

·基础研究·

14-3-3 σ 干扰逆转录病毒载体的构建及其稳定转染 HaCat 细胞系的建立*

周美娟 丁振华[△]

(南方医科大学公共卫生与热带医学学院放射医学系 广东 广州 510515)

摘要 目的 构建 14-3-3 σ 干扰逆转录病毒载体,建立稳定转染的 HaCat 细胞系。方法 人工合成 14-3-3 σ 基因干扰序列并定向插入到 pSuper-retro-neo-EGFP 质粒,并在 STBL3 菌内进行质粒扩增,刷选阳性克隆,酶切测序鉴定,转染 293FT 细胞进行病毒包装、扩增、纯化、获取逆转录病毒载体,将逆转录病毒载体感染 HaCat 细胞后 Western 免疫印迹法、Real-time PCR 法检测 14-3-3 σ 的表达情况。结果 连接重组后经酶切和测序筛选出 pSuper-retro-neo-EGFP-si14-3-3 σ 干扰质粒稳定转染的 HaCat 细胞系在倒置荧光显微镜下呈绿色荧光,Western 免疫印迹法和 Real-time PCR 法表明 14-3-3 σ 表达明显抑制。结论 成功构建了 14-3-3 σ 干扰的逆转录病毒载体,并构建了其稳定转染的 HaCat 细胞系。

关键词 14-3-3 σ 逆转录病毒 稳定转染的 HaCat 细胞系

中图分类号:Q75,Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)09-1601-04

Construction of RNAi Recombinant Retroviral Vector of 14-3-3P and Its Stably Transfected HaCat Cell Lines*

ZHOU Mei-juan, DING Zhen-hua[△]

(Department of of Radiation Medicine, Public Hygiene and Tropical Medicine School, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT Objective: To construct the RNAi retroviral vector of 14-3-3 σ and establish the stable transfected HaCat cell lines. **Methods:** Hairpin siRNA of 14-3-3 σ was synthesized and inserted into pSuper-retro-neo-EGFP plasmid. PSuper-retro-neo-EGFP-si14-3-3 σ was transformed into competent STBL3 cells. Then the positive clones were confirmed by sequencing and transfected into the packaging 293FT cells to amplify and purify virus. HaCat cells were infected by the recombinant retroviral vector and the expression of 14-3-3 σ was detected by Western blot and real time PCR. **Results:** The recombinant retroviral plasmid PSuper-retro-neo-EGFP-si14-3-3 σ was successfully constructed and green fluorescence of the stable transfected HaCat cell lines were observed under inverted fluorescence microscope. The expression of 14-3-3 was down-regulated by the RNAi-14-3-3 σ . **Conclusion:** The RNAi retroviral vector targeting 14-3-3 σ was successfully constructed and stably transfected HaCat cell lines were established.

Key words: 14-3-3 σ retroviral vector stably transfected HaCat cell lines

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)09-1601-04

前言

近年来,14-3-3 σ 蛋白已是一种重要的细胞周期调节蛋白,可通过 G2/M 期限制点等对细胞周期发挥负性调控作用^[1,2],从而阻止细胞的有丝分裂并且诱导细胞凋亡。在一些恶性肿瘤形成过程中常有 14-3-3 σ 蛋白表达减少或缺失^[3]。现已明确,14-3-3 σ 在对 DNA 损伤处理的抗性中发挥了调节作用,但是其上下游的作用网络还没有完全清晰;另外,在肿瘤的发生发展中,14-3-3 σ 的过表达和临床预后之间的关系还没有完全证实^[4]。本研究采用 RNAi 技术,通过设计针对 14-3-3 σ mRNA 的干扰序列逆转录病毒载体,并导入到人皮肤角质形成细胞 HaCat 细胞,建立干扰质粒稳定转染的 HaCat 细胞系,为今后

