文章编号:1000-5404(2011)18-1897-03

论著

人 eIF4A3 真核表达载体构建及稳定表达细胞株筛选

李向云[1,2],徐 祥[2],李秉煦[1],黄 宏[2],徐云升[1] (325000 浙江 温州,温州医学院附属第一医院皮肤科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所一室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 构建人 eIF4A3 重组质粒载体,筛选高表达人 eIF4A3 的稳定细胞株。**方法** RT-PCR 克隆 eIF4A3 基因,将获得的基因片段分别连接到含有 HA 和 c-myc 标签的质粒载体上,转染 HeLa 细胞,经 G418 筛选获稳定表达细胞株,在体外翻译体系中进行体外翻译,通过免疫印迹鉴定 eIF4A3 的表达。**结果** 成功构建人 eIF4A3 的真核表达载体,可在 HeLa 细胞中稳定表达,且能在体外翻译体系中翻译 eIF4A3 蛋白质。功能研究初步证明 eIF4A3 可以抑制荧光素酶报告基因的表达。**结论** 获得了可稳定高表达人 eIF4A3 的 HeLa 细胞株及可用于体外翻译的真核表达载体。

[关键词] 真核起始因子 4A3;稳定细胞株;体外翻译
[中图法分类号] R341;R394-33;R394.2 [文献标志码] A

Construction of human eIF4A3 eukaryotic expression plasmid and screening of stable cell line

Li Xiangyun[1,2], Xu Xiang[2], Li Bingxu[1], Huang Hong[2], Xu Yunsheng[1] ([1]Department of Dermatology, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang Province, 325000; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the human eIF4A3 recombinant vector and screen the stable cell line over-expressing human eIF4A3. **Methods** Human eIF4A3 gene was cloned by RT-PCR. Gene fragments were linked to HA and c-myc labeled plasmid vectors to transfect HeLa cells. A stable cell line was generated by screening G418. *In vitro* translation was conducted in an *in vitro* translation system. Expression of eIF4A3 was identified by Western blotting. **Results** The human eIF4A3 eukaryotic expression vector was successfully constructed, which was stably expressed in HeLa cells and could translate the eIF4A3 protein in an *in vitro* translation system. Preliminary function study showed that eIF4A3 could inhibit the expression of luciferase reporter gene. **Conclusion** A HeLa cell line over-expressing human eIF4A3 we generated can be used as an eukaryotic expression vector in an *in vitro* translation system.

[**Key words**] eukaryotic initiation factor 4A3; stable cell line; *in vitro* translation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972800). Corresponding author: Xu Yunsheng, E-mail: xuyunsh@sohu.com

真核细胞翻译起始因子 4A(eukaryotic translation initiation factor 4A,eIF4A)是 DEAD 盒蛋白质家族中的一员[1],其所具有的 RNA 解旋酶活性可解旋 mRNA 5'-非翻译区的二级结构[2],促进 40S 核糖体亚基对起始密码子的扫描,在蛋白质翻译起始中起到非常重要的作用。eIF4A 有 3 种异构体,其中 eIF4A1 与 eIF4A2 在序列和功能上基本一致,而 eIF4A3 与 eIF4A1 在序列上只有 65% 的相似性[3]。eIF4A1 和 eIF4A2 主要存在于细胞质内,与真核细胞起始因子 4E(eukaryotic translation initiation factor 4E,eIF4E)和真核细胞起始因子 4G(eukaryotic translation initiation factor 4G,eIF4G)共同组成真核细胞起始因子 4F(eukaryotic translation initiation factor 4F,eIF4F)复合体,参与蛋白质翻译起始[4];eIF4A3 主要存在于细胞核内,是外显子连接复合体的一个组成成分[5],参与 mRNA 的剪接。

目前关于 eIF4A3 在蛋白质翻译调控中的作用尚未研究清楚,且存在自相矛盾的报道[3,6]。本研究采用 RT-PCR 自人 cDNA 克隆获得 eIF4A3 基因,构建可用于体外翻译并带有 HA 或 c-myc 标签以及筛选标记的真核表达载体,筛选获得高效稳定表达外源性 eIF4A3 的细胞株,为进一步研究 eIF4A3 的功能及其在蛋白质翻译调控中的作用奠定基础。

