

· 基础研究 ·

人 BRCA1 干涉慢病毒载体的构建与验证 *

张永平 赵 虎 韦伊芳 张 健 药立波[△]

(第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:设计合成干涉 BRCA1 表达的小干扰 RNA,并克隆入 pLKO.1 慢病毒表达载体,为研究基因 BRCA1 在乳腺癌细胞增殖中的作用提供基础。方法:根据人 BRCA1 的基因序列,设计合成三对 BRCA1 干涉片段(序列前后加入酶切位点 EcoRI 和 AgeI),再利用酶切连接反应将其插入到慢病毒载体 pLKO.1 中,经过酶切鉴定及测序正确后,将重组质粒转染入 MCF-7 细胞,48h 后提取蛋白质和 RNA,通过蛋白印迹验证 BRCA1 的蛋白水平的表达情况,Realtime PCR 验证 BRCA1 的 RNA 水平的表达变化。结果:重组质粒经酶切鉴定和测序比对完全正确,转染乳腺癌细胞 48h 后可见 BRCA1 表达的明显下调。结论:成功构建 BRCA1 干涉的慢病毒载体,并且转染 MCF-7 细胞证实其能够下调 BRCA1 的表达,为后续研究 BRCA1 在乳腺癌细胞的功能奠定了基础。

关键词 BRCA1;慢病毒载体;干涉;重组质粒

中图分类号:Q95, Q75, Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)17-3201-04

Construction and Verification of Lentiviral Vectors Targeting
for Human BRCA1 Gene*ZHANG Yong-ping, ZHAO Hu, WEI Yi-fang, ZHANG Jian, YAO Li-bo[△]

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

ABSTRACT Objective: To design and synthesize three small interference RNA targeting for human BRCA1 gene, and translate them into a lentiviral expression vector pLKO.1, lay the foundation for further study of BRCA1 functions in breast tumor cells. **Methods:** To construct the lentiviral vectors of small interference RNA targeting for BRCA1 gene. Three interference fragments were designed and synthesized based on human BRCA1 gene sequence, and then they were digested by double restriction enzymes and inserted into the lentiviral expression vector pLKO.1. After confirmation by enzyme digestion and sequencing, the constructed plasmids were transfected into MCF-7 breast tumor cells. 48 hours later, BRCA1 expression were verified by Western-blot and real-time PCR. **Results:** Three small lentiviral plasmids were all 500 bp. The constructed recombination plasmids were verified by enzyme digestion and DNA sequencing. BRCA1 gene expression can be down-regulated in MCF-7 cells after transfection. **Conclusion:** The lentiviral vectors with siRNAs targeting human BRCA1 gene were successfully constructed, and they were able to down-regulate BRCA1 gene expression significantly in MCF-7 cells after cell transfection, which lays the foundation for the following studies.

Key words: BRCA1; Lentiviral vector; Interference; Recombinant plasmid

Chinese Library Classification(CLC): Q95, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)17-3201-04

前言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[1],尤其近年来呈现出的发病年轻化的趋势,严重影响了女性的生活质量。随着分子生物学等相关技术的发展,人们逐渐认识到,乳腺癌的发生是相关基因和环境共同作用的结果。有研究^[2]报道绝大多数的乳腺癌患者都有遗传乳腺癌易感基因 BRCA1 的突变,并证实 BRCA1 基因与乳腺癌的发生密切相关。对于 BRCA1 基因突变的检测目前已成为临床评估女性患乳腺癌风险和筛查乳腺癌高危人群的重要分子指标^[3]。

自从 1994 年 Miki 等第一次分离克隆到人乳腺癌易感基因 BRCA1 之后^[4],科学家对于 BRCA1 在乳腺癌发生过程中的作用及具体机制进行了广泛的研究。到目前为止,BRCA1 的功能主要包括自身蛋白的锌指结构和酸性基团调控基因的转录^[5]、通过同源重组途径介导 DNA 损伤修复^[6]、通过自身磷酸化与去磷酸化调控细胞周期^[7]及参与蛋白质泛素化^[8]等。由此我们可以得出 BRCA1 是一个抑癌基因^[9],正常 BRCA1 蛋白具有抑制肿瘤增殖的能力,但在人类多种肿瘤如乳腺癌、卵巢癌等中却频繁发生 BRCA1 基因的突变或失活^[10]。