进一步研究 14-3-3 σ 在细胞周期中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

穿梭质粒 pSuper-retro-neo-EGFP,PIK 包装质粒、STBL3 菌、包装细胞 293FT (博川生物科技有限公司),羊抗鼠二抗、LipofectamineTM2000(Invitrogen),HaCat 细胞(中国典型培养物保藏中心),限制性内切酶 Bgl^I、Hind^{III} (NEB 公司),T4DNA 连接酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶(TaKaRa 公司),质粒提取试剂盒、RT-PCR 反转录试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司),DMEM 高糖培养基(GIBCO 公司),新生牛血清(四季清),14-3-3 σ 一抗、二抗(Millipore),G418(Sigma), β -actin 一抗

* 基金项目 国家自然科学基金项目(30970673) 广东省自然科学基金项目(9151022501000013);

南方医科大学公共卫生与热带医学学院院长基金(GW200826)

[△]通讯作者:丁振华 Email:dingzh@fimmu.com

(收稿日期 2010-12-18 接受日期 2011-01-13)

(Booster) SuperSignal West Pico 化学发光底物设计盒(Pierce 公司)。

1.2 siRNA 靶序列的设计

针对 NCBI 上已经提交的 14-3-3 σ 基因序列 (登录号为 NC_000001) 并进行分析, 遵循 siRNA 设计原则, 在线寻找合适的干扰靶点 (<http://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>), 即 RNAi-5' -GCGCATCATTTGACTCAGCC-3', RNAi- GCTGCGA-GACAACCTGACACT-3', RNAi-5' -ACCTGCTCTCAGTAGC-CTA -3', 同时设计出阴性对照序列 5'-GAGTCAGTGC-TAAGCTGGC-3'。正义链、反义链两端分别引入 Bgl I、Hind 酶切位点, 由 Invitrogen 公司合成。

1.3 14-3-3 σ 干扰质粒 pSuper-retro-neo-EGFP-si14-3-3 σ 的构建

将合成好的脱氧核苷酸稀释为 1 μ g/ μ l, 正义寡核苷酸链和反义寡核苷酸链各取 5 μ l 退火, ddH₂O 15 μ l, 95 $^{\circ}$ C 5min, 缓慢降至室温。用 Bgl I 和 Hind 双酶切 shRNA 表达载体 pSUPERretro-GFP/Neo 反应如下: NEB 10 $\times$ 2 号缓冲液 4 μ l, Bgl I (10U/ μ l) 1 μ l, Hind (10U/ μ l) 1 μ l、质粒 20 μ l (约 2 μ g)、ddH₂O 14 μ l, 酶切 2h, 胶回收酶切后的 pSUPERretro-GFP/Neo。连接上述退火形成的 DNA 双链与双酶切的空载体, 反应体系是 pSUPERretro-GFP/Neo- Bgl I Hind 5 μ l、寡核苷酸双链 4.5 μ l、10 $\times$ 连接缓冲液 2 μ l、T4 连接酶 1 μ l、ddH₂O 7.5 μ l, 16 $^{\circ}$ C 过夜。连接产物转化感受态的 STBL3, 收集转化后的菌液, 涂布在含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板表面, 倒置平皿, 37 $^{\circ}$ C 培养, 12~16h 后出现菌落蓝白斑筛选, 挑取白色阳性克隆, 37 $^{\circ}$ C 摇菌, 试剂盒提取质粒, 送英捷公司测序。同时用 LipofectamineTM2000 瞬转 48h, 并用 western 筛选出干扰最有效的一条序列, 进一步 CsCl 质粒大提。

1.4 14-3-3 σ 干扰逆转录病毒载体的构建

磷酸钙法转染 PIK 包装质粒与 pSuper-retro-neo-EGFP-si14-3-3 σ 于 293FT 包装细胞产生病毒: 0.1%明胶包被培养皿 5-10min; 将 HaCat 细胞种于培养皿, 转染前 2h 更换培养基, 制备质粒混合物(ddH₂O 110 μ l, 1M CaCl₂ 50 μ l, PIK 20 μ g, 2 $\times$ HBS 200 μ l, 干扰质粒 20 μ g), 室温放置 15-20min, 并将质粒混合物均匀加入 293FT 细胞皿中, 37 $^{\circ}$ C 孵箱 5-6h, PBS 洗 3 次, 换新鲜培养基, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 吸取上清作为初始病毒液体, 后每 3h 收集一次, 共 3-4 次, 上清以 0.45 μ m 的滤器过滤, 分装后 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 逆转录病毒感染 HaCat 细胞和 G418 筛选

