

bcl-2 基因克隆、转染及其在 PC12 细胞中的表达

吴永青¹, 刘彦文², 邱鹏新³, 葛 坚¹

(中山医科大学 1. 中山眼科中心; 2. 实验动物中心; 3. 药理教研室, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】研究 bcl-2 基因(*bcl-2*)在 PC12 细胞中的表达。【方法】构建真核表达载体 pcDNA3-bcl-2, 采用脂质体介导将重组质粒导入 PC12 细胞, Western blot 和原位免疫组化检测外源基因表达。【结果】本实验成功构建了真核表达载体 pcDNA3-bcl-2 并用脂质体介导的方法获得了稳定表达 *bcl-2* 的细胞克隆; Western blot 显示有 26 ku 的蛋白质表达, *bcl-2* 单克隆抗体免疫组化染色呈阳性反应。【结论】重组质粒 pcDNA3-bcl-2 经转染能够在 PC12 细胞中有效表达, 为进一步研究 *bcl-2* 对 PC12 细胞的生物学功能奠定了基础。

关键词: DNA, 重组; 质粒 pcDNA3-bcl-2; PC12 细胞; 转染; 基因表达

中图分类号: R322.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)02-0099-04

Study on the Expression of bcl-2 Gene in PC12 Cells by Cloning and Transfection WU Yong-qing¹, LIU Yan-wen², QIU Peng-xin³, GE Jian¹. (1. Zhongshan Ophthalmic Center, 2. Experimental Animal Center, 3. Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To investigate the expression of bcl-2 gene (*bcl-2*) in PC12 cell line.【Methods】The recombinant expression plasmid pcDNA3-bcl-2 was constructed from pSFFV-bcl-2, then it was introduced into PC12 cell line by liposome method. Western blotting and immunohistochemistry *in situ* were applied to exam the exogenous gene expression.【Results】The recombinant expression plasmid pcDNA3-bcl-2 was constructed successfully. In PC12 cell line transfected by the plasmid, 26 ku protein was expressed by Western-Blot test and immunoreactivity of cells were shown by immunohistochemical staining.【Conclusion】*bcl-2* can be expressed effectively in PC12 cell lines transfected by recombinant plasmid pcDNA3-bcl-2. The success of this research provides us with the basis for further study on the *bcl-2* function in PC12 cell line.

Key words: DNA, recombinant; plasmid pcDNA3-bcl-2; PC12 cell line; transfection; gene expression

神经系统退行性病变目前被认为是基因失控引起, 从基因水平进行研究是治疗研究的一个合理方向。*bcl-2* 是细胞功能重要的调控基因, 作用于细胞的发育、分化、增殖, 存活及死亡等过程^[1]。有研究表明, *bcl-2* 不仅能够促进神经元存活甚至能够促进神经再生^[2]。所以本文选择 *bcl-2* 为目的基因, 构建了高效表达的真核表达载体 pcDNA3-bcl-2, 通过基因转染分析了其在 PC12 细胞中的蛋白表达。PC12 为嗜铬细胞瘤来源的神经元细胞系, 是广泛用来研究神经元发育和功能的组织培养模型, 这样就为进一步研究 *bcl-2* 对神经元的功能, 进而为基因治疗的下一步工作奠定了可靠的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、RNase I、SDS、低熔点琼脂糖、EDTA、EB (Promega 公司); 100 bp DNA marker、胰蛋白酶、酵

母提取物 (Gene 公司); dNTP、DNA 聚合物、RPMI1640、胰酶、马血清、Lipofectin、Geneticin、链霉素、抗生素蛋白-过氧化酶免疫组化染色试剂盒 (Gibco 公司); 胰蛋白酶大豆抑制剂 (Sigma 公司); λDNA/*Hind* II 分子 DNA marker (华美生物工程公司); 质粒提取和纯化试剂盒 (Qiagen 公司)。

1.1.2 引物设计 根据 *bcl-2* cDNA 碱基序列设计合成特异的 PCR 引物 P1 和 P2, 为便于克隆, P1 的 5'端引入了 *Hind* II 酶切位点, P2 的 5'端引入了 *Eco*RI 酶切位点。引物序列如下: 上游引物 P1, 5'-GGAAGCTT ATG GCG CAC GCT GGG AG; 下游引物 P2, 5'-GG GAATTC TCA CTT GTG GCC CAG A。引物由上海生物工程公司合成。

