

pEGFP-C2-MeCP2 重组质粒的构建和表达

彭云云^{1,2}, 黄成^{1,2}, 马陶陶^{1,2}, 徐涛^{1,2}, 李琳^{1,2}, 陈晨^{1,2}, 李俊^{1,2}

摘要 目的 构建人类甲基化 CpG 结合蛋白 (MeCP2) 基因的真核表达载体 pEGFP-C2-MeCP2, 在非洲绿猴肾成纤维细胞 (COS-7) 中检测其表达及定位。方法 从人肝癌细胞 (HepG2) 中获得 cDNA, 以其为模板扩增 MeCP2 全长编码基因, 克隆到载体 pEGFP-C2 上。构建的重组质粒测序后转染至 COS-7 细胞中, 荧光倒置显微镜观察绿色荧光蛋白的表达。检测 MeCP2 蛋白定位, Western blot 法和 RT-PCR 法鉴定 MeCP2 蛋白和基因表达。结果 成功构建 pEGFP-C2-MeCP2 重组质粒, 酶切鉴定片段为 1 461 bp。MeCP2 蛋白及基因表达水平明显增加。细胞定位实验结果显示 MeCP2 蛋白定位于胞核。结论 成功构建重组质粒 pEGFP-C2-MeCP2, 该质粒的构建为进行 MeCP2 功能研究提供了依据。

关键词 MeCP2; COS-7; 基因表达

中图分类号 R 349.64

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1193-05

甲基化 CpG 结合蛋白 (methyl-CpG-binding proteins, MeCPs) 是一类转录调控因子, 能特异识别甲基化的 CpG 二核苷酸, 在甲基化区募集组蛋白去乙酰化酶、组蛋白乙酰化酶、组蛋白甲基化酶和 DNA 甲基转移酶, 导致该区域染色质结构改变从而抑制基因转录^[1]。甲基化结合蛋白家族目前主要包括 MeCP1、MeCP2 和同源蛋白甲基化 CpG 结合域蛋白 1 (methyl-CpG-binding domain protein 1, MBD1)、MBD2、MBD3 和 MBD4。MeCPs 含有甲基 CpG 结合域, 是其与甲基化 DNA 结合的重要区域, 其中又以 MeCP2 的 DNA 结合能力最强, 是该家族中第一个证明具有能结合到甲基化 DNA 上的蛋白质。目前对 MeCP2 的沉默机制研究较多, 但其在相关细胞中的过表达及其蛋白定位目前还没有相关文献报道。该研究利用基因重组技术成功构建人源 MeCP2 真核表达载体, 为进一步研究 MeCP2 蛋白的

生物学特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 COS-7 非洲绿猴肾成纤维细胞系、HepG2 人肝癌细胞系、载体 pEGFP-C2、DH5 α 感受态细胞均来自安徽医科大学药学院。胎牛血清购自杭州四季青生物材料研究所; TRIzol RNA 提取试剂盒、Lipofectamine 2000、Opti-MEM 培养基均购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒、EcoR I 和 BamH I 限制性核酸内切酶、T4 DNA Ligase 均购自加拿大 Fermentas 生物工程公司; LA Taq 试剂盒和 DNA marker 均购自日本 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒和质粒大量提取试剂盒均购自美国 Axygen 公司; DAPI 购自武汉博士德生物工程有限公司; RIPA 裂解液 购自上海碧云天生物技术研究所; ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo 公司; MeCP2 和 GFP 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 MeCP2 cDNA 的制备 设计 MeCP2 的 PCR 扩增引物, 并在上、下游引物 5' 端分别加入 EcoR I、BamH I 限制性酶切位点及保护性碱基, 引物序列为 F: 5'-CCGGAATTCCGGATGCTAGCTGGGAT-3'; R: 5'-CGCGGATCCGCGTCAGCTACTCTCT-3'。扩增片段大小为 1 461 bp。MeCP2 扩增条件: 以 TRIzol 提取总 RNA 进行逆转录后所得 cDNA 为模板进行扩增, 采用 LA PCR 扩增法: TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l) 0.5 μ l, 10 \times LA PCR Buffer II (Mg²⁺ Plus) 5 μ l, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 8 μ l, cDNA 2.5 ng, 上下游引物 (20 μ mol/L) 各 1 μ l, 水补足 50 μ l。反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s; 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 45 s; 循环 35 次后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收并进行纯化。

