

稳定表达 Mcm6-GFP 细胞株的建立

李金龙¹ 蔡于琛^{2,3} 胡志明^{1*} 高基民^{1*}

(¹南方医科大学生物技术学院生物治疗研究所, 广州 510515; ²华南肿瘤学国家重点实验室, 广州 510060;

³中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060)

摘要 采用 RT-PCR 的方法扩增人 Mcm6 基因, 克隆入真核表达载体 pEGFP-N3, 成功构建了 pEGFP-Mcm6 真核表达质粒, 酶切及 DNA 测序证实了构建质粒序列的正确性。脂质体介导转染 Hela 细胞后, 荧光显微镜可检测到绿色荧光信号, 通过 G418 筛选最终获得了稳定表达的细胞株, Western blot 验证了稳定表达细胞株中 Mcm6-GFP 融合蛋白的表达。本实验成功建立了稳定表达 Mcm6-GFP 融合蛋白的细胞株, 为动态观察 Mcm6 细胞定位的变化, 进一步研究抗肿瘤药物的作用机制提供了有效的分子工具。

关键词 Mcm6; GFP; 融合蛋白; 稳定表达

微染色体稳定蛋白 Mcm6 (Minichromosome maintenance protein 6) 是 Mcm 蛋白家族成员之一, Mcm 蛋白家族包括 Mcm2 - Mcm7 共六种蛋白, 其功能是在核外组装成六聚体后进入核内起始细胞的 DNA 复制^[1]。研究表明, Mcm 蛋白家族中的 Mcm6 可作为抗肿瘤作用靶点。首先, Mcm6 蛋白被证实存在于许多肿瘤组织中高表达, 且其表达水平与组织的恶性进程及病人预后存在正相关性^[2,3]; 其次, 在化合物致癌的动物模型中观察到 Mcm6 蛋白表达与肿瘤过程成正相关^[4]; 另外, 通过抑制 Mcm6 功能可有效地抑制肿瘤细胞增殖, 全反式维甲酸在抑制黑色素瘤细胞增殖过程中就明显地抑制了 Mcm6 蛋白表达^[5]。

Mcm6 蛋白作为增殖细胞的特征性指标及治疗肿瘤的有效靶点, 可用于抗肿瘤药物筛选和药物作用机理的研究。抑制 Mcm6 蛋白功能可以通过抑制其蛋白表达, 或通过抑制其核定位从而抑制其功能来实现, 为此本实验构建绿色荧光标记的融合蛋白 Mcm6-GFP, 并筛选建立稳定表达 Mcm6-GFP 细胞株, 以动态显示 Mcm6 蛋白的表达及其细胞定位, 为抗肿瘤药物筛选及作用机理的研究提供方便有力的分子工具。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; pEGFP-N3 表达质粒、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; 各种限制性内切酶购自 New England Biolab; DH5 α 菌株购自 Novagen 公司; DMEM 培养基、胎牛血清为 Gibco 产品; 宫颈癌细胞 Hela 为我室保存, 在含 10%

小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养。

1.2 表达质粒的构建

提取细胞 mRNA, RT-PCR 扩增获得 Mcm6 基因, 上下游引物分别引入 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点及保护性碱基, 编码基因不含终止密码子。上游引物 5'-GGT GGT GAA TTC ATG GAC CTC GCG GCG G-3', 下游引物 5'-GGT GGT GGA TCC ATC TTC GAG CAA GTA GTT A-3'。PCR 产物于 N 端克隆入 pEGFP-N3 表达质粒, 具体操作如下: PCR 产物与 pEGFP-N3 质粒行 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切, T4-DNA 连接酶连接双酶切片段, 连接产物转化 DH5 α , 挑选阳性克隆, 提取质粒后酶切鉴定并测序, 最终获得重组质粒命名为 pEGFP-Mcm6。如图 1 所示。

