

• 实验研究 •

PC12-Mint2 基因工程细胞株的构建

Establishment of gene-engineered PC12-Mint2 cell line

张 骐,张 勇,曹 莉,刘 翔,矫 力,何 成*

(第二军医大学基础医学部神经生物学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**构建稳定表达 Mint2 蛋白的 PC12-Mint2 基因工程细胞株。**方法:**用 PCR 方法将 Mint2 基因亚克隆至真核表达载体 pcDNA3.1A,构建真核表达质粒 pcDNA3.1A-Mint2;采用脂质体 Lipofectamine2000 介导,将重组载体转染入 PC12 细胞,G418 筛选抗性克隆,有血清培养并传代具有 G418 抗性的细胞,数代培养后获得工程细胞株;分别提取野生型 PC12 细胞和 PC12-Mint2 工程细胞的 mRNA 及细胞裂解液,RT-PCR 方法检测 Mint2 基因是否整合入 PC12 细胞基因组,并用 Western 印迹法检测外源基因 Mint2 在 PC12-Mint2 工程细胞中是否正常表达。**结果:**扩增出的基因片段大小为 2 253 bp;pcDNA3.1A-Mint2 重组质粒酶切结果表明 Mint2 基因正确地插入到 pcDNA3.1A 载体中,测序结果正确;将 pcDNA3.1A-Mint2 转染 PC12 细胞,经 G418 筛选获得 PC12-Mint2 工程细胞株;RT-PCR 结果表明 Mint2 基因已整合入 PC12 细胞,Western 印迹结果显示在 120 000 处有特异条带,大小与 Mint2 蛋白理论计算值一致,表明在 PC12-Mint2 基因工程细胞中确实有 Mint2 蛋白表达。**结论:**本试验成功构建了真核表达质粒 pcDNA3.1-Mint2,并获得了稳定表达 Mint2 蛋白的 PC12-Mint2 基因工程细胞株,为进一步研究 Mint2 生物学功能及其作用机制奠定了基础。

[关键词] 基因亚克隆;Mint2;PC12 细胞;转染;Western 印迹法

[中图分类号] Q 813.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0214-03

Mints 家族是一个新的接头分子家族,由 3 个成员 Mint1(X11)、Mint2(X11L)、Mint3(X11L2)组成,其中 Mint1、Mint2 在脑中呈特异性分布^[1]。研究报道 Mint1、Mint2 蛋白在神经突触囊泡的运输与释放的过程中发挥重要作用^[2],同时亦参与阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)中 β-淀粉样前体蛋白的代谢^[3],在 AD 发病机制中具有重要作用。然而对于 Mints 在胞内确切的分子间相互作用、信号转导途径以及对功能的影响还缺乏深入的了解。为此我们拟构建能够稳定表达 Mint2 的 PC12 工程细胞株,为进一步研究 Mint2 生理功能的细胞模型。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒、细胞及试剂 大肠杆菌 TG1、pBlue-scriptSK(+),质粒 pCMV-Mint2、pcDNA3.1A、PC12 细胞均由本实验室保存。G418、质粒抽提和胶回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品;Pyrobest DNA 聚合酶、逆转录酶为 TaKaRa 公司产品;限制性核酸内切酶、T₄ DNA 连接酶为 MBI 公司产品;DNA marker 为 TaKaRa 公司的 DL2000;Lipofectamine2000 转染试剂为 Gibco BRL 公司产品;TRIzol 试剂购自 Promega 公司;预染彩色蛋白 marker、Western 印迹检测用 ECL 试剂购自 PIERCE 公司;anti-Mint2 小鼠多抗、山羊抗小鼠的 HRP 偶联二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 PCR 扩增 引物设计参考 GenBank(AF029107)序列及表达载体 pcDNA3.1A 多克隆位点,应用 DNASTAR 软件设计,并由上海申友公司合成。上游引物 1 含 BamH I 位点:5'-GC G GAT TC A TGG CCC ACC GCA AGC GCC AGA GCA CT-3';下游引物 2 含 Hind III 位点:5'-GG A AGC TT C TAG ATG TAC AGC GGT GTC TCC TGG CC-3'。取 pCMV-Mint2 质粒 2.0 μl 为模板,按常规 PCR 反应条件,

先将样品于 94℃ 变性 5 min,加入 1 μl Pyrobest DNA 聚合酶,按下列参数循环 30 次:94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,最后 1 个循环后,72℃ 延伸 10 min。pcDNA3.1A 空载体为阴性对照。