1.2.2 pEGFP-C2-MeCP2 真核表达载体的构建 将纯化的 MeCP2 扩增产物和 pEGFP-C2 载体分别用 EcoR I、BamH I 快速双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收其产物并纯化, 将目的片段和载体用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 条件下连接过夜, 产物转化到 DH5 α 感受态细胞, 在卡那霉素抗性的 LB 平板中

2014-03-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号 81273526、81202978); 新教师博士点基金 (编号: 20123420120001)

作者单位: ¹ 安徽医科大学药学院; ² 安徽医科大学肝病研究所, 合肥 230032

作者简介: 彭云云, 女, 硕士研究生;

李俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

37 °C 倒置过夜。挑取单克隆菌落,接种于含卡那霉素的液体培养基,210 r/min、37 °C 摇菌培养过夜。按照质粒提取试剂盒说明提取质粒,EcoR I 和 BamH I 内切酶双酶切鉴定阳性重组质粒的插入,并由上海生工公司作基因测序分析。

1.2.3 pEGFP-C2-MeCP2 重组质粒转染 COS-7 细胞 COS-7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,传代细胞后接种于 6 孔板中,置 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后细胞分布达 60% ~ 70% 将重组质粒转入细胞。转染步骤如下:在两个 1.5 ml 离心管中各加入 150 μl Opti-MEM 培养基,分别将重组质粒 2 μg 和脂质体(Lipofectamine 2000)4 μl 溶于培养基中,室温放置 5 min 后再将两者混合充分混匀,室温孵育 20 min;同时用 PBS 洗涤待转染细胞 2 遍后加入 1.7 ml Opti-MEM 培养基,再将质粒脂质体混合物加入到培养细胞中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h,去除混合物,替换成常规 DMEM 培养液,继续培养 24 h 后荧光倒置显微镜下观察,将此作为重组质粒转染组。并同时设置空白组、阴性组作为对照。

1.2.4 GFP 融合蛋白细胞定位实验 将处理好的盖玻片平铺于 35 mm 培养皿中,然后用胰酶消化细胞,适量密度接种于培养皿中,37 °C、5% CO₂ 培养过夜。转染 24 h 后,弃培养基,取出盖玻片。预温的 PBS 溶液洗 3 次,每次 10 min,弃 PBS;4% 预冷多聚甲醛固定 25 min,弃多聚甲醛;PBS 洗 3 次,每次 10 min,弃 PBS;0.2% Triton X-100 透化 7 min,弃去;PBS 洗 3 次,每次 10 min,弃 PBS;0.5 μg/ml DAPI 染色 10 min,弃 DAPI;PBS 洗 3 次,每次 10 min,弃 PBS;将盖玻片封于载玻片上,荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.5 RT-PCR 法鉴定 MeCP2 基因表达 采用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,分光光度计法测量 RNA 的浓度及纯度。按 Fermentas 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 并以其为模板进行扩增。MeCP2 的引物序列为 F:5'-GCGACACATCCCT GGACCCTA-3',R:5'-ACCCCTTTCACCTGCACACCC-3',扩增片段大小为 199 bp;扩增条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 40 s,54.5 °C 40 s,72 °C 10 min,进行 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min;β-actin 作为内参其引物序列为 F:5'-CGGTTGGCCTTGGGGTTCAGGGG-3',R:5'-ATCGTGGGGCGCCCCA GGCACCA-3',扩增长度为 248 bp;扩增条件:94 °C 预变性 5 min,35 个 PCR 循环(94 °C 40 s,51 °C 40 s,72 °C 10 min),72 °C 延伸

10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳并在紫外灯下拍照。

1.2.6 Western blot 法鉴定 MeCP2 蛋白和 GFP-MeCP2 融合蛋白表达 重组质粒转染细胞 24 h 后,提取各组细胞总蛋白,弃掉旧培养液,PBS 洗待处理细胞 2 遍,每孔加 RIPA 裂解液 200 μl(含蛋白酶抑制剂 1 mmol/L PMSF 2 μl),放置在冰上裂解 30 min,并收集细胞裂解悬液,12 000 r/min 冷冻离心机离心 30 min 后收集上清液。BCA 法定量,取 20 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 垂直电泳分离蛋白质并将样品蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 3 h。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,分别使用 β-actin、MeCP2 和 GFP 抗体 4 °C 孵育过夜(稀释浓度分别为 1:1 000、1:500 和 1:500),TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,对应加入二抗山羊抗鼠和抗兔(稀释比均为 1:10 000)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 遍后,加入 ECL 化学发光试剂显影,仪器成像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒 pEGFP-C2-MeCP2 的构建和鉴定

