bcl-2/EGFP 融合基因真核表达质粒的构建*

彭树英,安志兴,张 涌
(西北农林科技大学 生物工程研究所,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为深入研究 bcl-2 对细胞凋亡的调控机制和肿瘤发生发展的影响,应用基因重组手段,根据表达载体 pEGFP-C1 上的多克隆位点和 bcl-2 基因序列设计了 1 对引物,对含有 bcl-2 基因的质粒 pWB-bcl 进行了 PCR 扩增,得到了 708 bp 的目的片断。将其克隆到 pMD18-T vector,筛选阳性克隆并测序,序列分析表明,其与原初序列同源性达 99 %。将 bcl-2 插入到载体启动子下游,与报告基因绿色荧光蛋白(Enhancer Green Fluorescent Protein, EGFP)融合,经限制性内切酶酶切和 PCR 鉴定,证明 Bcl-2/EGFP 真核表达质粒构建成功。

[关键词] bcl-2;绿色荧光蛋白;真核表达质粒
[中图分类号] Q819; R318 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2004)12-0065-04

原癌基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B cell lymphmo/leukemia-2 gene, bcl-2)在细胞凋亡的调控过程中具有极其重要的作用,最初是从伴有 t(14, 18)染色体易位的滤泡状 B 细胞淋巴瘤中发现的[1]。随着细胞凋亡研究的不断深入,人们对肿瘤的发生、发展也有了新的认识,肿瘤的发生不仅与细胞过度增殖有关,也与细胞凋亡减少有关[2,3]。大量研究表明[4~9],bcl-2 与多种肿瘤的发生、发展密切相关,其不同于一般致癌的癌基因,而是通过抑制细胞凋亡,延长细胞寿命,使细胞数积累增多来促进肿瘤形成的[10]。原癌基因 bcl-2 抑制细胞凋亡的研究,不仅在理论上有重大意义,而且在临床治疗上也具有诱人的前景。然而,关于 bcl-2 的具体作用机制,目前仍知之甚少,有关研究还需深入。因此,本研究构建了能够在哺乳动物细胞中高效表达的 bcl-2/EGFP 真核表达质粒,以期为 bcl-2 基因调控细胞的凋亡机制研究提供检测方便、快捷的候选载体。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pWB-bcl 由解放军军需大学提供;载体 pEGFP-C1 购自 Clontech 公司;pMD18-T vector 购自大连宝生物工程有限公司;*E. coli* DH5α 由西北农林科技大学生物工程研究所分子生物实验室保存。

1.2 工具酶及试剂

各种限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;*Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 购自大连宝生物工程有限公司;Marker 购自加拿大 MBI 公司;DNA Gel Extraction kit 和 Plasmid Miniprips kit 购自杭州维特洁生物工程公司;PCR 引物由上海生物工程服务公司合成。

1.3 仪 器

Gene AmpR PCR-2 400(美国 PE 公司);UVP GDS 8 000 凝胶成像分析系统(英国);冷冻离心机(德国 Sigma 公司);DK-8D 电热恒温水槽(上海医用恒温设备厂)。

1.4 引物设计

根据质粒 pWB-bcl 上 bcl-2 基因和载体 pEGFP-C1 的多克隆位点,利用 Primer 5.0 设计 1 对引物 b1 和 b2,为便于构建表达载体,2 条引物 5′端分别添加了酶切位点 *Eco*R Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ,引物序列如下:

b1:5′cgGAATTCtatggcgcaagccgggag3′

b2:5′cgGGTACCtcacactggcccaggtatgcaccc3′

1.5 bcl-2 基因的 PCR 扩增

在 PCR 反应管中加入适量模板 pWB-bcl,10 × *Taq* buffer 5 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,10 μmol/L 上下游引物各 1 μL,5 U/L *Taq* DNA 聚合酶 1 μL,25 mmol/L $MgCl_2$ 3.5 μL,最后加 ddH_2O 至终体积 50 μL,混匀,瞬时离心,进行 PCR 扩增,设置循环参

