文章编号:1000-5404(2006)06-0577-03

论著

稳定高效表达正反义 Alu-Sx 细胞系的建立

彭 亮[1],吴 刚[2],蒋继志[1],靳风烁[2],丁 瑞[2] ([1]河北大学生命科学学院,保定 071002;[2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 建立稳定高效表达正反义 Alu-Sx 的细胞系。**方法** 根据 Alu 亚家族 Sx 序列合成两对两端带有限制性酶切位点的引物,提取 HEK293 细胞的总 DNA 后 PCR 扩增,产物连接到真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His A 中构建成重组体。经酶切及测序鉴定后,阳离子脂质体转染法转染 HEK293 细胞后 G418 筛选稳定表达的细胞克隆,Northern 杂交检测并挑选出表达最强的亚克隆。**结果** 成功构建 Alu 亚家族 Sx 的正反义真核表达载体并获得高效稳定表达的 HEK293 细胞亚克隆。**结论** 高效稳定表达正反义 Alu Sx 的 HEK293 细胞亚克隆可用于下一步研究。

关键词:Alu 亚家族 Sx;真核表达载体;HEK293 细胞系;稳定转染
中图法分类号:Q782;Q785;Q813 **文献标识码**:A

Establishment of HEK293 cell line expressing sense and antisense Alu-Sx stably and efficiently

PENG Liang[1], WU Gang[2], JIANG Ji-zhi[1], JIN Feng-shuo[2], DING Rui[2] ([1]College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, [2]Department of Urinary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish a HEK293 cell line stably and highly expressing sense and antisense Alu-Sx. **Methods** According to Alu subfamily Sx sequence, a pair of primers containing the sites for given restrictive endonuclease at both ends were designed and synthesized. PCR of the total DNA extracted from HEK293 cell line was performed, the products of which were cloned into a highly efficient eukaryotic expression vector pcDNA3.1/myc-His A. The recombinants were sequenced and identified by restrictive endonuclease digestion and then transfected into the HEK293 cell line by lipofectamine2000. The stable transfectants were screened by G418. Cell subclones were isolated by gradient dilution. The highly expressing clones were identified by Northern blotting. **Results** Eukaryotic expressing vectors stably and efficiently expressing sense and antisense Alu-Sx were constructed and cell subclones stably and efficiently expressing sense and antisense Alu-Sx were established. **Conclusion** Cell subclones stably and efficiently expressing sense and antisense Alu-Sx can used for our further study.

Key words: Alu subfamily Sx; eukaryotic expressing vector; HEK293 cell line; stable transfection

Alu 家族是灵长类基因组特有的含量丰富的中度重复序列,是短散在重复序列中最大的家族,也是基因组中最活跃的遗传元件之一[1]。Alu 家族序列可产生不具有编码蛋白质的转录本,但是这些转录本有何功能还不是很清楚[2]。本研究通过构建正反义 Alu 家族 Sx 的真核表达载体,脂质体转染法转染 HEK293 细胞后通过筛选获得高效稳定表达的亚克隆,为进一步研究 Alu 序列可能在 RNA 剪切及表达调空的研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞系和质粒 DH5α 大肠杆菌菌株为本室保存;人胚肾成纤维细胞系 HEK293、高效真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His A 及带有绿色荧光蛋白(GFP)的对照质粒由第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室徐翔博士惠赠。

1.1.2 试剂 细胞培养用 DMEM 以及小牛血清(Hyclone 公司),细胞总 DNA 提取试剂盒(Promega 公司),细胞转染用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),Wizard purefection plasmid DNA purification system(Promega 公司),DNA 胶回收试剂盒以及 T_4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司),限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI(TaKaRa 公司),T_4 多核苷酸激酶试剂盒(Promega 公司),PCR 所用试剂(TaKaRa 公司),Trizol 试剂(Invitrogen 公

作者简介:彭 亮(1980-),男,河北省唐山市人,硕士研究生,主要从事 RNA 干扰方面的研究。电话:(023)66127712
通讯作者:吴 刚,电话:13708310161,E-mail:wugangdoctor@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-08-24;修回日期:2005-11-01