本研究拟构建三个 BRCA1 干涉的慢病毒载体,转染入乳

* 基金项目 国家自然科学基金重点项目(30830054)

作者简介 张永平(1984-)男,硕士研究生,主要研究方向 肿瘤耐药

[△]通讯作者 药立波,电话 029-84774513, E-mail bioyao@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-12-19 接受日期 2012-01-15)

腺癌细胞 MCF-7 中, 研究下调 BRCA1 基因的表达后对乳腺癌细胞的增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌 MCF-7 细胞、*E.coli* JM109 菌株和 pLKO.1-TRC 质粒为本室保存, Trizol 逆转录试剂盒、PrimerStar DNA 聚合酶、DNA Marker DL15000 和 DL2000、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Age* I、T4 连接酶、PrimeScript RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq 均为 TaKaRa 公司产品, 质粒小提试剂盒为 Tiangen 公司产品, 蛋白预染 Marker 为 Invitrogen 公司产品。抗 BRCA1 抗体购自 Cell signaling, 荧光标记的羊抗鼠 IgG 购自 Odyssey 公司, 抗 actin 抗体购自博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计、合成及退火 根据 Genbank BRCA1 基因序列进行干涉 RNA 小片段的设计, 设计原则参照 Addgene 网站对于 pLKO.1-TRC 的干涉小片段设计的最佳条件, 并在其上游引物引入 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物引入 *Age* I 酶切位点, 最终由 TaKaRa 公司合成。合成好的引物稀释成 0.01OD/μl, 后在 PCR 仪上进行退火, 反应体系为 sense oligo 1 μl, antisense oligo 1 μl, NEB Buffer 1 μl, H₂O 7 μl。退火条件为 94℃ 5min, 30℃ 90min 至慢慢冷却。以下为 3 个 shRNA 的序列。BRCA1 ShRNA -1481: 上游引物 5'-CCGGGAGAATCCTAGAACTGA-CTCGAGTTCAGTATCTCTAGGATTCTCTTTTG-3', 下游引物 5'-AATTCAAAAAGAGAATCCTAGAGATACTGAACT-CGAGTTCAGTATCTCTAGGATTCTC-3'。BRCA1 ShRNA-5683: 上游引物 5'-CCGGGGGCUAGAAAUCUGUUGCUCTC-GAGAGCAACAGAUUUCUAGCCCTTTTG-3', 下游引物 5'-AATTCAAAAAGGGCUAGAAAUCUGUUGCUCTCGAGAG-CAACAGAUUUCUAGCCC-3'。BRCA1 ShRNA-7048: 上游引物: 5'-CCGGTATAAGACCTCTGGCATGAATCTCGAGATTTCAT-GCCAGAGGTCTTATATTTTG-3', 下游引物 5'-AATTCAAA-AATATAAGACCTCTGGCATGAATCTCGAGATTTCATGCC-AGAGGTCTTATA-3'。

1.2.2 重组质粒的构建 用 *Age* I 和 *EcoR* I 限制性内切酶双酶切 pLKO.1-TRC 质粒, 去除 1.9 kb 的填充片段, 并用胶回收试剂盒回收 7 kb 大小的片段。使用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的 Solution I 分别将退火产物 200 ng 与 pLKO.1-TRC(*Age* I/*EcoR* I) 载体 50 ng 16℃连接过夜后, 热转化至 *E.coli* Competent Cell JM109 中, 分别命名为 BRCA1 ShRNA -1481、BRCA1 ShRNA -5683、BRCA1 ShRNA -7048, 涂布含 100 μg/ml 氨苄的平板上, 37℃过夜培养。从转化的平板上各挑选 8 个单菌落, 用 Premix Taq 和引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增后的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测阳性克隆。其中引物序列分别为上游: 5'-GGCCTATTTCCCATGATTCC-3'; 下游: 5'-GAGCCGCGG-CCAAAGTGGAT-3'。

