

胶质细胞源性神经营养因子基因真核荧光表达载体的构建

陈传好, 赵 莉, 单增强, 王小标

[摘要]目的: 构建可在真核细胞中表达胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line derived neurotrophic growth factor GDNF) 的荧光表达载体。方法: 采用聚合酶链反应 (PCR) 扩增 GDNF 基因, 将 GDNF DNA 克隆到 pEGFP-N₁ 质粒, 通过抗性基因筛选阳性克隆, 经酶切和测序鉴定。结果: 酶切和 DNA 序列鉴定均证实插入片段与 Genebank 报道的 GDNF 基因序列一致。结论: 成功构建了 GDNF 荧光真核表达载体, 为从分子水平开展 GDNF 转基因相关研究奠定了基础。

[关键词] 神经营养因子; 荧光真核表达载体

[中国图书资料分类法分类号] Q 426 [文献标识码] A

Construction of glial cell line derived neurotrophic growth factor gene fluorescent eukaryotic cell expression vector

CHEN Chuan hao ZHAO Li SHAN Zeng qiang WANG X iao biao
(Department of Anatomy, Bengbu Medical College Bengbu 233030 China)

[Abstract] **Objective** To construct glial cell line derived neurotrophic growth factor (GDNF) gene fluorescent eukaryotic expression plasmid. **Methods** The coding sequence of GDNF was amplified by PCR, the GDNF gene was cloned into plasmid pEGFP-N₁, and the recombinant vector was selected and identified by restriction enzyme analysis and nucleotide sequence determination. **Results** Correct construction of pEGFP-N₁-GDNF was identified by methods of restriction enzyme analysis and nucleotide sequence determination. **Conclusion** An eukaryotic expression plasmid pEGFP-N₁-GDNF has been constructed successfully which will provide the basis for studying the gene of GDNF.

[Key words] neurotrophic growth factor fluorescent eukaryotic cell expression vector

神经元在生长发育和受损后存活主要依赖于多种神经营养因子的作用。胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line derived neurotrophic growth factor GDNF) 是 Lin 等 1993 年发现的, 属于转化生长因子-β 超家族成员。大量研究表明, GDNF 不仅作用于多巴胺神经元, 而且对周围神经系统运动神经元和感觉神经元的发育、存活和再生有促进作用, 是神经系统最为重要的生物活性分子之一^[1~4]。本试验采用分子生物学技术构建 GDNF 的真核荧光表达载体, 以期为进一步开展 GDNF 转基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 鼠 GDNF cDNA 由南方医科大学蒋立新博士惠赠, pEGFP-N₁ 真核表达载体为德国 QIAGEN 公司产品, 脂质体、HindIII 和 SacII 内切酶购自 Promega 公司。大肠埃希菌 DH5α 由本室保存, 质粒提取试剂盒、低熔点胶购自上海生工公司, 其它试剂为国产分析醇。

[收稿日期] 2005-08-15

[基金项目] 安徽省教育厅重点科学研究资助项目 (2000JL165zd)

[作者单位] 蚌埠医学院 人体解剖学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 陈传好 (1971-), 男, 硕士, 副教授。

[通讯作者] 赵 莉, 教授, 硕士生导师。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 人工合成两条引物, 引入酶切位点。Primer A: 5'-ACG AAG CTT ATG AAG TTA TGG GAT GTC GTG-3'; Primer B: 5'-ATA CCG CGG GAT ACA TCC ACA CCG TTT AG-3'。引物合成由上海申友公司合成。