待培养皿中细胞生长融合度达到 70%~80%时, 弃培养基, 加入 2ml 病毒上清(含 2 μ g/ml polybrene), 37 $^{\circ}$ C 孵育 3h, 吸弃后换新病毒上清, 再孵育 3h, 重复 2 次后加含 G418 500 μ g/ml 的培养液培养 48h, 荧光显微镜(250 $\times$)拍照, 并用含经预试验确定的能使正常细胞 100%死亡, 而干扰细胞存活 50%浓度的 G418 筛选 7 天得稳转细胞株^[9]。

1.6 14-3-3 σ 干扰效果的 western 免疫印迹和 Real-time PCR 的鉴定

western 免疫印迹: 蛋白提取液 RIPA 提取细胞总蛋白, BCA 法测蛋白浓度。取 20 μ g 细胞总蛋白, 12% 变性 SDS-PAGE 电泳, 半干转印至 PVDF 膜, 5% 的脱脂奶粉封闭,

一抗封闭过夜, 对应二抗室温孵育, ECL 法显色。RT-PCR: Trizol 一步法提取细胞总 RNA。取 2ng~2 μ g 总 RNA 用 MM-LV-RT 逆转录酶合成 cDNA, 选取 14-3-3 σ 编码区设计 2 条引物 5'-GACAGCCACCTCATCAAGGA-3', 5'-GATGCGCTTCT-TGTCGTCAC-3', 扩增长度为 120bp, 上机进行 Real-time PCR 扩增和检测。具体反应体系为 2 $\times$ Mix SYBR Green I 荧光反应液 10 μ l, 上下游引物(10 pM)各 0.25 μ l, 样品模板 1 μ l, 灭菌水补足 20 μ l。95 $^{\circ}$ C 2 min 预变性, 循环内 95 $^{\circ}$ C 30s 变性, 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 40 个循环, 在每个循环延伸末端点收集荧光信号, 绘制扩增曲线, 40 个循环后设置(95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 95 $^{\circ}$ C 15s)反应步骤, 并且对 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 升温整个过程进行全程荧光信号收集, 绘制融解曲线。

2 结果

2.1 重组 siRNA 真核表达载体的测序

通过英捷公司测序结果表明, 所获得的重组干扰质粒目的片断与预期结果相符。表明退火形成的干扰寡核苷酸成功连接入 pSuper-retro-neo-EGFP 载体。

2.2 LipofectamineTM2000 瞬时转染的 HaCat 细胞 western blotting 结果

LipofectamineTM2000 瞬转 48h, 空载、阴性对照序列、三条合成序列, western 免疫印迹结果见图 1。三条干扰序列均具有干扰 14-3-3 σ 表达的效果, 其中 Si14-3-3 σ 3 的干扰效果最好。

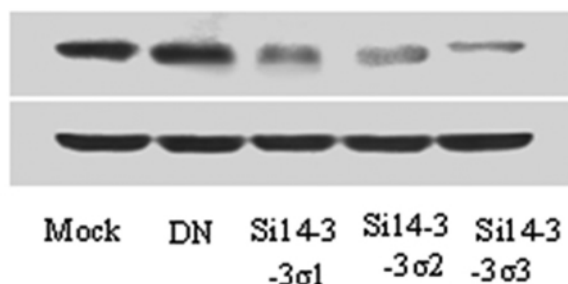


图 1 不同干扰序列的 western 蛋白分析结果

Figure 1 RNA interference effects of different groups by western blotting

2.3 14-3-3 σ 干扰 HaCat 稳定株的荧光显微镜观察

图 A 为 HaCat 细胞未转染前的照片, 细胞中未见绿色荧光, 图 B 为转染后的细胞的情况, 由于 pSuper-retro-neo-EGFP-si14-3-3 σ 逆转录病毒载体带有绿色荧光报告基因, 因此, 转染成功的细胞会发出绿色荧光(图 2)。表明细胞中有转染成功的外源性基因表达。