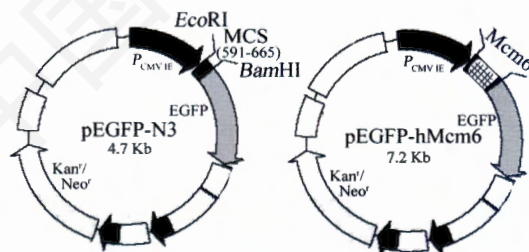


Fig.1 Structure of pEGFP-Mcm6 plasmid

收稿日期: 2009-11-14 接受日期: 2010-05-27

国家自然科学基金青年科学基金(No.30901822)资助项目

* 通讯作者。Tel: 020-61648325, E-mail: jimingao64@163.com;

Tel: 020-62789135, E-mail: hzhiming99@126.com

1.3 细胞转染及荧光观察

采用 Lipofectamine 2000 介导的细胞转染。方法如下: HeLa 细胞接种于 6 孔培养板, 按照 Lipofectamine 2000 试剂盒操作说明转染细胞 4 h 后, 更换新鲜培养液, 继续细胞培养至 24 h, 荧光显微镜下观察。

1.4 稳定表达 GFP-Mcm6 细胞的筛选

HeLa 细胞生长密度达 80% 时, Lipofectamine 2000 介导 pEGFP-Mcm6 质粒转染细胞, 转染 24 h 后, 1:20 稀释细胞接种于含 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 的 DMEM 培养液中, 10 cm 培养皿继续培养, 3 天换一次含 G418 的新鲜培养液, 2 周后出现细胞克隆集落。加入标准浓度 5% 胰酶 (1 ml 0.25% 胰酶 + 19 ml PBS), 荧光显微镜下吸取绿色荧光细胞克隆, 转入 24 孔培养板, 加入 1 ml 含 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 的 DMEM 培养液继续培养 2 周, 获得稳定表达 GFP-Mcm6 的细胞克隆。低浓度 G418 (200 $\mu\text{g/ml}$) DMEM 培养液中维持培养稳定表达细胞。

1.5 Western bolt 检测 Mcm6-GFP 融合蛋白

收集细胞, 加入预冷的磷酸盐 (PBS) 洗涤两遍, 以 1×10^7 cells/ml 加入细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 10 U/mL aprotinin) 置冰上 20 min, 13 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清。蛋白样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至 PVDF 膜。含 5% 脱脂奶的 TBST 封闭 30 min, 抗 GFP 单抗 (Santa Cruz) 孵育 2 h, TBST 洗膜, 二抗孵育后显影曝光。

2 结果

2.1 pEGFP-Mcm6 质粒的鉴定结果

重组质粒经 *EcoR*I 和 *Bam*H1 双酶切后, 获得大约 2.5 Kb 和 4.7 Kb 的条带, 所获目的条带大小与预期相符 (图 2)。经测序鉴定, 序列及插入顺序完全正确 (测序图略)。

2.2 细胞转染及荧光观察结果

Lipofectamine 2000 介导 pEGFP-Mcm6 质粒转染 HeLa 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下观察瞬时转染后绿色荧光信号。结果显示, Mcm6-GFP 质粒转染组, 绿色荧光分布于整个细胞内, 细胞核内信号较强, 而在 pEGFP-N3 空质粒组, 绿色荧光均匀分布在细胞内 (图 3)。Western blot 也检测到 GFP 融合蛋白的表达 (结果未附)。结果说明, 构建的 pEGFP-Mcm6 质粒获得

