

比格犬 ER β 剪切异构体 ER β 419 沉默表达载体的构建及筛选

甘 艺^{1,2}, 赵彦斌², 陈福军³, 孙兆增², 胡仲明², 刘 冰², 杨焕民¹, 曾 林²

(1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 实验动物中心, 北京 100071;
3. 五棵樹经济开发区动物卫生监督所, 长春 130401)

【摘要】 目的 构建最有效的慢病毒介导 RNAi 干扰序列, 未来将应用于比格犬 ER β 419 的未知生物学功能的探索。方法 模拟比格犬 ER β 419 靶细胞筛选针对目的基因 mRNA 设计的最佳干扰序列实验, 通过 qRT-PCR 和 Western Blot 技术筛选最佳沉默表达载体序列。结果 qRT-PCR 结果显示, ER β 419-shRNA1 ($P < 0.01$) 和 ER β 419-shRNA3 ($P < 0.01$) 的差异表达极显著, Western Blot 结果与 qRT-PCR 结果一致, ER β 419-shRNA3 的干扰效果最佳。结论 ER β 419-shRNA3 最有效地抑制了目的基因的表达, 未来将应用于探索比格犬 ER β 419 未知生物学功能对比格犬生殖系统影响的研究, 并进而预防和治疗比格犬繁殖机能障碍性疾病。

【关键词】 比格犬 ER β 419; 稳定表达细胞系; 基因沉默

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0010-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.003

Construction and identification of ER β 419 gene silencing recombined vectors of beagle ER β isoforms

GAN Yi^{1,2}, ZHAO Yan-bin², CHEN Fu-jun³, SUN Zhao-zeng², ZENG Lin², LIU Bing², YANG Huan-min¹, HU Zhong-ming²

(1. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Heilongjiang Daqing 163319, China;
2. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China;
3. Animal health supervision of Wukesong Economic Development Zone, Changchun 130401, China)

【Abstract】 **Objective** To construct and identify retroviral-mediated short hairpin RNA (shRNA) expression vectors of ER β 419, and explore ER β 419 unknown biological function in beagles in future. **Methods** To screen out the most effective gene silencing sequence of beagle ER β 419 mRNA using qRT-PCR and Western Blot assays, imitate beagle estrogen target cells. **Results** qRT-PCR results showed, ER β 419-shRNA1 ($P < 0.01$) and ER β 419-shRNA3 ($P < 0.01$) differed significantly, Western Blot result as same as qRT-PCR, ER β 419-shRNA3 is the best choice. **Conclusion** Beagles ER β 419-shRNA3 retrain most effectively target gene repression. It is applied to explore ER β 419 unknown biological function in beagles reproductive system, and to prevent and treat beagles reproductive function diseases.

【Key words】 Beagles ER β 419; Stable expression cell lines; Gene silencing

比格犬 ER β 419 为该犬最新发现的 ER β 剪切 异构体, 尚无其生物学功能的报道。ER β 419 cDNA

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31372271)。

[作者简介] 甘艺(1988-), 女, 硕士生, 研究方向: 基础兽医学, E-mail: gy_szz@126.com。

[通讯作者] 曾林(1965-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 实验动物科学与管理。E-mail: zenglin1965@126.com。

序列由下丘脑-垂体-性腺轴提纯得到, ER β 419 由 1257 个碱基组成, 编码 419aa, 命名为 ER β 419。研究未知基因的生物学功能通常借助于慢病毒介导 RNAi 重组载体, 本实验旨在筛选最有效的沉默表达载体, 为后续探索比格犬 ER β 419 的生物学功能提供试验材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:

无内毒素质粒小提试剂盒、GenFectinTM 基因转染试剂、为 Biomed 品牌产品, 4 × SDS 上样缓冲液为 Solarbio 品牌产品, 胎牛血清、DMEM 高糖培养基为 Hyclone 品牌产品, 0.25% EDTA 胰酶、PBS 缓冲液、1 mol/L Tris-Cl、1.5 mol/L Tris-Cl 为 Solarbio 品牌产品、抗 MYC 标签兔单克隆抗体 (GTX115046) 为 GENETEX 品牌产品, 抗 GAPDH 兔多克隆抗体 (CW0101)、HRP 标记兔二抗 (CW0103) 为康为品牌产品, DMSO 为 Invitrogen 品牌产品, G418 为 Gibco 品牌产品, T4 DNA Ligase 和 PrimeScript RT reagent Kit, SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 是 TaKaRa 品牌产品, 胰蛋白酶、NaCl、酵母粉、脱脂奶粉等均为国产试剂。