1.2.2 PCR 法扩增目的基因 (1) 在一个 0.5 ml 的 EP 管内建立如下反应体系: 1 μl 130 pmol/L 正向引物, 1 μl 130 pmol/L 反向引物, 1 μl 模板 DNA, 1 μl 14dNTP (10 mmol/L), 0.5 μl Taq DNA 聚合酶 (5 u μl), 5 μl 10×buffer 3 μl MgCl₂ (25 mmol/L), 最后补消毒去离子水至 50 μl 覆盖石蜡油。(2) PCR 仪扩增目的基因, 条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 54℃ 35 s, 72℃ 45 s, 30 次循环后, 再 72℃ 延伸 5 min。(3) 取 5 μl PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。(4) PCR 反应产物经低熔点胶电泳回收, 常规正丁醇浓缩, 酚 氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, 将沉淀用适当水溶解, 置于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 克隆 PCR 产物 (1) PCR 产物 6 μl pEGFP-N₁ 载体 2.5 μl 连接酶缓冲液 1 μl T4 连接酶 0.5 μl 在 16℃ 孵育 8 h。(2) 连接产物转化: 用 CaCl₂ 法制感受态 *E. coli* DH5α 细胞, 并将转化菌涂布在表面涂有 X-gal 和 IPTG 的 Kan 琼脂平板上进行培养, 37℃ 倒置过夜, 筛选阳性克隆至 3 ml 卡

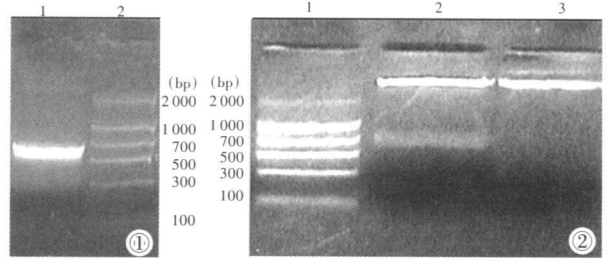
那抗性的 LB 培养基中, 在 37℃ 恒温振荡器以 250 r/min 培养过夜。

1.2.4 克隆基因鉴定 (1)采用碱裂解法少量提取质粒; (2)利用 pEGFP-N₁载体的 HindIII和 SacII 的酶切位点进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定克隆基因大小; (3)克隆基因测序(上海申友公司检测)。

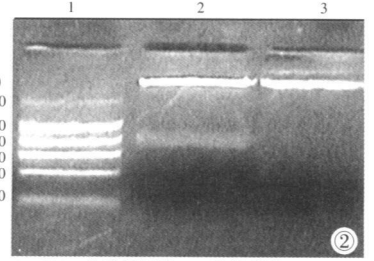
2 结果

2.1 PCR 产物鉴定 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并以标准 DNA 分子量作对照, 可见 PCR 产物约 700 bp 电泳条带(见图 1), 与预计值相符。

2.2 PCR 产物克隆结果 将重组质粒 pEGFP-N₁-GDNF 作双酶切(HindIII+ SacII)后, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示(见图 2), 可获得一个分子量与 PCR 产物一致的 DNA 片段, 实际值与理论值一致。