[基金项目] 国家自然科学基金(30972800)
[通信作者] 徐云升,E-mail:xuyunsh@sohu.com

1 材料与方法

1.1 主要材料

pcDNA质粒(含HA标签)、pCMV-tag3C质粒(含c-myc标签)、TOP10菌为本实验室保存。HeLa细胞为本实验室保种。限制性内切酶*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ、T_4 DNA连接酶为TaKaRa公司产品。TNT SP6/T7 Coupled Reticulocyte Lysate System购自Promega公司。HA、c-myc抗体为TaKaRa公司产品。

1.2 目的基因eIF4A3的克隆

收集6孔板1个孔的HeLa细胞,提取RNA后进行RT-PCR检测(试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司)。eIF4A3引物,上游:5′-CGGGAATTCATGGCGGCTAACGC-CACGATGGC-3′,下游:5′-CGGCTCGAGTCAGATGAGGTCAGC-CACATTC-3′,片段长度1 236 bp取PCR产物与T载体连接(T-eIF4A3)备用。

1.3 重组质粒pcDNA-HA-eIF4A3、pCMV-c-myc-eIF4A3的构建和鉴定

将pcDNA、pCMV-tag3C及上述T-eIF4A3分别用*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ双酶切,回收载体和目的基因后分别用T_4 DNA连接酶连接,即为重组质粒pcDNA-HA-eIF4A3、pCMV-c-myc-eIF4A3,再进行PCR和双酶切初步鉴定后,进一步测序鉴定。

1.4 纯化质粒大量抽提

将构建好的质粒菌液扩增200 ml,使用无内毒素质粒大量制备试剂盒(购自北京百泰克生物技术有限公司)对以下4种质粒进行抽提:pcDNA(空白对照)、pcDNA-HA-eIF4A3、pCMV(空白对照)、pCMV-c-myc-eIF4A3,测定质粒浓度。

1.5 稳定细胞系的筛选与鉴定

将pCMV-tag3C、pCMV-c-myc-eIF4A3分别转染入HeLa细胞中,换液后加500 μg/ml G418筛选2周,挑取单克隆进行扩增保种,余以200 μg/ml G418维持培养。Western blot检测eIF4A3蛋白的表达,鉴定阳性细胞克隆。

1.6 体外翻译实验

TNT Rabbit Reticulocyte Lysate 12.5 μl, Amino Acids Minus Methionine 0.25 μl, Amino Acids Minus Leucine 0.25 μl, TNT Reaction Buffer 1 μl, TNT T_7 Polymerase 0.5 μl, RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μl, recombinant plasmid(pcDNA-HA、pcDNA-HA- eIF4A3) 1.1 μl, ddH_2O 补至25 μl,混匀后放入30 ℃水浴箱中孵育90 min,则eIF4A3基因翻译为eIF4A3蛋白,取2 μl Western blot检测eIF4A3是否表达。

1.7 Western blot检测eIF4A3蛋白的表达

将所筛选的稳定细胞系铺6 cm平板,不加G418培养至细胞密度为80%~90%,加200 μl RIPA裂解液提取蛋白后用考马斯亮蓝G250定量,取50 μg蛋白上样。一抗孵c-myc(1∶1 000)4 ℃过夜,二抗羊抗鼠(1∶15 000)室温2 h,后加化学发光剂,压片显影。体外翻译实验取2 μl上样,一抗孵HA(1∶1 000)4 ℃过夜,二抗羊抗鼠(1∶15 000)室温2 h,后加化学发光剂,压片显影。

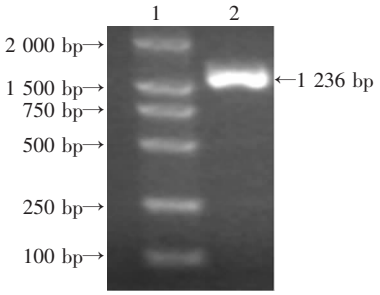
1.8 检测eIF4A3的高表达对蛋白质翻译的影响

将荧光素酶报告基因和pCMV-c-myc-eIF4A3真核表达载体共转染HeLa细胞,48 h后裂解细胞,加入荧光素酶底物(购自Promega公司),测定化学发光值,作为评价荧光素酶翻译水平的指标。以荧光素酶报告基因和空载体pCMV共转染HeLa细胞作为对照组实验。