MeCP2 引物中加入限制性酶切位点和保护性碱基,基因全长序列长度为 1 461 bp,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,与 DNA Marker 比对片段大小符合,经过 EcoR I、BamH I 内切酶双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳分离,结果显示一条与预期大小符合的条带,见图 1。基因序列分析测序结果证实插入片段为 MeCP2 编码序列,MeCP2 序列与 GenBank 上的一致。

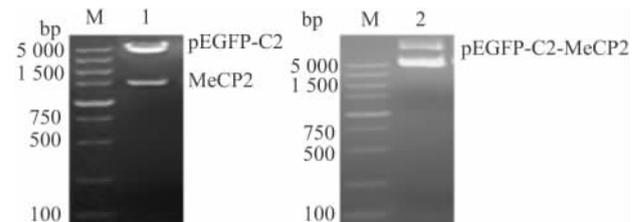


图 1 重组质粒双酶切鉴定及重组质粒凝胶电泳图

M:DNA Marker;1:EcoR I 和 BamH I 内切酶双酶切重组质粒 pEGFP-C2-MeCP2;2:重组质粒 pEGFP-C2-MeCP2

2.2 重组质粒 pEGFP-C2-MeCP2 在 COS-7 细胞中的表达和定位

将重组质粒转染到 COS-7 细胞中 24 h 后使用荧光倒置显微镜观察,结果显示

现绿色荧光,见图2。细胞定位实验结果显示重组质粒转染到细胞中绿色荧光表达定位于细胞核内,见图3B1,而阴性组转染的是 pEGFP-C2 载体,绿色荧光弥散性分布于整个细胞,见图3A1。

2.3 重组质粒对 MeCP2 mRNA 水平的影响 转

染后各组细胞的 RT-PCR 结果见图4,与空白组和阴性组比较,重组质粒转染组细胞中 MeCP2 mRNA 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$, $F = 157.742$),而空白组和阴性组两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$, $F = 7.214$)。