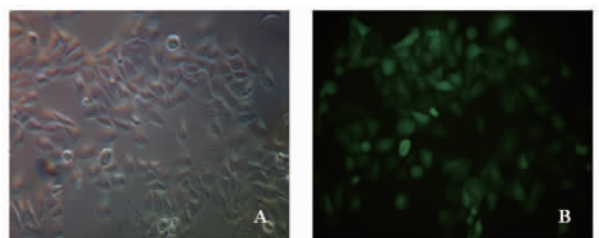


图 2 14-3-3 σ 干扰 HaCat 荧光照片(A)及稳定株相差(B)

Figure 2 Phase contrast and fluorescence photogram of RNAi HaCat cell line

2.4 Real-time PCR 及 Western 免疫印迹检测结果

Real-timePCR 的结果见图 3。以未转染的细胞为 1 转染干扰序列的稳定株的表达仅为未转染细胞的(28± 1.4)%。Western 免疫印迹的结果见图 4。蛋白分析的结果可见, 干扰株的 14-3-3σ 表达下降。

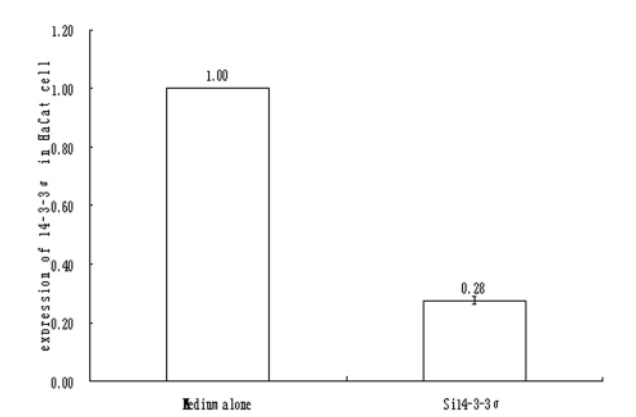


图 3 Real-time PCR 检测 HaCat 细胞中 14-3-3σmRNA 表达情况
Figure 3 The expression of 14-3-3σmRNA in different HaCat cell by real time quantitative PCR

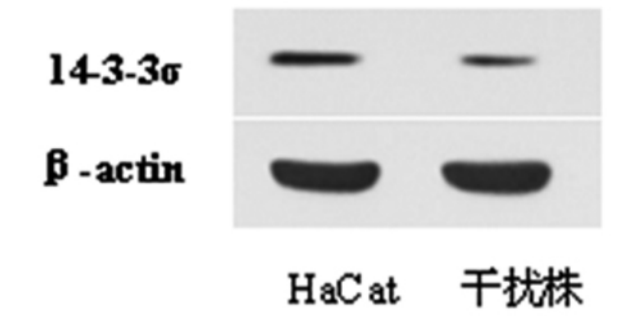


图 4 稳定株 western 蛋白分析结果
Figure 4 Expression of 14-3-3σprotein in different HaCat cell by western blotting

3 讨论

14-3-3 蛋白最早由 Moore 和 Perez 在 1967 年发现^[6] 现已证明它是高度保守的可溶性酸性蛋白家族,存在于所有真核细胞中,在哺乳动物中至少存在 7 种不同基因编码的亚型(β,γ,ε,ζ,η,σ,τ) 其中 14-3-3σ 是一种上皮特异性标记物,主要分布于上皮细胞,具有组织特异性,且主要存在于细胞质^[7]。正常组织中鳞状上皮 14-3-3σ 表达最强,其次为气管、支气管黏膜基底细胞^[8]。14-3-3σ 蛋白可与细胞内多种信号蛋白相互作用,促进 DNA 损伤后的细胞周期 G2 期阻滞,调控细胞的生长、分化和增殖、癌变等多种生物学功能等原因^[9-11] 因此 14-3-3σ 蛋白功能越来越得到人们的关注。

