为 1%, 而染色体数目异常引起的约占到自然流产总数的 50%。染色体数目异常胚胎的发生机制至今为止尚不清楚。近年来,有学者认为在细胞分裂的整个过程中,细胞内有一个监控体系(surveillance systems)保证细胞分裂的正常进行,它对 DNA 的损伤、纺锤丝的完整性及染色体最终是否正常分离起着重要的监控作用。Rieder 等[1-3]认为,细胞内的着丝粒相关蛋白-关卡蛋白(Checkpoint Protein, CP)能够准确的识别纺锤丝微管与染色体着丝粒点的连接,是细胞分裂监控体系中的一个重要组成部分。其中 MAD2(Mitotic Arrest Deficient)基因编码的 CP 的功能尤其引人注目。本研究旨在构建 MAD2 基因的绿色荧光蛋白真核表达质粒,为胚胎细胞中 MAD2 基因的功能研究提供有效的评价系统,为进一步研究细胞分裂机制奠定基础。

作者介绍: 施 琼(1969-),女,讲师,博士生,
主要研究方向:细胞周期与染色体异常。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 MAD2 geng 片断的制备

1.1.1 含 MAD2 gene 全长 cDNA 该样本已在以往的原代培养的胚胎细胞中提取的 RNA，经逆转录而获得。

1.1.2 引物设计与合成 根据 MAD2 gene 基因序列，设计合成一对扩增引物。上游引物为 5′ GATAAGCTTATGGCGCT-GCAGCTCTCC3′，含有 Hind Ⅲ酶切位点；下游引物为 5′ AGTGGATCCAGTCATTGACAGGAATT 3′，含有 Bamh Ⅰ酶切位点。扩增产物为 1432bp 片断。引物由上海博亚申友公司合成。

1.1.3 PCR 扩增 反应体系 25μl，10×PCR buffer（含 Mg^{2+}）2.5μl，dNTP（2.5mmol/Leach）2μl，上下游引物（10pmol/μl）各 1μl，cDNA 模板（20ng/μl）1μl，pyrobest 高保真酶 1U，DH_2O 补足 25μl（PCR 试剂均为 Takara 公司产品）。反应条件为：94℃预变性 5min；94℃变性 30s，58℃退火 30s，72℃延伸 40s，循环 35 次后 72℃延伸 10min。扩增产物用 1.5%低熔点琼脂糖凝胶电泳分离，并用 PCR 产物纯化试剂盒（Omega 产品）纯化。纯化产物用 *Bamh* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切（限制性内切酶为 Takara 公司产品），纯化并进行紫外定量。

1.2 质粒构建

将 pEGFP-N1 质粒载体（由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存并提供）用 *Bamh* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，胶回收试剂盒（Omega 产品）回收大片断，紫外定量。纯化的酶切处理的 PCR 产物与载体片断按摩尔比 8∶1 进行连接（连接酶及 buffer 为 promega 产品）、连接产物转化感受态细菌 JM109。连接及转化操作均参照《分子克隆》进行。

1.3 克隆鉴定

1.3.1 阳性克隆快速筛选 挑取 LA 平板上生长的单个菌落至 LA 液体培养基，37℃，300r/min 震摇培养 16h，取 1ml 细菌作快速筛选。简言之，10 000g 离心 30s，弃上清，加入 30μl 酶：氯仿：异戊醇（25∶24∶1），重悬后离心 2min，取 10μl 上清液电泳。以空载体作对照。

1.3.2 酶切鉴定 取快速筛选阳性的细菌提取质粒（promega 质粒小量提取试剂盒），按说明书操作。质粒紫外定量后用 Bamh Ⅰ和 Hind Ⅲ双酶切进行鉴定，同时以空载体作对照。

1.3.3 序列分析 酶切鉴定阳性的克隆进行克隆片断的 DNA 序列分析，由上海博亚申友公司完成。

1.4 质粒在细胞中的表达

1.4.1 细胞培养 HepG2 肝癌细胞株由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存并提供。采用 1640 培养基，加入 10%小牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml，在 37℃，5% CO_2 条件下进行培养及传代。

1.4.2 质粒转染 HepG2 肝癌细胞接种于 24 孔板，0.5×10^5/孔，待 90%细胞融合后，采用脂质体 Lipofectamine (1mg/ml，invitrogen 产品)试剂盒进行转染并按说明书操作。每孔细胞脂质体用量为 2μl，质粒为 1μg。

1.4.3 绿色荧光蛋白活性观察 转染后继续培养，在荧光显微镜下观察细胞培养 24、48、72h 荧光。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