司),焦碳酸二乙酯(Sigma 公司),RNaseZap(Ambion 公司),腺苷[γ-^{32}P]三磷酸盐(北京福瑞生物工程公司核酸研究室)。

1.1.3 PCR 引物的设计合成 根据 GenBank 数据库 Alu 亚家族 Sx 的序列设计两对引物,在上下游引物的 5′引入相应的 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ限制性内切酶识别序列及保护碱基,经软件分析目的序列不含有 *Bam*H Ⅰ及 *Eco*R Ⅰ的酶切位点,引物由上海 Sangon 公司合成。Alu-Sx(正义):5′-CGGGATCCCTGAATTAGTTCCTTATCACTCC-3′, 5′-CGGAATTCAGAAGAACAACTGGCCAGGTG-3′;Alu-Sx (反义): 5′-CGGAATTCCTGAATTAGTTCCTTATCACTCC-3′, 5′-CGGGATCCTAGAAGAACAACTGGCCAGGTG-3′。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养以及总 DNA 的提取 HEK293 细胞常规复苏,培养液为 DMEM + 10% 小牛血清,5% CO_2、37 ℃培养箱中培养。总 DNA 提取按照 Promega DNA 提取试剂盒的操作说明书进行。

1.2.2 PCR 扩增 采用 PE 公司 9600 型扩增仪进行扩增反应:预变性 94 ℃ 5 min;变性 94 ℃ 30 s;退火 58 ℃ 30 s;72 ℃延伸 30 s 共 30 个循环,最后 1 个循环 72 ℃延伸 5 min,PCR 反应结束后取 5 μl 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳,用 UVPGD800 凝胶分析仪观察和记录结果。

1.2.3 真核表达质粒重组体的构建 将 PCR 产物及载体 pcDNA 3.1/myc-His A 进行 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切,用凝胶回收试剂盒回收目的片段,T_4 DNA 连接酶 4 ℃将目的片段与载体进行连接。重组体转化感受态细胞后涂于含有氨苄青霉素的 LB 培养板,挑选阳性菌落扩增,抽提质粒后双酶切及测序鉴定(测序送上海 Sangon 公司)。

1.2.4 HEK293 细胞的转染 将带有 GFP 的质粒进行转染优化实验,采用不同的质粒及阳离子脂质体 Lipofectamin 2000 的剂量,获得最佳的转染效率。转染前 1 d 将细胞以每孔 8×10^5 的细胞密度铺入 6 孔板,转染时细胞达到 80% 的融合,3 μg 重组载体与 10 μl Lipofectamin 2000 混合后加入每孔细胞,阳性对照加入带有绿色荧光蛋白(GFP)的质粒,阴性对照只加脂质体,转染 12 h 更换为常规培养液。48 h 后按 1 000、2 000、5 000、10 000、20 000 个细胞的不同稀释梯度转入 3.5 cm 培养皿中,同时加入终浓度为 500 μg/ml 的 G418,培养两个星期待阴性对照的细胞全部死亡后,观察见按 5 000 个细胞/皿稀释的 3.5 cm 培养皿的细胞单克隆数量最为理想,于超净工作台上用 20 μl 微量移液管管尖压住细胞克隆,小心吸细胞克隆入管内后移至 24 孔板,胰酶消化后继续用含 300 μg/ml 的 G418 培养液培养,5 ~ 8 d 后转入 6 孔板,待细胞长到一定密度转入 25 cm^2 培养瓶,传代后一部分冻存,另一部分加入 Trizol 试剂提取总 RNA。

1.2.5 Northern 检测 按照 Trizol 试剂说明提取细胞总 RNA,经过分光光度计及琼脂糖凝胶电泳检测质量,选用合格的 RNA 样本进行分析。在含有甲醛的琼脂糖凝胶上进行 RNA 电泳,每个加样空点 18 μg RNA,8 V/cm 电泳 3 h。上行毛细管转移法将 RNA 转移至带正电荷的尼龙膜上,转移 12 h 后 80 ℃烤干 2 h 进行杂交。根据外源 Alu Sx 的特征序列合成的寡核苷酸探针(上海 Sangon 公司合成),该探针与内源 Alu Sx 转录本无同源性。T_4 多核苷酸激酶对探针 5′端进行[γ-^{32}P]ATP 标记,杂交 12 h 后放射自显影 48 h 洗片。对照采用 GAPDH 特征序列合成的寡核苷酸探针,同样方法杂交。

