

植物生长发育各阶段发生的特定的、局部的细胞程序化死亡这种生命现象是物种进化、功能建成和抵御外界伤害所必需的。但为什么植物中的某些细胞死亡时,其周围细胞仍然存活?阐明植物 PCD 的诱发因子、信号传导途径有一定理论意义,如能用于指导农业生产,那么在如何增强植物抗旱、抗病和抗逆境能力等方面将有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 华志明等,1998,生物工程进展,18:32-36.
- [2] Wang, M. et al., 1996, *Plant Mol Biol*, 32:1125-1134.
- [3] Fath, A. et al., 1999, *Plant J*, 20:305-315.
- [4] Fath, A. et al., 2000, *Plant Mol Biol*, 44:255-266.
- [5] Bethke, P. C. et al., 1999, *Plant Cell*, 11:1033-1046.
- [6] Bethke, P. C., Jones, R. L., 2001, *Plant J*, 25:19-29.
- [7] Fath, A. et al., 2001, *Plant Physiol*, 126:156-166.
- [8] Fath, A. et al., 2002, *J Exp Bot*, 53:1273-1282.
- [9] Beligni, M. V. et al., 2002, *Plant Physiol*, 129:1642-1650.
- [10] 林久生、王根轩,2001,植物生理学通讯,37:551-555.
- [11] Mittler, R., 2002, *Trends Plant Sci*, 7:405-410.
- [12] Neill, S. J. et al., 2002, *J Exp Bot*, 53:1237-1247.
- [13] Kuo, A. et al., 1996, *Plant Cell*, 8:259-269.
- [14] Pedroso, M. C. et al., 2000, *J Exp Bot*, 51:1027-1036.
- [15] Clarke, A. et al., 2000, *Plant J*, 24:667-677.
- [16] Saviani, E. E. et al., 2002, *FEBS Lett*, 510:136-140.
- [17] Chung, H. T. et al., 2001, *Biochem Biophys Res Commun*, 282:1075-1079.
- [18] Beligni, M. V., Lamattina, L., 1999, *Trends Plant Sci*, 4:299-300.
- [19] 于明革等,2002,植物生理学通讯,38:493-499.
- [20] Klessig, D. F. et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:8849-8855.
- [21] Orozco-Cardenas, M. L., Ryan, C. A., 2002, *Plant Physiol*, 130:487-493.
- [22] 何奕晶等,2002,植物生理与分子生物学学报,28:325-332.
- [23] Delledone, M. et al., 1998, *Nature*, 394:585-588.
- [24] Beligni, M. V., Lamattina, L., 1999, *Nitric Oxide*, 3:199-208.

研究工作

绿色荧光蛋白与人肾脏 NaDC3 融合基因的构建及其在肾小管上皮细胞中的定位

程根阳 陈香美* 白雪源 冯 哲 刘章锁** 付 博 洪 权

(解放军总医院肾科 全军肾病中心暨重点实验室 北京 100853 **郑州大学第一附属医院肾科 郑州 450052)

摘 要 本文采用 RT-PCR 方法从人的正常肾组织中扩增出 hNaDC3 基因全长 cDNA 序列,采用基因重组技术将 hNaDC3 基因和绿色荧光蛋白基因融合,通过真核表达质粒-脂质体介导,导入 LLC-PK1 细胞系,激光共聚焦显微镜动态观察 GFP-hNaDC3 的定位情况。结果显示 pEGFP-C3 空白质粒转染的 LLC-PK1 细胞表达了 GFP, GFP 在胞内分布以核浆为主,呈均匀致密的细颗粒荧光,胞核染色强,核仁荧光稀少,界线清楚。而 pEGFP-C3-hNaDC3 转染细胞株的绿色荧光蛋白,转染后第 1 天混合分布于细胞浆和细胞膜,以粗颗粒荧光为主,两者界限不清楚,胞浆中可见未染色的圆形空洞,未见胞核染色;第 3 天主要聚集于细胞膜,核周的胞浆中可见粗颗粒荧光物质,胞浆和胞膜界线清楚,胞核亦未见绿色荧光蛋白;第 5 天清晰聚集于细胞膜,细胞膜连接呈网状。因此 hNaDC3 蛋白在细胞质中生成后,定位于细胞膜并稳定表达。