1.1.3 质粒、菌株和细胞 质粒 pcDNA3 由中山医科大学实验动物中心刘彦文博士惠赠。质粒 pSFFV-bcl-2 由中山医科大学生化教研室张清秀博士惠赠。受体菌株大肠杆菌 (*E. coli*) TG1 基因型: SupE hsdΔ 5 thiΔ (Lac-proAB) F' [tra D36

收稿日期: 2001-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770789)

作者简介: 吴永青(1967-), 女, 安徽滁县人, 博士, 现在南京大学医学院附属鼓楼医院眼科(210008); 葛坚, 教授, 博士生导师, 通讯作者。

ProAB⁺ lacI^q LacZ Δ M15]。PC12 细胞株由中山医科大学药理教研室邱鹏新老师惠赠。

1.2 方法

1.2.1 酶切反应及琼脂糖凝胶电泳 限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Hind* III 各 15 U, 酶切缓冲体系为 30 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 2 h。制备 8 g/L 琼脂糖凝胶, 将限制性内切酶消化与标准品 λ DNA/*Hind* III 及 DNA marker 同时上样, 电压 20 V, 电泳时间 3 h。在紫外线下观察电泳结果。

1.2.2 PCR 扩增外源基因 0.5 mL Eppendorf 管中依次加入下列成分, 扩增容积 50 μ L: 10 \times Buffer 5 μ L, 4 \times dNTP (2 mmol/L) 5 μ L, P1、P2 各 1 μ L (各 25 pmol/L), 模板 DNA 0.1 μ g, 双蒸水加至 50 μ L。混匀后, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 加入 Taq 酶 2 U, 液体石蜡油 50 μ L, 整个反应在 DNA 扩增仪 (Hema480 型) 上完成。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min。循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 外源基因的序列测定 按 Sanger 等双脱氧核苷酸末端终止法, 在 ABI PRISM TM 310 测序仪上, 通过 T7 和 SP6 启动子, 引物从两端测定 PCR 产物全长序列。

1.2.4 目的基因的克隆、鉴定及纯化 按《分子克隆实验指南》方法^[3]进行。将目的基因定向克隆到 pcDNA3 的 *Hind* III 和 *Eco*RI 位点, 重组质粒再进行双酶切鉴定和 PCR 验证。用 Qiagen 提取和纯化质粒的试剂盒纯化该重组质粒。

1.2.5 PC12 细胞培养及基因转染 PC12 细胞培养于含 100 mL/L 马血清和 50 mL/L 胎牛血清及 50 kU/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C, 饱和湿度及体积分数 5% CO₂ 和 95% 空气的培养箱中培养。分别将 60 μ g 质粒 pcDNA3-bcl-2 及空质粒 pcDNA3 溶于 300 μ L 无血清培养液制备成溶液 A1 和 A2, 另将 60 μ L Lipofectin 稀释于 240 μ L 无血清培养液制备成溶液 B。混合溶液 A1(A2) 与溶液 B, 室温放置 15 min, 加无血清培养液 2.4 mL。PC12 细胞增长至 70%~80% 密度, 将其制成 10⁸ 细胞/L, 将细胞悬液按 4 mL/孔加入 24 孔培养板, 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO₂ 条件下培养。培养的 PC12 细胞去除培养基, 无血清培养液洗 2 次, 然后分别滴加混合液于上述 24 孔培养板各 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度培养箱培养 48

h。弃上清液, 加含 600 mg/L 的 G418, 进行筛选培养, 获得稳定转化细胞。继续培养至 12 d 时用克隆环挑出 G418 抗性克隆, 扩大培养。

1.2.6 检测培养细胞中 *bcl-2* 表达 Western blot: 用脂质体介导的基因转染将 pcDNA3-bcl-2 和空质粒 pcDNA3 导入 PC12 细胞, 转化后的细胞用 G418 进行选择培养和加压, 再经扩大培养后收集细胞, 进行 SDS-PAGE 分析, 进行 Western blot 反应, 第 1 抗体为鼠抗人 *bcl-2* 单克隆抗体 (Gibco), 工作浓度 1:200, 第 2 抗体为羊抗鼠 IgG 1:200 (华美), 加染交联荧光剂, X 线胶片感光。

