

新基因 *hSSB1* 逆转录病毒载体的构建、 鉴定和稳定株的筛选*

张如华, 徐双兵, 武远众, 康铁邦

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心实验研究部, 广东 广州 510060)

摘要: *hSSB1* (Human Single-strand DNA-binding protein) 是参与细胞 DNA 损伤应答的一个重要信号分子。根据 GenBank 提供的 *hSSB1* 基因序列扩增其 cDNA 序列, 插入到 pBABE 逆转录病毒载体中, 连接后的质粒转化后经过双酶切, PCR 扩增及测序来鉴定 pBABE-*hSSB1* 阳性克隆。将阳性表达的 pBABE-*hSSB1* 和包装质粒转染到 HEK293T 细胞中, 产生病毒液。将包装好的病毒感染细胞并用嘌呤霉素 (puromycin) 筛选稳定表达 *hSSB1* 的细胞株。重组 pBABE-*hSSB1* 质粒经双酶切, PCR 扩增鉴定及 DNA 测序分析等方法证实克隆成功。Western blotting 检测发现转染重组质粒 pBABE-*hSSB1* 的细胞株中 *hSSB1* 蛋白的表达水平高于对照组。该研究成功构建了针对 *hSSB1* 基因的逆转录病毒载体 (pBABE-*hSSB1*), 并得到了稳定高表达 *hSSB1* 的细胞株, 为深入研究其功能奠定了基础。

关键词: *hSSB1*; 病毒载体; 稳定株

中图分类号: R73-3 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2012) 02-0073-05

Construction and Identification of *hSSB1* Retrovirus Expressing Vector and Screening of Stable Transfected Cells

ZHANG Ruhua, XU Shuangbing, WU Yuanzhong, KANG Tiebang

(State Key Laboratory of Oncology in South China; Department of Experimental Research,
Sun Yat-Sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract: *hSSB1* is a key signaling molecule that participates in DNA damage response. In this study, the cDNA of *hSSB1* gene amplified by RT-PCR was inserted into the retroviral vector pBABE. The recombinant positive plasmid clone was identified by endonuclease digestion, PCR amplification and sequencing analysis. The retroviral expression vector pBABE-*hSSB1* and PIK packaging plasmid were co-transfected into 293T cells to produce the retrovirus. The packaging retrovirus was then infected into cancer cells and the over-expression cells were selected with puromycin. pBABE-*hSSB1* positive clones have been validated to be correct by restriction endonuclease, PCR amplification and DNA sequencing analysis. The protein level of *hSSB1* in pBABE-*hSSB1* transfected cancer cell line was significantly up-regulated as validated by Western blotting. Our data indicate that the recombinant plasmid of pBABE-*hSSB1* was successfully constructed and transfected stably into cancer cells. It established a favorable foundation for further functional study.

Key words: *hSSB1*; retroviral vector; stable cell line

细胞周期是一个复杂的过程, 其精确调控是维持基因组稳定性以及细胞正常功能的必要条件^[1]。

已有研究表明很多种调节蛋白参与调控细胞周期的进程, 包括 cyclins (细胞周期素), CDKs (Cyclin-

* 收稿日期: 2011-06-16

基金项目: 国家 973 计划资助项目 (2010CB912201)

作者简介: 张如华 (1974 年生), 男, 技师; 通讯作者: 康铁邦; E-mail: kangtb@mail.sysu.edu.cn

dependent kinase 周期素依赖性激酶) 以及 CDK 抑制分子^[2,3]。为确保细胞周期正常运行, 细胞内自发形成了许多的调控机制。细胞周期检测点就是其中重要的一种调控机制, 如果其激活缺陷就会导致细胞周期的紊乱, 从而有可能导致肿瘤的发生^[4]。

hSSB1 是最近发现的一种单链 DNA 结合蛋白, 是参与调控细胞周期检测点的一个重要分子^[5]。缺失 hSSB1 的细胞表现为细胞检测点的激活缺陷, 放射敏感性增加以及基因组的不稳定性^[5]。本课题组前期研究结果发现 hSSB1 可以和 p21 相互作用从而调控细胞周期检测点的运行, 而且 hSSB1 在人类肝癌组织中呈高表达^[6], 但其高表达后对肿瘤生物学行为的影响目前并不清楚。在本研究中, 拟构建 hSSB1 高表达的逆转录病毒载体 pBABE-hSSB1, 并进行高表达稳定株的筛选, 为进一步研究 hSSB1 的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

