

构建可诱导表达 MST1 基因的慢病毒载体 及其在肝癌细胞系 Huh-7 中的表达

顾博[△]

(复旦大学生物医学研究院 上海 200032)

【摘要】 目的 构建可诱导表达 MST1 基因的慢病毒载体,为进一步研究 MST1 与肝癌之间的关系提供理想的模型。方法 克隆 MST1 基因到慢病毒载体 pLVPT-tTRKRAB 中,2 种慢病毒载体(pLVPT-tTRKRAB-MST1 和 pLV-tTRKRAB-Red)与包装质粒通过 293FT 细胞系介导,分别包装成病毒颗粒,先后 2 次去感染肝癌细胞系 Huh-7。培养 7 d 后,使用强力霉素(doxycycline)进行诱导,用 Western blot 检测 MST1 表达情况。结果 构建了可诱导 MST1 真核表达病毒载体并获得相应的病毒,病毒可以高效感染目的肝癌细胞系 Huh-7。在强力霉素诱导条件下,肝癌细胞系 Huh-7 可以表达 MST1。结论 成功构建出可诱导表达 MST1 基因的慢病毒载体,并获得在强力霉素诱导条件下可以表达 MST1 的肝癌细胞亚系。

【关键词】 可诱导慢病毒载体; MST1 基因; 强力霉素

【中图分类号】 Q 782 **【文献标志码】** A

Construction of inducible lentiviral expression vector containing MST1 gene and its expression in Huh-7 cell line

GU Bo[△]

(Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To construct inducible lentiviral vector containing MST1 gene, which provides an ideal model for further study of the relationship between liver cancer and MST1 gene. **Methods** We cloned MST1 into inducible lentiviral vector. Two lentiviral vectors (pLVPT-tTRKRAB-MST1 and pLV-tTRKRAB-Red) with package plasmids were cotransfected into 293FT respectively, and the lentiviral viruses were harvested from 293FT. Viruses were used to infect liver cancer cell line (Huh-7) in tandem. We used doxycycline to induce the expression of target gene MST1 which was identified by Western blot after 7-day cell culture. **Results** The recombinant inducible lentiviral vector containing MST1 gene was successfully constructed. The lentiviruses were also obtained and mediated by 293FT, which were highly efficient to infect liver cell lines Huh-7. The expression of MST1 was identified under Dox induction. **Conclusions** The recombinant inducible lentiviral vector containing MST1 gene has been successfully constructed. It is viable to obtain inducible cell lines Huh-7 with MST1 gene expression under Dox induction.

【Key words】 inducible lentiviral vector; MST1 gene; doxycycline

转基因技术的发展为我们研究基因功能和揭示基因遗传学上相互作用,提供了无法估量的作用。而基于慢病毒的转基因技术具有宿主范围广、转基因效率高等突出优势而越来越受到重视。

但是,传统慢病毒表达载体也存在一个重要问题:基因的表达和终止无法调控,无法准确研究基因功能。由于基因发挥作用往往是表达瞬时、快速起效的,传统的慢病毒载体无法体现相同条件来

[△]Corresponding author E-mail:Devin.gu@gmail.com

模拟基因变化瞬间的情况。可诱导表达慢病毒载体成为解决这一问题的重要工具,既保留传统慢病毒表达载体的优势,又解决了基因不能被调控的问题。MST1 (mammalian sterile 20-like kinase 1) 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,是 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 家族的生殖中心激酶 II (germinal center kinase group II) 的成员,是一个促凋亡的蛋白激酶,主要是对外界凋亡信号刺激应答,参与凋亡信号传递^[1,2]。本文使用一种新型两载体可诱导慢病毒表达系统,通过 2 次病毒感染,构建可诱导表达 MST1 基的肝癌细胞株,为进一步研究 MST1 在肝癌的作用建立了理想的模型。