* [收稿日期] 2003-11-27
[基金项目] 国家"863"高科技项目(2001AA213081)
[作者简介] 彭树英(1977-),女,内蒙古通辽人,在读硕士,主要从事胚胎工程及分子生物学研究。
[通讯作者] 张 涌(1956-),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士生导师,主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

数:首次变性 94 ℃4 min 后,再 94 ℃30 s,58 ℃45 s,72 ℃延伸 1 min,进行 30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。反应完毕后,取 5 μL 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳 40～50 min,在凝胶成像系统上观察结果。

1.6 PCR 产物回收、克隆、酶切鉴定及序列分析

按胶回收试剂盒说明书回收纯化 PCR 产物,将回收产物克隆在 pMD18-T vector 的 T 位点,并转化感受态细胞。蓝白斑筛选阳性克隆菌落,具体方法见参考文献[11]。提取重组质粒 pMD18-bcl,*Bam*H Ⅰ酶切鉴定,穿刺培养过夜,送交上海生物工程公司完成序列测定。

1.7 pEGFP-bcl 真核表达载体构建

质粒 pMD-bcl 和载体 pEGFP-C1 分别经 *Eco*R Ⅰ, *Kpn* Ⅰ双酶切过夜,回收,编号分别 EKB 和 EKG;将 EKB 和 EKG 按适当比例混合,加入 T_4 DNA 连接酶,16 ℃连接过夜,连接产物转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞,涂布于含抗生素 Kana 的 LB 培养基上,培养 16～24 h;挑取单个阳性菌落,提取重组质粒 pEGFP-bcl,再经 *Eco*R Ⅰ, *Kpn* Ⅰ双酶切,*Bam*H Ⅰ单酶切鉴定。然后以质粒 pEGFP-bcl 为模板,利用引物 b1 和 b2 进行 PCR 鉴定。表达载体构建过程见图 1。

