基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0816-03

pcDNA3.1 载体对内参基因表达影响分析

陈 可,王增产

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究转染质粒 pcDNA3.1 对内参基因表达影响差别,为今后在采用 pcDNA3.1 载体进行表达分析时内参基因的选择提供参考。方法:选用 HepG2、HEK293、Hela、A549、QGY 共 5 种细胞转染 pcDNA3.1 空载体质粒,转染后 48 h 提取细胞总 RNA 荧光定量 PCR 法比较内参基因甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphste dehydrogenase,GAPDH)、肌动蛋白(β-actin)、18sRNA 表达水平差异,提取细胞总蛋白,检测 GAPDH、β-actin 表达水平差异。结果:5 种细胞在转染质粒 pcDNA3.1 后,内参基因转录和蛋白表达均出现不同程度的下降,其中以 β-actin 下降最为明显,GAPDH 及 18sRNA 在转录水平下降幅度小,且下降程度接近。结论:pcDNA3.1 质粒转染造成基因表达非特异性抑制,其中对管家基因 β-actin 影响较大,因此在应用 pcDNA3.1 来源载体进行基因功能分析时,不推荐使用 β-actin 作为内参基因。

【关键词】pcDNA3.1;内参基因;转染;转录;表达

【中国图书分类法分类号】Q753 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-31

Analysis of the effect of pcDNA3.1 on house keeping gene expression

CHEN Ke, et al

(*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of pcDNA3.1 vector on housekeeping gene expression and set guide to further study work in using pcDNA3.1. *Methods*: 5 cell lines were transfected with pcDNA3.1, 48 h post transfection total RNA was extracted and applied for real time PCR to detect the RNA level of GAPDH、β-*actin*、18sRNA *difference. Meanwhile, extract total protein and*

作者简介:陈 可(1968-),男,实验师,研究方向:分子生物学。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30600520)。

目前关于几种乙肝治疗性疫苗的研究,主要分为抗原蛋白或肽负荷/冲击的 DC 以及抗原基因导入的 DC 两种类型,我们的实验结果均提示 HBsAg 冲击的 DC 比同样蛋白冲击的巨噬细胞在体内能刺激更强的 MHC 类限制性 CTL 应答[9],表明 DC 疫苗具有突出的诱导细胞免疫应答的能力[10]。HBV 特异性 CTL 是控制病毒持续感染进而清除病毒的重要因素,而慢性 HBV 感染者 DC 的抗原提呈功能有缺陷,不能把病毒抗原的信号传递给机体的免疫系统,引起 CTL 应答不足。本实验中,我们用 HBsAg 冲击的 DC 制备的 HBsAg-DC 疫苗,并初步观察其体外的免疫刺激活性,也发现经此处理对 DC 的成熟表型、及刺激同种异体 T 细胞增殖的功能均有增强作用。

参 考 文 献

[1] Su W J, Ho M C, Ni Y H, *et al. Clinical course of de novo hepatitis B infection after pediatric liver transplantation*[J]. Liver Transpl, 2010, 16(2): 215-221.

[2] Woltman A M, Boonstra A, Janssen H L. Dendritic cells in chronic viral hepatitis B and C: victims or guardian angels[J]? Gut, 2010, 9(1): 115-125.

[3] Yang J Y, Cao D Y, Xue Y, et al. Improvement of dendritic-based vaccine efficacy against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by two tumor-associated antigen gene-infected dendritic cells[J]. Hum Immunol, 2010, 1(3): 255-262.

[4] *Huang Y, Chen Z, Zhou C, et al. The modulation of thymosin alpha 1* in the maturation, differentiation and function of murine bone marrow-derived dendritic cells in the absence or presence of tumor necrosis factor-alpha[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(4): 539-546.

[5] Fazle Akbar S M, Furukawa S, Yoshida O, et al. Induction of anti-HBs in HB vaccine nonresponders in vivo by hepatitis B surface antigen-pulsed blood dendritic cells[J]. J Hepatol. 2007, 7(1): 60-66.

[6] Akbar SM, Furukawa S, Hasebe A, et al. Production and efficacy of a dendritic cell-based therapeutic vaccine for murine chronic hepatitis B virus carriere [J]r. Int J Mol Med, 2004, 4(2): 295-299.

[7] Akbar SM, Horiike N, Onji M, et al. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers [J]. Intervirology, 2001, 4(4): 199-208.

[8] 达万明,曹雪涛.外周血干细胞移植 [M].第 1 版.北京:人民卫生出版社,2000.222.

[9] Carotenuto P, Artsen A, Niesters H G, et al. In vitro use of autologous dendritic cells improves detection of T cell responses to hepatitis B virus (HBV) antigens [J]. J Med Virol, 2009, 81(2): 332-339.

[10] Boonstra A, Woltman A M, Janssen H L. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2008, 22(6): 1049-1061.

(责任编辑:关蕴良)

analyze the GAPDH and β-actin expression by Western blot. *Results*: RNA and protein levels all show of a decrease in 5 cell lines after transfection, with the most obviously β-actin. *Conclusion*: pcDNA3.1 might have non specif inhibition effect to cell, when using pcDNA3.1 for gene function research, it is not recommend to use β-actin as reference gene.

