

新基因 *P15RS* 表达产物在人胃癌细胞 细胞周期中定位的研究*

张小勇¹⁾ 张伟¹⁾ 高萍¹⁾ 常智杰²⁾ 孙一娜¹⁾ 柳惠图^{1)**}

¹⁾北京师范大学生命科学学院, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875

²⁾清华大学生命科学与医学研究院, 北京 100084)

摘要 *P15RS* 是在 *p15^{INK4b}* 高表达的人黑色素瘤细胞 MLIK6 G1 期中发现和克隆的新基因. 研究表明, 该基因可能在 G1 期作为增殖负调因子起作用. 为了观察 *P15RS* 基因产物在细胞中的定位, 构建了表达 *P15RS*-EGFP 融合蛋白的真核表达质粒 pEGFP-*P15RS*. 用绿色荧光蛋白 GFP 作为报告基因, 以人胃癌细胞 BGC-823 为实验模型, 将 pEGFP-*P15RS* 转染 BGC-823 细胞. 实验表明, *P15RS* 基因表达产物在 G1 期、S 期和 G2 期均定位于细胞核内, 未见核仁中分布, M 期凝缩的染色体上未见. 因此, *P15RS* 可能定位在核质中.

关键词 *P15RS*, 人胃癌细胞, GFP, 细胞定位

学科分类号 Q291

周期蛋白依赖性激酶 CDKs(cyclin dependent kinase)普遍存在于从低等到高等的真核细胞中, 它与调节亚基 Cyclin 结合, 磷酸化相应的底物, 使周期事件有条不紊地进行. CDKs 活性的正常发挥是细胞周期有序运行所必需的. CKI(CDK inhibitor)是 CDK 活性调节的重要机制之一. INK4 是 CKI 家族成员之一, 包括 *p16^{INK4a}*、*p15^{INK4b}*、*p18^{INK4c}* 和 *p19^{INK4d}* 等^[1]. 已有实验表明, 在我室自行构建的 *p15^{INK4b}* 高表达的人黑色素瘤细胞 (MLIK6 细胞) 中, *p15^{INK4b}* 高表达阻抑了 G1/S 转换, 并且观察到在处于不同时期的 G1 期中, *Cyclin D*、*E* 和 *c-myc* 等表达均被抑制, 同时 CKI *p21*、*p27* 表达上升, 显示出协同作用^[2]. 进一步在对 *p15^{INK4b}* 高表达的 MLIK6 细胞的研究中, 我室发现了一个新的基因并将其命名为 *P15RS*. 研究表明, *P15RS* 可抑制肿瘤细胞生长, 阻抑 G1/S 期进程, 显示出该基因在 G1 期可能作为增殖负调因子起作用^[3,4].

为了观察 *P15RS* 基因产物在细胞中的定位情况, 我们构建了表达 *P15RS*-EGFP 融合蛋白的真核表达质粒 pEGFP-*P15RS*, 用绿色荧光蛋白 (GFP) 作为报告基因, 以人胃癌细胞 BGC-823 为实验模型, 将 pEGFP-*P15RS* 转染不同细胞周期时相的 BGC-823 细胞, 通过 GFP 发光位置来观察 *P15RS* 基因产物在不同细胞周期细胞中的定位特点.

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞 BGC-823 本室保存; 质粒

pEGFP-N2 购自 Clontech 公司; Lipofect AMINE 脂质体转染试剂盒、DMEM 培养基、OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium 购自 Gibco 公司; 核酸内切酶 *EcoR* I、*Xho* I, T4DNA 连接酶, DL 2000 DNA Marker、DL 15000 DNA Marker 购自 Takara 公司; 胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术研究所; TdR 购自 Sigma 公司.

1.2 细胞培养

细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 (含 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素) 中于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养.

1.3 流式细胞术

收集细胞, 70% 乙醇 4°C 固定 24 h, 重悬细胞, 加入 RNase A 至终浓度为 25 mg/L, 37°C 反应 30 min, PI (终浓度 50 mg/L) 避光染色 1 h. 用流式细胞仪测定.