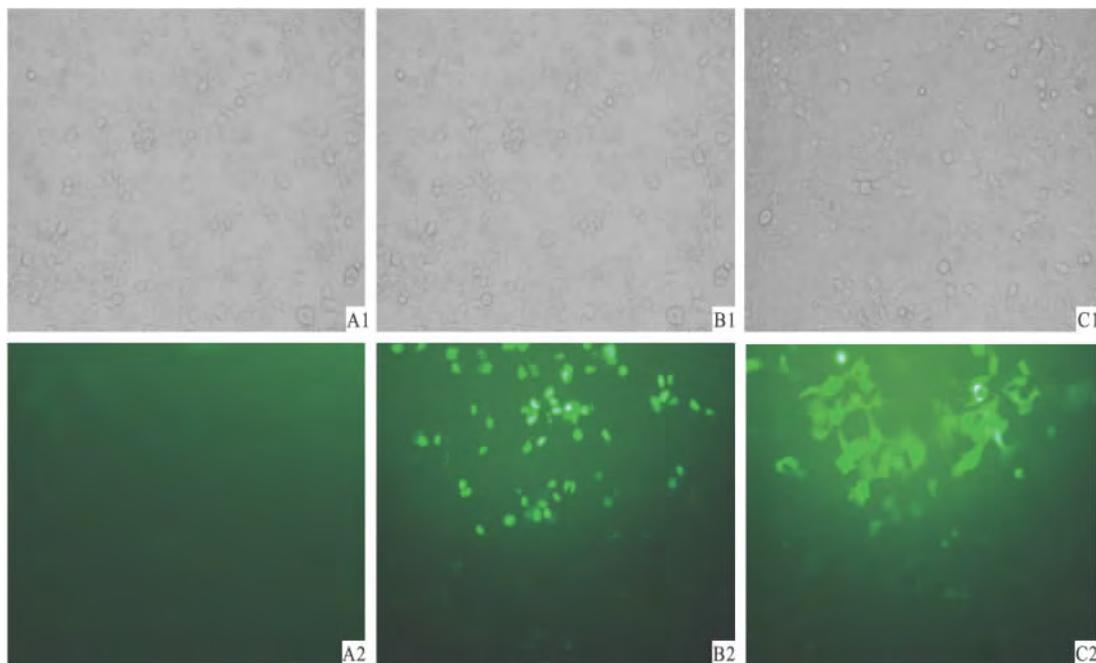


图2 荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白表达 ×200

A:空白组;B:重组质粒转染组;C:阴性组;1:24 h 明场;2:24 h 暗场

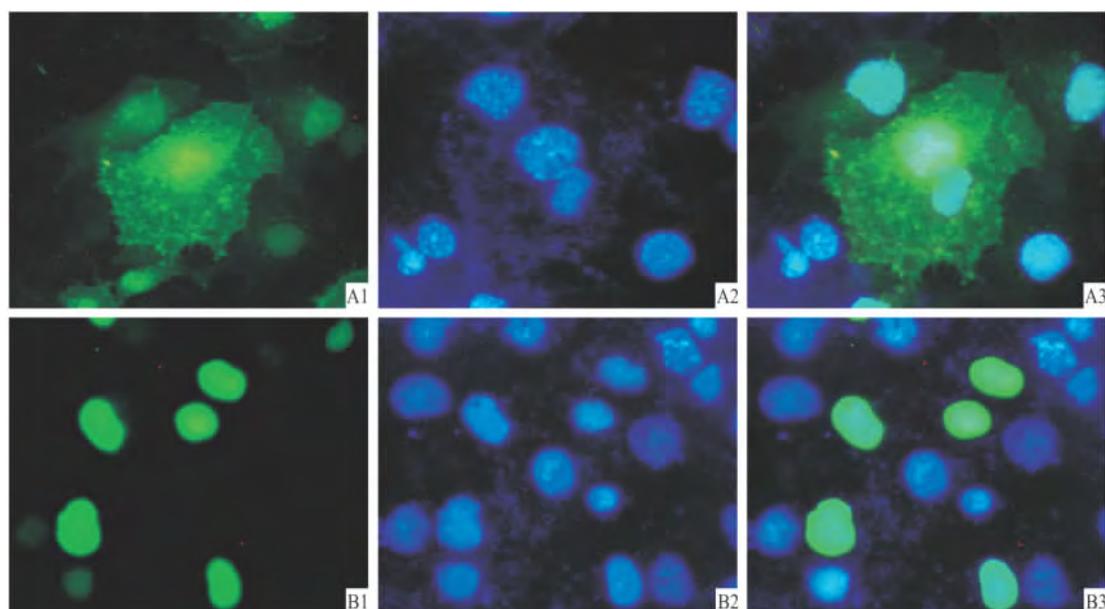


图3 细胞定位实验观察 MeCP2 蛋白定位 ×1 000

A:单转 pEGFP-C2;A1:pEGFP-C2 的定位;A2:DAPI 染核;A3:A1 和 A2 复合图;B:单转 pEGFP-C2-MeCP2;B1:MeCP2 的定位;B2:DAPI 染核;B3:B1 和 B2 复合图

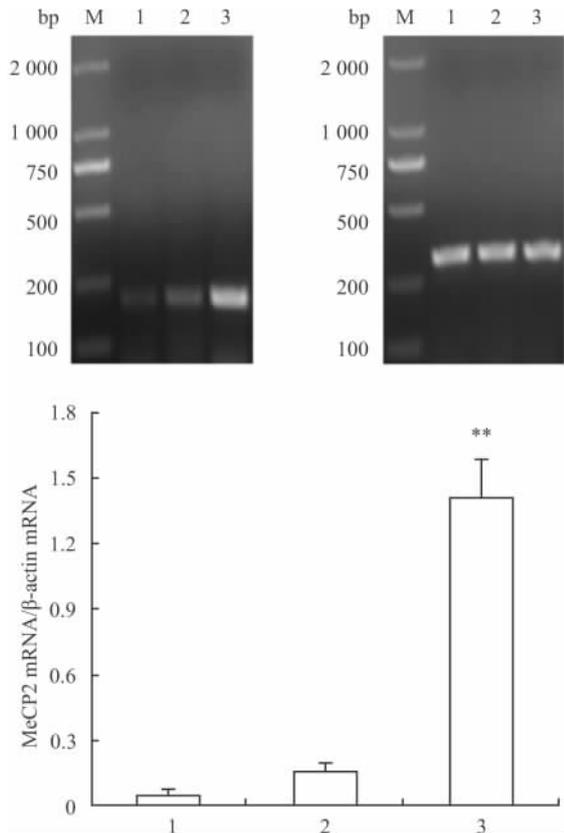


图4 RT-PCR法检测 MeCP2 mRNA 的表达

M: Marker; 1: 空白组; 2: 阴性组; 3: 重组质粒转染组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$