【Key words】pcDNA3.1; Housekeeping Gene; Transfection; Transcription; Expression

基因表达分析在生命科学的众多研究领域中日趋重要，在转录水平进行基因表达定量的方法，如实时定量 PCR、RNA 印迹，核糖核酸酶保护分析、基因芯片等，在蛋白质平行定量的方法如蛋白质印迹等，都需要应用内参基因对目标基因表达量进行校正，以期获得真实可靠的结果。看家基因有几百种，最常用的为 ACTB、GAPDH、18SrRNA、28SrRNA，理想的看家基因在各种实验因素条件下，各种类型的组织或细胞均恒定表达[1]。然而，大量的研究结果表明，任意一种看家基因的所谓恒定表达都只是在一定类型细胞或实验因素作用下“有范围”的恒定。在其它类型的细胞中或实验因素作用下则是变化的，有可能是十几倍几十倍甚至是上百倍的差异[2,3]。盲目地使用一种看家基因作为内参，一方面，可能使基因表达的微小差异难以发现，另一方面能引致错误甚至相反的结论[4,5]。本研究比较了基因表达分析常用的质粒载体 pcDNA3.1 在不同细胞系中对 GAPDH、β-actin、18sRNA 3 种内参基因表达影响分析，通过该实验对后续采用 pcDNA3.1 载体进行表达分析时内参基因选择提供参考。

1 材料和方法

1.1 细胞培养与转染

实验用细胞系 HepG2、HEK293、Hela、A549、QGY 均为本室自行保存，细胞培养于含 10%FBS 的 MEM 血清培养基进行培养，转染前 12 h 以每孔 5×10^5 个细胞数密度接种于 6 孔板。采用 Lipofectamin 2000™(Invitrogen)进行转染，转染条件：pcDNA3.1(Invitrogen)4 μg/孔，脂质体 10 μl/孔，按照 Lipofectamin 2000™ 操作说明书进行转染，转染后 4 h 更换培养基培养过夜。转染实验均采用 3 次重复。

1.2 细胞总 RNA 提取及荧光定量 PCR 检测

细胞转染 48 h 后，终止细胞培养，使用 Trizol 试剂(Invitrogen，USA)按说明书提取总 RNA，采用无 RNA 酶的 DNA 酶(Promega 公司)按照说明书处理总 RNA 以去除基因组 DNA。取 2 μg 总 RNA 按照 M-MLV 逆转录酶(Promega)说明书逆转为 cDNA，并对 cDNA 原液进行 10 倍稀释作为实时定量PCR 的 cDNA 工作液。PCR 通过 BIO-RAD 公司 IQ5 Real-time PCR system 进行分析。引物序列见表 1，反应体系参照 Real-time PCR Master Mix(Fermentas)说明书：荧光定量 PCR 反应体系 20 μl，Syber Green mix10 μl、上下游引物(10 pmol/μl)各 0.75 μl、cDNA 1 μl，高压灭菌去离子水 7.5 μl。经摸索和优化 PCR 的反应条件最终设置如下：95℃ 10 min(预变性)后进入循环；95℃ 15 s(变性)，60℃ 30 s(退火及延伸)，重复 40 个循环。设置在延伸阶段收集荧光信号。经 IQ5 自带分析软件可得到样本各看家基因的循环域值(Ct 值)。

1.3 Western blot 检测

转染后 48 h，RIPA150(碧云天)裂解液裂解细胞，总蛋白定量后，取 50 μg 蛋白量进行 SDS-PAGE 电泳，经转膜封闭后，采用鼠抗 β-actin(santa cruz)，鼠抗 GAPDH 单抗(santa cruz)，4℃孵育过夜，羊抗鼠 -HRP 二抗室温孵育 1.5 h，胶片曝光显色。

1.4 统计学分析处理

将荧光定量数据结果利用 SPSS12.0 统计分析软件进行分析处理。

2 结 果

2.1 pcDNA3.1 空载体转染抑制非特异性抑制细胞基因表达

转染后 48 h，细胞总 RNA 进行 real time PCR 检测，通过脂质体转染(不含质粒 DNA)细胞作为对照，结果发现 GAPDH、β-actin、18sRNA 3 种内参基因表达均出现不同程度下降，其中以 β-actin 下降最为明显($P<0.01$)，GAPDH 和 18sRNA 差别不明显，且在所选择的几种细胞系中，3 种基因的表达趋势接近。

2.2 pcDNA3.1 明显抑制 β-actin 蛋白表达

在蛋白水平表达的检测的结果与转录水平类似，β-actin 的表达在 5 种细胞系种均出现不同程度的抑制，其表达较空白组明显减弱，而 GAPDH 在各组之间变化不大(图 1)。

表 1 荧光定量引物序列

引物名称	引物序列	片段大小 (bp)
GAPDH	正向：5'-TTC AGCTCTGGGATGACCTT-3'	198
	反向：5'-TGCCACTCAGAAGACT GTGG-3'	
β-actin	正向：5'-GTCGTACCA CTGGCA TCGTG-3'	180
	反向：5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGA AG-3'	
18srRNA	正向：5'-GTA ACC CGTTGA ACCCCATT-3'	150
	反向：5'-CCATCCAAT CGGTAGTAGCG-3'	