原位免疫组化检测重组蛋白表达: 实验的具体方法步骤按链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色试剂盒所附说明书进行。

2 结果

2.1 目的基因鉴定

以 pSFFV-bcl-2 为模板, 用 P1 和 P2 对 *bcl-2* cDNA 读框进行 PCR 扩增, 扩增得到的产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 产生的条带位于对照分子的 700 和 800 bp 两条带之间, 与预期的 720 bp 分子大小一致 (图 1)。PCR 产物经测序得到的序列与文献报道一致^[4]。

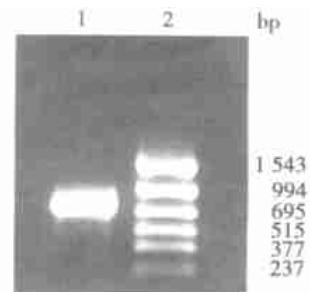


图 1 以 pSFFV-bcl-2 为模板扩增 720 bp DNA 片段

Fig 1 PCR amplification of 720 bp DNA fragment

1: 720 bp fragment; 2: PCR marker

2.2 目的基因的克隆与筛选

将纯化的 PCR 扩增产物定向克隆到 pcDNA3 的 *Eco*RI 和 *Hind* III 位点, 再将重组子转化到大肠杆菌 TG1, 从氨苄西林 LB 平板随机取 20 个菌落, 摇菌扩增重组子 DNA, 酚氯仿抽提及 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳初筛, 有 6 个重组子的 DNA 条带位于空白 pcDNA3 质粒条带的后方。

2.3 重组子鉴定

将初筛到的 6 个重组子摇菌扩增后抽提重组子 DNA, 用 *Eco*RI 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 并以重

组子 DNA 为模板,用 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。该重组子用 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切后产生两条带,大小分别为 5.4 kb 和 720 bp (图 2)。PCR 扩增也显示出特异性扩增条带 (720 bp),证明该重组子确为带有目的基因 *bcl-2* 的重组克隆。

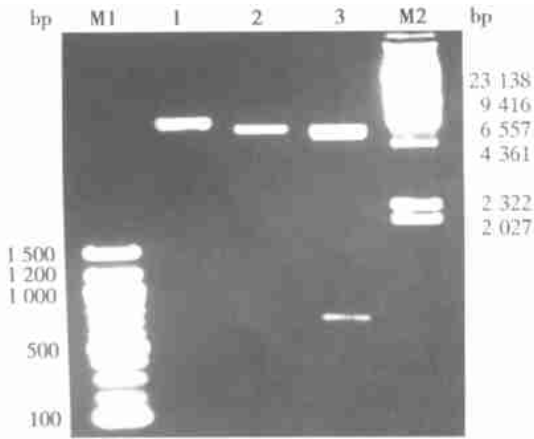


图 2 重组质粒 pcDNA3-*bcl-2* 酶切鉴定

Fig 2 Characterization of pcDNA3-*bcl-2* by restriction enzyme

M1: PCR marker; 1: pcDNA3-*bcl-2*/*EcoRI*; 2: pcDNA3/*EcoRI*; 3: pcDNA3-*bcl-2*/*EcoRI* + *HindIII*; M2: λ *HindIII* molecular standard

2.4 PC12 细胞外源基因表达的检测

2.4.1 Western blot 法 将表达产物进行 SDS-PAGE 后,电转移到硝酸纤膜上进行 Western blot 分析,结果见图 3,转染 pcDNA3-*bcl-2* 的实验组中,在相应位置出现特异性反应条带;而转染空质粒 pcDNA3 的对照组未见条带。

