

· 论 著 ·

大鼠谷氨酰胺合成酶基因的克隆及其在 HeLa-G 细胞中的表达*

孙伟峰¹, 刘春兴², 邹健^{3△}

(1. 南京医科大学附属无锡市人民医院检验科 214023; 2. 上海市华东疗养院 214065;

3. 南京医科大学附属无锡市人民医院中心实验室 214023)

摘要:目的 克隆大鼠谷氨酰胺合成酶(GS)基因,构建其真核表达载体,并观察其在 HeLa-G 细胞中的表达。方法 采用 RT-PCR 方法,以大鼠大脑皮层总 RNA 为模板,扩增 GS 基因,定向克隆到 pEGFP-N3 载体中。以 LipofectamineTM2000 试剂转染 pEGFP-N3-GS 表达载体至 HeLa-G 细胞中进行瞬时真核表达。以免疫细胞化学方法鉴定 GS 的表达。结果 从大鼠大脑皮层组织中克隆到序列正确的 GS 全长编码序列。所构建的 pEGFP-N3-GS 质粒在 HeLa-G 细胞中获得高效表达。结论 大鼠 GS 基因的克隆、真核表达载体的构建及在 HeLa-G 中的表达获得成功。

关键词:谷氨酰胺连接酶;克隆,生物;真核表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)07-0636-02

Cloning of rat glutamine synthetase gene and its expression in HeLa-G cells*

Sun Weifeng¹, Liu Chunxing², Zou Jian^{3△},

(1. Department of Laboratory Medicine, First Wuxi Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi,

Jiangsu 214023, China; 2. Shanghai Huadong Sanitarium, Shanghai 214065, China;

3 Department of Clinical Laboratory Science, First Wuxi Affiliated Hospital of Nanjing Medical

University, Wuxi, Jiangsu 214023, China)

Abstract: Objective To clone rat glutamine synthetase(GS) gene and to express it in mammalian cells. **Methods** Rat GS cDNA was amplified by RT-PCR from RNA of rat cerebral cortex tissue. GS cDNA was inserted into eukaryotic expression vector pEGFP-N3. The recombinant expression vector was transiently transfected into HeLa-G cells by LipofectamineTM2000 reagent. The expression of GS in HeLa-G cells was detected by immunocytochemistry. **Results** The sequence of the cloned GS was confirmed by DNA sequencing. The HeLa-G cells transfected with pEGFP-N3-GS could efficiently express GS protein. **Conclusion** The cloning of rat GS gene and the construction of its eukaryotic expression vector are successful, which lays the foundation for further investigating the role of GS in astrocytes.

Key words: glutamate-ammonia ligase; cloning, drgarism; eukaryotic expression

谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)在中枢神经系统(central nervous system, CNS)的大多数星形胶质细胞中都有表达^[1-2]。它能将星形胶质细胞摄取的谷氨酸转化为具有神经营养作用的谷氨酰胺供神经元摄取利用^[3]。因此,它具有调节细胞间谷氨酸和谷氨酰胺平衡的重要作用^[4],是星形胶质细胞行使兴奋性毒性保护作用的重要分子^[5-6]。目前对于 GS 的研究主要集中于与谷氨酸代谢相关的一些领域,其他方面的研究很少涉及。已有研究表明 GS 与星形胶质细胞的分化成熟有关^[7-9],提示 GS 有可能在星形胶质细胞中发挥更为广泛的作用。为深入研究 GS 的功能,本研究克隆了大鼠 GS 基因,并构建了 pEGFP-N3-GS 真核表达载体,在 HeLa-G 细胞中进行了瞬时表达和鉴定,为今后研究 GS 在星形胶质细胞分化和 CNS 损伤后反应性星形胶质细胞中的表达和功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心。HeLa-G 细胞和 DH5 α 菌为本室保存。所有细胞培养用液和 Trizol 试剂均购自 Invitrogen 公司。真核表达载体 pEGFP-N3 购自 Clontech 公司。限制性内切酶 Hind III 和 Kpn I、T4 DNA 连