关键词: 人钠/二羧酸协同转运蛋白-3 绿色荧光蛋白 融合基因

人钠/二羧酸协同转运蛋白-3(human Na⁺/dicarboxylate cotransporter 3, hNaDC3)是近年克隆出的一种钠离子依赖性二羧酸跨膜转运蛋白,其基因定位于染色体 20q12-13.1,属于钠/二羧酸协同转运蛋白(Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC)家

族,参与琥珀酸、枸橼酸及 α-酮戊二酸等有机阴离子

本文 2002 年 12 月 9 日收到,2003 年 3 月 9 日接受。
国家 973 重点基础研究发展规划资助项目(G2000057000)。
国家自然科学基金创新研究群体项目(30121005)。
国家自然科学基金项目(30270505)。

* 通讯作者。E-mail: xmchen@public.bta.net.cn

转运^[1]。NaDC 主要分布于肾脏、肝脏、脑及胎盘等重要生命器官。根据该家族成员对底物亲和力的不同,目前认为在人肾脏至少存在两种钠/二羧酸转运蛋白,包括主要分布于肾小管刷状缘的低亲和力转运蛋白(NaDC1)和主要位于肾小管基底膜的高亲和力转运蛋白(NaDC3)^[2]。NaDC 可参与能量代谢,有机阴离子的分泌和体内酸碱平衡调节,参与氨基酸的代谢及糖皮质激素的合成,并可能在肾结石的形成过程中发挥重要的作用^[3-6]。由于其重要的生理功能,NaDC 家族正日益引起人们的关注并成为研究的热点。

绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)是一种来自水母体内的生物发光物质,EGFP 是 GFP 的突变体,其荧光强度是前者的 100 倍^[7]。与其他荧光标记物相比, GFP 的一个突出优点在于 GFP 与蛋白偶联后可在活细胞或生物体内动态观察目标蛋白质的表达、分布及效应^[8]。

迄今为止,有关 NaDC 的组织定位报道较多,而利用 GFP 作为分子标签研究其细胞定位,国内外尚未见报道。为此我们用 RT-PCR 方法从人的正常肾组织中克隆出 hNaDC3 基因全长 cDNA 序列,采用基因重组技术构建了 pEGFP-C3-hNaDC3 真核表达载体,利用绿色荧光蛋白(GFP)示踪技术,动态观察 hNaDC3 在猪近端肾小管上皮细胞(LLC-PK1)中的定位情况。本项实验不仅探讨研究膜蛋白定位与表达的新方法,并且为进一步研究 hNaDC3 的生理功能及其病理生理意义打下基础。

材料与方法

1. 实验材料

(1) 试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、各种工具酶均购自 Promega 公司。T-A cloning 试剂盒购自 Invitrogen 公司。GENECLEAN 纯化试剂盒购自 BIO 101 公司。逆转录试剂盒、Lipofectamine 脂质体、G418 及 TRIzol 购自 GibcoBRL 公司。Wizard 质粒 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司。Taq DNA Polymerase 购自 TaKara 公司。

(2) 菌株、质粒及细胞株 LLC-PK1 为猪近端肾小管上皮细胞,由本室保存;增强型绿色荧光蛋白基因质粒(pEGFP-C3)由本院内分泌实验室母义明博士馈赠;大肠杆菌 JM109 感受态购自北京博大公司。

2. 实验方法

(1) 细胞培养 LLC-PK1 细胞用 10% FBS DMEM 培养基(内含 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素),在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的温箱中培养。

(2) hNaDC3 基因的 PCR 扩增 取正常新鲜肾组织,加入 TRIzol 匀浆,氯仿抽提,异丙醇沉淀,70% 乙醇洗一次,溶于 DEPC 水中,以电泳和 260nm 的光密度值来判断 RNA 的质和量。利用逆转录试剂盒合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中人胎盘 hNaDC3 的 cDNA 序列及 PCR 产物设计原则设计一对 PCR 引物(由上海博亚生物公司合成),上游引物:5'-CGCCAGGCGATCGCGCTGATG-3',下游引物:5'-GGGCCACTGGAGGTACOCCTTGC-3'。PCR 反应循环参数为:94℃, 30s; 56℃, 30s; 72℃, 30s, 共 30 轮循环。PCR 产物用 GENECLEAN 的方法(参照试剂盒说明书)进行纯化。参照 T-A cloning 试剂盒操作手册上的实验方法,将纯化后的 hNaDC3 PCR 产物连接到载体 pGEM-T(图 1),以 pGEM-T 上的 T7 及 SP6 为测序引物,利用 ABI373ADNA 自动测序图谱分析仪进行测序,具体由赛百盛公司操作。