1.4 细胞同步化

按文献 [5] 中的方法, 采用 TdR-N₂O、TdR-N₂O-TdR 阻断法同步细胞. 通过 TdR-N₂O 阻断获取 M 期细胞, 释放后收集同步的 G1 期细胞, 通过 TdR-N₂O-TdR 阻断获得 G1/S 交界细胞, 释放后分别收集同步的 S 期与 G2 期细胞.

*国家自然科学基金资助项目(39780014, 30300173), 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-58809699, E-mail: liuhuitu@bnu.edu.cn

收稿日期: 2005-02-25, 接受日期: 2005-03-31

1.5 质粒的制备和纯化

按文献[6]中的方法进行。

1.6 DNA 的酶切和片段的回收、连接

质粒和 PCR 产物采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切体系, 并使用博大公司的玻璃奶回收试剂盒回收酶切产物, 进一步将质粒和 PCR 产物的酶切回收片段采用 T4 DNA 连接酶连接体系连接成重组质粒。

1.7 瞬时转染

按照 Lipofect AMINE 脂质体转染试剂盒说明进行转染。

1.8 GFP 荧光观察

常规方法爬片, 转染, 4% 甲醛固定 20 min 后, 0.3% Triton X-100 通透 15 min, 60 μ l PI 染 5 min, 用甘油:PBS (9:1) 封片. 需要同步化的, 先转染再同步, 然后步骤同前. 激光共聚焦显微镜采集图片。

2 结 果

2.1 人胃癌 BGC-823 细胞的同步化

采用 TdR-N₂O 和 TdR-N₂O-TdR 阻断法对人胃癌 BGC-823 细胞进行同步化, 并分别获得 M 期、G1 期、S 期和 G2 期人胃癌 BGC-823 细胞。

2.1.1 流式细胞术检测 M 期细胞

流式细胞术检测表明通过 TdR-N₂O 同步法取得 M 期细胞, 结果见图 1。

M 期细胞在细胞群体中的比例约为 93.2% (图 1b)。

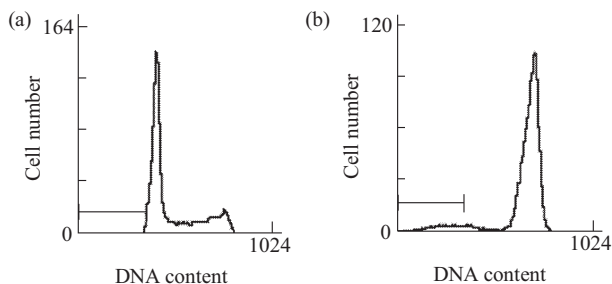


Fig.1 M phase cells analyzed by FCM

(a) BGC-823 cells. G1: 62.6%; S: 28.9%; G2/M: 8.4%. (b) M phase cells of BGC-823. M: 93.2%.

2.1.2 M 期细胞光学显微镜检测

采用固定、低渗和 Giemsa 方法, 显微镜下可观察到同步至 M 期的人胃癌 BGC-823 细胞 (图 2)。

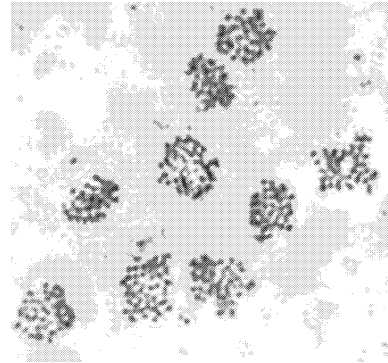


Fig.2 M phase cells of BGC-823
($\times 400$)