材料和方法

材料和试剂 大肠埃希菌 DH5 α , 肝癌细胞系 Huh-7, 细胞系 293FT 由本实验室保存。两载体慢病毒载体质粒 pLV-tTRKRAB-Red、pLVPT-tTRKRAB 由法国波尔多大学 Jean Rosenbaum 教授惠赠;病毒包装质粒 pSPx2、pMD. G 由复旦大学生物医学研究院 MCB 实验室雷群英教授惠赠。质粒 pcDNA-MST1 由美国新泽西医科和牙科大学孙建新教授惠赠。其他材料包括 DNA 聚合酶、DNA 连接酶和各种限制性内切酶 (TaKaRa 公司), 强力霉素 (Doxycycline, Sigma 公司), Polybrene (Sigma 公司), 质粒抽提试剂盒及 Opti-MEM (Invitrogen 公司), 转染试剂 Trans-EZ (Sun-bio 公司), 细胞培养液 (Hyclone 公司)。MST1 抗体 (Bethy 公司), β -actin 抗体 (PTG Lab 公司)。

重组子 pLVPT-tTRKRAB-MST1 的克隆 以 pcDNA-MST1 为模板,克隆两端带有 *Mlu* I 和 *Xho* I 酶切位点的 MST1 基因 DNA 序列,引物序列如下: primer (+) *Mlu* I-MST1-F: 5'-CAgACgCg-TATggAgACggTACAgCTg-3'; primer (-) *Xho* I-MST1-R: 5'-gACCTCgAgTCAgAAgTTTTg-TTgCCg-3'。PCR 反应条件为: 98 °C, 预变性 2 min, 98 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 2 min, 30 个循环后,再 72 °C 10 min。回收 PCR 产物。PCR 产物再经过限制性内切酶 *Xho* I 和 *Mlu* I 双酶切,酶切后回收 DNA (20 μ g/mL),慢病毒载体 pLVPT-tTRKRAB 经过限制性内切酶 *Sal* I 和 *Mlu* I 的双酶切,酶切后回收 DNA (40 μ g/mL),将 PCR 的产物与 pLVPT-tTRKRAB 酶切产物连接,连接体系 10 μ L (其中载体 1 μ L, PCR DNA 2 μ L, 连接酶 1 μ L, 10 \times buffer 1 μ L, 去离子水 5 μ L), 16 °C 过夜反应,转化感受态大肠埃希菌。挑出阳性单克隆,做

质粒抽提,酶切鉴定。酶切鉴定正确的质粒由华大基因公司进行 DNA 测序进一步验证,构建克隆正确。

慢病毒 LV-tTRKRAB-Red 和 LV-tTRKRAB-MST1 的包装及使用 分别将慢病毒载体 pLVPT-tTRKRAB-MST1 和 pLV-tTRKRAB-Red 与包装质粒共转染 293FT 细胞系,制备慢病毒颗粒,293FT 细胞转染前一天传代,转染当日细胞为 40%~50% 覆盖度。转染前 30 min,换新鲜无双抗 10% 血清的 DMEM 培养基 10 mL。转染中慢病毒与包装质粒配量为慢病毒质粒:pSPx2:pMD. G = 4:3:1,将总量 24 μ g 的 DNA 和 20 μ L 的 Tran-EZ 分别加到 800 μ L 的 Opti-MEM,轻微振荡后混合,静置 20 min,将两者的混合物滴加到接种了 293FT 细胞的直径 10 cm 的细胞培养皿中。

转染后 8h,去除原培养液,加入 7 mL 完全培养基。转染 24 h 后,补充 3 mL 左右完全培养基。转染 48 h 后,小心收集病毒上清,1 000 \times g 离心 5 min,取上清,经 0.2 μ m 过滤器过滤,若不立即使用,应放在 -80 °C 冻存,使用时再 37 °C 复融,尽量避免反复冻融。通过 293FT 介导,分别得到 LV-tTRKRAB-Red 和 LV-tTRKRAB-MST1 的病毒颗粒,病毒使用前,病毒液加入 polybrene,终浓度为 8 μ g/mL。