1.1.2 菌种及细胞株:

pcDNA3.1-MYC-ER β 419 重组质粒菌液及质粒、pGLV3/H1/GPF + Puro 载体和 HEK293T 细胞由本实验室冻存。

1.2 试验方法

1.2.1 稳定表达 ER β 419 蛋白细胞株的构建

1.2.1.1 构建稳定表达 ER β 419 基因的细胞株

将细胞计数后适宜数量接种于 6 孔板中, 高糖 DMEM 完全培养基 (含有 10% FBS, 无双抗) 培养 18 ~ 22 h。细胞铺板底 70% ~ 80% 时进行转染。将 4 μ g pcDNA3.1-Myc-ER β 419 重组质粒及 10 μ L GenFectinTM 基因转染试剂分别稀释于 50 μ L 0.15 mol/L NaCl 中, 两者再轻柔混合, 室温静置 5 min, 混合液加入 6 孔板培养基中, 培养 24 h。

将瞬时转染的细胞以适当倍数稀释于 100 mm 细胞培养皿中, 并设对照组细胞 (同等数量的 HEK293T 细胞); 待细胞贴壁, 并铺至瓶底 50% ~ 70% 时, 加入含有青霉素浓度为 100 μ g/mL 和 G418 浓度为 800 μ g/mL 的筛选培养基; 每 2 ~ 3 日更换一次筛选培养基; 待对照组细胞全部死亡, 挑取单克隆细胞至 96 孔板中用完全培养基继续培养;

每 2 ~ 3 d 更换一次半浓度筛选培养基; 筛选 28 d 后, 可见有抗性的细胞团未发生死亡, 生长状态良好, 即可停药, 扩大培养; 当细胞量达到一定数量时, 即可检测目的蛋白的表达。

1.2.1.2 蛋白质印迹法检测目的重组真核表达载体在 HEK293T 细胞中的表达

收集待测细胞于离心管, 每管加入 500 μ L 细胞裂解液, 4℃ 全速离心 30 min; 取上清, 用 BCA 法测定上清蛋白浓度; 加适量 4 × SDS 上样缓冲液; 沸水浴 10 ~ 15 min, 待 10% SDS-PAGE 胶干后, 每个胶孔加入等质量蛋白; 恒电压电泳; 蛋白胶恒电流转印至 0.45 μ m PVDF 膜; 蛋白膜用 5% 脱脂奶粉封闭 0.5 ~ 1 h 后, 按实验需要剪裁蛋白膜; 目的蛋白膜放入抗 Myc 标签兔单抗 1:1000 稀释液, GAPDH 蛋白膜放入抗 GAPDH 兔多克隆抗体 1:5000 稀释液, 孵育 4℃ 过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 7 min; 加入 HRP 标记兔二抗 1:3000 稀释液, 室温孵育 1 h; TBST 洗膜 3 次, 每次 7 min; 待目的蛋白膜和 GAPDH 蛋白膜半干后, 按原位置拼接, 逐滴添加发光试剂盒 A/B 液等体积混合液, 反应 1 min, 去除混合液后, 即可显影。

1.2.2 针对 ER β 419 基因慢病毒介导 RNAi 重组载体的构建

1.2.2.1 ER β 419 基因 shRNA 序列的设计

依据 siRNA 设计原则, 选择 ER β 419 基因 CDs 序列为 RNAi 靶序列, 在 (网址 <http://www.lifetechnologies.com/cn/zh/home/life-science/rnai.html>) 上针对每条目的基因设计出三对互补的 siRNA 模板序列, 以 5' -TTCAAGAGA-3' 为发夹状, 每个基因设计三条特异性 shRNA 环形序列, 并采用 Blast 软件对选择的三条靶序列进行同源分析, 排除 shRNA 特异性地抑制其他基因片段的可能。再在 shRNA 碱基序列的 5' 端和 3' 端分别加入限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 的酶切位点, 最后将 shRNA 序列插入 pGLV3/H1/GPF 载体中; 三条 shRNA 的寡核苷酸, 分别为:

shRNA1: 5' -GATCCgctgtgatgaattacagtaTTCAAGAGAtactgtatcatcacagcTTTTTTG-3'; shRNA2: 5' -GATCCggtcgtgtgaaggatgtaaTTCAAGAGAttacatccttcacagaccTTTTTTG-3'; shRNA3: 5' -GATCCgctcttggaacaactcaTTCAAGAGAtgaagtgttgccaagagcTTTTTTG-3'; shNC: 5' -GATCCGttccgaacgtgtcacgtTTCAAGAGAAacgtgacacgttcggagaaCTTTTTT-3'。将构建成功的重组质粒送

