基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0145-03

人 REGγ cDNA 克隆及其稳定转染细胞株的建立

田 甜,王小毅,李 凡,任国胜
(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建真核表达重组体 PcDNA3.1-REGγ 的稳定转染细胞株,为进一步深入研究 REGγ 的功能奠定基础。方法:提取 MCF-7 细胞的总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 获取全长 REGγ cDNA,经限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ酶切后与 PcDNA3.1 连接构建重组体,再经内切酶酶切及 DNA 序列分析鉴定重组体构建正确。以 Lipofectamine2000 将重组体导入 HBL-100 细胞,由 G418 筛选出稳定转染细胞株。结果:经免疫细胞化学和 RT-PCR 检测并证实稳定转染细胞株中有 REGγ 的高表达。结论:真核表达重组体 PcDNA3.1-REGγ 构建成功,并经抗生素筛选获得了稳定高表达 REGγ 的细胞株,为进一步研究 REGγ 的功能奠定了基础。

【关键词】REGγ;cDNA 克隆;转染
【中国图书分类法分类号】R329 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-16

Cloning of human REGγ cDNA and construction of the stable transfective cell line

TIAN Tian, et al
(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the stable transfective cell line with the eukaryotic expression vector for human REGγ cDNA to laid the foundation for further study of the function of REGγ. *Methods*: REGγ cDNA was obtained by RT-PCR of total RNA extracted from the human breast cancer cell MCF-7, and it was digested by the restriction endonuclease *EcoR* Ⅰ and *EcoR* Ⅴ before connection with PcDNA3.1.The recombination with forward insert were slelected by restriction endonuclease digestion and confirmed correct by sequencing and then transfected into HBL-100 cell by using lipofectamine2000.The stable transfected cell line was selected in medium containing antibiotic(G418). *Results*: The result of immunocytochemistry and RT-PCR of total RNA

作者介绍:田 甜(1973-),男,主治医师,博士,研究方向:乳腺癌的发病机制。
通讯作者:任国胜,男,教授,E-mail:rgs726@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:30670811)。

1082-1088.
[2] Visconti R.Importance of the MKK6/P38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity[J]. Blood,2000,96(5):1844-1852.
[3] Gately MK,Desai BB,Wolitzky AG,et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)[J]. J Immunol,1991,147(3):874-882.
[4] Germann T,Bongartz M, Dlugonska H, et al. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a,IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo [J]. Eur J Immunol, 1995,25(3):823-829.
[5] Murray HW,Hariprashad J. Interleukin 12 is effective against an established systematic intercellular infections: experimental visceral leishmaniasis[J]. J Exp Med,1995,181(1):387-391.
[6] Trinchieri G. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specitic adaptive immunity [J]. Annu Rev Immunol,1995,13 (1): 251-276.
[7] Wynn TA,Cheever AW,Jankovic D,et al. An IL-12-based Vaccination method for Preventing fibrosis induced by Schistosome infection[J].Nature,1995,376(6541):594-596.
[8] 李宝金,殷晓煜,吕明德,等.IL-12 基因修饰树突状细胞体外诱导免疫杀伤肝癌细胞[J]. 中华外科杂志,2004,42(5):315-316.
[9] Emery I,Leclerc C,Sengphommachanh K, et al. In vivo treatment with recombinant IL-12 protects C57BL/6j mice against secondary alveolar echinococcoris[J]. Parasite Immmunol,1998,20(2):81-91.
[10] 李富荣,石佑恩,史大中,等.泡球蚴感染过程中宿主 CD4⁺T 细胞凋亡和凋亡相关基因转录水平的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003,19(4):59-65.
[11] Kremer L,Estaquier J,Brandt E, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes[J]. Eur J Immunol,1997,27(9):2450-2456.
[12] Estaquier J,Idziorek T,Zou WP,et al. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin-12 on activation-induced and CD95(FAC/APO-1)-mediated apoptosis of CD_4^+T cells from human immunodeficiency virus-infected persons [J]. J Exp Med, 1995,182(5):1759-1767.
[13] 杨 梅,李文桂.多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗对小鼠脾细胞凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(8):796-798.

(责任编辑:关蕴良)

extracted from the stable transfected cell line showed that there existed the overexpression of REG γ cDNA in it. *Conclusion*: The construction of the eukaryotic expression vector for REG γ was successful, and the stable transfected cell line for overexpression REG γ was obtained by G418 selection. This work may pave the way for further study of the functions of REG γ.