接酶、rTaq DNA 聚合酶和逆转录试剂盒均购自 Takara 公司。质粒纯化试剂盒及胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。LipofectamineTM2000 转染试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品。兔抗大鼠 GS 多克隆抗体为 Abcam 公司产品。罗丹明标记的羊抗兔多抗购自 Jackson 公司。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠 GS 全长 cDNA 的 RT-PCR 扩增 用 Trizol 试剂抽提大鼠大脑皮层总 RNA 并逆转录为 cDNA,以该 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。上游引物:5'-CCC AAG CTT ATG GCC ACC TCA GCA AGT TC-3',在 5'端引入 Hind III 酶切位点;下游引物:5'-GGG GTA CCG TTC TTG TAT TGG AAG GGC TC-3',在 5'端引入 Kpn I 酶切位点;循环条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 33 个循环,最后于 72 °C 延伸 10 min。将 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

1.2.2 大鼠 GS 基因真核表达质粒的构建和鉴定 PCR 产物经胶回收纯化后与 pEGFP-N3 载体分别以 Hind III、Kpn I 进行双酶切。将酶切后的目的基因与载体经 T4 DNA 连接酶于

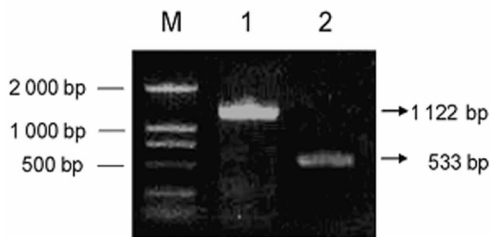
4 °C 连接过夜,并转化 DH5a 菌。挑取阳性克隆经摇菌后提取质粒,以 Hind III 和 Kpn I 双酶切鉴定^[10],酶切鉴定符合的克隆送上海鼎国生物技术有限公司测序鉴定。

1.2.3 脂质体法转染 HeLa-G 细胞 将 HeLa-G 细胞接种于 24 孔板中多聚赖氨酸包被的 coverslips 上,培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM。待细胞生长达 70% 融合时进行转染,转染前用 HBSS 和 Opti-MEM 洗细胞并换上 Opti-MEM。转染步骤与方法按 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行。每平皿加 0.8 mg 载体和 2.4 mL Lipofectamine™ 2000。同时以 pEGFP-N3 空载体进行转染,作为阴性对照。转染 4 h 后换上 DMEM 培养液,72 h 后结束培养并用 4% 多聚甲醛固定细胞。

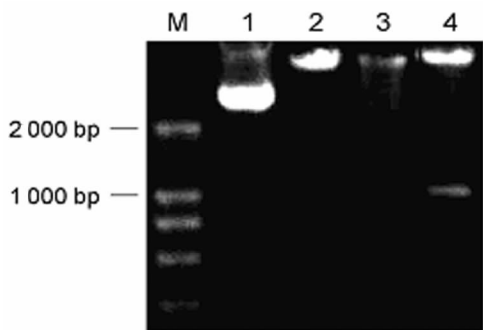
1.2.4 免疫细胞化学法检测 GS 蛋白的表达 多聚甲醛固定后的细胞用 10% 正常山羊血清室温封闭 1 h 后与兔抗大鼠 GS 多克隆抗体在 4 °C 孵育过夜,然后与罗丹明标记的羊抗兔二抗在 37 °C 孵育 1 h, Gel/Mount 封片后在 Olympus BX60 荧光显微镜下观察染色结果及绿色荧光蛋白 (grten fluorescent pntein, GFP) 荧光。

2 结 果

2.1 大鼠 GS cDNA 的 RT-PCR 扩增 大鼠大脑皮层总 RNA 应用上述特异性引物经 RT-PCR 扩增后,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,在预期的位置显示一条约 1 122 bp 的条带,见图 1。



M: DNA 标记物; 1: GS PCR 产物; 2: β-肌动蛋白。
图 1 GS 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析



M: DNA 标记物; 1: pEGFP-N3; 2: pEGFP-N3/Hind III; 3: pEGFP-N3-GS/Hind III; 4: pEGFP-N3-GS/Hind III + Kpn I。

图 2 重组质粒 pEGFP-N3-GS 的酶切鉴定

2.2 pEGFP-N3-GS 表达质粒的构建和鉴定 RT-PCR 扩增的片段经 Hind III、Kpn I 双酶切后,克隆到同样经 Hind III、Kpn I 双酶切的真核表达质粒 pEGFP-N3 中。转化 DH5a 菌后筛选出对卡那霉素具有抗性的阳性克隆,小量制备质粒,用 Hind III 和 Kpn I 双酶切鉴定重组质粒,可释放出约 1 122 bp 和 4.7 kb 大小的片段,同预期的结果一致(图 2)。测序结果经