1.2.3 阳性克隆的鉴定 每组挑取阳性菌落植菌 2 株, 摇菌, 提取质粒后送去 TaKaRa 公司测序, 测序引物同筛选阳性克隆步骤中使用的引物。

1.2.4 重组质粒的转染 乳腺癌细胞系 MCF-7 用含 10% 胎牛

血清的 DMEM 培养基, 在 37℃ 恒温箱维持 5% 的 CO₂ 下培养。转染前将细胞接种于 6 孔板上, 将 2 μg 质粒 DNA 和 Lipofectamine 2000 转染试剂 5 μl 分别混合于 250 μl 无血清 DMEM 培养液中, 常温放置 5 min 后将其混匀, 室温下作用 20 min 后加到六孔板中, 放回 CO₂ 培养箱内, 37℃ 5%CO₂ 孵箱内培养 5 h, 更换为含血清的 DMEM 培养液, 继续培养 48 h。

1.2.5 RNA 提取和实时定量 PCR 细胞转染 48 h 后, 弃去培养液, PBS 清洗两次, 用 Trizol 法提取 RNA 后, 用 PrimeScript RT Reagent Kit 将 RNA 反转录成 cDNA, 具体操作参照说明书, 合成的 cDNA 于 -20℃ 保存。按照 SYBR Premix Ex Taq 说明书上的操作流程加样, 反应条件为 95℃ 10sec, 95℃ 5sec; 60℃ 34sec(2, 3 步共循环 45 次)。引物序列分别为: 人 BRCA1 上游 5'-CTTAGAGTGTCCCATCTGTCTGG-3', 下游 5'-GCC-CTTTCTTCTGGTTGAGA-3'; 人 GAPDH 上游 5'-TGCACCA-CCAACTGCTTAGC-3', 下游 5'-GGCATGGACTGTGGTCAT-GAG-3'。

1.2.6 蛋白质提取和免疫印迹 细胞转染 48 h 后, 弃去培养液, PBS 清洗两次, 每孔加入细胞裂解液 100 μL(提前已加好蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 5 分钟, 用细胞刮将细胞刮下, 分别收集到 1.5ml EP 管中, 超声 3 秒后 4℃ 12000 rpm 离心 20 分钟, 吸取上清, 并加入 5X 上样缓冲液, 混匀后 100℃ 煮 10 分钟, 同时进行蛋白定量。配制 SDS-PAGE 蛋白电泳胶, 其中分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 6%。按照定量结果上样, 上样量为 20 μg。浓缩胶中电压为 100 V, 分离胶中为 120 V, 电泳 2 h 后, 100 V 电转移 2 h, 5% 奶粉溶液封闭 1 h。BRCA1 抗体以 1:1000 稀释, Actin 抗体以 1:500 稀释, 4℃ 孵育过夜, 洗膜, 羊抗鼠荧光二抗孵育 1 h, Odyssey 红外扫描仪检测。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

2.1.1 pLKO.1-TRC 质粒的双酶切预处理 经 *Age* I 和 *EcoR* I 双酶切的产物在 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳上检测, 可以明显看到 7 kb 的位置带, 与预测结果相符。

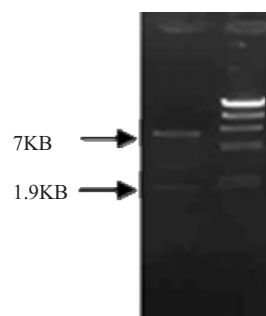


图 1 pLKO.1-TRC 质粒双酶切产物

Fig.1 Double enzymes digestion of pLKO.1-TRC plasmids

2.1.2 三种重组质粒阳性克隆的挑选 经 PCR 扩增得到的产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 都在 550 bp 的位置出现条带, 结果与预测相符。从图上结果可以看出, 所挑选的三个重组质粒的 8 个克隆均为阳性克隆。