【Key words】REG γ; cDNA clone; Transfect

REGγ(也叫 PA28γ、PSME3、或 Ki 抗原)属于蛋白酶体激活因子的 REG 或 11 S 家族,已证明其可以结合并激活 20 S 蛋白酶体。蛋白酶体是一个主要的非溶酶体蛋白水解途径,它可以消除受损的或错误折叠的蛋白质,从而调节基本的细胞过程如细胞周期、转录、细胞信号、细胞死亡和免疫应答[1]。本文试图构建真核表达重组体 PcDNA3.1-REGγ 的稳定转染细胞株,为进一步研究 REGγ 的生物学作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、菌株和质粒

乳腺癌细胞株 MCF-7、HBL-100 及大肠杆菌 JM109 由重庆医科大学基础医学研究所保存。PcDNA3.1 质粒由重庆医科大学病毒性肝炎研究所、教育部感染性疾病分子生物学重点实验室汤华副研究员惠赠。

1.2 主要试剂

所用工具酶(*EcoR* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ、Taq DNA polymerase、T4DNA 连接酶)及 DNA Marker 购自TaKaRa 公司,RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清为 Hyclone 生产,Plasmid Mini Kit、PCR-Preps DNA Purification System等试剂购自 OMEGA 公司,Lipofectamine2000、G418、TRIZOL 试剂等购自 Invitrogen 公司。

1.3 引物设计与合成

参照 Xiaotao Li 论文[2]设计引物序列。Prime1:5'-CAC-CATGGCCTCGTTGCTGAAGG-3';Prime2:5'-TCAGTACAGT-GTCTCTGCATTGCTG-3'由上海生物工程有限公司合成。

1.4 人 MCF-7 细胞总 RNA 的提取

按试剂盒说明书进行。

1.5 RT-PCR

根据逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第 1 链,再以逆转录产物为模板进行 PCR 扩增。反应条件为 94℃变性 1 min,66℃退火 30 s,72℃延伸 3 min,共进行 30 个循环。

1.6 重组质粒的构建

PcDNA3.1-REG γ 的构建及感受态制备、转化、菌落挑选、酶切鉴定等操作按文献[3]进行,DNA 测序由重庆医科大学病毒性肝炎研究所、教育部感染性疾病分子生物学重点实验室完成。

1.7 脂质体转染、G418 筛选

按参考文献[3]进行。

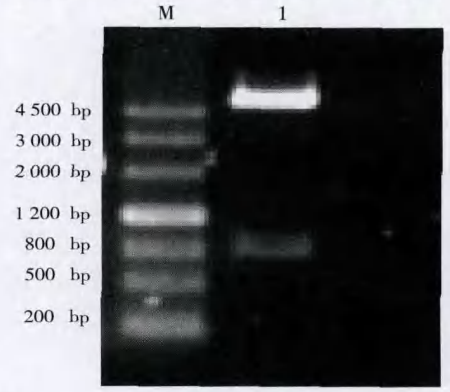
1.8 免疫细胞化学及 RT-PCR

根据试剂盒说明书进行。

2 结 果

2.1 PcDNA3.1-REGγ 重组质粒的酶切鉴定结果

重组体经 *EcoR* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ酶切后电泳结果如图 1。图示重组体被酶切为大小分别为 5 400 bp (PcDNA3.1)和 780 bp(REGγ)的两条片段。经序列分析进一步证实该真核表达重组体构建成功。



M.DNA Marker; 1.重组体被酶切为大小分别为 5 400 bp (PcDNA3.1)和 780 bp(REG γ)的两条片段

图 1 PcDNA3.1-REGγ 重组质粒的酶切鉴定

2.2 不同浓度的 G418 对 HBL-100 细胞的作用

制备 HBL-100 细胞悬液,计数使其达到 1×10^4 个/ml,接种于 24 孔培养板,每个孔 200 μl,每孔再加 RPMI1640 培养基 800 μl,设定 G418 浓度梯度为 600、500、400、300、200、100 μg/ml,每个浓度设 3 复孔。计算活细胞数并取 3 孔的平均值。结果:在 14 d 内使细胞全部死亡的最低浓度为 200 μg/ml。因此,200 μg/ml 的 G418 浓度可作为筛选本细胞系的最佳有效浓度,用此浓度的 G418 连续筛选转染重组体的细胞 3 次,每次 14 d,获得稳定转染的存活细胞。

2.3 PcDNA3.1-REGγ 的表达

将稳定转染重组体的 HBL-100 扩大培养、制备爬片,通过免疫细胞化学(SP 法)检测显示阳性产物主要表达在胞核,转染重组体的细胞可与 REGγmAb 结合出现阳性至强阳性反应,而未经转染的细胞普

遍呈弱阳性反应，采用北航 CM-2000B 生物医学图像分析系统对免疫组化染色阳性反应产物进行定量分析，以平均光密度值大小代表阳性产物表达的多少。实验检测数据用均数±标准差表示。应用 SPSS13.0 软件作方差分析，结果显示，在稳定转染 REGγ 重组体的 HBL-100 细胞与未转染的细胞相比较有显著性差异（$P<0.05$），REGγ 基因表达明显增强（见图 2）。

