

hTERT 基因荧光表达载体在真核细胞中的表达

周海文 杨雯君 刘德莉 刘 伟 周曾同

摘要 目的 研究具绿色荧光蛋白报道系统的端粒酶基因真核质粒载体在真核细胞中的表达情况。方法 用 LipofectAMINE 2000 介导重组端粒酶 pEGFP-hTERT 质粒转染 293 细胞及人正常口腔黏膜细胞,经荧光显微镜、激光共聚焦显微镜观察荧光表达并进行流式细胞仪检测转染效率,采用 RT-PCR 检测转染细胞中外源性 hTERT 的表达。结果 质粒在 293 细胞及人正常口腔黏膜细胞中正确表达,外源性端粒酶在细胞中表达。293 细胞及人正常口腔黏膜角化细胞转染效率分别为 34.74% 和 6.88%。结论 hTERT 基因荧光表达载体在真核细胞中表达,便于观察转染情况,对研究组织工程种子细胞的衰老问题具有重要的意义。

关键词 端粒酶 绿色荧光蛋白 基因转染 质粒

Expression of Recombinant hTERT Plasmid in Eukaryotic Cells. Zhou Haiwen, Yang Wenjun, Liu Deli, Liu wei, Zhou Zengtong. Department of Oral Medicine, Ninth People's Hospital, School of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai 200011, China

Abstract Objective To study the expression of human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) in vitro cell cultivation by transfecting plasmid pEGFP-hTERT into eukaryote for exploring. **Methods** The pEGFP-hTERT was transfected into 293 cells and normal human oral keratinocytes (OKC) by lipofectAMINE 2000. Transfection efficiency of the Green Fluorescent Protein (GFP) was detected under fluorescent microscope. Transfection efficiency was examined by flow cytometer. Exogenous hTERT was analyzed by RT-PCR. **Results** Transfected cells showed green fluorescent. Exogenous hTERT was reconstructed. The transfection efficiency of 293 cells and OKC was 34.74% and 6.88% respectively. **Conclusion** The pEGFP-hTERT has been successfully transfected into eukaryotic cells, which has an important role for extension life-span of normal human cells.

Key words hTERT; Transgenic plasmid; GFP; Liposome

端粒 (telomere) 是真核细胞染色体末端的 DNA 序列。端粒的丢失被认为是细胞进入衰老的关键,端粒缩短到一定长度,细胞就停止生长并衰老死亡。端粒由端粒酶 (telomerase) 合成。端粒酶在生殖细胞及一些干细胞中具有活性,而在人体大多数体细胞中不表达,因此端粒会随着细胞的分裂而逐渐缩短。基于端粒、端粒酶与细胞衰老之间的密切关系,人们设想在正常体细胞中重建端粒酶活性,补足因细胞分裂而导致的端粒缩短,从而增强细胞增生能力,延长细胞寿命^[1]。

本课题组在得到 Geron 公司馈赠的携带有 hTERT cDNA 的质粒 pGRN145,导入细胞,试图延长细胞寿命的过程中发现,pGRN145 质粒较大,致使转入细胞的效率较低,而且该质粒缺乏报道基因不适宜对转染结果进行简单、及时的观察和检测。因此构建了具绿色荧光蛋白报道系统的端粒酶基因真核载体 pEGFP-hTERT 质粒,并观察其在真核细胞中表达情况。

材料与方法

1. hTERT 基因荧光表达载体 pEGFP-hTERT 构建。以 pGRN145 (美国 Geron 公司馈赠) 作为目的基因片段 hTERT cDNA 的来源。该质粒全长 14kb,4215 位点为 EcoR I 酶切位点,4225 为 hTERT 开放阅读框的起始点,7620 为 hTERT 开放阅读框的终止点,7626 是 hTERTcDNA 序列末端,7630 为 Not I 酶切位点,7668 为 EcoR I 酶切位点。用 EcoR I 酶切 pGRN145,琼脂糖凝胶电泳,切下 3443kb 条带,用 Qiagen 凝胶纯化试剂盒回收目的基因片段 hTERT cDNA。pEGFP-C1 为绿色荧光蛋白质粒载体 (Clontech 公司)。采用 EcoR I 酶切 pEGFP-C1,用小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 进行 5' 末端除磷处理。采用 T4 连接酶,按载体与插入片段比为 1:3 进行连接反应。将连