2.2 流式细胞术检测 G1, S, G2 期细胞

M 期细胞接种后选择接种后 5、6、7 h 3 个时间点, 分别收集细胞进行流式细胞术测试. 测试结果见图 3。

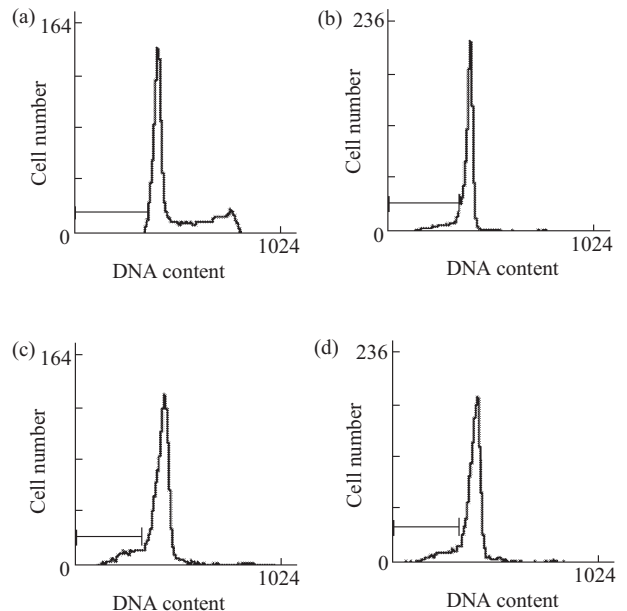


Fig.3 G1 phase cells analyzed by FCM

BGC-823 cells (a), release from M phase for 5 h (b) 6 h (c) 7 h (d). (a) G1: 62.6%; S: 28.9%; G2/M: 8.4%. (b) G1: 93.8%; S: 6.2%; G2/M: 0%. (c) G1: 90.2%; S: 8.3%; G2/M: 1.5%. (d) G1: 92.5%; S: 6.9%; G2/M: 0.6%.

结果表明 M 期释放后 5、6、7 h, G1 期细胞百分数都在 90% 以上, 考虑到后续实验中需要的加药作用时间, 最后我们选择 M 期释放后 5 h 作为收集 G1 期细胞的时间点。