HeLa, HepG2 和 HEK293T 细胞由中山大学肿瘤防治中心保存。pBABE-puro 逆转录病毒载体 (含有嘌呤霉素抗性基因) 为中山大学公共卫生学院陈雯教授馈赠。PIK 病毒包装质粒由中山大学肿瘤防治中心曾木圣教授馈赠。BamH I、Sal I 内切酶以及逆转录试剂盒均为 MBI Fermentas 公司产品, T4 DNA Ligase 购自 Takara 公司, 质粒小提试剂盒和切胶回收试剂盒均购自 Qiagen 公司, 2 × Taq PCR MasterMix 购自北京天根公司。Trizol 试剂和脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。兔抗人 hSSB1 多克隆抗体为 Bethyl 公司产品, 鼠抗人 HSP70 抗体购自 Santa Cruz 公司, 感受态细胞 DH5 α 以及 HRP 羊抗兔和鼠二抗均购自北京鼎国生物技术有限公司。Polybrene 和 puromycin 均购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HeLa 细胞总 RNA 的提取 按照 Trizol 试剂说明书步骤提取总 RNA。收集所培养的 HeLa 细胞, 6 孔板中每孔加入 1 mL Trizol 试剂, 室温静置 5 min。加入氯仿 0.2 mL, 充分混匀, 室温静置 2~3 min 后, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min。将上清转移到一个新的无 RNA 酶的 EP 管中, 加入 500 μ L 的异丙醇, 充分混匀, 室温静置 10 min。4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入 $\varphi = 75\%$ 乙醇 1 mL, 4 °C 7 500 r/min 离心 5 min。弃上清, 室温干燥 5~10 min, 加入 20 μ L DEPC 处理水,

58 °C 水浴 10 min, 得到的 RNA 保存于 -80 °C。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 的基因序列 (NM_024068), 设计扩增 hSSB1 编码区 cDNA 上、下游引物。上、下游引物中分别引入 BamHI、SalI 酶切位点。GAPDH 引物序列同前^[7]。所有引物均由 Invitrogen 公司合成。引物序列见表 1。

表 1 扩增基因所需的引物
Table 1 Primers for amplifying the genes

基因	序列 (5'-3')	退火温度/°C (循环数)	条带 大小/bp
hSSB1	F: CGCGGATCCATGACG ACCGAGACCTTTGTG	58 (30)	655
	R: GCGTCGACGCCTATC TCTTGCTGCTCCTCCG		
	F: CGGGAAACTGTGGCG		
GAPDH	TGATG R: CGTCAAAGGTGGAGG	58 (30)	314
	ACTGG		

1.2.3 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) RNA 用分光光度计测浓度后行逆转录反应, 选用 MBI Fermentas 公司的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit。按试剂说明书操作。合成的 cDNA 置于 -20 °C 保存。取 1.5 μ L cDNA 进行 PCR 反应, 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环。再于 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 $w = 2\%$ 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 然后切胶回收。胶回收根据 Qiagen 公司的胶回收试剂盒说明书进行。

1.2.4 pBABE-hSSB1 重组逆转录病毒载体构建

1) 目的基因片段和载体双酶切: 用 BamH I、Sal I 酶分别双酶切回收的 hSSB1 目的片段以及载体 pBABE, 37 °C 酶切 30 min。

2) 切胶回收: 双酶切后的产物经切胶回收, 按试剂说明书操作。

3) 目的片段与 pBABE 表达载体的连接: 将回收的目的基因 hSSB1 片段以及载体 pBABE 在 T4 DNA 连接酶作用下连接, 16 °C 水浴反应过夜。