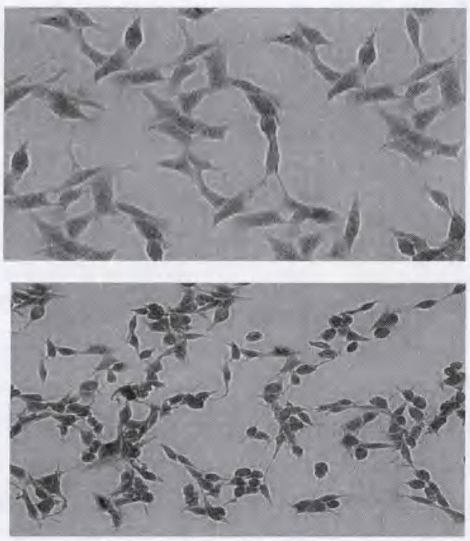
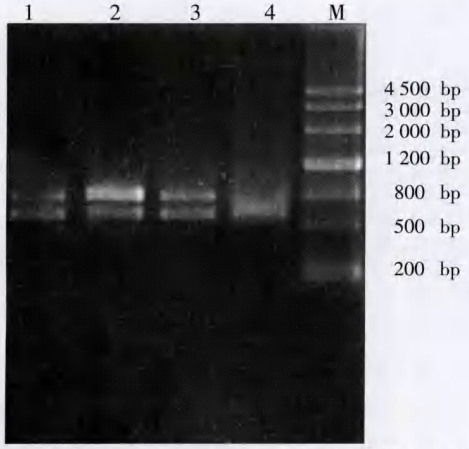


图 2 未转染 REGγ 的细胞（上）与转染 REGγ 的细胞（下）的免疫细胞化学检测（SP×200）

2.4 对转染的 HBL-100 细胞进行 RT-PCR 分析

用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基将稳定转染重组体后的细胞扩大培养，达 80%密度后提取其总 RNA 进行 RT-PCR，产物电泳结果如图 3。780 bp 条带为 REGγ，650 bp 条带为内参（β-actin）。



1.未转染的细胞；2.转染 REGγ 重组体的细胞；3.转染 PcDNA3.1 空载体的细胞；4.以去离子水为模板的 RT-PCR M.DNA Marker

图 3 对转染 REGγ 前后的细胞进行的 RT-PCR 分析

其中第 1、2、3 泳道均见 780 bp 大小的特异性条带，说明细胞有 REGγcDNA 表达；其中第 1 泳道为未转染 REGγ 的细胞，第 2 泳道为转染重组体的细胞，第 3 泳道为转染空质粒的细胞。经 Dolphin 1D 软件进行半定量分析，第 2 泳道的表达明显强于第 1、3 泳道，第 4 泳道以去离子水为模板进行 RT-PCR 无特异性条带出现，说明整个反应体系无污染，排除了假阳性可能。

3 讨 论

通过基因工程方法表达真核蛋白，能在原核细胞和真核细胞中进行。但许多在细菌中合成的真核蛋白或因折叠方式不正确，或因折叠效率低下，结果使得蛋白活性低或无活性。不仅如此，真核生物蛋白的活性往往需要糖基化、磷酸化、二硫键形成等翻译后加工，而原核细胞对这些加工却无能为力。由于 DNA 导入哺乳动物细胞的相关技术方法的发展，使真核表达成为可能。REGγ 是一种有多种生物学活性的蛋白质，故我们将其 cDNA 重组在真核表达载体 PcDNA3.1 中。

由于我们在预实验中得知 REGγ 在乳腺（癌）细胞中以 HBL-100 表达最低而被选作受体细胞。

不同细胞株对 G418 的敏感性差异悬殊。本实验通过 G418 的梯度浓度连续筛选确定的有效筛选浓度为 200 μg/ml，经连续筛选成活表明，转染重组体的 HBL-100 能表达 G418 抗性，结合免疫细胞化学检测及转染细胞的 RT-PCR 结果说明，脂质体介导的重组 REGγcDNA 已经稳定整合到细胞基因组中。

真核表达重组体 PcDNA3.1-REGγ 的稳定转染细胞株的构建成功，为深入研究 REGγ 的功能奠定了基础，进一步的研究结果将在随后的相关文章中陆续报道。

参 考 文 献

[1] Goldberg A L. Protein d egradation and protection against misfolded or damaged proteins[J]. Nature, 2003, 6968 (426): 895-899.

[2] L X, David M L, Sung Y J, et al.The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a Ubiquitin and ATP-IndependentManner by the REG γ proteasome[J]. Cell, 2006, 124(2): 381-392.

[3] 萨姆布鲁克 J 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京：科学出版社，2002. 96-99.

（责任编辑：冉明会）