可诱导 MST1 基因表达的 Huh-7 细胞系的构建

首先用 LV-tTRKRAB-Red 病毒感染目的细胞系 Huh-7。病毒感染前,将 Huh-7 细胞接种到 6 孔细胞培养板中,预培养 12 h 左右,细胞覆盖度 50% 为宜。添加病毒液时,先吸去原培养基,PBS 清洗 1 次,然后每个孔加入 1 mL 左右病毒液,培养 10 h 左右,吸去病毒液,换成完全培养液。感染 72 h 后,达到病毒载体表达最高峰,由于慢病毒载体 pLV-tTRKRAB-Red 带有红色荧光基因,可用红色荧光来观察感染效率,然后用流式细胞仪检测病毒感染效率,同时分选出带有红色荧光的细胞。

然后再用 LV-tTRKRAB-MST1 的病毒感染经流式细胞仪分选得到的 Huh-7 细胞系。二次感染完毕即得到可诱导 MST1 表达的稳定细胞系 Huh-7-MST1。

Dox 诱导和 Western blot 鉴定 MST1 的表达 将 Dox 用 PBS 稀释,添加到细胞系 Huh-7-MST1 培养基中,使用终浓度为 1 μ g/mL,不进行诱导的细胞系作为对照组。72 h 后,以 β -actin 为内参,用 Western blot 检测,方法简述如下:将细胞用胰酶消化,500 \times g 离心 5 min,吸去上清液,按照 1:4 倍体积添加细胞裂解液,充分混合,冰上静置 20 min,20 000 \times g 离心

15 min,取上清液。将提取的蛋白按照 Bradford 法定量,上样 20 μ g,用 10%的 SDS-PAGE 分离蛋白,分离的蛋白转到 PVDF 膜上,随后 4%的 BSA 封闭 1 h,加入 MST1 的抗体孵育 1 h,经过 TBST 洗涤 3 次,加入二抗孵育 1 h,再用 TBST 洗涤 3 次,取出膜加上化学发光液,进行曝光。

结 果

MST1 基因的克隆及慢病毒载体 pLVPT-tTRKRAB 的酶切、电泳 以 pcDNA-MST1 为模板,克隆出两端分别具有 *Mlu* I 和 *Xho* I 的酶切位点的 MST1 基因,获得 1 463 bp 的目的片段,图 1 是 MST1 基因克隆 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果。使用限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Sal* I 双酶切病毒载体 pLVPT-tTRKRAB,经 0.8%的琼脂糖电泳,回收 9 165 bp 的条带。图 2 是载体酶切产物琼脂糖电泳的结果。

重组子 pLVPT-tTRKRAB-MST1 克隆的鉴定

将 PCR 产物和慢病毒载体双酶切产物连接,构成重组子 pLVPT-tTRKRAB-MST1。挑出阳性克隆,质粒抽提后经 *Mlu* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,出现预计的条带,证明正确构建了重组子(图 3)。

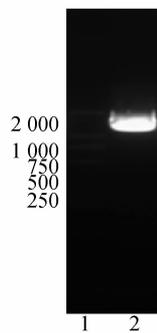


图 1 MST1 基因 PCR 结果

Fig 1 Result of MST1 PCR

1:DNA Marker; 2:MST1 PCR

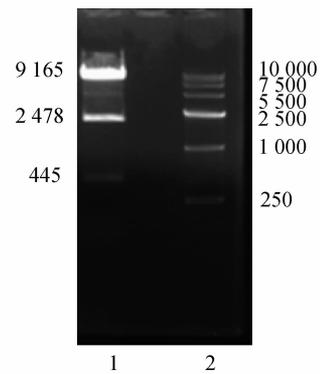


图 2 慢病毒载体双酶切结果

Fig 2 The double enzyme digestion of lentiviral vector

1:Vector with double enzyme digestion; 2:DNA Marker

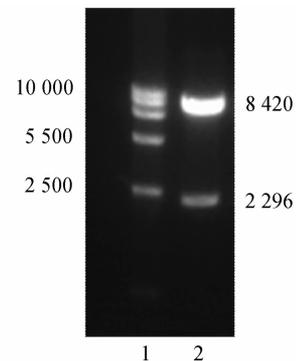


图 3 重组子 pLVPT-tTRKRAB-MST1 的酶切鉴定

Fig 3 The identification of recombinant pLVPT-tTRKRAB-MST1 by double enzyme digestion