4) 质粒转化: 各取 5 μ L 过夜连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 分别涂布于含氨苄抗性的 LB 平板上, 37 °C 恒温箱培养过夜。从每个培养皿上各挑取 3 个单克隆菌落接种于 6 mL 含氨苄抗性的 LB 培养液中, 37 °C 恒温摇床培养过夜。

5) 质粒提取与酶切鉴定: 按照质粒小提试剂盒说明书提取质粒, 并分别用 BamHI、SalI 酶做酶

切鉴定,同时也做 PCR 扩增验证。酶切产物和 PCR 产物行 $w = 1.5\%$ 琼脂糖凝胶电泳。

6) 测序鉴定: 将酶切及 PCR 扩增鉴定正确的克隆送 Invitrogen 公司测序分析。

1.2.5 制备病毒上清液 转染前 1 d, 10 cm 平皿铺板 HEK293T 包装细胞, 待细胞密度达到 30% ~ 50% 左右时进行转染。转染对照载体 pBABE-vector 或 pBABE-hSSB1 和病毒包装质粒 PIK, 操作按 Lipofectamine2000 说明书进行。转染后将细胞置于 37 °C, $\varphi = 5\%$ 的 CO₂ 的培养箱中培养, 48 h 后, 收集病毒上清液, 用 0.45 μm 过滤器过滤病毒上清, -80 °C 保存。

1.2.6 稳定细胞株的建立 铺板 HeLa 和 HepG2 细胞于 6 孔板中, 培养过夜。待细胞密度达到 50% 时开始感染病毒。每孔加入 2 mL 病毒液 (含 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene), 37 °C 培养箱中培养。4 h 后换另外 2 mL 病毒液继续感染细胞。再过 4 h 后, 弃去病毒液, 换正常培养基过夜。感染 24 h 后, 用 puromycin (0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 筛选 5 d 后, 收集细胞提取蛋白, Western blot 检测目的蛋白表达。

1.2.7 Western blotting 检测 收集 HeLa 和 HepG2 对照组和转染组细胞, 提取蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白浓度并定量, 用 $w = 10\%$ 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电泳结束后转膜 200 mA, 2 h, 用含 $w = 5\%$ 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 孵育 hSSB1 一抗 (1:2 000) 和 HSP70 (1:1 000) 4 °C 过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1.5 h; TBST 洗涤同前, X 光片压片, 显影、定影。

2 结 果

2.1 目的基因 hSSB1 的扩增

从 HeLa 细胞中提取 RNA, 经过逆转录后得到其 cDNA。以该 cDNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增出目的基因 hSSB1 和 GAPDH 基因的条带。扩增产物电泳结果可见在 300 bp 左右的条带 (图 1), 为 GAPDH 的扩增条带, 说明所抽提的 RNA 是完整的。同样在 500 ~ 750 bp 处也有一特异性扩增条带 (图 1), 与预期扩增的 hSSB1 片段大小相符。

2.2 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定

将 PCR 扩增的目的基因片段用 BamHI、SalI 双酶切后与同样经双酶切的逆转录病毒载体 pBABE-puro 连接, 连接产物经转化后挑菌, 并提取质粒。重组质粒经双酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳显示得到了约 650 bp 的目的片段和约 5 100 bp 的载体片段 (图 2 中第 2 泳道)。同时将得到的重组质粒

进行 PCR 扩增, 可得到很明显的目的条带 (图 2 中第 3 泳道)。说明得到的阳性克隆质粒是正确的。

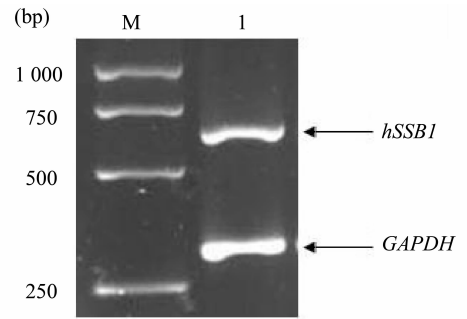


图 1 RT-PCR 扩增获得的 hSSB1 编码区的电泳结果
Fig. 1 Encoding region of hSSB1 was amplified by RT-PCR
M: DNA Marker; 1: 扩增出来的 hSSB1 和 GAPDH 片段

