

重组大鼠质粒 pEGFP-GDNF 的构建 及 SH-SY5Y 细胞的转染

摘要

目的

构建携带大鼠胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 基因的真核细胞表达载体，为应用 GDNF 进行如帕金森综合症之类的神经元退化性疾病的基因治疗打基础。

方法

采用 RT-PCR 方法从大鼠胎脑组织总 RNA 中扩增出该基因的全序列 cDNA，并克隆到增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 报告基因的真核表达载体 pEGFP-C1 中，经酶切鉴定及测序分析对重组质粒 pEGFP-GDNF 作进一步鉴定。采用电转方法将重组质粒 pEGFP-GDNF 转染至 SH-SY5Y 细胞。

结果

大鼠 GDNF cDNA 已正确地克隆到真核表达载体 pEGFP-C1 中，而构建成重组大鼠质粒 pEGFP-GDNF。GDNF 基因在细胞中可稳定表达。

结论

真核细胞表达载体 pEGFP-GDNF 以及表达 GDNF 工程细胞 SH-SY5Y 的成功构建，为进一步开展 GDNF 基因治疗脑缺血疾病的研究奠定了基础。

关键词

胶质细胞源性神经营养因子 / 生物合成，逆转录 - 聚合酶链反应、遗传载体，重组，遗传，基因疗法，融合蛋白转染细胞

胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic growth factor, GDNF) 属于 TGF- β 超家族成员，最早由小鼠胶质细胞株 B49 细胞分离并命名。这种蛋白质具有很强的促多巴胺能神经元存活的作用。随着研究的深入，发现它具有广谱性神经营养作用^[1,2]。它不仅作用于多巴胺神经元，而且对周围神经系统运动神经元和感觉神经元的发育，存活和再生有促进作用。在脑缺血的研究中，发现 GDNF 参与神经修复过程，并发挥神经保护作用。

GDNF 可以调节酪氨酸羟化酶的表达，有实验表明海马内注入 GDNF 后，降低了缺血诱发的 TH mRNA 水平；海马局部用 GDNF 处理，也减少了 TH 样免疫阳性反应^[3]。另外 GDNF 还有抗 NMDA 的细胞毒作用，在海马切片培养基中加入重组人类 GDNF(rhGDNF)，1h 后暴露于 NMDA 48h，在暴露前、后均可见到神经元死亡。通过检查发现，加入 rhGDNF 后，存活神经元数目显著增加，呈现明显的神经保护作用^[4]。GDNF 有抗凋亡作用，Kitagawa H 及 Abe K 等在局部应用 GDNF 的研究中发现，将大鼠的大脑中动脉永

久性栓塞，GDNF 减小了脑缺血后的梗塞面积，脑水肿也明显减轻，而 DNA 断裂情况及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶免疫阳性反应，也都有改善。局部应用 GDNF，脑梗塞面积减小了 48% (P = 0.01)，脑水肿程度减少 30% (P=0.01)。TUNEL 和免疫染色显示的 caspases-1、3 阳性反应明显减弱。提示 GDNF 减小梗塞面积和脑水肿程度，可能与减少 DNA 断裂和凋亡信号有关，也有可能是通过 caspases-1 和 caspases-3 级联反应实现的^[5,6]。

鉴于 GDNF 具有强大的神经保护作用，目前的研究主要集中在基因治疗上。将外源性 GDNF 基因导入动物体内，然后检测 GDNF 的表达水平，观察其效果。但 GDNF 属生物大分子，不能直接通过血脑屏障，其应用受到了限制。作者拟用分子生物学及细胞生物学技术将大鼠 GDNF 基因转移到神经前体细胞或非神经细胞中，然后用于移植治疗实验性脑缺血，为脑缺血后神经保护基因治疗这一新思路进行尝试。本文报告第一部分工作，即大鼠 GDNF 基因真核细胞表达载体的构建及其鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒：大肠杆菌 JM109、pMD18-T Simple 平滑载体及质粒 pEGFP-C1 为 ClonTech 公司产品。

1.1.2 试剂：限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Klenow 酶、TRIzol 试剂、cDNA 合成试剂盒、Tag DNA、聚合酶 X-gal 及异丙基 - β -D- 硫代半乳糖苷酶 (IPTG) 为 TaKaRa 公司产品。pEGFP-C1 质粒购自 ClonTech 公司。

1.1.3 引物设计：

CTS728F:

5'ATAGATCTCGGGACTCTAAGATGAAGTT3'

CTS728R:

5'AAGGTACCCAGGGTCAGATACATCCAC3'

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取：取约 100 mg 的新鲜 SD 大鼠胎脑组织，加入 1ml 的 RNA 提取试剂 TRIzol，充分匀浆后室温放置 5 分钟。加入 200 μ l 的氯仿充分振荡，室温放置 2-3 分钟。4°C 12,000 rpm/min 离心 10 min，沉淀以 70% 的乙醇洗一次后抽干，溶解于 50 μ l DEPC 处理的水中，-70°C 保存。以电泳和波长 260 nm 光谱吸收的情况来判定所抽提 RNA 的质量和浓度。