基金项目:国家自然科学基金 (39970791);上海市教委资助项目 (04BC45)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔医学院口腔黏膜科/上海市口腔医学研究所/上海市口腔医学重点实验室 (周海文、周曾同);上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔医学院口腔颌面外科 (杨雯君);上海交通大学组织工程研究中心上海市组织工程重点实验室 (刘德莉、刘伟)

通讯作者:周曾同,电子信箱:zhouzengtong@hotmail.com

接形成的新质粒导入感受态 DH5 α 菌,菌液涂于含丁胺卡那霉素的琼脂糖平板上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取抗性单菌落,进行质粒 DNA 扩增,抽提质粒 DNA, Hind III 限制性内切酶酶切,电泳,筛选出 8.1kb 大小的质粒标本,再用 Hind III 和 Not I 双酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析电泳条带,并测序^[2]。

2. 293 细胞及口腔黏膜角化细胞 (OKC) 的培养与分组。293 细胞用 DMEM 培养液 (含 10% FBS) 培养于 6 孔板,长至 80% 融合时待用。无菌条件下取健康人拔智齿时切除的龈黏膜。PBS 冲洗,除去黏膜下组织,剪成约 5mm \times 5mm 小块,加入 0.25% dispase (美国 GIBCO), 4 $^{\circ}$ C 消化 16 ~ 18h,将表层上皮及上皮下层分开。上皮层加入混合消化液中 (0.25% 胰蛋白酶; 0.02% EDTA = 1:1), 37 $^{\circ}$ C 振荡消化 5 ~ 10min,加小牛血清终止消化,用吸管吹打成单细胞悬液。洗涤,弃上清,加入角化细胞培养液 (美国 GIBCO), 血球计数板计数。以 0.25×10^4 个细胞/平方厘米的密度接种于 35mm 直径的塑料培养皿中 (丹麦 NUNC), 置 37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$ 饱和湿度细胞培养箱 (美国 NAPCO) 中培养。第 3 天首次换液,以后每 2 天换液一次^[3,4]。取指数生长期的人正常口腔黏膜角化细胞,0.05% 胰蛋白酶消化传代,血清终止。6 孔板中每孔种植 1×10^5 个口腔黏膜角化细胞,采用角化细胞培养液,37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$ 饱和湿度细胞培养箱培养。细胞融合至 60% ~ 80% 时准备转染。设立实验组 (pEGFP - hTRT 质粒转染), 阳性对照组 (pEGFP - C1 质粒转染), 空白载体对照组 (仅未加质粒,其余过程同实验组)。

3. pEGFP - hTRT 质粒转染及观察。用 LipofectAMINE 2000 (购自 GIBCO) 介导法进行基因转染。取 pEGFP - hTRT 质粒 2 μ g、pEGFP 质粒 2 μ g、pEGFP - C1 质粒 2 μ g, 分别加入 LipofectAMINE 2000 6 μ l, 转染细胞 6h 后终止反应,换成新鲜培养液,连续培养 48h 后在荧光显微镜下观察发绿色荧光的细胞,激光共聚焦显微镜拍摄,流式细胞仪 (FACS) 检测转染效率。

4. pEGFP - hTRT 质粒转染 293 细胞及口腔黏膜角化细胞的鉴定。采用 RT - PCR 检测转染细胞中外源性 hTRT 的表达。引物设计:应用 DNA star 软件,选取 pEGFP - hTRT 融合基因中 GFP 和融合位点两侧序列设计引物,由上海华美生物工程公司合成。引物序列为 Primer A: 5' - ACC TAC GGC GTC GTG CAG TGC TT - 3'; Primer B: 5' - AGT GCG TCG GTC ACC GTG TT - 3'。收集转染细胞,裂解提取细胞 RNA 进行 PCR 反应。试剂盒为 BcaBESTM RNA PCR KIT VER. 1.1。PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