1. PCR 产物
2. DNA 分子量标准



1. DNA 分子量标准; 2. 重组质粒 pEGFP-N₁-GDNF 作双酶切(Hind III + Sac II)
3. 重组质粒 pEGFP-N₁-GDNF

图 1 PCR 产物电泳图谱 图 2 重组质粒 pEGFP-N₁-GDNF 作双酶切(Hind III + Sac II)电泳图谱

2.3 GDNF 克隆片段测序结果 对本实验扩增得到的 GDNF 基因开放阅读框进行的核苷酸序列测定结果与 GenBank 收录的 GDNF 蛋白编码基因同源性达 100% (见图 3)。

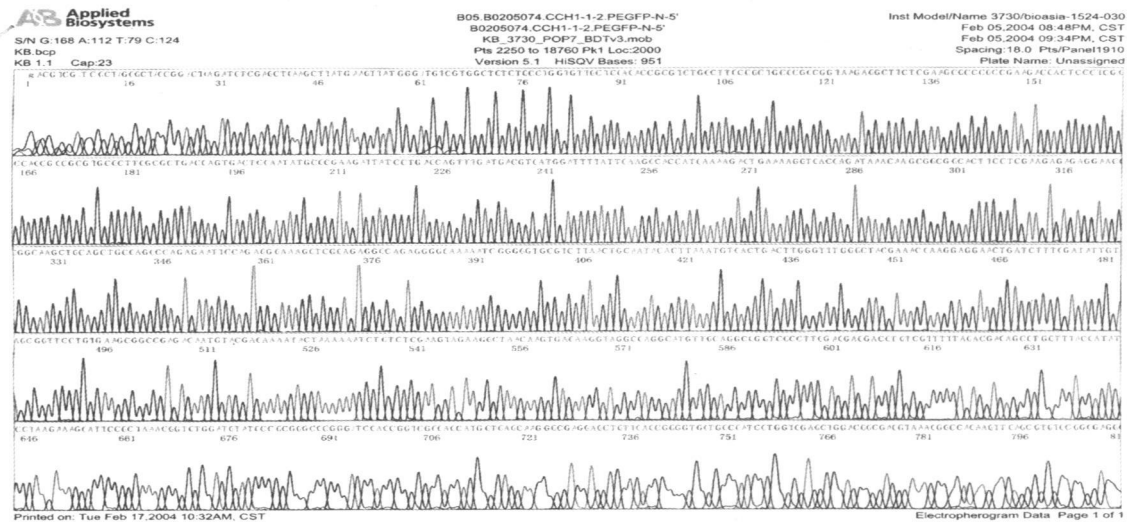


图 3 GDNF 克隆片段测序

3 讨论

胶质细胞源性神经营养因子是目前发现的活性最强的神经营养因子之一^[5], 在人和鼠的许多外周组织都有 GDNF mRNA 的表达。GDNF 的广泛表达提示它可能具有广泛的生物学作用。为此, 本实验采用分子生物学技术构建了重组质粒 pEGFP-GDNF 在体表达载体, 将重组质粒 pEGFP-GDNF 双酶切后, 可获得一大小约为 700 bp 片断, 与预期结果一致, 并通过测序验证 GDNF 基因被正向连入真核表达载体 pEGFP 中, 表明成功地构建 GDNF 荧光真核表达载体, 使 GDNF 基因在 CMV 启动子控制下表达。将 GFP 基因融合在 GDNF 基因的 5 端, 并且两者之间以编码柔软肽段的核苷酸连接, 而 GDNF 的 N 末端氨基酸残基对其生物活性的影响不大, 这样既保持 GFP 与 GDNF 各自的活性, 又保留了 GDNF

蛋白的神经营养活性, 还可以通过 GFP 间接观察 GDNF 蛋白在体内的表达。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein GFP) 是从一种能自体发光的水母 Aequorea victoria 中分离出来的蛋白质, 它能够在紫外线的激发下发出明亮的绿色荧光。在 1992 年克隆了它的基因后, 人们对该蛋白的特性和基因进行了深入的研究和改造, 使 GFP 得以作为一种新型的报告基因加以利用^[6]。与以往常用的报告基因相比, GFP 具有以下优点: (1)在荧光显微镜下, 用波长约 490 nm 的紫外线激发后, 即可观察到增强绿色荧光, 直接、简捷, 便于检测。(2)无需任何的作用底物。检测的灵敏度不受反应效率的影响, 保证了极高的检出率。(3)蛋白本身性质稳定。(4)可在多种异源生物中表达且无细胞毒性。我们构建的 GDNF 荧光真核表达载体, 能否在真核细胞中成功地表达完整、正确及有功能的 GDNF 蛋白, 仍有待进一步研究。

三羟异黄酮抑制黑色素瘤 B₁₆ 细胞增殖作用的机制研究

江城梅¹, 赵文红¹, 孟 灿¹, 吕合作²

[摘要]目的: 研究三羟异黄酮抑制黑色素瘤 B₁₆细胞增殖作用的分子机制。方法: 以 4', 5', 7-三羟异黄酮处理黑色素瘤 B₁₆细胞 1~4天后, 以生长曲线反映其增殖活力, 以 B₁₆细胞形态、黑色素含量及以流式细胞仪检测细胞周期变化等观察三羟异黄酮对黑色素瘤 B₁₆细胞的抑制增殖作用。结果: 用 10, 30, 90 μmol/L 的三羟异黄酮作用肿瘤细胞均有不同程度的抑瘤作用 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。表现为黑色素生成能力增加, 细胞生长缓慢, 可使 B₁₆细胞阻断在 S期。结论: 三羟异黄酮不同剂量对体外黑色素瘤 B₁₆细胞增殖有明显的抑制作用。