往江苏吉玛生物公司合成慢病毒,病毒滴度为 10^8 。

1.2.2.2 慢病毒转染病毒复数值(MOI 值)的测定

将 HEK293T 细胞按 3×10^3 /孔细胞量接种于 96 孔板中;空白对照和实验组分组铺板后,添加无青链霉素的完全培养基至 150 μ L,培养 18 ~ 22 h;取干净 1.5 mL 离心管 4 支,分别加入 90 μ L 新鲜完全培养基。向第 1 支离心管添加 10 μ L 病毒原液,混匀后吸取 10 μ L 加入第 2 支离心管中,以此类推,4 支离心管中慢病毒浓度依次稀释 10 倍,混合均匀;弃废液,加入预混稀释后的病毒液,空白对照组加入 100 μ L 完全培养基,培养 24 h;弃旧病毒液,加入 150 μ L 完全培养基,培养 48 h;在荧光显微镜下观察感染细胞的荧光效率,并计算慢病毒的 MOI 值。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测 ER β 419 RNAi 慢病毒重组载体的干涉效率

1.2.3.1 引物荧光定量 PCR 特异性设计

根据 GenBank 中 β -actin (AF021873) 基因和比格犬 ER β 剪切异构体 ER β 419 编码区序列,利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,并且通过 NCBI 中 Blast 序列比对功能,初步检测引物的特异性。引物由北京 Biomed 生物技术公司合成。

1.2.3.2 慢病毒感染目的基因稳转细胞系

按照 2×10^5 个/孔将稳转细胞均匀铺至细胞 6 孔板中,实验分为正常培养组,无关序列组,shRNA1 组,shRNA2 组,shRNA3 组。每孔加入完全培养基至 2 mL,培养 18 ~ 24 h;取干净 1.5 mL 离心管 4 支,吸取 1 mL 新鲜完全培养基,加入适量病毒原液,混合均匀,弃实验组旧培养基,加入病毒稀释液,正常培养基组加入同等体积的完全培养基,培养 24 h;弃废病毒稀释液,加入 2 mL 完全培养基,培养 36 h;根据实验需要,采用适当的试验方法,处理感染慢病毒的靶细胞。

1.2.3.3 慢病毒感染目的基因稳转细胞 RNA 的提取

用于提取 RNA 的耗材、塑料器皿均经 0.1 % DEPC 水浸泡 24 h,高压灭菌处理,氯仿、异丙醇及 75% 乙醇 4℃ 预冷,6 孔板中每孔加入 1 mL Trizol,反复吹打细胞,将细胞-Trizol 混合液收集用移液枪吸出,转入 1.5 mL 离心管中,冰上放置 5 ~ 10 min;加入 0.2 mL 氯仿,剧烈震荡 30 s,冰上放置 10 min;12 000 g,4℃ 低温离心 15 min;将上层水相转入新的 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 异丙醇,轻轻上下颠

倒混匀,冰上放置 10 min;12 000 g,4℃ 低温离心 15 min;弃上清,加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇,用 1 mL 移液器吹起沉淀;7 500 g,4℃ 低温离心 5 min;弃去乙醇并瞬时离心,小心吸弃并蒸发管内液体;加入预冷的适量 0.1% DEPC 处理水溶解总 RNA;仪器测定 A260/A280 吸光度,定量总 RNA 的浓度和纯度。取 1 μ g RNA 混合液加入 0.1% DEPC 处理水配制的 1% 琼脂糖凝胶槽中,150 V,10 min,检测总 RNA 的完整性;根据实验需要适当用 0.1% DEPC 处理水稀释 RNA。

1.2.3.4 反转录反应

按照 PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) 试剂盒的说明书在冰上配制操作。反应条件为 37 ℃ 30 min,85 ℃ 5 s,所得 cDNA 于 -20℃ 保存。

1.2.3.5 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 RNAi 重组慢病毒载体干涉效果

按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa) 试剂盒的说明书在冰上配制操作。反应条件为预变性 95 ℃ 30 s;变性 95 ℃ 5 s,退火 58 ℃ (β -actin) 20 s/55 ℃ (ER β 419) 20 s,40 个循环。融解曲线条件为 95 ℃ 1 min;55 ℃ 1 min;55 ℃ ~ 94.6 ℃ (每隔 0.3℃ 采集一次荧光信号) 循环 133 次,每组的样本均设 3 次重复;反应结束后,软件自动导出扩增动力学曲线、融解曲线和循环阈值 (cycle threshold, Ct 值),由融解曲线判定 PCR 反应的特异性,根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值计算定量结果。使用 SPSS17.0 统计软件处理实验数据,得到三条干涉序列对目的基因 mRNA 的抑制效果。