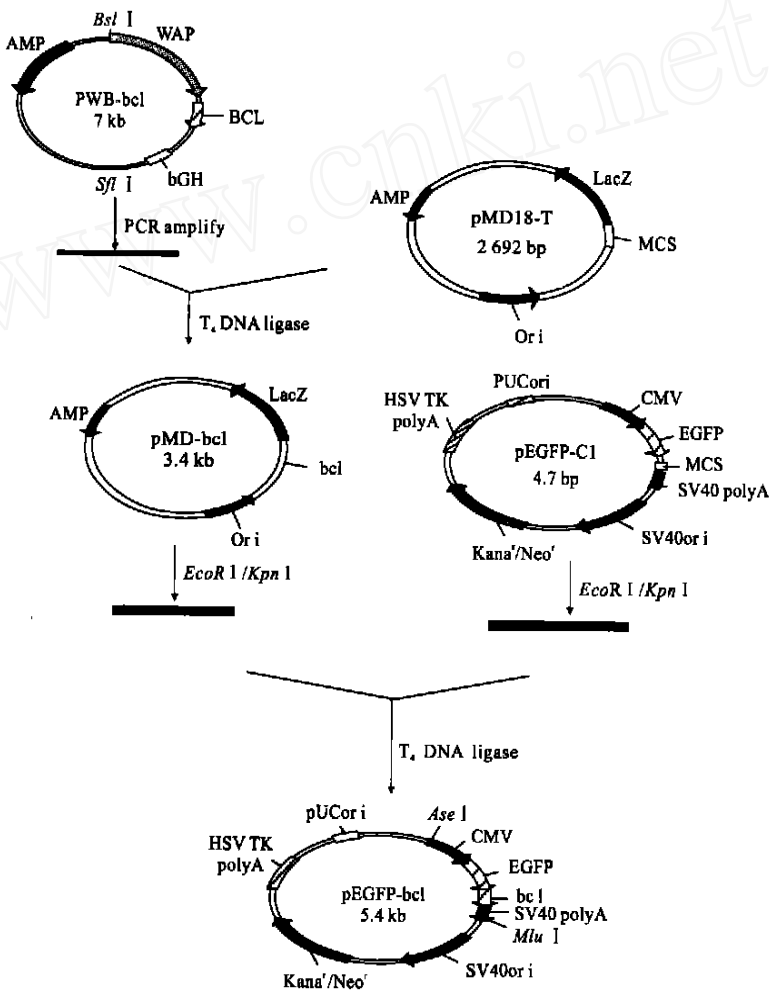

图 1 pEGFP-bcl 融合基因表达载体构建策略

Fig. 1 Construction strategy of pEGFP-bcl fused gene expressing vector

2 结果与分析

2.1 bcl-2 的扩增产物

以质粒 pWB-bcl 为模板,利用引物 b1 和 b2 进行 PCR 扩增,取 5 μL 扩增产物电泳,得到 708 bp 的目的基因 bcl-2,结果见图 2。

2.2 重组克隆 pWB-bcl 的酶切分析

已知 bcl-2 基因和克隆载体 pMD18-T 均有单一的 *Bam*H Ⅰ酶切位点,经 *Bam*H Ⅰ酶切得到 3 110 和 154 bp 的目的片断,可以确定 bcl-2 已反向插入到 pMD18-T 的多克隆位点内。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　bcl-2 的核酸序列分析

测序结果表明,bcl-2 基因编码框完整,含 233 个氨基酸,与原初序列同源性达 99 %。BLAST 软件分析表明,该基因与小鼠、大鼠同源性达 90 %以上,与鸡的 bcl-2 同源性达 70 %以上。

2.4　重组子 pEGFP-bcl 酶切鉴定

将阳性重组子 pEGFP-bcl 和 pEGFP-C1 分别进行 *Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ双酶切和 *Eco*R Ⅰ/ *Kpn* Ⅰ双酶切,可分别得到预期结果 3.1 kb + 2.3 kb,3.1 kb + 1.6 kb(图 3,4)。

利用引物 b_1,b_2,以初步酶切鉴定为阳性的重组子为模板扩增得到 708 bp 的片段(图 5),从而进一步说明 pEGFP-bcl 确为阳性重组子。

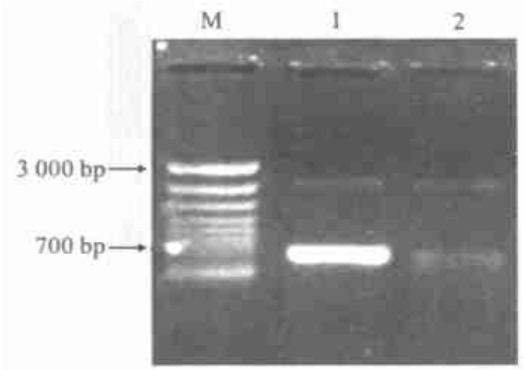

图 2　PCR 产物的电泳图
M. 3 kb marker;1,2. PCR 产物
Fig. 2　Electrophoresis of PCR product
M. 3 kb marker;1,2. PCR product

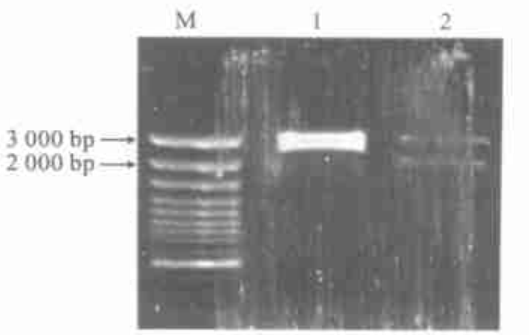

图 3　*Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ双酶切阳性重组子 pEGFP-bcl 和载体 pEGFP-C1
M. 3 kb DNA Marker;1. *Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ酶切 pEGFP-bcl;
2. *Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ酶切 pEGFP-C1
Fig. 3　*Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ digested pEGFP-bcl and pEGFP-C1
M. 3 kb DNA Marker;1. *Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ digested pEGFP-bcl;2. *Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ digested pEGFP-C1