TdR-N₂O-TdR 阻断释放后选择 5、7、9、11、12、13 h 6 个时间点, 分别收集细胞进行流式细胞术测试. 测试结果见图 4。

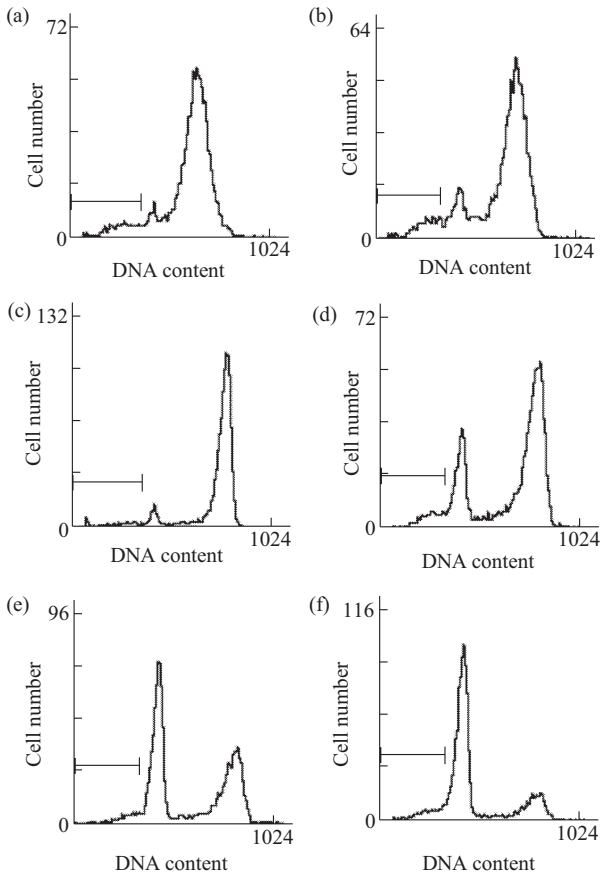


Fig.4 S phase cells analyzed by FCM

Release from arresting of TdR-N₂O-TdR for 5 h (a), 7 h (b), 9 h (c), 11 h (d), 12 h (e), 13 h (f). (a) G1: 7.4%; S: 81.9%; G2/M: 7.3%. (b) G1: 12.1%; S: 85.4%; G2/M: 5.9%. (c) G1: 5.1%; S: 13.1%; G2/M: 81.9%. (d) G1: 19.7%; S: 18.8%; G2/M: 61.5%. (e) G1: 47.6%; S: 14.3%; G2/M: 38.1%. (f) G1: 71.1%; S: 10.9%; G2/M: 18.0%.

通过流式细胞术检测的结果, 可以看到被 TdR-N₂O-TdR 阻断的细胞释放后 5, 7 h 的 S 期细胞百分数均在 80% 以上, 考虑到后续实验中需要的加药作用时间, 我们选择释放后 5 h 的细胞作为 S 期细胞. 释放后 9 h 的 G2 期百分数在 80% 以上, 经检测 MI 基本为零, 因此选择释放后 9 h 作为 G2 期细胞的收集时间点.

2.3 P15RS 基因表达产物在人胃癌细胞 BGC-823 中的定位

2.3.1 pEGFP-P15RS 质粒的构建

pEGFP-N1,2,3 系列载体是将 EGFP 基因连接于目的基因的 3' 端, 形成可表达 EGFP 与目的蛋白的融合蛋白, 通过观察 EGFP 在细胞中发光的部位来确定目的基因所表达的蛋白质在细胞中的定位.

根据 pEGFP-N 载体中蛋白质表达要求, 我们重新设计了 P15RS 编码区上、下游的引物, 在上游引物的起始密码子前插入了 Kozak 序列, 下游引物的终止密码子突变为有义密码子, 然后以 pXJ41-P15RS 质粒为模板, 扩增得到了 P15RS 编码区序列.

用 Xho I 和 EcoR I 分别双酶切 P15RS PCR 产物和 pEGFP-N2, 回收线性化的 pEGFP-N2 和 P15RS 片段, 纯化后, 用 T4 DNA 连接酶进行连接 (图 5), 连接产物转化 DH5α 感受态菌, 挑取转化菌落, 小提酶切鉴定 (图 6). 构建的重组质粒命名为 pEGFP-P15RS.