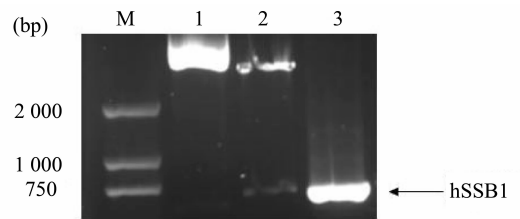


图 2 重组质粒经 BamHI、SalI 酶切及 PCR 扩增后的电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of recombinant plasmid digested by BamHI and SalI, and PCR amplification product
M: DNA Marker; 1: pBABE-vector; 2: 重组 pBABE-hSSB1 质粒的 BamHI 和 SalI 双酶切产物; 3: 重组 pBABE-hSSB1 PCR 扩增产物

2.3 重组质粒的测序鉴定

将酶切和 PCR 鉴定正确的质粒送去 Invitrogen 公司测序, 测序结果表明克隆的 hSSB1 片段已成功插入 pBABE 中的指定位点, 而且阅读框架也正确无误, 其序列与基因文库中完全一致, 未见有碱基突变 (图 3, 框示为 hSSB1 的起始密码子)。

2.4 Western blotting 检测 HeLa 和 HepG2 细胞中 hSSB1 的表达

将包装好的 pBABE-hSSB1 和对照病毒液感染人肿瘤细胞系 HeLa 和 HepG2 细胞, 经嘌呤霉素 (0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 筛选后, 得到了稳定表达目的蛋白的阳性细胞株。筛选后的细胞提取蛋白做 Western blotting 鉴定。结果表明: hSSB1 转染的 HeLa 和 HepG2 细胞中均可见到 hSSB1 特异性条带, 且 hSSB1 的表达明显高于对照组 (图 4)。证实稳定筛选得到的 HeLa 和 HepG2 细胞株中有 hSSB1 蛋白的持续高表达。

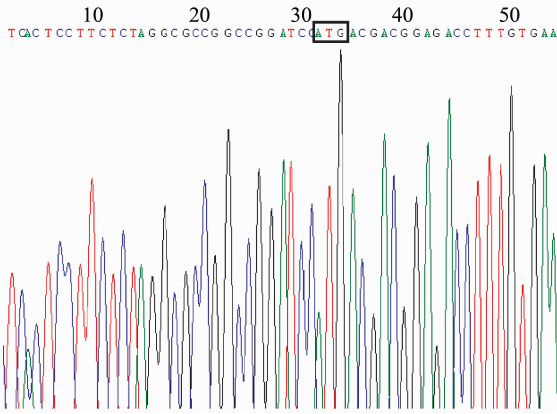


图 3 pBABE-*hSSB1* 的测序结果: 框中所示为 *hSSB1* 的起始密码子

Fig. 3 The sequencing result of pBABE-*hSSB1*

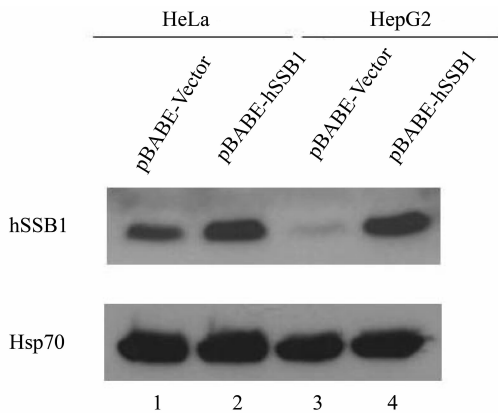


图 4 Western blotting 检测 *hSSB1* 基因表达情况

Fig. 4 The result of *hSSB1* expression by Western blotting analysis

- 1: HeLa 细胞转染对照病毒载体 pBABE-vector;
- 2: HeLa 细胞稳定转染 pBABE-*hSSB1*;
- 3: HepG2 细胞转染对照病毒载体 pBABE-vector;
- 4: HepG2 细胞稳定转染 pBABE-*hSSB1*