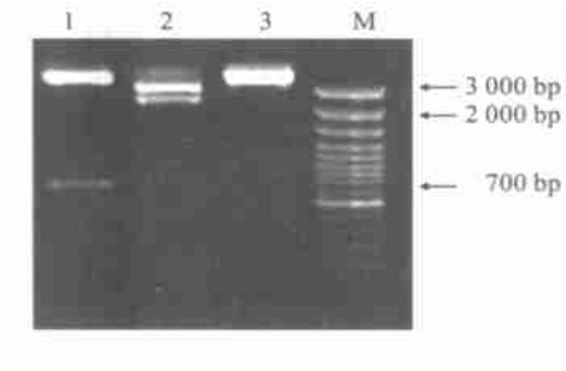

图 4　酶切鉴定 pEGFP-bcl
M. DNA Marker;1. *Eco*lR Ⅰ/ *Kpn* Ⅰ酶切 pEGFP-bcl;
2. *Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ酶切 pEGFP-bcl;3. *Bam*H Ⅰ酶切 pEGFP-bcl
Fig. 4　Identification of recombinant plasmid pEGFP-bcl
M. DNA Marker;1. *Eco*lR Ⅰ/ *Kpn* Ⅰ digested doubly pEGFP-bcl;2. *Ase* Ⅰ/ *Mlu* Ⅰ digested pEGFP-bcl;
3. *Bam*H Ⅰ digested pEGFP-bcl

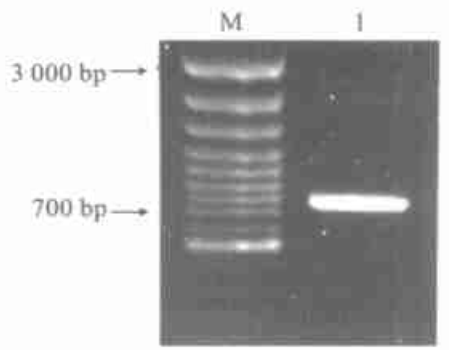

图 5　重组子 pEGFP-bcl 的 PCR 鉴定
M. DNA Marker;1. 从 pEGFP-bcl 上扩增 bcl-2
Fig. 5　Identification of pEGFP-bcl by PCR
M. DNA Marker;1. Amplify bcl-2 from pEGFP-bcl

3　讨　论

利用细胞或转基因动物模型研究 bcl-2 对细胞凋亡作用的调控机制,首先要构建 bcl-2 cDNA 真核表达质粒。关于构建 bcl-2 真核表达质粒的研究已有很多,如张书霞等[12]构建的鸡 bcl-2 真核表达质粒及赵君等[13]所构建的小鼠乳腺定位表达人 bcl-2 的表达质粒。但目前国内尚未出现以 EGFP 基因为报告基因构建 bcl-2 真核表达质粒的报道。因此,本研究构建了 bcl-2/ EGFP 融合基因真核表达质粒,这种以 EGFP 为报告基因的表达载体具有以下优点:①检测方便。因为 EGFP 荧光反应不需要外加底物(酶或其他共反应因子),因此不存在难于进入细胞的问题,而且 EGFP 发射的荧光用肉眼或荧光显微镜就可检测,从而能间接检测与其相融合的 bcl-2 的表达情况[14]。②荧光稳定。EGFP 对光致漂白作

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

用有强烈的耐受性,能耐受长时间光照,从而延长了探测时间。③EGFP 对宿主细胞无任何毒害。因此,在研究 bcl-2 对细胞凋亡的调控机制时,不必担心 EGFP 会对细胞凋亡产生影响。④具有共用性和通用性。即不受受体范围的限制,可以在细胞、胚胎或转基因动物模型中表达。

bcl-2 作为一种功能蛋白调节基因,其表达涉及 mRNA 转录后剪接。因此,构建其 cDNA 真核表达质粒时,必须在 bcl-2 基因上游引入外源强启动子,确保转录启动,在其下游引入 poly 加尾信号则有助于提高转录剪接后 mRNA 的稳定性和表达效率。载体 pEGFP-C1 中的启动子 CMV 和加尾信号 SV40 poly 是两个高效的转录调控元件,将 bcl-2 插入到 pEGFP-C1 的多克隆位点中,即将 bcl-2 克隆到启动子 CMV 和加尾信号 SV 40 poly 间的 EGFP 基因 C 末端,并与其融合,以确保 bcl-2 在宿主细胞内的有效表达及其产物特定调节功能的发挥。

bcl-2 基因抗细胞凋亡的研究,无论在理论上还是实际应用中均具有不可估量的前景。如人为造成 bcl-2 基因过量表达,可使细胞在无血清蛋白的培养基中存活时间增长。因此利用表达质粒将 bcl-2 cDNA导入生产生物药品乳腺细胞株或乳腺生物反应器中,制成生存能力增强的转基因宿主,可达到降低成本、提高产量的功效,其产物应用在临床上进行肿瘤防治,必将产生巨大的经济效益和社会效益。