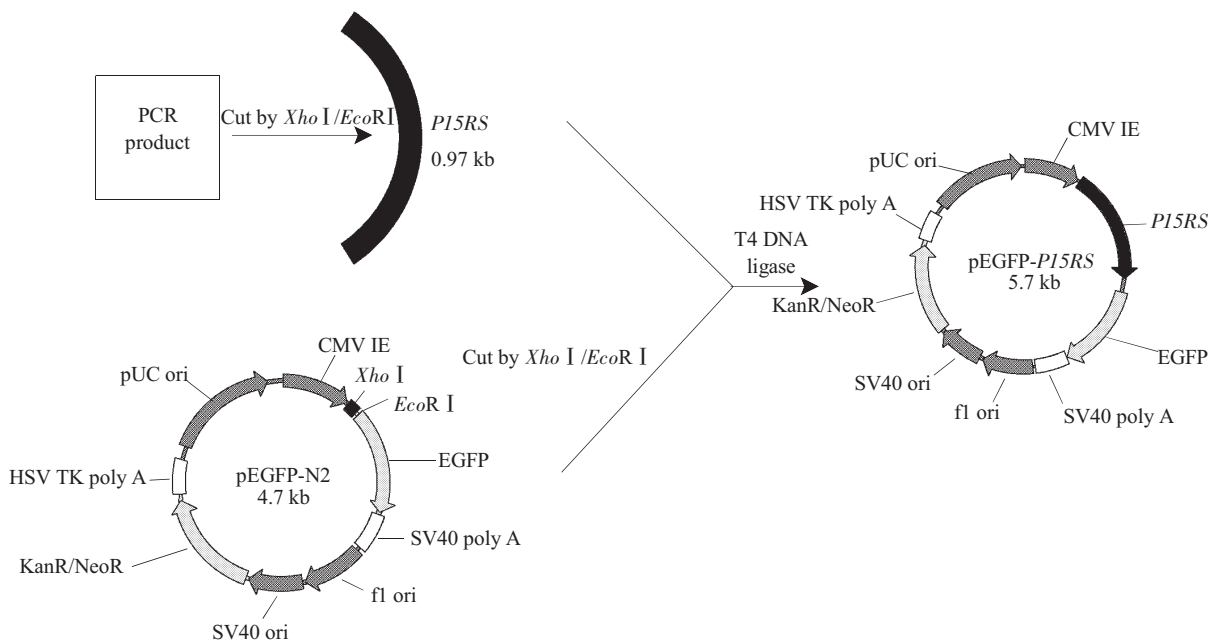


Fig.5 Construction of pEGFP-P15RS

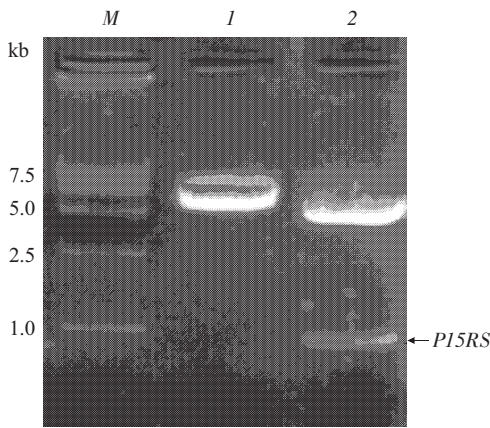


Fig.6 The result of pEGFP-*P15RS* digestion

M: Marker DL 15000; *I*: pEGFP-*P15RS* digested by *EcoR* I; *2*: pEGFP-*P15RS* digested by *EcoR* I / *Xho* I.

定浓度后, 转染人胃癌细胞 BGC-823, 转染后分别进行下列处理: a. 转染 48 h 后直接观察; b. 转染后 48 h 进行同步化, 检测不同周期时相细胞中 *P15RS* 基因表达产物的定位情况. 在激光共聚焦扫描显微镜下观察结果见图 7(A: 转染 pEGFP-N2/ pEGFP-*P15RS* 的细胞, B: PI 染色的转染细胞, C: 明场观察的转染细胞, D: a 和 b 的叠加图).

由激光共聚焦结果可以看出, 在转染 pEGFP-N2质粒的细胞中, 报告基因产物 GFP 绿色荧光在整个细胞中均有分布, 未呈现特异性定位现象; 而在转染 pEGFP-*P15RS* 的细胞中, pEGFP-*P15RS* 融合蛋白分布于细胞核中, 表明 *P15RS* 基因表达产物在 G1 期、S 期和 G2 期均定位于细胞核内, 但未见在核仁中, M 期凝缩的染色体上未见. 因此, 综合上述结果显示 *P15RS* 蛋白可能定位在核质中.

2.3.2 *P15RS* 基因表达产物在细胞中的定位.