1:DNA Marker; 2:Recombinant with double enzyme digestion

慢病毒 LV-tTRKRAB-Red 和 LV-tTRKRAB-MST1 对 Huh-7 的感染效率 pLV-tTRKRAB-Red 和 pLVPT-tTRKRAB-MST1 分别经 293FT 包装得到慢病毒 LV-tTRKRAB-Red 和 LV-tTRKRAB-MST1。LV-tTRKRAB-Red 感染 Huh-7 后 72 h,病毒感染结果如图 4 所示。用流式细胞仪检测出感染效率为 84.1% (图 5)。由于慢病毒 LV-tTRKRAB-MST1 不带有报告基因,因此无法通过荧光检测,但因其与慢病毒 LV-tTRKRAB-Red 十分类似,因此感染效率也类似。

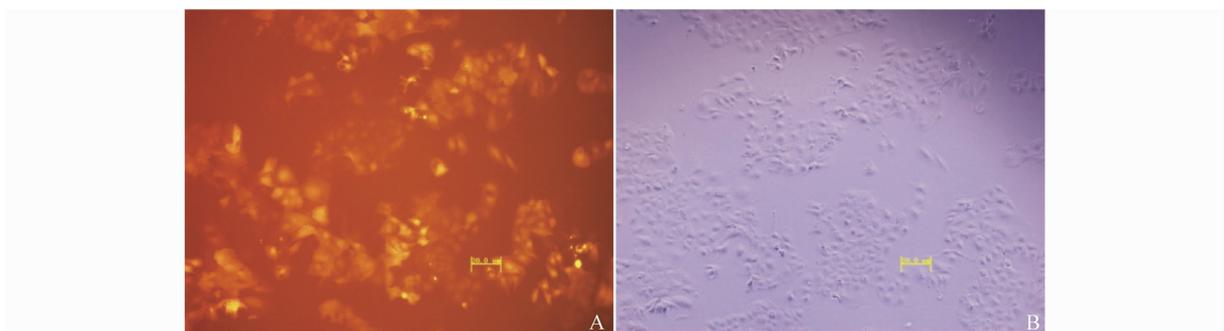


图 4 荧光分析病毒感染 Huh-7 细胞效率(72 h, X100)

Fig 4 Fluorescent analysis of Huh-7 cells after virus infection (72 h, X100)

A:Red fluorescence; B:White light

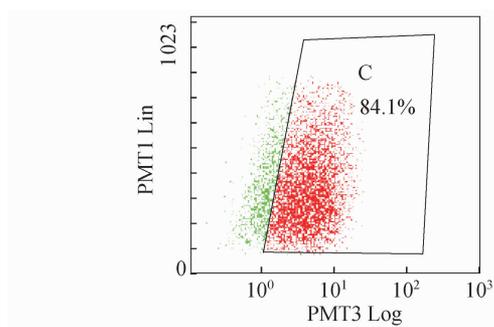


图 5 流式细胞仪检测病毒感染效率

Fig 5 The analysis of virus infection efficiency by flow cytometry

可诱导 MST1 表达的细胞系的 Western blot 鉴定 经过 2 次病毒感染的细胞系, 经过 7 d 以上的培养, 加入 Dox 诱导 72 h 后, 用 Western blot 检测 MST1 的表达。结果发现加入 Dox 诱导, 细胞系表达 MST1 (图 6), 而对照组的细胞系不表达 MST1, 证明可诱导表达 MST1 的肝癌细胞系构建成功, 病毒整合到基因组。没有发现随传代而发生基因丢失。