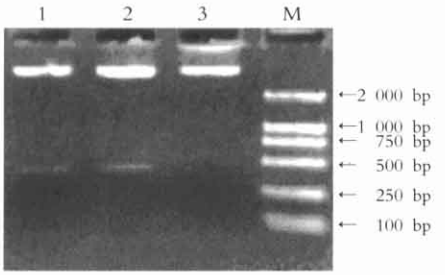
2 结果

2.1 Alu 亚家族 Sx 基因目的片段的扩增

PCR 扩增产生的特异性条带约 400 bp,与预计片段大小相同。

2.2 正反义 pcDNA-Alu-Sx 真核表达载体的双酶切鉴定结果

将两个重组子经 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ双酶切后,在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,结果重组体产生约 400 bp 的两个特异性条带(图 1),与 PCR 扩增片段结果一致。但插入片段的方向性仍需测序进一步证实。

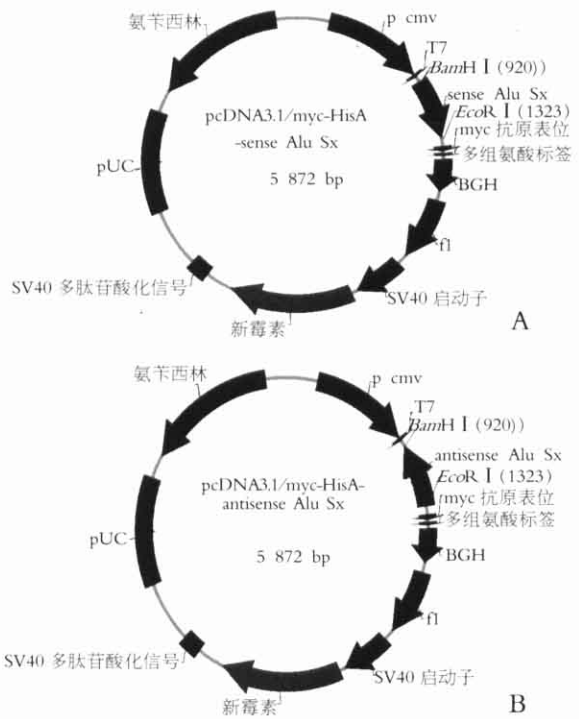


1:正义真核表达载体 pcDNA-Alu-Sx 双酶切;2:反义真核表达载体 pcDNA-Alu-Sx;3:真核表达载体 pcDNA 3.1/myc-His A;M:标准

图 1 正反义 pcDNA-Alu-Sx 真核表达载体的双酶切鉴定

2.3 序列分析

重组子送上海 Sangon 公司进行测序,序列分析序列与已经公布的 Alu 亚家族 Sx 核苷酸序列完全一致。插入片段位置及方向性正确,表明正反义 pcDNA-Alu-Sx 真核表达载体构建成功(图 2)。

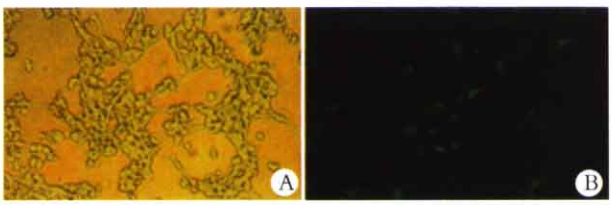


A:正义真核表达载体;B:反义真核表载体

图 2 正反义真核表达载体图谱

2.4　HEK293 的转染

通过优化实验，带有 GFP 的质粒与 Lipofectamin 2 000 剂量比为 1∶3.3(μg∶μl)可获得最佳的转染效率。图 3 为转染 48 h 后在荧光显微镜下观察，初步估计转染效率为 30% ~40%。转染正反义 pcDNA3.1-Alu Sx 的细胞经过 G418 的反复筛选，最后获得可能稳定表达正义 Alu Sx 的细胞亚克隆 9 个，反义 Alu Sx 的细胞亚克隆 7 个。

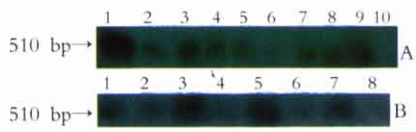


A：可见光；B：绿色荧光

图 3　带有 GFP 的质粒转染 48 h 后的 HEK293 细胞　(FM×100)

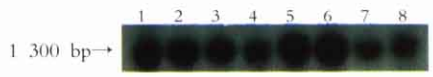
2.5　Northern 杂交检测

通过 Northern 检测证实，G418 筛选出的所有细胞亚克隆有不同程度的目的基因表达，图 4A 中的第 1 个细胞亚克隆表达的正义 Alu-Sx 最强，图 4B 中第 5、7 个细胞亚克隆表达的反义 Alu-Sx 最强。而转染对照带有 GFP 质粒的克隆为阴性(图 4A 中第 10 道，图 4B 中第 8 道)。所有细胞亚克隆 GAPDH 基因的表达量基本一致，说明总 RNA 的上样量相同(图 5)。