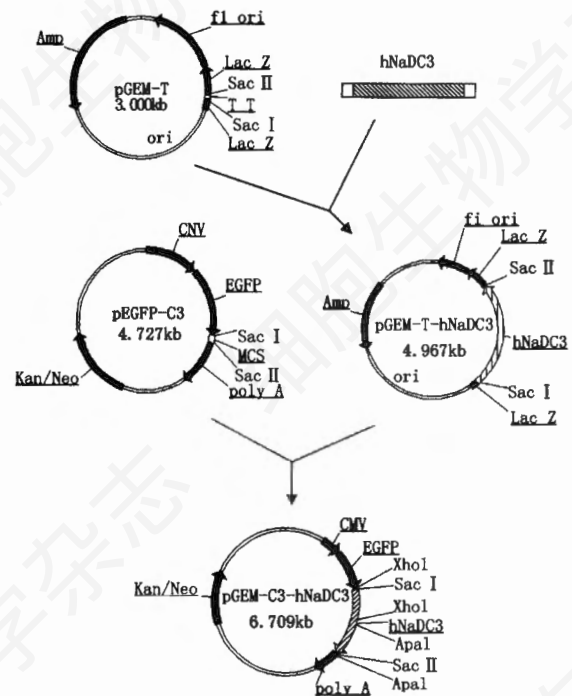


图 1 pEGFP-C3-hNaDC3 重组质粒构建图

(3) hNaDC3 与 GFP 融合基因的构建 将质粒 pGEM-T-hNaDC3 和 pEGFP-C3 均用 Sac II 和 Sac I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳分离所需片段,按 GENECLEAN 纯化试剂盒纯化。利用 T4 DNA 连接酶使 hNaDC3 基因定向插入 EGFP 的羧基端,并使两者在阅读框架内融合(图 1)。将连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态,摇菌扩增后,参照 Wizard 质粒 DNA 提取试剂盒操作手册提取重组质粒,经多组限制性内酶鉴定后,命名为 pEGFP-C3-hNaDC3。

(4) 脂质体介导重组质粒转染细胞 将 LLC-PK1 细胞接种于直径 35mm 的 Glass Bottom Culture Dishes 中(5 ×

10^4 细胞/个), 利用 $6\mu\text{l}$ 脂质体 Lipofectamine 将 $2\mu\text{g}$ 质粒 pEGFP-C3-hNaDC3 转染到 LLC-PK1 细胞中, 同时转染空载体 pEGFP-C3 作为对照。转染后 8h 更换 DMEM 完全培养基, 48h 后更换含有 $1000\mu\text{g/ml}$ 的 G418 的 DMEM 完全培养基筛选。转染后定时使用 Radiance 2000 型激光共聚焦显微镜(LSCM, 美国 Bio-Rad 公司) 观察融合蛋白荧光强弱和定位情况。具体操作如下, 采用 49m 瓦的氩离子激光, 激发波长为 488nm, 选择 510nm 的滤光片进行接收, 倒置显微镜在 60X 油镜下观察。调节扫描参数以取得最大电信号、最小光漂白和最好的信噪比, 参数确定后同时选定视野($512 \times 512 \times 8\text{bits}$), 在 Lasersharp2000 程序下扫描, 进行横扫(X-Y 轴)和纵扫(X-Z 轴)。扫描图像储存在硬盘, 用 LaserPix4.0 软件进行图片处理。

结 果

1. 人 NaDC3 基因全长 cDNA 扩增

提取人肾组织的总 RNA, 经 RT-PCR 扩增出 1967bp 的目的片段, 用 T-A 克隆的方法将 hNaDC3 cDNA 连接到载体 pGEM-T(图 1), 经用 Sac II 和 Sac I 双酶切鉴定后得到 pGEM-T-hNaDC3 重组质粒(图 2), 测序结果证实 hNaDC3 基因已反向插入到 pGEM-T 载体中, 序列分析与文献报道完全一致^[9]。