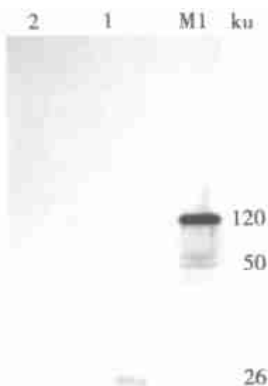


图 3 Western blot 检测 PC12 细胞中 BCL-2 蛋白表达

Fig. 3 Analysis of BCL-2 protein in retinal neurons by Western blot

M1: protein marker; 1: PC12 cells transfected by pcDNA3-*bcl-2*; 2: PC12 cells transfected by pcDNA3

2.4.2 免疫组化法 用脂质体 Lipofectin 介导将重组质粒 pcDNA3-*bcl-2* 及空质粒 pcDNA3 转染到

PC12 细胞,通过 G418 筛选培养获得细胞克隆,用 *bcl-2* 单克隆抗体对该细胞进行免疫组化染色,显示前者所有细胞均染呈棕色,而后者及未转染的对照组未见有染色阳性的细胞。

3 讨论

青光眼及视网膜视神经损害的治疗是临床上至今还无法解决的难题,基因治疗作为一种根本的治疗手段,为该问题的解决带了希望。在国内,青光眼等病的基因治疗研究几乎还没开展。神经细胞凋亡及相关研究^[5,6] 揭示了这类疾病的发生与细胞凋亡有关,而 *bcl-2* 具有明确的抗细胞凋亡作用,因此,选择 *bcl-2* 作为目的基因进行基因治疗研究有着可靠的基础。

真核表达载体 pSFFV-neo 全长 7227 bp,其宿主范围广,实验中酶切鉴定 pSFFV-*bcl-2* 时发现目的基因含量非常少,故选择 pcDNA3 重组真核表达载体质粒。pcDNA3 作为载体有其独特的优点,它具有松弛型复制子 COIE1 和丝状噬菌体复制起始位点 fl。在复制子以外存在几个单一内切酶位点,便于外源基因插入。pcDNA3 上还存在可供选择的多克隆位点,为外源基因的插入提供了方便。另外,其多克隆位点附近带有来源 T7 和 SP6 噬菌体的启动子,为外源基因的转录和翻译研究提供了便捷的工具。

外源基因在真核细胞中的高效表达受多方面因素的影响如基因拷贝数,增强子或启动子强度,转录高效性以及蛋白质加工等。真核表达载体 pcDNA3 在目的基因上游以 hCMV 强启动子作为基因高水平转录的顺式调控元件,具有转染多种哺乳类细胞的通用性^[7],在多种细胞的组织中均有很强活性,可望通过它为研究目的基因的真核表达调控,阐明目的基因调节神经元的分子机制奠定工作基础。

PC12 细胞是目前广泛用来研究神经元的发育和功能的一种组织培养模型。PC12 细胞上除有 TrkB 受体和 P75^{LNTFR} 外,还能表达两类钙通道: L 型和 N 型,同时具有两类敏感型钙池: caffeine 敏感型和 IP3 敏感型^[8]。不仅可用于研究神经细胞分化、离子通道、受体、递质分泌,也可用于研究神经毒性作用。由于 PC12 细胞增殖,可产生和挑选出缺乏特异性质的突变亚克隆,进而可用于评价特殊基因产物的功能和用于对参与调节复杂神经元功

能的不同成分进行基因分析。

本文采用脂质体转染法,将 pcDNA3-bcl-2 质粒导入体外培养的 PC12 细胞,培养 48 h 后,用含有 G418 的完全培养基筛选,继续培养至 12 d 时用克隆环挑出 G418 抗性克隆,扩大培养进行鉴定。转染后的 PC12-bcl-2 细胞经 Western blot 检测发现有 26 ku 的蛋白表达,而 PC12 细胞中没有检测到该蛋白表达,原位免疫组化实验也证实了这点。脂质体转染法是基于带正电荷的脂质体可与带负电荷的哺乳动物 DNA 结合,在靠近细胞膜时与膜融合,从而将 DNA 释放到细胞浆中。实验发现该方法简单、稳定、重复性好。

pcDNA3-bcl-2 的成功构建,并通过脂质体转染 PC12 细胞获得了稳定有效表达 *bcl-2* 的细胞克隆,这样不仅能够研究 BCL-2 蛋白对神经元的作用,而且对探索神经元的生命调控具有重要意义,为进一步针对各类神经损害和神经退行性疾病的基因治疗工作奠定必要的实验基础。

参考文献:

[1] Tsujimoto Y, Croce C. Cloning of chromosome breakpoint of neo-

plastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation [J]. Science, 1984, 226(4687): 1097.