1.2.2 GDNF cDNA 的合成与 PCR 扩增反应：以 Total RNA 为模板，Oligo dT-Adaptor primer 为反转录引物，使用 TaKaRa RNA LAPCR kit (AMV) Ver.1.1 进行 RT 反应，合成 cDNA。再以合成的 cDNA 为模板，CTS728F/CTS728R 为引物，进行 PCR 扩增目的片段。取 2 μ l 反转录产物为模板；按常规的 PCR 反应条件，先将样品于 94°C 变性 5 min，加入 2U 的 Taq DNA 聚合酶，按下列参数循环 35 次：94°C 变性 1 min，55°C 退火 1 min，72°C 延伸 1 min，最后一个循环 72°C 反应 10 min。由于扩增片段量少，进行二次 PCR 扩增反应，取 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳，并切胶回收目的片段，溶于 15 μ l dH₂O。使用 DNA 连接试剂将 Insert DNA 与 pMD18-T Simple 平滑载体连接后，热转化至 E.coli Competent JM109 Cell 中，涂布平板后，37°C 过夜培养。

1.2.3 挑选菌落，提取质粒后，测序：质粒 CTS728-1、质粒 CTS728-8 以 BcaBEST Primer M13-47、BcaBEST Primer RV-M 为引物进行 DNA 测序。

1.2.4 GDNF cDNA 真核表达载体的构建：pEGFP-C1 质粒用 Bg1II 和 KpnI 双酶切，切胶回收 Insert DNA 载体。溶于

15 μ l 的 dH₂O 中。质粒 CTS728-8 用 Bg1II 和 KpnI 双酶切，切胶回收 Insert DNA 片段。将载体和 Insert 片段连接，构建载体转基因重组质粒 pEGFP-GDNF。热转化至 E.coli Competent DH5 α 中，涂布平板过夜培养。挑选菌落，提取质粒后，Bg1II 和 KpnI 以 10 μ l 体系做双酶切检测，确认目的片段是否插入。酶切产物全量琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 SH-SY5Y 细胞培养：培养基采用 DMEM，10% 胎牛血清，100 U/ml 青霉素和链霉素，于 37°C，5% CO₂ 孵箱中培养，2d 换液一次。

1.2.6 GDNF 工程细胞的制备：电转使用 Eppendorf 公司电转仪 240 伏，100 ms'。转染后 48 小时加 G418 300 μ g/ml，72 小时荧光显微镜观察。挑取阳性克隆扩增培养。

2 结果

2.1 大鼠 GDNF cDNA 的克隆

实验中我们以 TRIzol 试剂来提取大鼠胎脑组织的总 RNA， A_{260}/A_{280} 为 2.0，电泳分析清晰可见 28S 及 18S 两条核糖体 RNA、说明抽提的总 RNA 无明显降解。根据 schaar 等报道的大鼠 GDNF 的全长 cDNA 序列，经微机分析，设计两个引物：

引物 1：5'ATAGATCTCGGGACTCTAAGATGAAGTT3'

引物 2：5'AAGGTACCCAGGGTCAGATACATCCAC3'

引物 1 为 GDNF 全长 cDNA 5' 端的序列，引入 Bg1II 酶切位点，含启动密码子 ATG。引物 2 为 GDNF 全长 cDNA 3' 端序列的互补序列，引入 KpnI 酶切位点。以上述合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增后得到一条约 640bp 的清晰条带。

使用 DNA 连接试剂将 Insert DNA 与 pMD18-T Simple 平滑载体连接后，热转化至 E.coli Competent JM109 Cell 中，涂布平板后，37°C 过夜培养。挑取两个阳性克隆质粒 CTS728-1、质粒 CTS728-8 以 BcaBEST Primer M13-47、BcaBEST Primer RV-M 为引物分别进行测序，所测序列与文献报道的序列一致。

2.2 重组质粒 pEGFP-GDNF 的构建

真核表达载体 pEGFP-C1 带有一突变的绿色荧光蛋白的 cDNA 基因，能发出高亮度的绿色荧光，在荧光显微镜下能检测到载体的表达。将克隆在 pMD18-T Simple 平滑载体中的大鼠 GDNF 基因片段以 Bg1II 和 KpnI 双酶切，低熔点胶分离后与先经 Bg1II 和 KpnI 双酶切的真核表达载体 PEGFP-C1 相连接，构建在体转基因重组质粒 pEGFP-GDNF (图 1)。

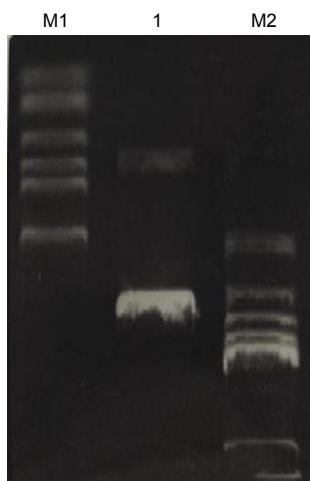


图 1: CTS728-8-1 质粒用 Bg1II 和 KpnI 双酶切

M1: λ - H ind III DNA Marker
1: CTS728-8-1 质粒用 Bg1II 和 KpnI 双酶切
M2: DNA Marker DL2,000