2.4 重组质粒对 MeCP2 蛋白水平的影响和 GFP-MeCP2 融合蛋白的表达 转染后融合蛋白检测结果如图 5, 可见重组质粒转染组 GFP-MeCP2 融合蛋白在 80 ku 处表达, 阴性组在 27 ku 处表达, 表明重组质粒转染到 COS-7 细胞中成功表达 GFP-MeCP2 融合蛋白。用 MeCP2 抗体特异性识别, 在 53 ku 处为其内源性表达, 在 80 ku 处质粒转染组出现明显条带, 同时空白组和阴性组没有类似条带, 表明外源性 MeCP2 在细胞中得到表达, 见图 6。

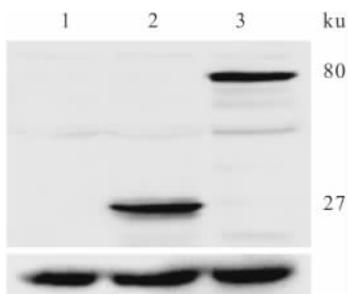


图5 重组质粒转染 COS-7 细胞后融合蛋白的表达

1: 空白组; 2: 阴性组; 3: 重组质粒转染组

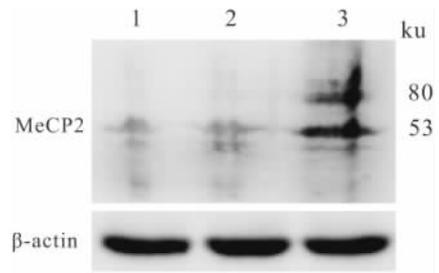


图6 Western blot 法检测 MeCP2 蛋白的表达

1: 空白组; 2: 阴性组; 3: 重组质粒转染组

3 讨论

MeCP2 蛋白广泛分布于多种组织和细胞, 在脑内的表达水平最高, 优先表达于神经元中, 与神经元发育有关。人类 MeCP2 基因位于染色体 Xq28 长臂区, 其结构含有 5' 非翻译区、4 个外显子、3' 非翻译区^[2]。MeCP2 作为一个多功能核蛋白, 影响染色质结构, 调控 RNA 剪接和转录激活, 其结构至少由 6 个结构域组成, 从 N 末端到 C 末端依次为 HMGD1、MBD、HMGD2、转录抑制域 (TRD)、羧基端 CTD 区域被分为 CTD-α 及 CTD-β^[3]。MeCP2 可以特异性结合甲基化 DNA, 含有两个功能区域: 由 85 个氨基酸组成的 MBD 和由 104 个氨基酸组成的 TRD^[4]。MBD 包含有特殊的 Asxi-ST 序列, 可以特异地结合 mCpG 上的 5-甲基胞嘧啶, 广泛的参与基因转录抑制。TRD 与一个转录抑制复合体起协同作用, 此复合体包括辅助抑制因子 Sin3A 和组蛋白去乙酰化酶, 使组蛋白 H3、H4 去乙酰化, 导致染色体浓缩从而抑制基因转录作用^[5]。

DNA 甲基化在基因调控中有着非常重要的作用, 研究^[6]显示人类肿瘤的发生与肿瘤相关基因的 CpG 岛甲基化程度有关联, 抑癌基因甲基化程度增加, 导致抑癌基因表达受到抑制, 而 CpG 岛异常高甲基化出现需要甲基化结合蛋白的参与^[7]。

MeCP2 是一个非常普遍的转录抑制子, 与肿瘤及其他疾病都有着密切关联。利用 shRNA 干扰 MeCP2 的表达, 可以使正常前列腺细胞和前列腺癌细胞生长发生阻滞, 将异质 MeCP2 导入前列腺癌细胞可以促进细胞的生长^[8]。利用 siRNA 干扰技术靶向封闭 MeCP2 的表达, 可抑制大鼠肝星状细胞的活化增殖, 提示 MeCP2 可能参与了肝纤维化的形成^[9]。关于过表达 MeCP2 对肿瘤细胞的影响的研究报道目前不是非常明确, 因此建立 MeCP2 过表达细胞模型对肿瘤细胞的研究很有必要。本研究将构建好的重组质粒 pEGFP-C2-MeCP2 转染到 COS-7 细