2 结果

2.1 目的基因eIF4A3的制备

从HeLa细胞中提取获得细胞总RNA,包括可翻译为eIF4A3蛋白的RNA。以此为模板,应用上述引物进行RT-PCR扩增获得eIF4A3基因片段,片段大小1 236 bp与eIF4A3基因一致(图1)。

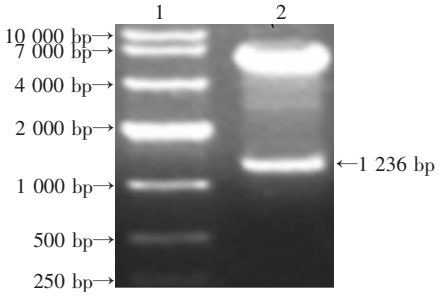


1:标准;2:eIF4A3

图1 通过RT-PCR制备的目的基因eIF4A3

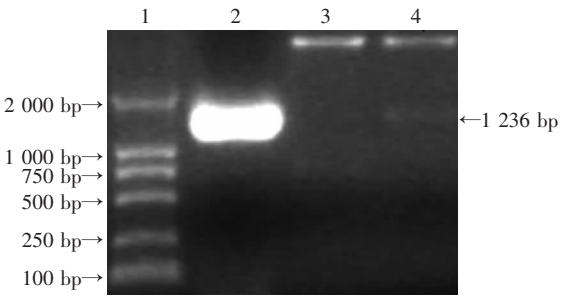
2.2 重组质粒pcDNA-HA-eIF4A3、pCMV-c-myc-eIF4A3的酶切鉴定

用*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ对重组质粒pcDNA-HA-eIF4A3、pCMV-c-myc-eIF4A3进行双酶切鉴定。理论上,这两种质粒的大小分别为6 600 bp和5 500 bp,经限制性内切酶双酶切后可得到2条片段,约1 236 bp的小片段即为eIF4A3基因,用1%的琼脂糖凝胶电泳分析所得到的酶切片段与理论预测值相符(图2、3),测序结果也证实构建的eIF4A3表达载体序列和阅读框均正确。



1:标准;2:pcDNA-HA-eIF4A3 双酶切

图2 重组质粒pcDNA-HA-eIF4A3的双酶切鉴定



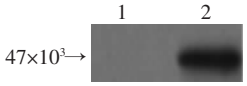
1:标准;2:eIF4A3;3:pcDNA 双酶切;4:pCMV-c-myc-eIF4A3 双酶切

图3 重组质粒pCMV-c-myc-eIF4A3的双酶切鉴定

2.3 稳定细胞系中重组质粒的表达

重组质粒pCMV(空白对照)、pCMV-c-myc-eIF4A3转染入HeLa细胞后,用G418筛选2周可在镜下观察到细胞克隆,挑

取单克隆扩增后提取蛋白做 Western blot 检测,可看到对照组中无外源性 eIF4A3 表达,实验组则有带 c-myc 标签的 eIF4A3(约 47×10^3)的表达(图 4)。

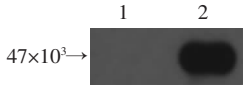


1:空白对照组;2: eIF4A3 组

图 4 重组质粒在 HeLa 细胞中的表达

2.4 重组质粒在体外翻译中的表达

用体外翻译试剂盒对重组质粒在体外进行翻译,对照组无目的条带出现,实验组则有带 HA 标签的 eIF4A3 的表达(图 5)。



1:空白对照组;2: eIF4A3 组

图 5 重组质粒在体外翻译中的表达

2.5 eIF4A3 高表达对蛋白质翻译的影响

将 eIF4A3 基因及其空载体分别与荧光素酶报告基因共转染入 HeLa 细胞中,瞬时表达荧光素酶,测定化学发光值,与对照组(2 305.0)相比,实验组(200.5)降低了约 92%。

3 讨论

蛋白质翻译起始是蛋白质合成的限速步骤,这一过程涉及多种翻译起始因子的参与。其中, eIF4A 在蛋白质翻译起始中起到非常重要的作用,但是,其亚族 eIF4A3 的生物学功能尚不清楚。