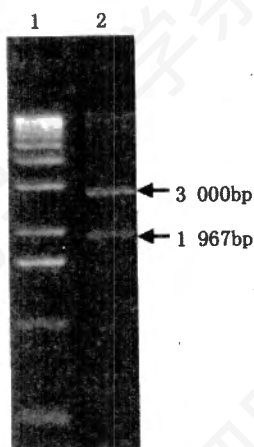


图 2 pGEM-T-hNaDC3 酶切鉴定
泳道 1: 1 kb Marker;
泳道 2: Sac II + Sac I 双酶切。

2. pEGFP-C3-hNaDC3 重组质粒构建及酶切鉴定

用 Sac II 和 Sac I 将 hNaDC3 基因片段从质粒 pGEM-T-hNaDC3 切下, 连接到载体 pEGFP-C3 上(图 1), 得到重组质粒 pEGFP-C3-hNaDC3。酶切鉴

定, 若有 hNaDC3 基因片段插入, 用 Sac II + Sac I 双酶切应切出 2.0kb 和 4.7kb 片段; 用 Xho I 酶切应切出 995bp 和 5.6kb 片段; 用 Apa I 酶切应切出 940bp 和 5.7kb 片段, 重组质粒切出预期片段(图 3)。

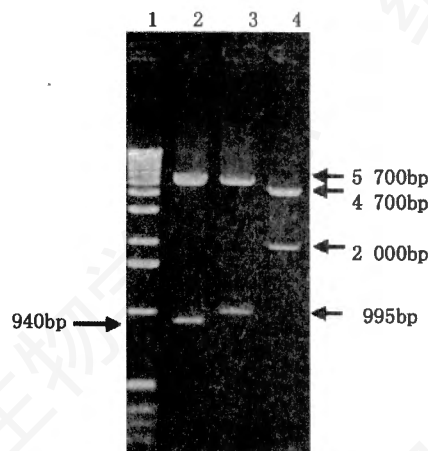


图 3 pEGFP-C3-hNaDC3 酶切鉴定
泳道 1: 1 kb Marker;
泳道 2: Apa I 酶切;
泳道 3: Xho I 酶切;
泳道 4: Sac II + Sac I 双酶切。

3. LLC-PK1 细胞中 hNaDC3 融合蛋白的细胞定位

通过激光共聚焦显微镜观察, pEGFP-C3 空白质粒转染的 LLC-PK1 细胞表达了 GFP, GFP 在胞内分布以核浆为主, 呈均匀致密的细颗粒荧光, 胞核染色强, 核仁荧光稀少, 界线清楚(见封面)。而 pEGFP-C3-hNaDC3 转染细胞株的绿色荧光蛋白, 转染后第 1 天混合分布于细胞浆和细胞膜, 以粗颗粒荧光为主, 两者界限不清楚, 胞浆中可见未染色的圆形空洞, 未见胞核染色; 第 3 天主要聚集于细胞膜, 核周的胞浆中可见粗颗粒荧光物质, 可能为高尔基体, 胞浆和胞膜界线清楚, 胞核亦未见绿色荧光蛋白; 第 5 天清晰聚集于细胞膜, 细胞膜连接呈网状。激光共聚焦显微镜所提供的纵切图片进一步支持了上述结果(见封面图)。

讨 论

绿色荧光蛋白(GFP)是一种生物发光物质, 其荧光的强弱取决于蛋白的含量; GFP 分子量较小(27KD), 与外源基因偶联时一般不影响外源蛋白的构象和功能, 并可在活细胞内长时间存在, 荧光没有

衰变,反映了外源基因表达的蛋白质强度,因此可通过激光共聚焦显微镜在活细胞内动态观察所研究的蛋白质,并推测其生成、转动和代谢通路以及对细胞的影响。因此 GFP 是一种理想的新型生物分子标签^[10],正广泛地应用于相关基因的研究^[11]。

钠/二羧酸协同转运蛋白对于机体而言有重要的生理意义。NaDC 可参与能量代谢,有机阴离子的分泌和体内酸碱平衡调节,参与氨基酸的代谢及糖皮质激素的合成,并可能在肾结石的形成过程中发挥重要的作用。1983 年, Simpson 等提出尿中的枸橼酸是肾脏能量代谢的窗口,从肾脏刷状缘和基底膜吸收的枸橼酸可以提供人类肾脏约 10% 的能量来源^[3]。近年来研究表明,许多病理生理过程与 NaDC 有关。2000 年, Rogina 等的研究发现,与 NaDC 同源性达 50% 的果蝇中的 Indy 基因的突变可以使果蝇平均寿命延长大约一倍,提示 NaDC 可能参与哺乳类动物寿命的调节^[12]。将分子生物学和细胞生物学联合起来研究蛋白质向细胞器的定位运送,是近年来基础医学研究的一个热门领域,而本研究首次在细胞水平,利用 GFP 作为分子标签,动态观察 hNaDC3 在活细胞中的定位与表达情况,更为研究 NaDC 与代谢和衰老的关系开辟了新领域。