pEGFP-N₂ 和 pEGFP-*P15RS* 质粒经纯化、测

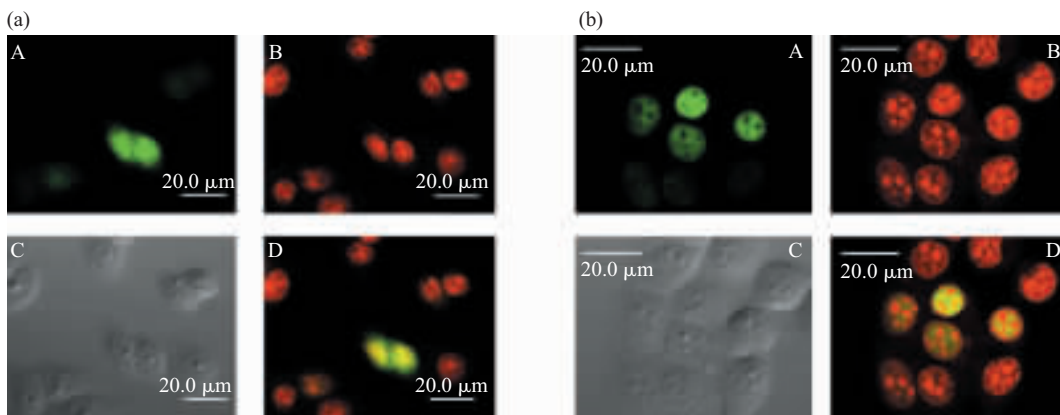


Fig.7 *P15RS* protein location in BGC-823 cells

(a) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-N2. (b) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-*P15RS*.

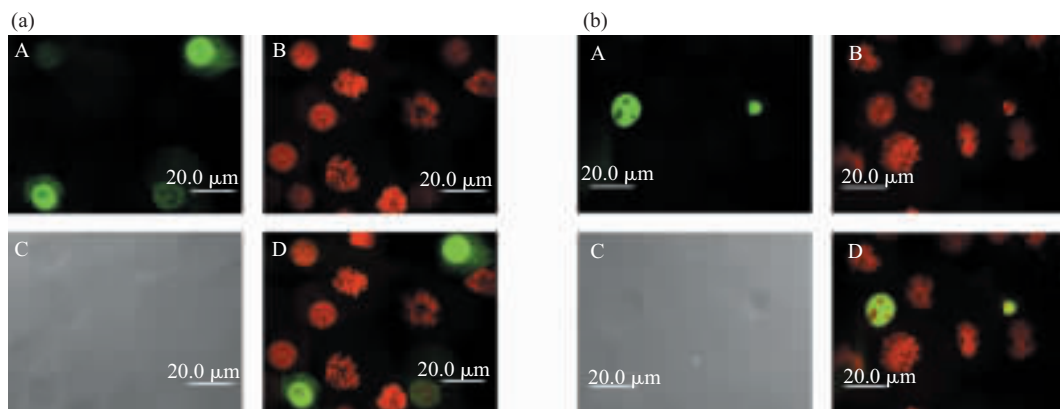


Fig.8 *P15RS* protein location in M phase BGC-823 cells

(a) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-N2. (b) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-*P15RS*.

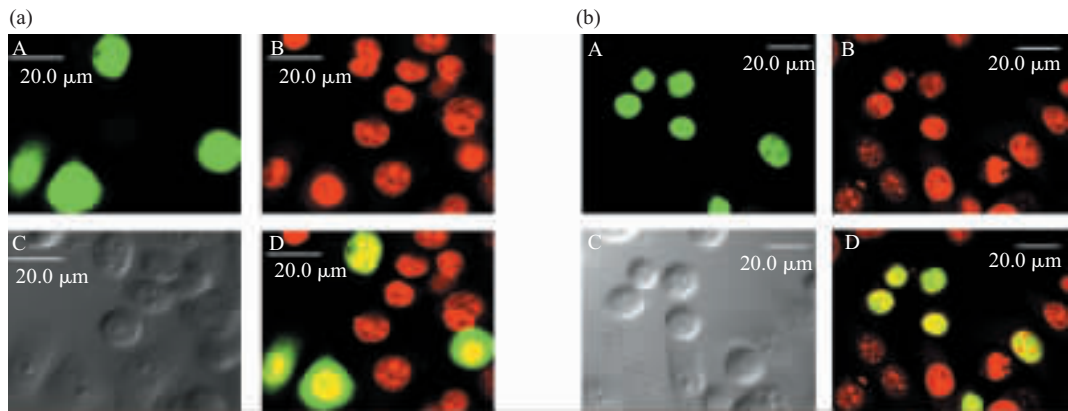


Fig.9 P15RS protein location in G1 phase BGC-823 cells

(a) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-N2. (b) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-*P15RS*.