臭氧空洞的形成使辐射到地面的紫外辐射 B(UVB)大大增加^[12] 人类皮肤长期暴露在 UVB 的照射下,可导致过度增生、炎症,最终诱发肿瘤^[13-15]。因此深入研究 UVB 对细胞周期调节的机制具有重要的理论价值,其也是研究紫外辐射致癌机理、紫外辐射防护的基础。Timothy AC 等人^[16]指出,14-3-3σ 是

DNA 损伤后抑制细胞有丝分裂的必要因素,因此为进一步研究 UVB 作用后,HaCat 细胞的信号转导机制,建立一 14-3-3σ 稳定干扰的细胞株是必要的。

RNAi 是指在细胞内,由内源性和/或外源性双链 RNA 引起序列特异性基因沉默的现象,可高效、特异地沉默特定基因^[17,18]。RNAi 技术虽然发现不久,但是作为后基因组时代基因功能分析的有力工具,已经被广泛应用到功能基因组学、疾病治疗等方面^[19-21]。RNAi 的干扰靶点的选择非常关键^[22] 本研究在线寻找了合适的靶位点,并针对不同的靶位点设计了三条干扰序列,分别加入到带有 EGFP 报告基因的穿梭质粒 pSuper-retro-neo-EGFP 中,并在转化到 STBL3 中进行扩增,挑取白色阳性克隆,试剂盒提取质粒,送英俊公司测序,结果证明序列正确,表明干扰序列成功连接入 pSuper-retro-neo-EGFP 载体。同时 Lipofectamine™2000 瞬转 293FT 细胞 48h,Western 免疫印迹显示, RNAi-5'- ACCTGCTCTCAGTAGCCTA -3' 干扰效果最好,于是确定此序列为我们最终选用序列。

该逆转录病毒载体携带有 EGFP 的荧光报告分子,利用其在倒置显微镜 488nm 蓝光激发下可以产生绿色荧光的特性,观察了报告基因的表达产物,结果表明报告基因可以表达并具有活性。为进一步证明 14-3-3σ 的干扰情况,本研究又进一步用 Real-timePCR 验证了 14-3-3σ 的 mRNA 的表达情况,以及 Western 免疫印迹验证 14-3-3σ 蛋白的表达情况,结果显示 14-3-3σmRNA 平均干扰效果达到 72%,蛋白表达也出现明显下降。

综上所述,我们成功构建了 14-3-3σ 干扰的逆转录病毒载体,并构建了其稳定转染的 HaCat 细胞系。

参考文献(References)

[1] Lee MH, Lozano G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3σ and other proteins[J].semin Cancer Biol, 2006, 16(3):225-234

[2] Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Skowasch D, et al. 14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis [J]. Nature, 2007,446(7133):329-332

[3] Schultz J, Ibrahim SM, Vera J, et al. 14-3-3sigma gene silencing during melanoma progression and its role in cell cycle control and cellular senescence[J]. Mol Cancer, 2009,8:53

[4] Li ZM, Liu JY, Zhang JT. 14-3-3σ , the double-edged sword of human cancers[R]. Am J Transl Res, 2009, 1(4):326-340

[5] Han YL, Deng J, Guo L, et al. CREG promotes a mature smooth muscle cell phenotype and reduces neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery[J]. Cardiovascular Research, 2008,78(3):597-604

[6] Moore BW, Perez VJ. Specific proteins of the nervous system. In: Carlson FD, editors.Physiological and biochemical aspects of nervous integration[J]. Englewood Cliffs, NJ:Prentice-Hall,1967, 343-359