表 2 转染后各细胞与对照组△Ct(转染－空白)

细胞基因	HepG2	HEK293	Hela	A549	QGY
GAPDH	0.55	0.68	0.79	0.76	1.03
β-actin	2.26	2.58	2.85	1.86	2.53
18srRNA	1.02	0.87	0.77	0.68	0.89

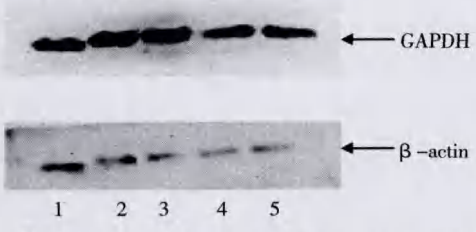


图 1 各细胞系 GAPDH 与 β-actin 蛋白表达分析，1~5 号分别代表 A549、HepG2、QGY、Hela 和 HEK293 细胞

3 讨 论

内参基因通常是各种看家基因，在细胞内组成稳定性表达，有助于保持细胞的功能。理想的内参基因应该满足以下条件：① 不存在假基因 (Pseudogene)，以避免基因 DNA 的扩增；②高度或中度表达，排除低表达；③稳定表达于不同类型的细胞和组织(如正常细胞和癌细胞)，而且其表达量是近似的，无显著性差别；④表达水平与细胞周期以及细胞是否活化无关；⑤其稳定的表达水平与目标基因相似；⑥不受任何内源性或外源性因素的影响，如不受任何实验处理措施的影响[6-10]。目前常用的内参基因包括：GAPDH、β-actin、18sRNA 和 28sRNA。近年来的研究发现：这些常用内参基因均存在缺陷，在不同类型的细胞和组织、细胞增殖和器官发育的不同阶段、体外培养、各种实验条件等情况下它们的表达量通常变异较大[11,13]。Sarah.Wetal 分析了 HSV 感染 7 种不同细胞系之后，10 种内参基因表达水平变化，并最终得到 HSV 感染下用作标化内参基因排序。其研究发现，HSV 感染细胞时，GAPDH 作为内参的可信度及稳定性高于 β-actin 及 18SrRNA[14]。pcDNA3.1 是真核表达质粒的一种，被广泛应用于构建基因真核表达质粒及其后续功能研究中，由于质粒转染本身会造成内参基因的改变，因此有必要选择一种合适的内参基因用于基因功能分析。本研究发现，pcDNA3.1 载体质粒在转染细胞后会引起看家基因 β-actin 表达下调，下调主要发生在转录水平，进而造成蛋白表达下调，根据实验结果，我们认为：在应用 pcDNA3.1 载体进行表达研究时不适合采用 β-actin 作为内参基因，相比之下 GAPDH 作为内参效果更好更为适合和稳定。

参 考 文 献

[1] Suzuki T, Higgins P J, Crawford D R. Control selection for RNA quantitation[J]. Biotechniques, 2000, 29(2): 332-337.

[2] P. Ward, E. Poitras, D.Leblanc. Comparative analysis of different TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of swine hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 2 (106): 1360-1369.

[3] Selvey S, Thompson E W, Matthaei, et al. Beta-actin an unsuitable internal control for RT-PCR[J]. Mol Cell Probes, 2001, 15(5): 307-311.

[4] Vandesompele J, De Preter Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biol, 2002, 3(7): 34-38.

[5] Hugger J, Dheda Bustin S. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations[J]. Genes Immun, 2005, 6(4): 279-284.

[6] Meier LL, Semmer NK, Elfering A, et al.The double meaning of control: three-way interactions between internal resources, job control, and stressors at work[J]. J Occup Health Psychol, 2008, 13(3): 244-258.

[7] Vila M R, Nicolas A, Morote J, et al.Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNA-based, arbitrarily primed polymerase chain reaction [J].Cancer, 2000, 89(1): 152-164.

[8] Zhu G, Chang Y, Zuo J, et al.Fudenine, a C-terminal truncated rat homologue of mouse prominin, is blood glueo-regulated and can up-regulate the expression of GAPDH[J].Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281 (4): 951-956.

[9] Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, et al.Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain eaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies [J].Anal Biochem, 2002, 309(2): 293-300.

[10] Lossos I S, Czerwinski D K, Wechser M A, et al.Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies[J].Leukemia, 2003, 17(4): 789-795.

[11] Radonic A, Thulke S, Mackay I M, et al.Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J].Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(4): 856-862.

[12] Stevenson J, Hymas W, Hillyard D. The use of Armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR[J].J Virol methods, 2008, 150 (1-2): 73-76.

[13] Hamalainen H K, Tubman J C, Vikman S, et al.Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR[J].Anal Biochem, 2001, 299(1): 63-70.

[14] Goidin D, Mamessier A, Staquet M J, et al.Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and B-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanonla cell subpopulations [J].Anal Biochem, 2001, 295(1): 17-21.

(责任编辑：关蕴良)