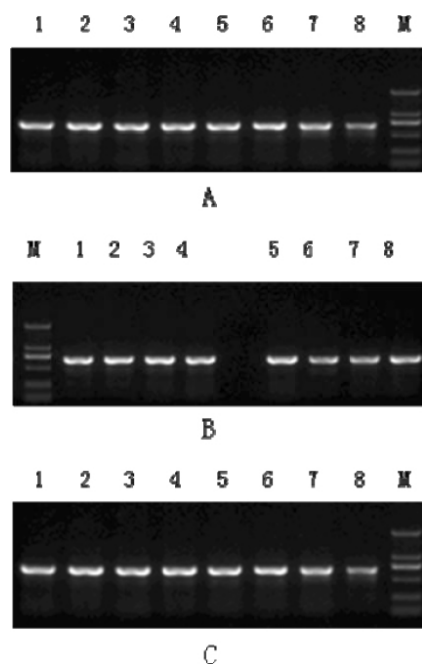


图2 三种重组质粒的阳性克隆的挑选:A BRCA1 ShRNA-1481 PCR 产物 B BRCA1 ShRNA-5683 PCR 产物
C BRCA1 ShRNA-7048 PCR 产物

Fig.2 Positive clones selection of three recombinant plasmids:A PCR products of BRCA1 ShRNA-1481 B PCR products of BRCA1 ShRNA-5683 C PCR products of BRCA1 ShRNA-7048

2.1.3 三种重组质粒阳性克隆的鉴定 三组重组质粒八个克隆中挑选 2 个去测序,测序结果经过序列比对,完全正确,表明载体构建成功。

2.2 三种重组质粒在 MCF-7 细胞中干涉效率的验证

三种重组质粒经脂质体转染 MCF-7 细胞 48 h 后,分别用 Trizol 法收集 RNA 和 RIPA 裂解细胞收集蛋白,利用实时定量 PCR 和蛋白免疫印记的方法检测重组质粒的干涉效果。结果显示,3 种质粒均能明显下调 BRCA1 的表达。

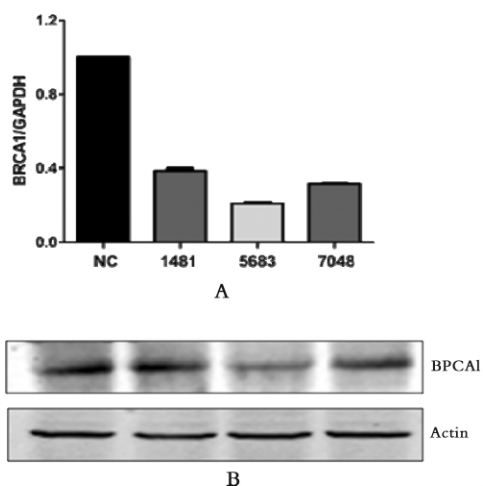


图4 三个重组质粒干涉效率的验证:A Realtime-PCR 结果 B Western blotting 结果

Fig.4 Verification of three plasmids interference efficiency: A Results of Realtime-PCR B Results of western blotting

3 讨论

BRCA1 基因是抑癌基因,位于染色体 17q21,共编码 1863 个氨基酸,主要表达在正常的乳腺上皮细胞及正常卵巢生发上皮的细胞核中,与乳腺癌、卵巢癌^[11]的发生存在密切的联系。国外有文献报道,BRCA1 基因突变位置与患乳腺癌风险的相关性分析发现,高比例乳腺癌病例的家系集中在 BRCA1 基因 3' 端 1/3 处^[12]。在约 50% 的遗传性乳腺癌中,BRCA1 基因的遗传性突变是基因功能丧失导致癌症的主要机制^[13]。而在散发性乳腺癌患者中,BRCA1 基因突变并不常见,但是有多达 30% 的乳腺癌患者 BRCA1 mRNA 或蛋白表达降低^[14]。因此,BRCA1 的正常表达对于乳腺癌的发生发展至关重要^[15-17]。