[7] Wilker EW, Grant RA, Artim SC,et al.A Structural Basis for 14-3-3 Functional Specificity [R]. The journal of biological chemistry, 2005, 280(19):18891-18898

[8] NakajimaT, ShimookaH, Weixap, et al. Immunohistochemical demonstration of 14-3-3sigma Protein in normal human tissues and lung Cancers, and the preponderance of its strong expression in epithelial cells of squamous cell lineage[J]. Patholhit, 2003, 53(6):353-360

[9] Neupane D, Korc M. 14-3-3sigma. Modulates pancreatic cancer cell

- survival and invasiveness [J]. Clin Cancer Res, 2008,14 (23): 7614-7623
- [10] Han B, Xie H, Chen Q, et al. Sensitizing hormone-refractory prostate cancer cells to drug treatment by targeting 14-3-3sigma [J]. Mol Cancer Ther, 2006,5(4):903-912
- [11] Suzuki T, Urano T, Miki Y, et al. Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor [J]. Cancer Sci, 2007,98(5): 644-651
- [12] Sherwood F, Rowland FS. Stratospheric ozone depletion [R]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006, 361(1469):769-790
- [13] Grant WB. The effect of solar UVB doses and vitamin D production, skin cancer action spectra, and smoking in explaining links between skin cancers and solid tumours[J]. Eur J Cancer, 2008,44(1):12-15
- [14] 周美娟, 郑莉, 郭玲, 等. 紫外辐射的细胞生物学效应及其机制[R]. 生物物理学报, 2010, 26(11): 209-215
Zhou Mei-juan, Zheng Li, Guo Ling, et al. Cell Biological Effect and Mechanism of Ultraviolet Radiation [R]. ACTA Biophysica Sinica, 2010, 26(11): 209-215
- [15] Norval M, Cullen AP, de Gruijl FR, et al. The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interactions with climate change[J]. Photochem Photobiol Sci, 2007, 6(3): 232-251
- [16] Meng S, Arbit T, Veeriah S, et al. 14-3-3sigma and p21 synergize to determine DNA damage response following Chk2 inhibition [J]. Cell Cycle, 2009, 8(14):2238-2246
- [17] de la Fuente J, Kocan KM, Almazán C, et al. RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks [J]. Trends Parasitol, 2007, 23(9): 427-433
- [18] Yang M, Mattes J. Discovery, biology and therapeutic potential of RNA interference microRNA and antagonists [J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(1): 94-104
- [19] John M, Constien R, Akinc A, et al. Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway [J]. Nature, 2007, 449(7163): 745-747
- [20] Alves AP, Lorenzen MD, Beeman RW, et al. RNA interference as a method for target-site screening in the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* [J]. J Insect Sci, 2010, 10: 162
- [21] Mueller S, Gausson V, Vodovar N, et al. RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(45): 19390-19395
- [22] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy [R]. Mol Interv, 2002, 2(3): 158-167

(上接第 1624 页)

- [14] McKenna GJ, Chen Y, Smith RM, et al. A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas [J]. Am J Surg, 2002, 183: 588-594
- [15] Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, et al. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma [J]. Int Cancer, 2000, 97: 425-431
- [16] 刘友良, 黄平. 基质金属蛋白酶-2 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(1): 109-111
Liu You-liang, Huang Ping. Matrix metalloproteinase -2 and Tumor Research Progress of [J]. Modern Oncology, 2006, 14 (1): 109-111
- [17] 周云飞, 张爱华, 刘文虎, 等. Transwell 模拟生物屏障 [J]. 北京生物医学工程, 2009, 28(6): 657-660
Zhou Yun-fei, Zhang Ai-hua, Liu Wen-hu, et al. Transwell simulated biological barrier [J]. Beijing Biomedical Engineering, 2009, 28 (6): 657-660
- [18] Fukushima S, Hiram S, Motomura Y, et al. Multiple antigenic immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells [J]. J Immunother, 2009, 32(3): 219-231