比对序列完全正确,说明 GS 基因已成功克隆至 pEGFP-N3 载体中。

2.3 pEGFP-N3-GS 质粒在 HeLa-G 细胞的表达及免疫染色鉴定 将 pEGFP-N3-GS 重组质粒和 pEGFP-N3 空载体用脂质体法分别转染到 HeLa-G 细胞中,转染后 12 h 即可在荧光显微镜下观察到转染细胞中 GFP 荧光的表达,但表达量较少,随着时间的延长,GFP 的表达量逐渐增加,至 72 h 最强。GS 免疫染色结果表明,重组质粒转染上的 HeLa-G 细胞(发绿色荧光)有 GS 的表达,而未转染上及转染空载体的细胞 GS 不表达,见插图 3。

3 讨 论

GS 是 CNS 损伤后兴奋性毒性保护性研究方面颇受关注的一个分子。GS 广泛表达于脊椎动物的神经系统中,尤其是大脑。它负责对氨基酸类神经递质的解毒,更是对谷氨酸类神经递质的代谢调控发挥举足轻重的作用^[11]。它主要表达于星形胶质细胞,故有关其作用的研究多在星形胶质细胞进行^[1]。GS 的表达或活性水平在一定程度上反映了星形胶质细胞的状态和功能,也间接地影响了神经元的功能^[12]。已有的研究表明,GS 表达水平与星形胶质细胞的分化成熟状态存在关联^[7]。GS 与 CNS 损伤后星形胶质细胞反应性活化也存在紧密的联系。阿尔茨海默病患者的脑皮层组织中 GS 的活性常出现显著的降低^[13];而在其他一些病理状况下,GS 的活性又会出现增高的现象,如脑缺血^[14]和脑缺氧^[15]。而在脑缺氧损伤中发现的 GS 活性增高被认为是神经系统应对缺氧造成损伤的一种自我保护机制^[1]。在这些病理状况下,星形胶质细胞在不同因素作用下其形态和功能都发生了明显的改变,GS 作为细胞重要能源物质谷氨酰胺的加工者必然参与其中,但它究竟发挥了怎样的功能尚待阐明。因此,有必要更加深入、直接地研究 GS 在星形胶质细胞分化以及星形胶质细胞损伤后的功能和意义。

为了进一步研究 GS 在星形胶质细胞分化及星形胶质细胞损伤后的功能,本研究构建了 GS 真核表达载体。实验结果表明,已经成功地将大鼠 GS 基因全长 cDNA 序列克隆到 pEGFP-N3 真核表达载体,并在 HeLa-G 细胞中进行了瞬时表达。转染后 GS 免疫荧光染色和 GFP 荧光均证实 GS 在 HeLa-G 中得到了表达,GS 定位于细胞质。这表明本研究所构建的 GS 表达载体能够被用来进一步转染到星形胶质细胞中,为下一步研究 GS 在星形胶质细胞分化和 CNS 损伤后反应性星形胶质细胞中的表达和功能提供了有力手段。

参考文献:

[1] Shaked I, Ben-Dror I, Vardimon L. Glutamine synthetase enhances the clearance of extracellular glutamate by the neural retina[J]. J Neurochem, 2002, 83(3): 574-580.
 [2] He Y, Hakvoort TB, Vermeulen JL, et al. Glutamine synthetase deficiency in murine astrocytes results in neonatal death[J]. Glia, 2010, 58(6): 741-754.
 [3] Lehmann C, Bette S, Engele J. High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes [J]. Brain Res, 2009(1297): 1-8.