[参考文献]

[1] Tsujimoro Y,Cossman J,Jaffe E,et al. Involvement of bcl-2 gene in human follicular lymphoma[J]. Science,1985,228:1440 - 1443.

[2] Chou H-K,Chen S-L,Hsu C-T,et al. bcl-2 accelerate retinoic acid induced growth arrest and recovery in human gastric cancer cells[J]. Biochem J,2000,348:2473 - 2479.

[3] 韩克强,吴娅利. 抗调亡基因 bcl-2 与肿瘤研究进展[J]. 中国医师杂志,2003,(增刊):303 - 305.

[4] La Q T,Abel P,Foster C S,et al. bcl-2 role in epithelial differention and oncogenesis[J]. Hum pathol,1996,27:102.

[5] Joensa Ⅱ,Pylkanen L,Tokanen S,et al. bcl-2 protein expression and long term survial in breast cancer[J]. Am J Pathol,1994,145(5):187 - 191.

[6] 杨永健,刘世玉,胡厚祥,等. 转染 bcl-2 基因对心肌细胞缺氧耐受性的影响[J]. 第三军医大学学报,2000,22(8):727 - 730.

[7] 马银斌,吴成义. bcl-2 基因在甲状腺癌中的表达与意义[J]. 重庆医学,2003,32(9):1256 - 1258.

[8] 张 杰,彭玮丹,惠宏襄,等. 翻译 bcl-2 在胃癌细胞中的诱导表达及促凋亡的作用[J]. 生物化学与生物物理学报,1999,31(3):279 - 283.

[9] Michael D J,Matin C R. Programmed cell death and bcl-2 protein in very low oxygen[J]. Nature,1995,374:814 - 816.

[10] 刘凌云,薛绍白,柳惠图,等. 细胞生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2002.

[11] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆指南[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1995.

[12] 张书霞,步志高,陈万方,等. 鸡 bcl-2 表达质粒的构建及其对转染细胞凋亡的影响[J]. 中国农业科学,2003,33(6):88 - 94.

[13] 赵 君,任文陟,张守锋,等. 人 bcl-2 乳腺定位表达转基因小鼠的建立[J]. 中国兽医学报,2002,22(5):430 - 432.

[14] 周盛梅,孟凡国,黄大年,等. 绿色荧光蛋白及其应用[J]. 生物工程进展,1999,19:56 - 60.

Construction of bcl-2/ EGFP fused gene eukaryotic expressing plasmid

PENG Shu-ying, AN Zhi-xing, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The pro-oncogene B cell lymphoma/leukemia-2 gene (bcl-2) plays an important role in the regulation of apoptosis. In order to study deeply the mechanism, the eukaryotic expressing vector of bcl-2/ EGFP fused gene was constructed by the methods of gene recombinating. A pair of primer was designed according to multiple cloning sites of pEGFP-C1 vector and the gene sequence of bcl-2 cDNA. The pWB-bcl plasmid which contains bcl-2 gene was amplified by PCR. The product of PCR was 708 bp. bcl-2 was integrated into pMD18-T vector. The recombinant pMD-bcl plasmid was sequenced and analyzed, homology was 99. bcl-2 gene was inserted into the promoter downstream of pEGFP-C1 vector and fused with Enhancer Green Fluorescent Protein (EGFP) gene. The result affirmed that bcl-2/ EGFP fused gene eukaryotic expressing vector was constructed successfully by the restricted endonuclease and PCR.

Key words: bcl-2; EGFP fused gene eukaryotic; expressing plasmid

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net