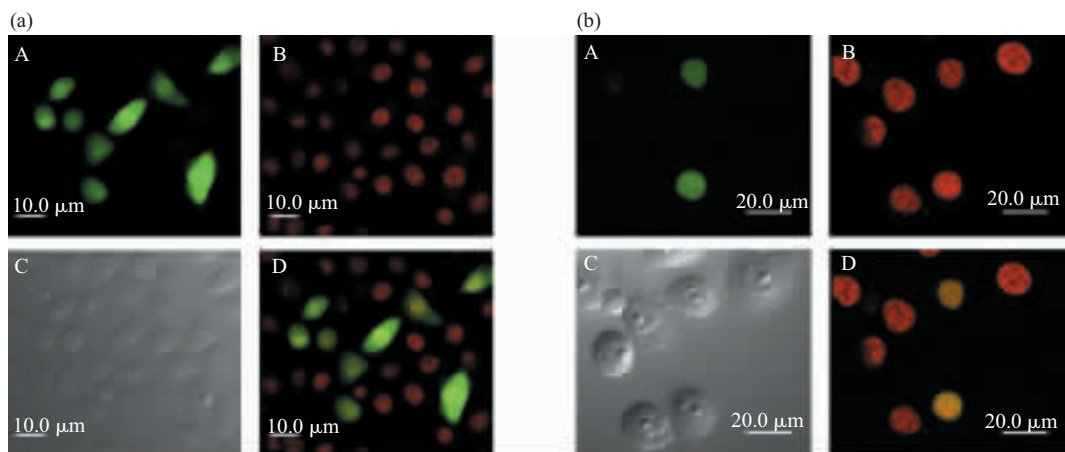


Fig.10 P15RS protein location in S phase BGC-823 cells

(a) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-N2. (b) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-*P15RS*.

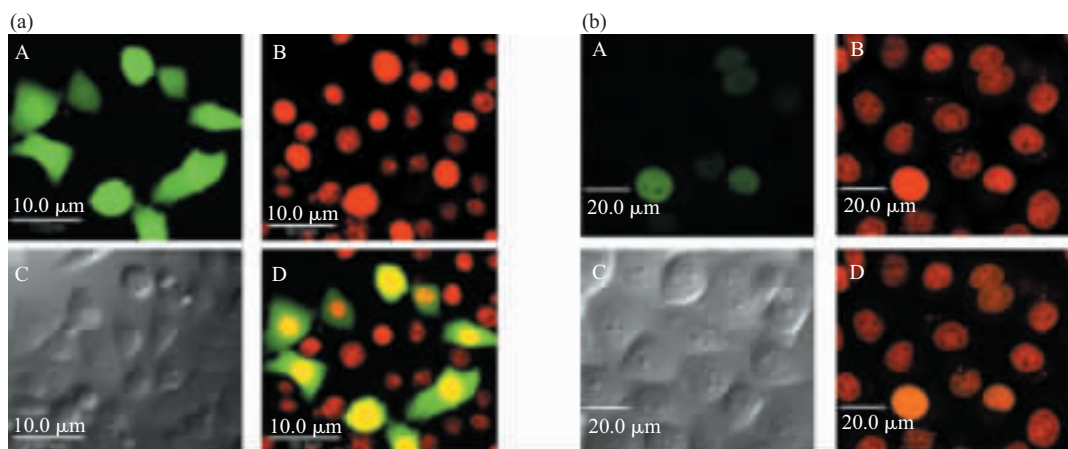


Fig.11 P15RS protein location in G2 phase BGC-823 cells

(a) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-N2. (b) Transfected BGC-823 cells with pEGFP-*P15RS*.