- ry arterial hypertension[J]. *New Engl J Med*, 2004, 351(16):1655-1665.
- [2] Humbert M, Sanchez O, Fartoukh M, et al. Short-term and long-term epoprostenol prostacyclin therapy in pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases: results of a pilot study[J]. *Eur Respir J*, 1999, 13(6):1351-1356.
- [3] 高莹, 崔大山, 周维新, 等. 41 例闭塞性肺动脉高压患者应用多普勒超声心动图法与右心导管法测定肺动脉压力的比较[J]. *中国循环杂志*, 2004, 19(3):216-218.
- [4] Sitbon O, Badesch DB, Channick RN, et al. Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension: a 1-year follow up study[J]. *Chest*, 2003, 124(1):247-254.
- [5] Pan TL, Thumboo J, Boe ML. Primary and secondary pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2000, 9(5):338-342.
- [6] Strange JW, Wharton J, Phillips PG, et al. Recent insights into the pathogenetics and therapeutics of pulmonary hypertension[J]. *Clin Sci (lond)*, 2002, 102(4):253-268.
- [7] Fishman AP. Primary pulmonary arterial hypertension: a look back[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(12 Suppl):S2-4.
- [8] Dawson JK, Goodson NG, Graham DR, et al. Raised pulmonary artery pressures measured with Doppler echocardiography in rheumatoid arthritis patients [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2000, 39(12):1320-1321.
- [9] Mukerjee D, Yap LB, Ong V, et al. The myth of pulmonary Raynaud's phenomenon: the contribution of pulmonary arterial vasospasm in patients with systemic sclerosis related pulmonary arterial hypertension [J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(12):1627-1631.
- [10] Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension[J]. *New Engl J Med*, 2002, 346(12):896-903.
- [11] 陈志营, 毕黎琦, 赵林阳, 等. 结缔组织病与肺动脉高压 [J]. *中国实验诊断学*, 2003, 7(6):551-555.
- [12] Proudman SM, Stevens WM, Sahhar J, et al. pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the need for early detection and treatment[J]. *Intern Med J*, 2007, 37(7):485-494.
- [13] Dawson JK, Goodson NG, Graham DR, et al. Raised pulmonary artery pressures measured with Doppler echocardiography in rheumatoid arthritis patients [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2000, 39(12):1320.
- [14] Mc Goon M, Gutterman D, Steen V, et al. Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines [J]. *Chest*, 2004, 126(1 Suppl):S14-34.
- [15] 唐雪梅, 李秋, 王墨. 儿童混合性结缔组织病 15 例临床分析 [J]. *重庆医学*, 2003, 32(4):30-32.

(收稿日期:2010-05-10 修回日期:2010-09-10)

(上接第 637 页)

- [4] Kam K, Nicoll R. Excitatory synaptic transmission persists independently of the glutamate-glutamine cycle[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(34):9192-9200.
- [5] Fernandez DC, Chianelli MS, Rosenstein RE. Involvement of glutamate in retinal protection against ischemia/reperfusion damage induced by post-conditioning[J]. *J Neurochem*, 2009, 111(2):488-498.
- [6] Lee A, Lingwood BE, Bjorkman ST, et al. Colditz, and DV. Pow, Rapid loss of glutamine synthetase from astrocytes in response to hypoxia: implications for excitotoxicity[J]. *J Chem Neuroanat*, 2009, 39(3):211-220.
- [7] Hama H, Sakurai T, Kasuya Y, et al. Action of endothelin-1 on rat astrocytes through the ETB receptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 186(1):355-362.
- [8] Fajerson J, Tinsley RB, Aprico K, et al. Eriksson, Reactive astrogliosis induces astrocytic differentiation of adult neural stem/progenitor cells in vitro[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(7):1415-1424.
- [9] Vermeulen T, Gorg B, Vogl T, et al. Glutamine synthetase is essential for proliferation of fetal skin fibroblasts[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 478(1):96-102.
- [10] 张从纪, 杨彦春, 单佑安. VEGF 基因真核表达载体的构建及其在骨髓间充质干细胞中的表达 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(1):4.
- [11] Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia[J]. *Neurochem Int*, 2002, 41(2/3):123-142.
- [12] Chiang CY, Wang J, Xie YF, et al. Sessle, Astroglial glutamate-glutamine shuttle is involved in central sensitization of nociceptive neurons in rat medullary dorsal horn [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(34):9068-9076.
- [13] Robinson SR. Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2000, 36(4/5):471-482.
- [14] Petit, CK, Chung MC, Verkhovsky LM, et al. Cooper, Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat[J]. *Brain Res*, 1992, 569(2):275-280.
- [15] Sher PK, Hu SX. Increased glutamate uptake and glutamine synthetase activity in neuronal cell cultures surviving chronic hypoxia[J]. *Glia*, 1990, 3(5):350-357.

(收稿日期:2010-03-10 修回日期:2010-09-10)