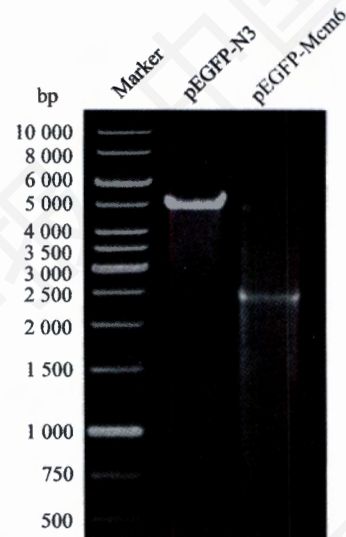


Fig.2 The recombinant plasmids digested with *EcoR*I and *Bam*H1

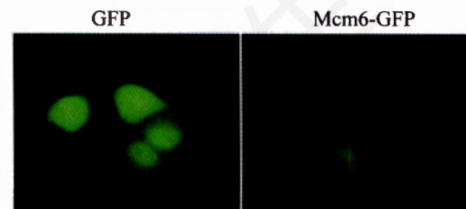


Fig.3 HeLa cells after plasmid transfection observed under fluorescence microscopy

GFP: transfected by pEGFP-N3 vector; Mcm6-GFP: transiently transfected by pEGFP-Mcm6.

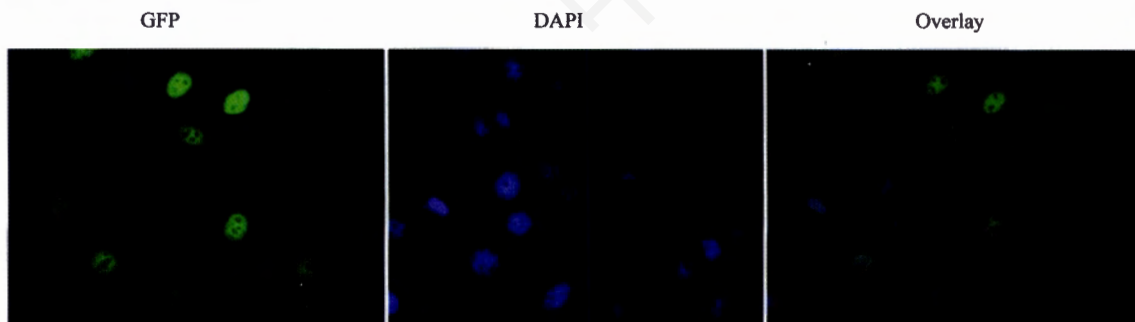


Fig.4 Cells stable expressing of Mcm6-GFP observed under fluorescence microscopy

有效表达,且Mcm6蛋白在表达初期可分布于整个细胞,但主要定位于细胞核。

2.3 稳定表达 Mcm6-GFP 细胞的建立

Hela 细胞转染 pEGFP-hMcm6 质粒,经 G418 加压筛选 5 周后,最终获得稳定表达的细胞。荧光显微镜下可见绿色荧光信号主要位于细胞核内,有表达的细胞约占总细胞数的 54%。细胞经培养 3 周后,仍能够检测到绿色荧光信号(图 4),说明 pEGFP-Mcm6 质粒在 Hela 细胞内获得了稳定表达, Mcm6 主要定位于核内(图 5)。

Western blot 验证筛选所获得稳定表达细胞中 Mcm6-GFP 蛋白的表达,分别以抗 GFP 或抗 Mcm6 为

一抗,以未转染 Hela 细胞作为阴性对照, pEGFP 空质粒瞬时转染 Hela 细胞作为阳性对照。结果显示,筛选得到的稳定表达细胞可表达 Mcm6-GFP 融合蛋白,分子量大小相符。

鉴于 Mcm6 蛋白在细胞周期中的调节作用,本实验检测了稳定转染 Mcm6 对 Hela 细胞增殖及细胞周期分布的影响。结果显示,筛选所获得的稳定转染细胞的形态和增殖能力与未转染细胞相似(结果未附),而且细胞周期的分布也无显著性差异(图 6)。实验最终获得了可稳定表达 Mcm6-GFP 融合蛋白的 Hela 细胞株。