1.3 真核表达质粒 pcDNA3.1A-Mint2 的构建 将 PCR 产物与 pBSK(+)质粒连接,转化大肠杆菌 TG1,挑白斑抽提质粒,送中友公司测序。把测序正确的质粒用 BamH I 和 Hind III 双酶切,胶回收后与先经 BamH I 和 Hind III 双酶切的表达载体 pcDNA3.1A 相连接,构建 pcDNA3.1A-Mint2 表达质粒,该质粒再经 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定。

1.4 PC12-Mint2 工程细胞的构建 PC12 细胞培养在事先用 poly-L-lysine 包被好的细胞培养瓶中,培养基为 DMEM 含 5% 胎牛血清和 5% 马血清,37℃、5% CO₂ 培养,每周更换培养基 2 次。收获对数中期细胞,调整细胞密度为 1×10⁵/ml,取 2 ml 种植于直径为 35 mm 塑料培养皿。1 d 后,细胞生长达培养皿底面积的 60%~80%。取 1 只无菌的 Eppendoff 管,加入无血清 DMEM 培养液 100 μl,再逐滴滴入 Lipofectamine2000 转染试剂 3 μl(注意不要碰管壁),最后将质粒 pcDNA3.1A-Mint2 1 μg 溶于以上 Eppendoff 管中;轻轻混匀,37℃ 孵育 30 min 后,分别逐滴加入培养皿中。于 5% CO₂ 孵育箱 37℃ 孵育 48~72 h,换含 5% 马血清和 5% 胎牛血清的新鲜 DMEM,并加 G418(1 000 μg/ml)进行筛选。筛选浓度依空白对照实验(对照实验可同时进行,细胞

[基金项目] 国家自然科学基金(30070167,30325022,30400123);国家重点基础研究规划("973"计划)课题(2002CB713808);教育部跨世纪优秀人才培养计划。

[作者简介] 张 骐(1970-),男(汉族),硕士。

* Corresponding author. E-mail:chenghe@online.sh.cn

种植密度、转染试剂作用时间及筛选浓度等条件完全相同,但转染时不加质粒)。阴性对照实验只转染 pcDNA3.1A 空载体。待空白对照组细胞完全杀死后,G418 浓度降至 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 形成持续筛选压力。约 10~20 d 后可见抗性克隆形成并增大,用吸管将单个克隆挑至培养瓶,继续筛选扩增。单克隆长满一瓶,以 1:10 传代备用。构建稳定 PC12-Mint2 基因工程细胞株。为明确转入 PC12 细胞中的 Mint2 基因是否有蛋白表达,我们对经数代培养后的 PC12-Mint2 工程细胞进行了 Western 印迹检测。

1.5 RT-PCR 对筛选获得的基因工程细胞(PC12-Mint2)及野生型 PC12 细胞,利用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,分别以此为模板进行 RT-PCR 反应,采取的引物是应用 DNASTAR 软件设计的特异对应于 Mint2 内 450 bp 的引物(上游引物 3:5'-GTC CTA TCC CCC ATG ACC AGG ACG CTG AGA ATG-3',下游引物 4:5'-CAT CCT CTG GGA TAG GCA GGT GGC TGT CTG GAT-3')。取逆转录产物 2.0 μl 为模板,按常规 PCR 反应条件,先将样品于 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,加入 1 μl Taq DNA 聚合酶,按下列参数循环 30 次:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,最后 1 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。阳性对照以 pcDNA3.1A-Mint2 质粒为模板进行 PCR 反应。

1.6 Western 印迹 培养细胞量至约 $(2\sim 5)\times 10^7$ 个时,用 2 ml 预冷的 RIPA 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaF, 0.02% NaN_3 , 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L Na_3VO_4 , 60 mmol/L β -octylglucoside)在冰上裂解细胞 20 min;行 SDS-PAGE 电泳;4 $^{\circ}\text{C}$ 100 V 转膜 1 h,整张硝酸纤维素膜的相对分子质量范围从大约 20 000~170 000,然后将膜置于含 10% 脱脂奶粉的 TBST 中,室温封闭 30 min;TBST 洗膜后加适当稀释的第一抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗膜后加适当稀释的第二抗体,室温孵育 1 h。洗膜后用 ECL Regent A、Regent B 混匀后涂抹于硝酸纤维素膜上,浸泡约 30 s。取出膜,滴干水分,固定于片匣中;在暗室中曝光压片。