A：正义；B：反义；1－10，1－8：不同细胞克隆的编号

图 4　外源正反义 Alu-Sx 在细胞亚克隆的表达



1－8：不同细胞克隆的编号

图 5　GAPDH 在细胞亚克隆的表达

3　讨论

人类基因组中散布的重复序列占到 50% 左右。其中 Alu 家族是灵长类基因组特有的含量丰富的中度重复序列，是短散在重复序列中最大的家族，也是基因组中最活跃的遗传元件之一[1]。Alu 家族主要分为 Alu-S 和 Alu-J 两大亚科，占整个人类基因组 Alu 家族的 90% 以上，另外还有较为年轻的 Alu-Y 亚科占不到 10%[2]。对于 Alu 序列的功能目前了解得还不很透彻，推测主要与基因调控有关，如基因重排[3]、CpG 甲基化[4]、hnRNA 选择性剪切[5]等。同时 Alu 元件的插入、删除和重组导致了许多先天性遗传疾病和癌症[6]。

尽管 Alu 家族在人基因组的拷贝非常高，但是其产生的转录本并不高。这部分转录本并不编码蛋白质，以前认为是没有功能的“垃圾”RNA，但是近来发现其可能与 hnRNA 选择性剪切相关[5]。如果通过高表达载体将外源 Alu 整合到基因组，人为地增加 Alu 家族的转录表达，是否会对细胞的生命活动产生影响？在哪方面影响？目前尚无相关研究的报道。

本实验选择 pcDNA 3.1/myc-His A 载体构建 Alu-Sx 正反义两对重组子，pcDNA3.1 载体是一种高效的真核表达载体，其多克隆位点上游是人巨细胞病毒的强启动子，它能使目的基因在绝大多数哺乳动物细胞中高水平表达，同时此载体具有 neo 基因，有利于后期的筛选。通过 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ限制性内切酶识别序列插入的正反义 Alu-Sx 序列，在载体上下游调控信号的作用下有望得到目的基因的高水平转录表达。但不同插入基因在不同真核表达载体及细胞系的转录表达率有很大的差异，所以外源基因的真核转染表达需要用不同真核表达载体及细胞系进行优化实验。我们在本项目研究先后选用了 3 种载体及 3 种细胞系，最后确立 pcDNA 3.1/myc-His A 载体及 HEK293 为正反义 Alu-Sx 表达的最佳选择。但同家族的 Alu-Y 及 Alu-Sq 在该载体及细胞系的表达率较差(另文发表)。

对于外源基因转录表达强度的检测，一般采用 Western blot 或者 ELISA 检测其蛋白表达的强弱。但由于 Alu 序列产生的转录本不编码蛋白，因此我们只能通过 Northern blot 进行目的转录本的定量检测。Northern blot 实验难度较大，但只要保证 RNA 提取的质量及转膜的效率，以 GAPDH 为参照的定量分析结果的可靠性远优于 RT-PCR。

本研究构建的正反义 pcDNA-Alu-Sx 真核表达载体，转染 HEK293 细胞后获得了高效稳定表达 Alu Sx 的细胞亚克隆，可用于下一步研究。

参考文献：

[1] ROWOLD D J, HERRERA R J. Alu elements and the human genome [J]. Genetica, 2000, 108(1): 57－72.

[2] 罗迪贤，李　凯，何淑雅，等. Alu 家族及其生物学意义[J]. 遗传，2005，27(2)：284－288.

[3] RICCI V, REGIS S, DI DUCA M, *et al*. An Alu-mediated rearrangement as cause of exon skipping in Hunter disease[J]. Hum Genet, 2003, 112(4): 419－425.

[4] GOLDBERG B, URNOVITZ H B, STRICKER R B. Beyond danger: unmethylated CpG dinucleotides and the immunopathogenesis of disease [J]. Immunol Lett, 2000, 73(1): 13－18.

[5] LEV MAOR G, SOREK R, SHOMRON N, *et al*. The birth of an alternatively spliced exon: 3′ splice-site selection in Alu exons[J]. Science, 2003, 300(5623): 1288－1291.

[6] KREAHLING J, GRAVELEY B R. The origins and implications of Aluternative splicing[J]. Trends Genet, 2004, 20(1): 1－4.

(编辑　陈聪连)