3 讨论

hSSB1 是一编码 211 个氨基酸残基, 相对分子质量为 33 000 的新蛋白质^[5]。已有研究发现 *hSSB1* 可以招募 MRN 复合物到双链 DNA 断裂位点, 激活 ATM 所依赖性的信号通路^[8]。此外, *hSSB1* 还可以和 MRN 复合物中的 NBS1 直接结合, 从而增强 MRN 复合物的核酶内切酶活性^[9]。运用串联亲和纯化的方法筛选出了一个与 *hSSB1* 相互作用的蛋白 INTS3, 进一步的研究发现 INTS3 可以通过调控 *hSSB1* 从而参与 DNA 损伤反应^[10-13]。因此 *hSSB1* 在 DNA 损伤应答中发挥着重要的功能。

逆转录病毒载体能有效地将外源基因整合进宿

主细胞基因组并可以稳定表达外源基因, 而且其病毒包装过程简单, 因此成为构建稳定表达株最常用载体之一。在本实验中我们将 *hSSB1* 基因构建在逆转录病毒载体 pBABE-puro, 经限制性核酸内切酶酶切和 PCR 鉴定以及测序证实目的基因 *hSSB1* 序列正确, 成功构建了重组子 pBABE-*hSSB1*。然后将所构建的含 *hSSB1* 基因的重组质粒以及对照质粒转染到 HeLa 和 HepG2 细胞, 并用嘌呤霉素筛选稳定转染细胞株。由于逆转录病毒载体 pBABE-puro 上含有嘌呤霉素抗性基因, 加入嘌呤霉素后阳性克隆细胞才会存活, 通过进一步扩大培养, 筛选出稳定表达株。为了鉴定 *hSSB1* 基因是否已经转染到 HeLa 和 HepG2 细胞中, 我们通过 western blot 的方法检测转染对照质粒和 pBABE-*hSSB1* 的细胞中 *hSSB1* 蛋白的表达, 结果发现转染了 *hSSB1* 基因的 HeLa 和 HepG2 细胞中, 其 *hSSB1* 目的条带比转染了对照质粒的细胞在蛋白水平表达量均明显增加, 表明 *hSSB1* 基因已经转染到 HeLa 和 HepG2 细胞中并且有此蛋白的过量表达。本实验中我们成功构建 *hSSB1* 高表达的病毒载体, 为今后进一步研究 *hSSB1* 的生物学功能奠定了良好的实验基础。

参考文献:

- [1] NAKANISHI M, SHIMADA M, NIIDA H. Genetic instability in cancer cells by impaired cell cycle checkpoints [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(10): 984-989.
- [2] FISHER R P. CDKs and cyclins in transition(s) [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1997, 7(1): 32-38.
- [3] SHERR C J, ROBERTS J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(12): 1501-1512.
- [4] HARTWELL L H, KASTAN M B. Cell cycle control and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5192): 1821-1828.
- [5] RICHARD D J, BOLDESON E, CUBEDDU L, et al. Single-stranded DNA-binding protein *hSSB1* is critical for genomic stability [J]. *Nature*, 2008, 453(7195): 677-681.
- [6] XU S, FENG Z, ZHANG M, et al. *hSSB1* binds and protects p21 from ubiquitin-mediated degradation and positively correlates with p21 in human hepatocellular carcinomas [J]. *Oncogene*, 2011, 30(19): 2219-2229.
- [7] LIU X H, XU S B, YUAN J, et al. Defective interleukin-4/Stat6 activity correlates with increased constitutive expression of negative regulators SOCS-3, SOCS-7, and CISH in colon cancer cells [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2009, 29(12): 809-816.