有研究认为,eIF4A3 在蛋白质翻译调控中起重要作用。eIF4A3 为 RNA 依赖的 ATP 水解酶和 ATP 依赖的 RNA 解旋酶,其 RNA 解旋酶活性可解旋 mRNA 5′-非翻译区的二级结构,促进翻译起始复合物与 mRNA的结合。另有研究表明 eIF4A3 为外显子连接复合体的一员,在此复合体中,eIF4A3 以钳夹的方式与 RNA 相结合[7],并与其他 3 种蛋白质 MLN51、Y14 及 Magoh 组成外显子连接复合体的核心成分[8-9],从而为其他数十种因子的结合提供一个平台[10]。外显子连接复合体除了促进未成熟的 mRNA 剪接为成熟的无内含子的 mRNA 外,还伴随 mRNA 出核,在出核的过程中及随后的翻译中都起到调节作用,直到翻译起始时核糖体与 mRNA 结合后才可促发其从 mRNA 上解离下来[11]。在这整个过程中,外显子连接复合体的许多成员都对翻译起促进作用[12],其中 eIF4A3 促进翻译的作用是在 80S 核糖体亚基形成之后[13]。

本研究结果显示,eIF4A3 的过表达可显著抑制荧光素酶报告基因的蛋白表达水平,初步说明 eIF4A3 对蛋白质翻译起抑制作用。Li 等也研究发现 eIF4A3 对翻译有抑制作用,与本实验结果一致。这个结果与其同源物 eIF4A1 的作用相反[6],可能是由于 eIF4A1 可与 eIF4G 的中间区域及氨基末端区域相结合,而 eIF4A3 只能与 eIF4G 的中间区域相结合[14-15]。也有学者认为它可能在某些情况下对翻译有促进作用,在另一些情况下则表现为抑制作用,但具体机制尚不明确。

本研究成功构建人 eIF4A3 的真核表达载体,获得了可稳定高表达人 eIF4A3 的 HeLa 细胞株,建立了人 eIF4A3 的体外翻译系统,为进一步揭示 eIF4A3 的结构和功能,及其在蛋白质翻译调控中的作用研究奠定基础。

参考文献:

[1] Tuteja N, Vashisht A A, Tuteja R. Translation initiation factor 4A: a prototype member of dead-box protein family[J]. Physiol Mol Biol Plants, 2008, 14(1/2): 101-107.

[2] Shibuya T, Tange T O, Stroupe M E, *et al*. Mutational analysis of human eIF4AIII identifies regions necessary for exon junction complex formation and nonsense-mediated mRNA decay[J]. RNA, 2006, 12(3): 360-374.

[3] Dhalia R, Marinsek N, Reis C R, *et al*. The two eIF4A helicases in Trypanosoma brucei are functionally distinct[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(9): 2495-2507.

[4] 李进军, 刘献志, 万学峰, 等. mTOR/eIF4E 信号通路在不同组别人脑脑质瘤组织中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(23): 2549-2551.

[5] Koroleva O A, Calder G, Pendle A F, *et al*. Dynamic behavior of Arabidopsis eIF4A-Ⅲ, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia[J]. Plant Cell, 2009, 21(5): 1592-1606.

[6] Nott A, Le-Hir H, Moore M J. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex[J]. Genes Dev, 2004, 18(2): 210-222.

[7] Bono F, Ebert J, Lorentzen E, *et al*. The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA[J]. Cell, 2006, 126(4): 713-725.

[8] Le-Hir H, Andersen G R. Structural insights into the exon junction complex[J]. Curr Opin Struct Biol, 2008, 18(1): 112-119.

[9] Stroupe M E, Tange T O, Thomas D R, *et al*. The three-dimensional Arcitecture of the EJC core[J]. J Mol Biol, 2006, 360(4): 743-749.

[10] Bercovich N, Levin M J, Clayton C, *et al*. Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes[J]. Mol Biochem Parasitol, 2009, 166(2): 190-193.

[11] Ballut L, Marchadier B, Baguet A, *et al*. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity[J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(10): 861-869.

[12] Diem M D, Chan C C, Younis I, *et al*. PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs[J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(12): 1173-1179.

[13] Lee H C, Choe J, Chi S G, *et al*. Exon junction complex enhances translation of spliced mRNAs at multiple steps[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 384(3): 334-340.

[14] Schutz P, Bumann M, Oberholzer A E, *et al*. Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(28): 9564-9569.

[15] Hilbert M, Kebbel F, Gubaev A, *et al*. eIF4G stimulates the activity of the DEAD box protein eIF4A by a conformational guidance mechanism[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(6): 2260-2270.

(**收稿**:2011-03-06;**修回**:2011-06-07)

(编辑 汪勤俭)