所有的样品同期做三次重复,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。标准曲线反应结果由 IQ5 仪器自动收集、分析和导出。自动显示内参基因和目的基因的标准曲线方程、扩增效率 R² 以及直线方程系数 (斜率)。

1.2.3.6 Western Blot 技术检测 ER β 419 RNAi 重组慢病毒载体干涉效果

方法同 1.2.1.2 操作步骤。通过 Photoshop 7.0 绘图软件对五组实验组蛋白表达量差异进行分析。每组蛋白进行三次灰度分析,所得数据经 SPSS17.0 处理。

2 结果

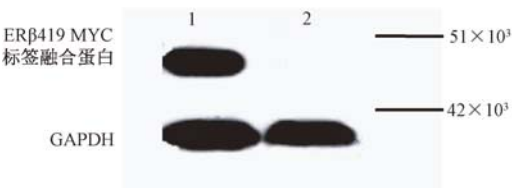
2.1 筛选 ER β 419 阳性克隆细胞

经过长达 28 d 的 G418 筛选培养基的筛选,出现阳性克隆细胞。挑取至 96 孔细胞培养板中,利用

半浓度 G418 筛选培养基的连续培养,细胞能够正常生长,状态良好,不再死亡,即为阳性克隆细胞。

2.2 Western Blot 方法检测 ERβ419 阳性克隆细胞中表达

Western Blot 结果显示, pcDNA3.1-MYC-ERβ419(列 1)编码蛋白质在 HEK293T 细胞中的分子量大小为 47×10^3 ,证明目的蛋白稳定且高效表达(图 1)。



注:1:pcDNA3.1-MYC-ERβ419;2:HEK293T 细胞。

图 1 Western Blot 检测重组质粒转染融合蛋白稳定表达

Note:1:pcDNA3.1-MYC-ERβ419;2:HEK293T.

Fig.1 Identification of Durative Expression Fusion Protein using Western Blot

2.3 qRT-PCR 和 Western Blot 检测 ERβ419 干扰序列在 mRNA 水平和蛋白水平的定量分析

通过 IQ5 荧光定量 PCR 仪自带软件的数据和 Photoshop 7.0 灰度分析软件,结合 SPSS17.0 分析软件得到以下数据(表 2.1),表明,ERβ419-shNC ($P > 0.05$)、ERβ419-shRNA2 ($P > 0.05$)、ERβ419-shRNA1 ($P < 0.01$) 和 ERβ419-shRNA3 ($P < 0.01$) 差异极显著,ERβ419-shRNA3 的干扰效果最优。

表 1 不同实验组目的基因 mRNA 和蛋白的表达情况($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The Expression of Target Genes mRNA and Protein in Different Groups($\bar{x} \pm s$)

ERβ419 gene		
mRNA level	Normal group	1.0000 ± 0.0000
	shNC group	1.0067 ± 0.05686
	shRNA1 group	0.4000 ± 0.03000 [#]
	shRNA2 group	0.9233 ± 0.04041
	shRNA3 group	0.3267 ± 0.04163 [#]
Protein level	Normal group	1.0000 ± 0.0000
	shNC group	0.9891 ± 0.30010
	shRNA1 group	0.4200 ± 0.05686 [#]
	shRNA2 group	0.9186 ± 0.29441
	shRNA3 group	0.2977 ± 0.28163 [#]

注: * $P < 0.05$ 与目的基因稳转细胞组相比差异显著, [#] $P < 0.01$ 与目的基因稳转细胞组相比差异极显著。

3 讨论

ERs 首先是在哺乳动物体内的生殖系统器官中发现,并研究其对机体生殖生理的影响。随着研究

方向的拓展和研究内容的深入,ERs 的生物学功能已不再单纯的只作用于生殖系统,在骨骼、中枢神经系统、心血管系统、内分泌系统、消化系统等方面也有涉及,对肿瘤的发生发展也有一定的影响。

ERs 的高表达除了刺激生殖器官的发育和维持第二性征外,也可有效降低血液中的血脂含量,促进其恢复到正常水平,促进血管平滑肌松弛,降低血压、保护心肌^[1-2],抑制自由基对机体伤害,直接和间接影响胰岛素功能,调节血糖,有效预防阿尔兹海默病、帕金森病及骨质疏松症等疾病^[3-7]。