(下转第 85 页)

- GeneTher, 2006, 17(1): 1-9.
- [23] JAKOBSSON J, LUNDBERG C. Lentiviral vectors for use in the central nervous system[J]. Mol Ther, 2006, 13(3): 484
- [24] COCKRELL A S, KAFRI T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(3): 184-204.
- [25] CHUMAKOV S P, KRAVCHENKO J E, PRASSOLOV V S, et al. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector [J]. Plasmid, 2010, 63: 143-149.
- [26] RAMOS O S, CARRATALA Y P, PUERTA S G, et al. Dual promoter lentiviral vector generates transgenic mice expressing E2-CSFV glycoprotein in their milk, but impairs early identification of transgenic embryos [J]. Theriogenology, 2011.
- [27] WITCHER M, EMERSON B M. Epigenetic Silencing of the p16INK4a Tumor Suppressor Is Associated with Loss of CTCF Binding and a Chromatin Boundary[J]. Molecular Cell, 2009, 34, 271-284.
- [28] ZHANG L, PROCUIK M, FANG T, et al. Functional analysis of the quantitative expression of a costimulatory molecule on dendritic cells using lentiviral vector-mediated RNA interference [J]. Journal of Immunological Methods, 2009, 344: 87-97.
- [29] 刘真, 甄艳, 于晓黎, 等. 人 NESG1 基因慢病毒载体的构建及其在 293FT 细胞中的表达[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31: 65-68
- [30] 汤展毅, 严云勤, 高学军, 等. 牛 myf6 基因真核表达载体的构建及在成肌细胞中的表达[J]. 中国农业科学, 2010, 43(13): 2793-2799.
- [31] MOTONO M, YAMADA Y, HATTORI Y, et al. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 109: 315-321.
- [32] KEEN J E, HUNGERFORD L L, LITLEDIKE E T, et al. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity[J]. Preventive Veterinary Medicine, 1997, 30: 155-169.
- [33] BLASCO A. The role of genetic engineering in livestock production[J]. Livestock Science, 2008, 113: 191-201.
- [34] 沈媛, 彭辉, 冯敏, 等. 构建 HMGB1/PEI 非病毒载体介导高效基因传递的研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 48(5): 91-96.
- [35] 钟建辉, 银巍, 藏林泉, 等. 腺病毒载体介导的大鼠 DNA 多聚酶 α 重组体的构建及其在 PC12 细胞中的表达[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 6(26): 622-625.
- [36] AZZOUC M, KINGSMAN S M, MAZARAKIS N D. Lentiviral vectors for treating and modeling human CNS disorders[J]. J GeneMed, 2004, 6(9): 951-962.
- [37] VERCAMMEN L, VAN DERPERREN A, VAUDANO E, et al. Parkin protects against neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease [J]. MolTher, 2006, 14(5): 716-723.

(上接第 76 页)

- [8] RICHARD D J, SAVAGE K, BOLDESON E, et al. hSSB1 rapidly binds at the sites of DNA double-strand breaks and is required for the efficient recruitment of the MRN complex [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(5): 1692-1702.
- [9] RICHARD D J, CUBEDDU L, URQUHART A J, et al. hSSB1 interacts directly with the MRN complex stimulating its recruitment to DNA double-strand breaks and its endo-nuclease activity [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(9): 3643-3651.
- [10] HUANG J, GONG Z, GHOSAL G, et al. SOSS complexes participate in the maintenance of genomic stability [J]. Mol Cell, 2009, 35(3): 384-393.
- [11] LI Y, BOLDESON E, KUMAR R, et al. HSSB1 and hSSB2 form similar multiprotein complexes that participate in DNA damage response [J]. J Biol Chem, 2009, 284(35): 23525-23531.
- [12] SKAAR J R, RICHARD D J, SARAF A, et al. INTS3 controls the hSSB1-mediated DNA damage response [J]. J Cell Biol, 2009, 187(1): 25-32.
- [13] ZHANG F, WU J, YU X. Integrator3, a partner of single-stranded DNA-binding protein 1, participates in the DNA damage response [J]. J Biol Chem, 2009, 284(44): 30408-30415.