1999 年, Chen 等^[4]首先克隆出大鼠肾脏高亲和力和钠/二羧酸协同转运蛋白(SDCT2),继之, Wang 等^[9]从胎盘组织中克隆出高亲和力和钠/二羧酸协同转运蛋白(hNaDC3)的 cDNA,全长 3438bp,包括 13 个外显子和 12 个内含子,其中编码区全部位于前 1828 位,全长 1809bp,编码 602 个氨基酸。本研究从人的正常肾组织 RT-PCR 扩增了包含全长编码序列在内的 hNaDC3 cDNA,共 1967bp,将 PCR 产物 T-A 克隆至中间载体 pGEM-T,由于该载体上 T7 和 SP6 引物序列,可以方便地进行测序。计算机分析所克隆的人肾组织 NaDC3 的核酸序列,结果证实与 Wang 等^[9]报告的人胎盘组织 hNaDC3 序列完全相同。迄今为止,钠/二羧酸协同转运蛋白-3 的亚细胞定位,国内外尚未见报道。针对这一问题,我们成功地构建了 hNaDC3 与 EGFP 融合基因质粒,并转染至 LLC-PK1 细胞,利用绿色荧光蛋白示踪技术,动态观察 hNaDC3 在该细胞中的定位与表达情况。激光共聚焦显微镜显示:pEGFP-C3-hNaDC3 转染细胞的绿色荧光,第 1 天混合分布于细胞质和细胞膜,第 5 天则主要聚集于细胞膜上。由于 EGFP 本身不是膜蛋白,没有膜定位信号,因此细胞膜上的荧

光浓聚信号只能为由与 EGFP 融合的 hNaDC3 蛋白所引起,提示 hNaDC3 可能产生于细胞质,而定位于细胞膜。GFP 与外源基因偶联时一般不影响外源蛋白的构象和功能,我们分别体外转录了 GFP-hNaDC3 融合基因和单纯 hNaDC3 基因的 cRNA,显微注射爪蟾卵母细胞后,分别测其电生理功能,发现没有区别;但我们的转基因细胞在转染 7 天后皱缩死亡,说明 GFP-hNaDC3 融合基因蛋白对细胞有毒性,可能与外源基因的特性以及外源基因连在 GFP 的氨基端或羧基端有关,说明在短期内 GFP 与外源基因偶联不影响外源蛋白的构象和功能,长期则对生物体产生毒性。

本研究成功构建了人钠/二羧酸协同转运蛋白-3 与增强型绿色荧光蛋白融合基因的真核表达载体,并利用激光共聚焦显微镜首次在细胞水平研究探讨了 hNaDC3 的定位情况。为进一步研究 hNaDC3 的生理功能及其病理生理意义奠定了基础。

图版说明

(图版见本期封面)

GFP-hNaDC3 融合蛋白在肾小管上皮细胞 LLC-PK1 中的荧光动态分布($\times 600$,图中黄色箭头所示为胞核)

A-C: pEGFP-C3 转染组;

D-F: pEGFP-C3-hNaDC3 转染组;

A 和 D: 转染后 1 天; B 和 E: 转染后 3 天;