2 结果

2.1 PCR 产物及重组质粒 pcDNA3.1A-Mint2 酶切鉴定

PCR 扩增得到大小约 2.2 kb 的特异条带,与 Mint2 相对分子质量的理论计算值一致。重组质粒 pcDNA3.1A-Mint2 用 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定,酶切下来的条带大小与 Mint2 的相对分子质量理论计算值一致。测序后表明,在真核表达载体 pcDNA3.1A 中插入的 Mint2 cDNA 与文献报道序列一致。

2.2 Mint2 基因在 PC12-Mint2 工程细胞中的表达 结果表明,PC12-Mint2 工程细胞的 mRNA 中能够检测到 Mint2 基因片段,即转入 PC12 细胞中的 Mint2 基因有 mRNA 转录,这表明 Mint2 基因已经整合入 PC12 细胞中。

为明确 Mint2 基因在 PC12-Mint2 工程细胞中是否有蛋白表达,我们行 Western 印迹检测。X 线片显影结果显示,

野生型 PC12 细胞在 120 000 处未能检测到特异条带,说明野生型 PC12 细胞无内源性 Mint2 的表达;而 PC12-Mint2 工程细胞经数代培养后,在 120 000 处仍能检测到特异条带,大小与 Mint2 蛋白理论计算值一致。由于此抗体为商业化抗体,因此我们认为此抗体检测的特异条带就是目的基因 Mint2 的蛋白条带,这表明 Mint2 基因在 PC12-Mint2 工程细胞中有稳定的 Mint2 蛋白表达。

3 讨论

研究发现 Mints 家族在神经元突触囊泡的运输与释放的过程中发挥重要作用^[1,2]。原位杂交和免疫组化证明,Mint2 特异性地分布于大脑,特别是在大脑皮质和海马 Mint2 的含量十分丰富^[4,5],这预示着 Mint2 在神经系统中发挥作用。AD 是老年性痴呆的代表性疾病,是一种进行性的神经退行性疾病,表现为痴呆、神经元数量减少,脑内出现 β -淀粉纤维,出现老年斑和神经元内神经纤维缠结^[6-8],目前对该病还没有十分有效的治疗措施。引起 AD 中的重要因素之一是 β -淀粉样蛋白(A β)的积聚形成,最近研究发现,Mint2 可参与此蛋白前体即 β -淀粉样前体蛋白(APP)的代谢进程^[3]。Mint2 通过其 PTB 结构域与 APP 结合,这种结合延长了 A β 的分泌时程,从而减少 A β 的产生^[9]。在 Mint2 分子中还含有 Munc18 结合结构域。Munc18-1(syntaxin 结合蛋白,参与细胞内囊泡的转运),与 Mint2 结合后可抑制 A β 的分泌过程^[10]。这样通过 Mint2 与 APP、Munc18-1 的相互作用就可以有效地调节 A β 的分泌,但是具体的分子机制仍不清楚。

PC12 细胞为小鼠嗜铬细胞瘤细胞系,在不同的神经营养因子作用下,PC12 细胞具有分裂或分化的不同表型变化^[11],是广泛用来研究多种神经系统疾病,如帕金森病(PD)、AD 等神经元发育和功能的细胞培养模型。在本试验中,我们通过基因转染技术将 Mint2 基因导入 PC12 细胞中,G418 筛选经数代培养后,获得 PC12-Mint2 稳定转染细胞株,RT-PCR 结果表明 Mint2 基因已整合入 PC12 细胞,Western 印迹结果证明在 PC12-Mint2 细胞中确实有 Mint2 蛋白的表达,这为进一步研究 Mint2 生物学功能及其作用机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Tanahashi H, Tabira T. Genomic organization of the human X11L2 gene (APBA3), a third member of the X11 protein family interacting with Alzheimer's beta-amyloid precursor protein [J]. *Neuroreport*, 1999, 10(12): 2575-2578.
- [2] Biederer T, Sudhof TC. Mints as adaptors. Direct binding to neurexins and recruitment of munc18 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(51): 39803-39806.
- [3] Mueller HT, Borg JP, Margolis B, et al. Modulation of amyloid precursor protein metabolism by X11alpha/Mint-1. A deletion analysis of protein-protein interaction domains [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39302-39306.
- [4] Tanahashi H, Tabira T. X11L2, a new member of the X11 pro-