2.3 GDNF 基因在 SH-SY5Y 细胞中可稳定表达

SH-SY5Y 细胞无内源性 GDNF 的表达^[7]。用荧光显微镜方法检测转染重组质粒 pEGFP-GDNF 的 SH-SY5Y 细胞, 挑选绿色荧光最强的细胞克隆 (图 2)。

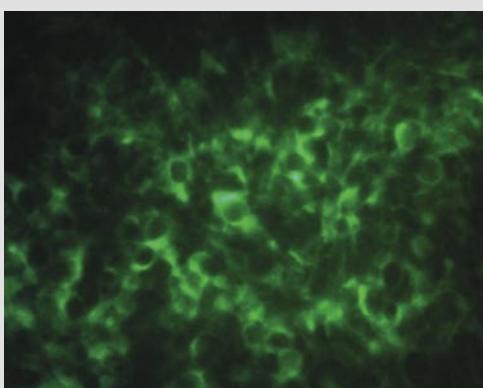


图 2: 用荧光显微镜检测电转重组质粒 pEGFP-GDNF 的 SH-SY5Y 细胞 400X

3 讨论

本实验从鼠胎脑组织中提取总 RNA, 以 RT-PCR 方法获取编码胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 成熟蛋白的 cDNA。为了能使 GDNF 基因体内转染时在体内能检测到蛋白表达, 我们在构建 GDNF cDNA 真核表达载体时将能发出绿色荧光的 EGFP 报告基因融合在 GDNF 基因的 5' 端, 体内转染后如果有绿色荧光蛋白表达, 也表明 GDNF 同时有表达。与以往常用的报告基因相比, GFP 具有以下优点^[8]: ①在荧光显微镜下, 用波长约 490 nm 的紫外线激发后, 即可观察到绿色荧光, 直接、简捷、便于检测。②无需任何的作用底物或共作用物。检测的灵敏度不受反应效率的影响, 保证了极高的检出率。③蛋白本身性质稳定。④可在多种异

源生物中表达且无细胞毒性。⑤其基因片段长度较小 (约 717 bp), 易于构建融合蛋白, 且融合蛋白仍能保持荧光激发活性, 为研究其他基因表达产物的分布提供了方便。GFP 与其他蛋白的融合表达已有很多成功的例子, 而且其 N 及 C 端均可融合, 并不影响其发光。本实验将报告基因 EGFP 和 GDNF 基因融合在一起, 这样既保留了 GDNF 蛋白的神经营养活性, 又能通过融合蛋白表达后仍能保持荧光激发活性, 观察表达的 GDNF 在局部的分布。

GDNF 对黑质纹状体中多巴胺能神经元的损伤有特异性保护作用, 随着研究的深入, 发现它具有广谱性神经营养作用, 在脑缺血的研究中, 发现 GDNF 参与神经修复过程。鉴于 GDNF 具有强大的神经保护作用, 且在低浓度就能表现出很强的活性, 故它可能成为治疗脑缺血等疾病的有效药物。pEGFP-C1 为一种带增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 报告基因的真核表达载体, 能将克隆至其中的目的片段高效表达。裸质粒 DNA 因不具有抗原性, 且纯化方便经济, 若能提高其转染效率, 它在神经系统的基因治疗具有诱人的前景。

本研究构建了真核表达质粒载体 pEGFP / GDNF, 采用了电转的方法将质粒载体 pEGFP / GDNF 转入 SH-SY5Y 细胞中, 构建表达 GDNF 的基因工程细胞。电转无毒, 且具有高转染效率, 已被认为是转染神经细胞的重要方法。本研究应用基因重组技术构建 GDNF 真核表达质粒重组体, 为脑内移植基因治疗奠定了基础。目前正尝试将基因工程细胞移植于脑缺血大鼠模型脑内, 此为开展脑缺血等疾病的基因治疗奠定了基础。

参考文献:

- 1 韩济生, 神经科学原理 [M], 第二版, 北京: 北京医科大学出版社, 1999, 1025-1027.
- 2 Lin LFH, Doberty DH, Lile JD, et al. GDNF a glial cell line derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 1993, 260: 1130-1132.
- 3 Miyazaki H, Ono T, Okuma Y, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor modulates ischemia-induced tyrosine hydroxylase expression in rat hippocampus [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(6): 2032-2038.
- 4 Bpmde C, Kristensen BW, Blaabjerg M, et al. GDNF and neublastin protect against NMDA-induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures [J]. *Neuroreport*, 2000, 11 (18): 4069-4073.5.
- 5 Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, et al. Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 1998, 29(7): 1417-1422.
- 6 Kitagawa H, Abe K, Hayashi T, et al. Ameliorative effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on brain dema formation after permanent middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Neurol Res*, 1998, 20(4): 333-336.
- 7 马端端, 王晓民, 王昕虹等。GDNF cDNA 在神经及非神经细胞系中的表达。北京医科大学学报, 1997, 29: 2-4。
- 8 Prasher DC. Using GFP to see the light [J]. *TIG*, 1995, 11(8): 320-322.