结 果

1. 重组质粒的筛选鉴定:新质粒导入感受态 DH5 α 菌后经培养挑取抗性单菌落,抽提新质粒 DNA 标本,经 Hind III 酶切、电泳,分析条带,选取插入片段与载体连接方向正确的 8.1kb 质粒,经 Hind III 和 Not I 双酶切鉴定、筛选出目的质粒。序列测定结果与 pEGFP - C1 插入点序列及目的基因片段 hTRT DNA

两端序列对比,序列相同^[2]。

2. 转染细胞的观察:pEGFP - hTRT 质粒转染 293 细胞及人正常口腔黏膜角化细胞 48h 后,激光共聚焦显微镜及荧光显微镜下观察发现多数细胞发出绿色荧光,前者的荧光强度较后者强,密度亦大 (第 124 页彩图 1)。转染 pEGFP - hTRT 质粒的细胞绿色荧光仅在细胞核中表达,而转染 pEGFP 的细胞绿色荧光在整个细胞中表达。流式细胞仪检测结果显示,293 细胞及人正常口腔黏膜角化细胞转染效率分别为 34.74% 和 6.88%。

3. 外源性 hTRT 的表达:采用 RT - PCR 检测转染细胞中外源性 hTRT 的表达,经琼脂糖凝胶电泳,转染 pEGFP - hTRT 质粒的 293 细胞及口腔黏膜角化细胞均检测到 958bp 的条带。根据引物设计外源性 hTRT 表达条带正是 958bp (图 1、图 2)。

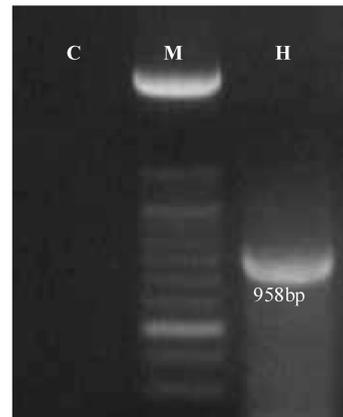


图 1 RT - PCR 检测转染细胞中外源性 hTRT 的表达
M. 100bp Ladder; H. 转染了 pEGFP - hTRT 的 293 细胞;
C. 转染了 pEGFP - C1 的 293 细胞

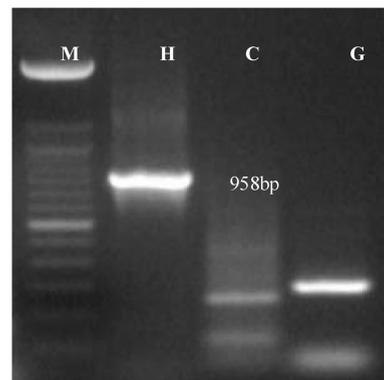


图 2 RT - PCR 检测转染 OKC 外源性 hTRT 的表达
M. 100bp Ladder; H. 转染了 pEGFP - hTRT 的 OKC 细胞;
C. 转染了 pEGFP - C1 的 OKC 细胞; G. GAPDH 内参照

讨 论

正常人体细胞在体外培养条件下生命有限,大多数培养细胞只能维持一定时间的生长,之后生长停滞并逐渐衰退死亡。影响细胞老化的因素很多,其中端粒的缩短被认为是细胞衰老过程中的一个十分关键的事件,直接决定了细胞进入衰老的命运。人的端粒由 250 ~ 1500 个 TTAGGG 六碱基重复序列组成,细胞每分裂一次,其端粒 DNA 序列就丧失 5 ~ 25bp,端粒缩短到一定长度,细胞就停止增生进而衰老死亡。端粒酶能合成端粒,它由 3 部分构成,一是端粒酶 RNA (hman telomerase RNA, hTR),端粒酶以此为模板,使端粒延长,是一种反转录酶。二是端粒酶的催化亚基 (hTERT),也是其活性部位。三是端粒酶相关蛋白^[5]。Bodar 等学者报道首次将人端粒酶反转录酶基因成功转入正常人成纤维细胞及视网膜色素上皮细胞中,能使细胞寿命延长,且维持正常表型^[1]。另外一些学者也证实了其研究结果^[6,7]。