3 讨论

Mcm6 蛋白与肿瘤的关系日益受到学者们的关注,在许多肿瘤组织标本中都检测到 Mcm6 高表达,这些肿瘤包括:何杰金淋巴瘤^[1]、外套细胞淋巴瘤^[2]、咽喉肿瘤^[6]和非小细胞肺癌^[7]等,说明 Mcm6 是细胞增殖信号的标记,可作为肿瘤标记物用以临床肿瘤的诊断和预后的分析^[2]。更有意义的是抑制 Mcm6 蛋白的功能也能发挥抗增殖的作用^[5],说明 Mcm6 可作为一个治疗肿瘤的有效靶点。

Mcm6 蛋白的功能是起始 DNA 的复制。真核细胞 DNA 复制的调控受到精确的调控,细胞一旦开始复制,染色体上起始复制的能力就会丧失,直到细胞完成有丝分裂进入下一个 G₁ 期,以保证每个细胞周期中 DNA 只复制一次。真核细胞精确调控 DNA 复制的机制是一种被称为“复制前复合体”的组装。在 G₁ 期各种调控因子在 DNA 复制起始位点组装完成“复制前复合体”起始 DNA 复制,一旦复制开始后,“复制前复合体”就会解体,保证 DNA 不会重复复制。Mcm6 蛋白是组成“复制前复合体”的重要成员。Mcm6 通过与其他 Mcm 蛋白家族成员在胞外组装成六聚体后,进入细胞核内结合到复制起始位点完成“复制前复合体”的组装,起始 DNA 的复制。Mcm6 功能的发挥有赖于其蛋白的表达及正确的核定位,只有进入核内完成“复制前复合体”组装后才能起始 DNA 的复制。因此本实验构建了绿色荧光蛋白标记的融合蛋白 Mcm6-GFP,并筛选获得了可稳定表达该融合蛋白的细胞株,以便能够观察 Mcm6 蛋白的表达及其细胞定位。

本实验中质粒瞬时转染 Hela 后,荧光显微镜下可见绿色荧光信号,证明蛋白获得有效表达(图 3)。其中空质粒转染组,绿色荧光在细胞内分布均匀,说明

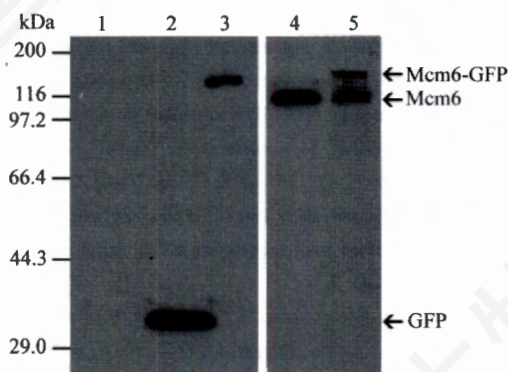


Fig.5 Expression of Mcm6-GFP fusion protein detected by Western blot

1,2,3: first antibody anti-GFP; 4,5: first antibody anti-Mcm6; 1: untransfected ; 2,4: transient transfection of pEGFP vector; 3,5: stable expressing of Mcm6-GFP.