根据引物的设计，PCR 应扩增出 1432bp 的产物（含酶切位点及保护碱基），包括完整的 MAD2 基因的片断。电泳图（图 1）可见，PCR 产物位置与设计一致。



图 1 PCR 产物电泳结果

2.2 阳性克隆鉴定

2.2.1 阳性克隆快速筛选结果 挑取 3 个克隆进行初筛试验，如图 2，克隆 1 质粒泳动速度较空载体慢，可能为阳性克隆。而克隆 2 和克隆 3 质粒泳动速度与空载体无明显差别，为自连产物。

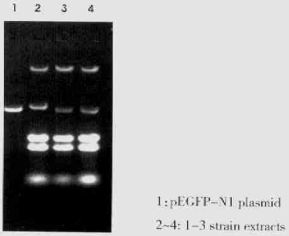


图 2 克隆快速初筛试验结果

2.2.2 酶切鉴定 取克隆 1 细菌提取质粒用 Bamh Ⅰ和 Hind Ⅲ双酶切，酶切产物电泳结果如图 3。可见该质粒双酶切后为两个片断，较空载体酶切产物多出约 1400bp 大小的片断，证明该质粒含有特异的插入片断。将该质粒命名为 Pmad2-gfp。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 3 质粒 pmad2-gfp 酶切鉴定电泳结果

2.2.3 序列测定结果 质粒 pmad2-gfp 克隆片断序列测定结果，通过 DNAMAN6.0 软件进行同源性分析，与 MAD2 模板相对应区完全一致，证明 PCR 过程无突变发生。

2.3 质粒在细胞中的表达

转染后 24、48、72h 均观察到绿色荧光蛋白的表达，以 48h 荧光最强。但相同量质粒转染时，pmad2-gfp 较 pEGFP-N1 表达弱，表达细胞数亦较少。



A



B

图 4 A、B 分别为质粒 pmad2-gfp、pEGFP-N1 转染 HepG2 细胞 48h 后绿色荧光蛋白观察结果

3 讨 论

染色体不稳定(CIN)导致染色体数目异常(非整倍体)是肿瘤细胞的一个标志，约 50% 15w 前的自然流产也都是由非整倍体引起的，但是染色体不稳定的机制与分子基础还不是很清楚。近年来的研究表明 spindle checkpoint 机制缺陷可能促进细胞非整倍体的形成。spindle checkpoint 是细胞分裂中染色体分离的一个监控机制，只有当所有染色体与功能正常的着丝点形成正确的连接后才允许细胞进入有丝分裂后期，因为染色体分离是一个不可逆转的步骤，因此 spindle checkpoint 在细胞分裂中具有重要的意义。MAD2 是 spindle checkpoint 的重要组成之一，MAD2 在染色体分离过程中的作用机制目前尚不完全清楚[4]。Johnson 等[5]认为 Mad2 结合到着丝点上需要 Mad1，Mad1 的羧基端与 Mad2 结合，氨基端与着丝点结合。一个含有 Mad2 结合位点但缺乏氨基端结构域的 Mad1 突变体使 MAD2 无法与着丝点正常连接，其 Checkpoint 机制不能正常运行。Schaar 等[6]实验发现，MAD2 与着丝点附着还将依赖 CENPs(Centromere Protien)蛋白家族中的 CENP-E，它们使用 CENP-E 的抗体注射入哺乳动物细胞使其灭活或对蟾蜍卵细胞提取液采用免疫消减的方法去掉 CENP-E 后，细胞中 Mad2 不能与着丝点结合，细胞不能形成正确的着丝点与微管的连接。研究细胞内 MAD2 基因的表达，对探讨染色体不分离的分子机制具有十分重要的意义。

本实验成功构建了 Pmad2-GFP 表达质粒，并能表达一定强度的荧光，可以用于细胞分裂机制的研究。同时细胞周期蛋白 mad2 作为肿瘤基因治疗的靶点越来越受到关注，Pmad2-gfp 荧光表达载体的成功构建，将为肿瘤的基因治疗提供实施和疗效观察的有效系统；而且 Pmad2-gfp 载体的构建也将为研究染色体数目异常胚胎和肿瘤中 MAD2 基因的功能打下良好的基础。

参 考 文 献

[1] Rieder C.L., Cole R.W. The checkpoint delaying ana- phase in response to chromosome monoorientation is mediated by an in-