3 讨 论

P15RS 是我室在自行构建的 *p15^{INK4b}* 高表达的人黑色素瘤细胞 MLIK6 G1 期中发现和克隆的新基因. 通过生物信息学分析表明, *P15RS* 可能是一个新的核内转录因子, 与多种信号通路密切相关, 通过调节下游基因的转录和表达参与细胞增殖的调控. 我室已有的研究表明, *P15RS* 可阻抑细胞 G1/S 期进程, 并且与 CyclinD、Cyclin E 水平的变化密切相关^[3,4], 提示该基因可能作为增殖负调因子在 G1 期调控中发挥作用.

我们运用融合表达技术, 使 *P15RS* 基因与 GFP 在 BGC-823 细胞中融合表达, 通过 GFP 在细胞中的发光部位来确定 *P15RS* 基因产物在细胞内的定位情况. 经激光共聚焦扫描显微镜分析, 确定了 *P15RS* 蛋白在细胞中的定位, *P15RS* 基因表达产物在 G1 期、S 期和 G2 期均定位于细胞核内, 但并不分布在核仁中, M 期凝缩的染色体上未见. 因此, *P15RS* 可能定位在核质中. 这与生物信息学分析所表明 *P15RS* 基因的产物可能定位于核内的

预测相吻合, 但是 *P15RS* 是否是一个新的核内转录因子还有待进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 Sherr C J, Roberts J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 1999, **13**(12): 1504~1512
- 2 Liu J, Tong Y K, Liu H T, *et al.* Effect of *P15^{INK4b}* expression on the cell cycle and G1 phase related regulatory genes in human melanoma cells. *Prog Nat Sci*, 2000, **11**(1): 40~45
- 3 Liu J, Liu H T, Zhang X, *et al.* Identification and characterization of *P15RS*, a novel *P15^{INK4b}*-related gene on G1/S progression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **299**(5): 880~885
- 4 汪娟, 柳惠图, 何大澄, 等. CKIp15INK4B 相关新基因 p15rs 对 HeLa 细胞增殖影响的初探. *解剖学报*, 2002, **33** (3): 259~262
Wang J, Liu H T, He D C, *et al.* *Acta Anatomica Sinica*, 2002, **33** (3): 259~262
- 5 梁云燕, 王代树. 一种高效率细胞同步化方法的改良与应用. *细胞生物学杂志*, 1991, **13** (3):137~140
Liang Y Y, Wang D S. *Chin J Cell Biol*, 1991, **13** (3):137~140
- 6 Sambrook J, Russell D W, Sambrook J. Translated by Huang P T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001. 30~32

Protein Localization of A Novel Gene *P15RS* in Cell Cycle of BGC-823 Cells*

ZHANG Xiao-Yong¹⁾, ZHANG Wei¹⁾, GAO Ping¹⁾,
CHANG Zhi-Jie²⁾, SUN YI-NA¹⁾, LIU Hui-Tu¹⁾**

¹⁾Key Laboratory for Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education

College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

²⁾Institute of Biomedicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract *P15RS* was identified as a novel gene cloned from the human melanoma cell model MLIK6 overexpressing *p15^{INK4b}*. *P15RS* has been reported as a negative regulator of cell proliferation in G1 phase. To investigate the localization of *P15RS*, EGFP-*P15RS*, a fusion protein with EGFP reporter was constructed and overexpressed in BGC-823 cells. The results showed that EGFP-*P15RS* protein was distributed in nuclear in interphase (G1, S, G2 phase) of BGC-823 cells. The EGFP-*P15RS* protein was observed not to localize in chromosome in M phase, suggesting that *P15RS* might be located in karyoplasm.

Key words *P15RS*, BGC-823 cells, GFP, cellular localization

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39780014, 30300173) and The Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education.

**Corresponding author. Tel: 86-10-58809699, E-mail: liuhuitu@bnu.edu.cn

Received: February 25, 2005 Accepted: March 31, 2005