胞并对 MeCP2 的 mRNA 和蛋白 表达水平进行了初步分析。

pEGFP-C2 是一种能够表达绿色荧光蛋白的载体,可以编码 GFP,一般情况下不影响目的基因的生物学活性,且不干扰细胞的生长,检测方便,荧光稳定,因而可以在活细胞状态下观察基因的表达,并可以根据其绿色荧光的分布分析目的蛋白在细胞中的定位^[10]。

本研究通过基因重组技术,将从 cDNA 文库中扩增出 MeCP2 全长基因序列并将其插入到 pEGFP-C2 载体中,成功构建出了表达 MeCP2 和绿色荧光蛋白融合基因的重组质粒,双酶切鉴定结果证实外源基因片段插入到载体相应的位置,序列测定分析插入的外源基因,结果证实质粒构建成功。pEGFP-C2-MeCP2 重组质粒转染至 COS-7 细胞后,荧光倒置显微镜和细胞定位实验观察到绿色荧光表达,MeCP2 蛋白定位于胞核。RT-PCR 法和 Western blot 法检测结果显示 MeCP2 重组质粒转染组与空白组和阴性组相比在 mRNA 和蛋白水平都明显增加,同时也利用 GFP 抗体检测到了 GFP-MeCP2 融合蛋白的表达。

参考文献

[1] Fournier A, Sasai N, Nakao M, et al. The role of methyl-binding

proteins in chromatin organization and epigenome maintenance [J]. *Brief Funct Genomics* 2012, 11(3):251-64.

[2] Liu J, Francke U. Identification of cis-regulatory elements for MECP2 expression [J]. *Hum Mol Genet* 2006, 15(11):1769-82.

[3] Hite K C, Adams V H, Hansen J C. Recent advances in MeCP2 structure and function [J]. *Biochem Cell Biol* 2009, 87(1):219-27.

[4] Della Ragione F, Filosa S, Scalabri F, et al. MeCP2 as a genome-wide modulator: the renewal of an old story [J]. *Front Genet*, 2012, 3:181.

[5] Chahrouh M, Zoghbi H Y. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology [J]. *Neuron* 2007, 56(3):422-37.

[6] Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges [J]. *Nat Rev Genet* 2012, 13(10):679-92.

[7] Scusi E L, Loose D S, Wray C J. Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma [J]. *HPB (Oxford)*, 2011, 13(6):369-76.

[8] Bernard D, Gil J, Dumont P, et al. The methyl-CpG-binding protein MECP2 is required for prostate cancer cell growth [J]. *Oncogene* 2006, 25(9):1358-66.

[9] 陶辉, 黄成, 杨晶晶, 等. RNAi 介导 MeCP2 基因沉默对 HSC-T6 细胞活化增殖的影响 [J]. *中国药理学通报* 2012, 28(3):333-6.

[10] 徐涛, 黄成, 李琳, 等. pEGFP-C2-TRPM7 重组质粒的构建及表达 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(1):89-93.

Construction of recombinant pEGFP-C2-MeCP2 and its expression

Peng Yunyun^{1,2}, Huang Cheng^{1,2}, Ma Taotao^{1,2}, et al

(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, ²Institute for Liver Disease of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the GFP-tagged eukaryotic expression vector of human MeCP2 gene and identify its expression and localization in COS-7 cells. **Methods** Total RNA and cDNA were extracted from HepG2 cells, the MeCP2 coding sequence was amplified by PCR method and cloned into pEGFP-C2 vectors. After the target region was sequenced, the recombinant vector was transfected into COS-7 cells, the expression and localization of pEGFP-C2-MeCP2 recombinant plasmid was monitored by immunofluorescence, PCR and Western blot. **Results** The recombinant vector was recombined successfully, the length of the fragment was about 1 461 bp. The protein and mRNA of MeCP2 were increased visibly. The nuclear fluorescence localization of MeCP2 protein was proved by immunofluorescence. **Conclusion** The eukaryotic expression vector of MeCP2 has been successfully constructed and expressed in COS-7 cells. The recombinant vector would be a useful material for MeCP2 function investigation.

Key words MeCP2; COS-7; gene expression