(下转第 239 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

低浓度胆汁酸刺激交感和副交感神经的传导性，高浓度胆汁酸则抑制自主神经的传导性，其中石胆酸抑制作用最强，胆酸和脱氧胆酸抑制作用较弱[9]。Yun 等[10]的研究发现，慢性交感神经活动异常可能增加突发性的致死性心律失常的危险性。许多研究发现，心脏自主神经系统功能失衡，尤其交感神经活动增加和迷走神经活动减弱，与心律失常和猝死的发生有着密切关系[11,12]。

妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)胎儿突然死亡的原因至今仍然是一个谜。我们的研究结果目前国内外文献上还未见报道。根据本项研究结果，作者推测，ICP 时胎儿猝死可能与高水平胆汁酸诱导胎儿心律失常有关。这一假说尚需要更多的研究尤其临床研究工作证实。我们的后续研究将对胎儿心律失常的发生机制进行更深入的探讨。

参 考 文 献

[1] Fagan EA.Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J].Clin Liver Dis, 1999;3(3): 603–632.

[2] Brites D, Rodrigues CMP, Oliveira N, et al. Correction of maternal serum bile acid profile during ursodeoxycholic acid therapy in cholestasis of pregnancy[J]. J Hepatology, 1998;28: 91–98.

[3] Williamson C, Gorelik J, Eaton BM, et al. The bile acid taurochlate impairs rat cardiomyocyte function: a proposed mechanism for intra–uterine fetal death in obstetric cholestasis [J]. Clin Sci, 2001;100(4): 363–369.

[4] Gorelik J,Harding SE, Shevchuk AI, et al. Taurocholate induces changes in rat cardiomyocyte contraction and calcium dynamics[J]. Clin Sci, 2002;103(2): 191–200.

[5] Gorelik J, Shevchuk AI, Diakonov I, et al. Dexamethasone and ursodeoxycholic acid protect against the arrhythmogenic effect of taurocholate in an in vitro study of rat cardiomyocytes[J]. Br J Obs Gyn, 2003;110 (5): 467–474.

[6] 王智彪，陆 杰，顾美礼，等. 超声波抗早孕的动物实验研究Ⅰ.宫内胚胎心电图：一种能反映胚胎急性损伤效应的动物模型[J]. 中国超声医学杂志，1995;11(2):107–110.

[7] Alonso J, Rioseco, Milenko B, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: A retrospective case–control study of perinatal outcome[J]. Am J Obstet Gynecol, 1994;170:890–895.

[8] Londero F, San Marco L. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Are we really able to predict fetal outcome [J]? Am J Obstet Gynecol, 1997;1274.

[9] Radymska–Wawrzyniak K, Szember–Nyrka B, Rybka A. Effect of the bile and bile acids on the motility of the innervated rabbit colon [J]. Pol Arch Weter, 1987;27(4):85–98.

[10] Yun AJ, Lee PY. Sudden death among infants and adults: companion disorders of maladaptive sympathetic bias [J]. Med Hypotheses,2004;62(6):857–860.

[11] Sztajzel J. Heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system [J].Swiss Med Wkly, 2004;134(35–36): 514–522.

[12] Lehnart SE, Wehrens XH, Laitinen PJ, et al. Sud– den death in familial polymorphic ventricular tachycardia associated with calcium release channel (ryanodine receptor) leak[J]. Circulation, 2004;109(25):3208–3214.

（上接第 182 页）

hibitory signal produced by unattached kinetochores [J]. J. Cell Biol, 1995;130: 941–948.

[2] Deantoni A, Sala V, Musacchio A, et al. Explaining the oligomerization properties of the spindle assembly checkpoint protein Mad2 [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005; 360 (1455):637–648.

[3] Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, et al . Differential expression of the MAD2, BUB1 and HSP27 genes in Barrett′ s oesophagus–their association with aneuploidy and neoplastic progression [J]. Mutat Res, 2004;547(1–2):133–144.

[4] Vigneron S, Prieto S, Bernis C, et al. (2004) Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom [J] ? Mol Biol Cell, 2004;15(10):4584–4596.

[5] Johnson VL, Scott MI, Holt SV, et al. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp–E, Cenp–F and Mad2, and chromosome congression [J]. J Cell Sci, 2004;117(8):1577–1589.

[6] Takanori Y, Naoya S, Nobuyuki E, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector–derived small interfering RNAs [J]. EMBO J, 2003;4(6): 602–608.

[7] Sharookh BK, Amy BA, Francis VC. Interference of hepatitis C virus replication by short interfering RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 18(4): 2014–2018.

[8] Seo MY, Abrignani S, Houghton M, et al. Small interfering RNA–mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell [J]. J Virol, 2003; 77: 810–812.

[9] Clearance of replicating hepatitis C virus replicon *RNAs in* cell culture by small interfering RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 100:235–240.