本课题在得到 Geron 公司的携带有 hTERT cDNA 的质粒 pGRN145 导入细胞,试图延长细胞寿命的过程中发现,pGRN145 质粒较大,长 14kb,转染细胞的效率较低,且该质粒缺乏报告基因,不适宜对转染结果进行简单、及时的观察和检测。因此重新构建了一个携有 hTERT cDNA 的新的质粒载体。采用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 作为报告基因。它是一种新的标记基因。对细胞无毒性,不影响与其连接的目的基因的表达,也不影响目的蛋白的结构和功能,便于用荧光显微镜及激光共聚焦显微镜观察以了解转染表达情况^[8,9]。

为研究 pEGFP - hTERT 在真核细胞中的表达情况,本研究对较易进行基因转染的 293 细胞及人正常口腔黏膜角化细胞进行转染,比较重组质粒转染两类细胞的转染情况。293 细胞为人胚胎肾脏上皮细胞转化细胞系,为永生细胞系,又称 HEK 293 细胞。而人正常口腔黏膜角化细胞是正常的上皮细胞,寿命有限。观察荧光显微镜及激光共聚焦显微镜观察绿色荧光结果表明,细胞均已导入 pEGFP - hTERT 质粒并表达 hTERT 外源基因。由于 hTERT 存在于细胞核中,转染 pEGFP - hTERT 质粒的细胞绿色荧光仅在细胞核中表达说明绿色荧光报告基因示踪定位正确^[10]。RT

- PCR 检测到转染细胞中外源性 hTERT 的表达进一步表明 pEGFP - hTERT 成功转染了 293 细胞及人正常口腔黏膜角化细胞。这些结果说明 hTERT 基因荧光表达载体 pEGFP - hTERT 可在真核细胞中表达,为后继研究打下基础。两种细胞转染率的差异再次验证了基因转染正常细胞,尤其是上皮细胞的困难,因此也提示我们需在正常口腔黏膜角化细胞转染体系的优化方面做进一步的研究。

hTERT 基因荧光表达载体的在真核细胞中成功表达,尤其是在人正常细胞中的成功表达,对延长人正常细胞寿命以及进一步研究组织工程种子细胞的衰老问题具有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M. Extension of life - span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998, 279: 349 - 352
- 2 周海文,周曾同,杨雯君,等. 重组端粒酶 pEGFP - hTERT 质粒构建. *中国修复重建外科杂志*, 2003, 17(3):230 - 232
- 3 Zhou Zeng tong, Zhou Hai wen, Shang Qin xin, *et al.* In - vitro Cultivation of Normal Human Oral Keratinocytes. *Chinese Medical Journal* 2001, 114:731 - 734
- 4 周海文,周曾同,商庆新,等. 体外连续培养人口腔黏膜角化细胞. *中华口腔医学杂志*, 2000, 35:455 - 457
- 5 Shore D, Bianchi A. Telomere length regulation: coupling DNA end processing to feedback regulation of telomerase. *EMBO J*, 2009, 28 (16): 2309 - 2322
- 6 Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, *et al.* Human Keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16INK4a enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:1436 - 1447
- 7 Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, *et al.* Putative telomere - independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes De*, 2001, 15: 398 - 403
- 8 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 3 版, 北京: 科学出版社, 2002: 1399 - 1405
- 9 F. M. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, J. G. 塞德曼, 等. 精编分子生物学实验指南. 4 版, 北京: 科学出版社, 2005: 357 - 358
- 10 Wolff M, Kredel S, Wiedenmann J, *et al.* Cell - based assays in practice: cell markers from autofluorescent proteins of the GFP - family. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(8): 602 - 609

(收稿: 2010 - 03 - 09)

(修回: 2010 - 03 - 16)