[关键词] 黑色素瘤; 三羟异黄酮; 黑色素瘤 B₁₆细胞; 细胞增殖; 细胞株

[中国图书资料分类法分类号] R 739.5 R 977.29 [文献标识码] A

Differentiation of B₁₆ melanoma cells induced by genistein

JIANG Cheng mei¹, ZHAO Wen hong¹, MENG Can¹, LYU He zuo²

(1. Department of Nutrition and Food Hygiene, 2. Center of Immunity, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effects of Genistein on the proliferation of B₁₆ melanoma cells. **Methods** B₁₆ melanoma cells were treated with 10, 30, 90 μmol/L Genistein for 1-4 days. Growth curve test was served as the index to reflect proliferation activity of B₁₆ melanoma cells. Morphological changes of B₁₆ melanoma cells, melanin content in the supernatant of melanoma cells, distribution of cell cycle were measured by Flow Cytometry. **Results** The Genistein at the concentration of 10, 30, 90 μmol/L inhibited significantly the growth of B₁₆ melanoma cells in dose dependent manner with statistical significance ($P < 0.05 \sim P < 0.01$ vs control). Interestingly Genistein induced the differentiation of B₁₆ melanoma cells which showed that melanin granule and number of cells decreased. Flow cytometry showed that numerous cells were retarded at S phase of cell cycle. **Conclusions** The Genistein at the dose of 10, 30, 90 μmol/L significantly inhibit the growth of B₁₆ cells.

[Key words] melanoma; genistein; B₁₆ melanoma cells; cell proliferation; cell line

三羟异黄酮 (genistein) 是大豆中一种主要生物类黄酮, 大豆经加工、微生物发酵或体外酶水解作用, 释放出游离形式的三羟异黄酮 (金雀异黄素, genistein) 和二羟异黄酮 (黄豆苷元, daidzein), 这两种形式的异黄酮可被肠道有效吸收。研究发现其具有明显的防治肿瘤作用, 对乳腺癌、胃癌、肝癌、白血病及其它一些癌细胞系的生长、增殖具有抑制作用^[1], 是癌症天然的化学预防剂。但三羟异黄酮对

黑色素瘤细胞是否有作用尚未见报道。本文通过体外细胞研究观察三羟异黄酮抑制黑色素瘤 B₁₆细胞的增殖作用并探讨其可能作用机制, 为食品药品开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 黑色素瘤 B₁₆细胞系中国科学院上海细胞生物研究所引进, 培养在含 10% 小牛血清 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素 RPMI 1640 培养基中, 置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养, 用 0.25% 胰酶消化传代, 每 2 天传代一次。

[参 考 文 献]

- [1] Lin LF, Doherty DH, Lik JD, *et al*. GDNF: A glial cell line derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science* 1993; 260(5111): 1130-1132
- [2] Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, *et al*. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease [J]. *Science* 2000; 290(5492): 767-773
- [3] Akenid B, Canals JM, Snyder EY, *et al*. Neuroprotection through delivery of glial cell line derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Neurosci* 2001; 21(20): 8108-8118
- [4] Bilak MM, Shifrin DA, Coose AM, *et al*. Neuroprotective utility and neurotrophic action of neurotin in postnatal motor neurons [J]. *Mol Cell Neurosci* 1999; 13(5): 326-336
- [5] Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, *et al*. GDNF: A potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle [J]. *Science* 1994; 266(5187): 1062-1064
- [6] Prasher DG, Eckenrode VK, Ward WW, *et al*. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein [J]. *Gene* 1992; 111(2): 229-233

[收稿日期] 2005-06-24

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 营养与食品卫生学教研室, 2. 免疫实验中心, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 江城梅 (1955-), 女, 教授, 研究方向: 营养毒理学。