C 和 F: 转染后 5 天

A-F: 横切图 a-f:纵切图

参考文献

- [1] Pajor, A. M., 1999, *Annu. Rev. Physiol.*, **61**: 663-682.
- [2] Pajor, A. M., 2000, *J. Membrane Biol.*, **175**: 1-8.
- [3] Simpson, D. P., 1983, *Am. J. Physiol.*, **244**: F223-F234.
- [4] Chen, X. M. et al., 1999, *J. Clin. Invest.*, **103**: 1159-1168.
- [5] Steffgen, J. et al., 1999, *Pflugers Arch.*, **438**: 860-864.
- [6] 何娅妮等, 2001, *中华医学杂志*, **81**: 1066-1069.
- [7] DCormack, B. P. et al., 1996, *Gene*, **173**: 33-38.
- [8] 何诚等, 2000, *中国生物化学与分子学报*, **16**: 51-56.
- [9] Wang, H. P. et al., 2000, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **278**: C1019-C1030.
- [10] Scales, S. J. et al., 1997, *Cell*, **90**: 1137-1148.
- [11] 于志恒等, 1999, *中华肾脏病杂志*, **15**: 236-240.
- [12] Rogina, B. et al., 2000, *Science*, **290**: 2137-2140.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT hNaDC3/GFP AND ITS LOCALIZATION IN RENAL PROXIMAL TUBULE EPITHELIA

CHENG Gen Yang CHEN Xiang Mei* BAI Xue Yuan FENG Zhe FU Bo HONG Quan
(The Department of Nephrology, the PLA General Hospital, Beijing 100853 China)

LIU Zhangsuo

(The Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052 China)

ABSTRACT To construct the fusion gene of hNaDC3 with green fluorescent protein(GFP), and study the localization of the fusion protein in renal proximal tubule epithelia, the full length cDNA of hNaDC3 was amplified by RT-PCR from normal human renal tissues, and then cloned into pGEM-T vector. After DNA sequencing, the hNaDC3 was inserted into mammalian expression plasmid pEGFP-C3 successfully. The fused gene was then transfected into LLC-PK1 cell with lipofectamine. Confocal fluorescence microscopy showed that green fluorescence spread over the whole cell transfected with pEGFP-C3. After transfection with pEGFP-C3-hNaDC3, fluorescence distributed in both the cytoplasm and on the plasma membrane first day, located mainly on the plasma membrane fifth day. It is suggested that the hNaDC3 protein localizes on the plasma membrane.

Key words: Human Na⁺/dicarboxylate cotransporter 3 Green fluorescent protein
Fusion gene

Supported by:

National Key Basic Research Program of China(973 program, No. G2000057000).

National creative research group fund from NSFC(No. 30121005).

National Natural Science Foundation of China(NSFC)(No. 30270505).

* Corresponding author. E-mail: xmchen@public.bta.net.cn

小鼠受精卵早期发育过程中 PKA 在 M/G1 期进程中的作用

王亚杰*** 刘莹* 陈菲* 于爱鸣** 宗志红** 于秉治****

(* 中国医科大学基础医学院生物化学教研室 ** 中国医科大学基础医学院病理生理教研室 沈阳 110001)

摘 要 为研究小鼠体内 1-细胞期受精卵蛋白激酶 A(PKA)对 M/G1 期进程的影响,应用热稳定性抑制剂 PKI 显微注射入 1-细胞期受精卵内,观察 M 期促进因子(MPF)及 PKA 活性变化以及 MPF 调节亚基 Cyclin B 含量情况。发现 PKI 显微注射后 PKA 活性低,而 MPF 活性在 hCG 后 27.5 h 即达高峰,较对照组提前 30 分钟。PKI 达一定浓度则 MPF 活性不下降,出现 M/G1 阻滞;与此同时 Western blotting 法显示 PKI 注射后 Cyclin B 含量在 M 末期相当于 M 中期水平。结果表明,PKI 显微注射抑制 PKA 活性后 MPF 活性呈高峰值,高浓度 PKI 显微注射可引起 M/G1 阻滞,其机制与 PKI 干扰了 Cyclin B 降解有关。

关键词: M 期促进因子 蛋白激酶 A 1-细胞期受精卵

MPF(M 期促进因子 M-phase promoting factor, MPF, 又可称为成熟促进因子 maturation promoting factor, MPF)的调节亚基 Cyclin B 含量在细胞周期中呈周期性变化, S 期开始产生, G2-M 增加, 并与活性亚基 Cdc2 结合, 使 MPF 具有活性。M 末期 Cyclin B 在泛素介导的蛋白水解酶作用下发生降

解, MPF 活性下降, 细胞进入下一个分裂间期 G1

本文 2002 年 11 月 27 日收到, 2003 年 3 月 8 日接受。

本研究项目受国家自然科学基金重点课题(39730460)及国家重点基础研究发展规划(973)项目(G1999055900-2)资助。

*** 通讯联系人。E-Mail: yzbiochem@yeah.net