同时,BRCA1 蛋白质结构的研究发现 BRCA1 能够与 BARD1 相互结合形成二聚体,发挥 E3 连接酶的活性^[18],泛素化蛋白质 H2A、FANCD2、NPM、RNA II 等,其中单泛素化 H2A 能使染色质发生重塑,启动 DNA 修复系统,修复受损的 DNA^[19]。也有文献报道 BRCA1 与细胞的转录调控存在着密切的联系,BRCA1 的 3' 酸性氨基酸区能够与很多分子相互结合发挥转录调控作用,如与 P53 相结合调控细胞周期进程^[20],与 ZBRK1 相互结合调节分子如 P21、GADD45 等的转录水平,从而最终调节细胞的损伤与修复水平^[21]。2011 年,美国科学家研究发现 BRCA1 能够调节异染色质的活性,从而调节细胞的增殖、凋亡,基因组的稳定以及细胞的修复能力^[22]。这些研究都表明 BRCA1 在乳腺癌乃至其他癌症的发生过程中发挥着重要的作用,甚至,美国科学家预测将来可以通过检测血液中 BRCA1 的基因表型,预测乳腺癌的发生概率的高低。

本实验中,我们成功构建了干涉 BRCA1 的慢病毒质粒 BRCA1ShRNA-1481、BRCA1ShRNA-5683、BRCA1 ShRNA-7048,并将它们瞬时转染 MCF-7 乳腺癌细胞中,提取 RNA 和蛋白质,证实了质粒的干涉效率,为后续研究 BRCA1 分子功能的研究,阐明乳腺癌发生的机理奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Robinson-White, S. Patient navigation in breast cancer: a systematic review[J]. Cancer Nurs, 2010, 33(2): 127-140
- [2] Rivera, P. and H. von Euler. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors[J]. Vet Pathol, 2011, 48(1): 132-146
- [3] Spitzer, E. Detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families by a comprehensive two-stage screening procedure[J]. Int J Cancer, 2000, 85(4): 474-481
- [4] Miki, Y. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. Science, 1994, 266(5182): 66-71
- [5] Arizti, P. Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(20):7450-7459
- [6] Srivastava, N. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers[J]. Mutat Res, 2009, 681(2-3): 180-188
- [7] Altio, S. Heregulin induces phosphorylation of BRCA1 through phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT in breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 1999,274(45): 32274-32278
- [8] Baer, R. and T. Ludwig. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity[J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(1):86-91

- [9] BRCA1 (breast cancer type 1). Tumor suppressor gene[J]. Bull Cancer, 1998, 85(10): 833
- [10] Antoniou, A.C. Parity and breast cancer risk among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers[J]. Breast Cancer Res, 2006,8(6): R72
- [11] Zheng, W.. Reduction of BRCA1 expression in sporadic ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2000, 76(3): 294-300
- [12] Lee, J.S.. Breast and ovarian cancer in relatives of cancer patients, with and without BRCA mutations[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006, 15(2): 359-363
- [13] Cullinane, C.A.. Effect of pregnancy as a risk factor for breast cancer in BRCA1/BRCA2 mutation carriers [J]. Int J Cancer, 2005,117 (6): 988-991
- [14] Rice, J.C., K.S. Massey-Brown, B.W. Futscher. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells [J]. Oncogene, 1998, 17 (14):1807-1812
- [15] Lubinski, J. The risk of breast cancer in women with a BRCA1 mutation from North America and Poland[J]. Int J Cancer, 2011, Epub 2011 Sep 22
- [16] Cox, D.G. Common variants of the BRCA1 wild-type allele modify the risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers [J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(23): 4732-4747
- [17] Mulligan, A.M. Common breast cancer susceptibility alleles are associated with tumor subtypes in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2[J]. Breast Cancer Res, 2011,13(6): R110
- [18] Xia, Y. Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein [J]. J Biol Chem, 2003, 278(7):5255-5263
- [19] Thakar, A. BRCA1/BARD1 E3 ubiquitin ligase can modify histones H2A and H2B in the nucleosome particle [J]. J Biomol Struct Dyn, 2010, 27(4):399-406
- [20] MacLachlan, T. K. BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(12):4280-4292
- [21] Peng, H. A common DNA-binding site for SZF1 and the BRCA1-associated zinc finger protein, ZBRK1 [J]. Cancer Res, 2002,62(13): 3773-3781
- [22] Zhu, Q. BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin mediated silencing[J]. Nature, 2011,477 (7363):179-184

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。