- [2] Chen D, Schneider G E, Martinou J C, *et al.* Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS [J]. Nature, 1997, 385(30): 434.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995. 880~897.
- [4] Seto M, Jaeger U, Hockett R D, *et al.* Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma [J]. EMBO, 1988, 7(1): 123.
- [5] 蔡翔, 邱鹏新, 苏兴文, 等. 海洋鲎体 YC-1 抑制低钾诱导大鼠小脑颗粒神经元的凋亡 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 3(21): 161.
- [6] 黎明涛, 王文雅, 孙娟, 等. p38MAPK 抑制剂通过抑制 JNK 活性抑制培养的小脑颗粒细胞凋亡 [J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(3): 165.
- [7] Chen L, Ziegelhoffer P R, Yang N S, *et al.* In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(10): 4455.
- [8] Starikova A M, Chvanov M A, Pogorelaya N C, *et al.* Nifedipine-induced morphological differentiation of rat pheochromocytoma cells [J]. Neuroscience, 1998, 86(2): 611.

(编辑 刘清海)

(上接第 98 页 from page 98)

3.3 不同性状不同剂量反应的临床意义

有研究表明,在出现放射性骨坏死的区域,仍能见到细胞的形态,但细胞的数目、活力、形态等生物学性状与正常状态的细胞均有差异^[10]。这说明此时细胞出现了辐射损伤,处于一种增殖状况受损的潜在的死亡状态。因此,在增殖能力丧失状态下即可发生骨坏死。

然而在临床上,虽然最终仍会出现骨髓炎,但放疗后患者可以长期处于无变化、症状轻微的稳定状态。对此,本研究认为,ROB 的功能和分化对辐射的敏感性较低,所以在细胞出现增殖性死亡的情况下,功能与分化的损伤仍可能较弱,这有可能使这种坏死延期发生,但由于缺乏细胞增殖与替换,坏死虽然延期但仍不可避免,且延期时间的长短取决于功能、分化损伤的程度。

参考文献:

[1] Epstein J B, Wong F L W, Stevenson-moore P, *et al.* Osteoradionecrosis: clinical experience and a proposal for classification [J]. J Oral Maxillofac Surg, 1987, 45(2): 104.

[2] 陈伟良, 陈小华, 林承光, 等. 高压氧预防颌骨放射性骨坏死

的病理学观察 [J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(4): 301.

- [3] Partidge N C, Alcorn D, Michelangeli V P, *et al.* Functional properties of hormonally responsive cultured normal and malignant rat osteoblastic cells [J]. Endocrinology, 1981, 108(1): 213.
- [4] Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, *et al.* Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells [J]. J Dent Res, 1997, 76(2): 658.
- [5] Moraes S, Sousa J P, Fernandes M H, *et al.* In vitro biomineralization by osteoblast-like cells I retardation of tissue mineralization by metal [J]. Biomaterials, 1998, 19(1-3): 13.
- [6] Collin P, Nefussi J R, Wetterwald A, *et al.* Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture [J]. Calcif Tissue Int, 1992, 50(2): 175.
- [7] 金慰芳, 朱文菁, 王洪复, 等. ¹³⁷Cs γ 射线照射建立成骨细胞衰老模型的研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 1996, 16(3): 164.
- [8] Matsumura S, Hiranuma H, Deguchi A, *et al.* Changes in phenotypic expression of osteoblasts after X irradiation [J]. Radiat Res, 1998, 149(5): 463.
- [9] 张晓铀, 汪恭质, 丁柏, 等. 模拟失重和辐照对大鼠心肌细胞和成骨细胞的影响 [J]. 航天医学与医学工程, 1998, 11(5): 313.
- [10] 孙勇刚, 孙开华, 王光和, 等. 颌骨及颌周软组织放射性损害的超微结构观察 [J]. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(31): 147.

(编辑 刘清海)