但 ERs 的高表达对机体也有负面影响,一些生殖系统方面的疾病都是因此而发生的。主要发生在卵巢、子宫和胸腺等实质器官。卵巢产生卵细胞和雌激素。卵巢分泌的雌激素与靶细胞上相应受体接触和结合,激活有丝分裂原相关的生物学效应,诱导靶器官功能性亢进,最终导致卵巢疾病的发生^[8]。卵巢癌变成为了最终且最恶劣的结果,其发病机制与雌激素信号通路有关。子宫作为雌激素调控的靶器官之一,其内膜细胞在妊娠期和发情周期发生周期性的增生和脱落。靶细胞受雌激素-ERs 复合物的协同调节。实验证明,对于子宫的发育及功能而言,ERs 的正常表达尤为重要,但其异常激活对子宫的正常发育产生影响^[9]。子宫内膜异位症、子宫内膜腺癌、子宫肌瘤等疾病成为与 ERβ 相关的热点子宫疾病。子宫肌瘤细胞内 ERs 和 E2 含量均较正常肌组织高,较高含量的雌激素刺激子宫肌瘤内的较高表达的 ERs,导致子宫肌瘤的快速增生。乳腺组织中的血管分布密集,使不同时期分泌量不断变化的雌激素到达间质组织、脂肪组织及上皮细胞腺状体等靶细胞,进而在青春期、月经周期和妊娠期不同生理期,完成乳腺的激素调节和生理功能。雌激素信号通路诱导乳腺细胞增殖和凋亡等功能,乳腺癌形成则因该信号通路异常导致^[10-12]。

RNAi 因针对特定基因高效沉默其表达而通常应用于未知基因生物学功能的研究,成为现今研究基因生物学功能的重要工具。科学家们试图通过调节雌激素或 ERs 的表达而起到预防和治疗疾病的效果。RNAi 技术就是一种极佳的临床治疗办法。主要是设计针对致病基因或诱导致病基因 mRNA 的干扰序列,通过特异性 dsRNA 的靶向作用,沉默目的基因的表达,从而抑制了疾病的发生发展。试验方法上便于操作,且高效持久,技术成熟。

比格犬雌性生殖系统方面常会出现繁殖能力下降、生殖器官病变等诸多问题,其主要原因是下丘脑-脑垂体-性腺轴中雌激素正负反馈调节机制发生异常。这种机制也受到 ERs 的表达量、表达水平与表达时间的调控^[13-15]。ERs 选择性剪切机制产生的剪切异构体增加了蛋白质组多样性,使雌激素信号在比格犬的生殖生理中发挥多种调节作用,了解 ERs 剪切异构体的生理学功能成为改善该犬生殖系统功能异常的研究重点。

参考文献:

- [1] Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen[J]. FASEB, 1996, 10(5):615-624.
- [2] Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen[J]. Endocr Rev, 1994, 15(3):275-300.
- [3] Gennari L, Becherini L, Falchetti A, et al. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 81(1):1-24.
- [4] Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1998, 3(1):49-61.
- [5] di Leo A, Messa C, Cavallini A, et al. Estrogens and colorectal cancer[J]. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2001, 1(1):1-12.
- [6] Pujol P, Rey JM, Nirde P, et al. Differential expression of estrogen receptor - alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis[J]. Cancer Res, 1998, 58(23):5367-5373.
- [7] CyrM, Calon F, Morissette M, et al. Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinsons disease[J]. J Psychiatry Neurosci, 2002, 27(1):12-27.
- [8] Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe RB. Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(3):1025-1028.
- [9] Huang WW, Yin Y, Bi Q, et al. Developmental diethylstilbestrol exposure alters genetic pathways of uterine differentiation[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 19(3):669-682.
- [10] 谭小宁,周知,谢小雷,等. 雌激素受体信号通路在乳腺癌发生和治疗中的作用[J]. 生命科学, 2011, 23(10):969-974.
- [11] Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor action[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2002, 12(4):237-257.
- [12] 陈莉,杨新华,杨程,等. 雌激素受体 $\beta 1$ 上调 p53 基因表达促进乳腺癌细胞的凋亡[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2010, 17(2):161-164.
- [13] K. W. Nettles, G. L. Greene, Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors[J]. Ann. Rev. Physiol. 2005, 67:309-333.
- [14] Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling[J]. J Biol Chem, 2001, 276(40):36869-36872.
- [15] Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor action[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2002, 12(4):237-257.

[修回日期]2014-10-22