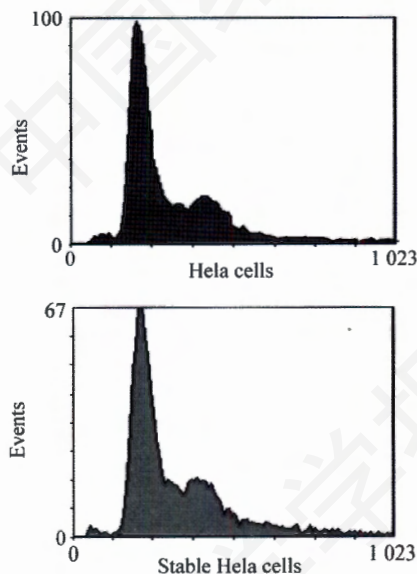


Fig.6 Cell cycle distribution of the stable Hela cells

绿色荧光蛋白 GFP 在细胞核内外呈现均匀分布; 而 pEGFP-Mcm6 质粒转染组, 绿色荧光主要分布于核内区域, 胞浆内也有分布但信号较弱, 说明融合蛋白 Mcm6-GFP 表达后迁移至细胞核内, 这也说明我们构建的 Mcm6-GFP 融合蛋白具有 Mcm6 蛋白的功能。在稳定表达 Mcm6-GFP 融合蛋白的细胞株中, 绿色荧光信号主要分布于核内区域, 胞浆中几乎没有分布 (图 4), 出现这种现象是因为在稳定表达的细胞内其融合基因的拷贝数低, 融合蛋白的表达量低, 融合蛋白表达后又迅速迁移至核内, 因此, 在胞浆区就观察不到绿色信号。另外, 鉴于 Mcm6 蛋白在细胞周期中的调节作用, 我们检测了表达 Mcm6 对细胞周期的影响, 结果显示稳定转染的 Hela 细胞周期与未转染组没有差别, 而且细胞的形态与增殖能力也不受影响。说明低表达 Mcm6 不会对细胞的增殖和细胞周期产生影响。

本实验成功构建了表达 Mcm6-GFP 融合蛋白的质粒, 并筛选获得了稳定表达的细胞株, 为抗肿瘤药物的筛选及药物作用机理的研究提供了有力的分子工具。

参考文献(References)

- 1 Lindner K, Gregán J, Montgomery S, Kearsey SE. Essential role of MCM proteins in premeiotic DNA replication. *Mol Biol Cell* 2002; 13(2):435-44.
- 2 Schrader C, Janssen D, Klapper W, Siebmann JU, Meusers P, Brittinger G, *et al.* Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma. *Br J Cancer* 2005; 93(8):939-45.
- 3 Karimi S, Mohammadi F, Khodadad K, Emami H, Seyfollahi L. High expression of minichromosome maintenance protein 6 in classic Hodgkin's lymphoma points to a cell cycle arrest in G₁ phase. *Arch Iran Med* 2008; 11(5):532-38.
- 4 Takahashi M, Shibutani M, Woo GH, Inoue K, Fujimoto H, Igarashi K, *et al.* Cellular distributions of molecules with altered expression specific to the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Carcinogenesis* 2008; 29(11):2218-26.
- 5 Estler M, Boskovic G, Denvir J, Miles S, Primerano DA, Niles RM. Global analysis of gene expression changes during retinoic acid-induced growth arrest and differentiation of melanoma: comparison to differentially expressed genes in melanocytes vs melanoma. *BMC Genomics* 2008; 9:478
- 6 Xu J, Zhang S, You C, Huang S, Cai B, Wang X. Expression of human MCM6 and DNA Topo II alpha in craniopharyngiomas and its correlation with recurrence of the tumor. *J Neurooncol* 2007; 83(2):183-9.
- 7 Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, Lipson D, Frimer H, Rienstein S, *et al.* Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 56(2):175-84.

Establishment of Stable Cell Line Expressing Mcm6-GFP Fusion Protein

Jin-Long Li¹, Yu-Chen Cai^{2,3}, Zhi-Ming Hu^{1*}, Ji-Min Gao^{1*}

¹Institute of Biotherapy, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

²State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, China;

³Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract Human Mcm6 gene was amplified by RT-PCR and cloned into pEGFP-N3 vector to get pEGFP-Mcm6 plasmid. The recombinant plasmid was confirmed by enzyme digestion and DNA sequencing. After transfection into Hela cells, green signals were observed under fluorescence microscopy. Under pressure of G418, stable cell lines were appeared and Western blot confirmed the expression of Mcm6-GFP fusion protein. In this study, stable cell line expressing Mcm6-GFP fusion protein was successfully established, by which the dynamic localization of Mcm6 can be studied.

Key words Mcm6; GFP; fusion prtein; stable cell line

Received: November 14, 2009 Accepted: May 27, 2010

This work was supported by the National Science Foundation of China (No.30901822)

*Corresponding author. Tel: 86-20-62789135, E-mail: jimingao64@163.com