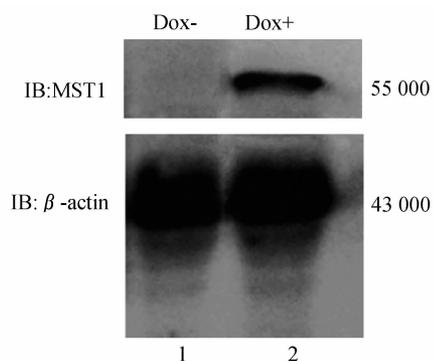


图 6 Western blot 检测 MST1 在 Huh-7 中的表达 (72 h)

Fig 6 Expression of MST1 in Huh-7 by Western blot (72 h)

1: Without Dox; 2: With 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox

讨 论

MST1 是一种促凋亡基因家族成员, 在体内普遍表达, 参与一条进化很保守的信号通路, 可调控细胞周期与细胞凋亡。它主要对外界凋亡信号刺激产生应答, 参与凋亡信号传递。在凋亡应答过程中, 通过 MEKK1/MKK7 途径 MST1 可以激活 c-Jun-NH2-kinase (JNK)^[3,4]。当接收到外界凋亡信号时, MST1 被激活, 从而激活细胞信号下游凋亡过程, 影响细胞内信号传导通路。MST1 的突变与许多疾病相关联, 特别是在很多肿瘤发生过程中, MST1 会发生不同程度的突变。MST1 在信号通路中发挥重要作用, 对其深入研究有助于理解肿瘤发

生、发展的过程。

目前对 MST1 基因功能的研究主要通过瞬时转染 MST1 质粒或 MST1 的 siRNA 方法, 但是都存在明显缺陷, 无法调控基因的表达^[5,6]。本文使用两载体慢病毒载体构建可诱导表达 MST1 基因的 Huh-7 肝癌细胞株, 除了具备传统慢病毒的优势如感染宿主范围广、可稳定整合表达、对宿主病性小以外^[7], 还具有以下优点: ①可以调节基因表达, 可以有效控制 MST1 基因的表达, 模拟细胞表达 MST1 的情况, 一般经过 3 个细胞增殖周期, 就可以达到基因表达高峰; ②感染效率高, 病毒感染宿主可以达到 80% 以上效率, 由于带有红色荧光基因, 再通过流式细胞仪的筛选可以达到 95% 以上的感染效率; ③诱导是可逆的, 根据细胞系种类的不同, 除去诱导剂后, 经过 4 d 左右无诱导剂的细胞培养, 基因的诱导就会停止^[8]; ④Dox 诱导灵敏性高, 这种慢病毒表达载体对 Dox 非常灵敏, 当 Dox 在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 就可以最大程度诱导基因表达, 实验中发现当 Dox 的浓度为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 仍然能诱导基因表达。当然这种基于 tet-SUPER LV 两载体慢病毒系统也不是完美的, 虽然解决基因表达可调控的目的, 但也存在一些漏洞, 由于基因的表达是通过 Dox 诱导实现的, 在培养细胞过程中, FBS 中很有可能含有微量的 Dox 及其衍生物, 会导致基因的表达^[9,10]。

综上所述, 本文采用的新型两质粒慢病毒系统构建可诱导表达 MST1 基因的肝癌细胞株亚型, 能够更真实地模拟细胞中 MST1 功能起效的情况, 从而为更加准确地研究 MST1 基因的功能提供了理想的模型, 是研究 MST1 功能与肝癌之间关系非常有效的工具。

参 考 文 献

- [1] O'Neill EE, Matallanas D, Kolch W. Mammalian sterile 20-like kinases in tumor suppression: an emerging pathway[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5 485 - 5 487.
- [2] Ren A, Yan G, You B, et al. Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2 266 - 2 274.
- [3] Yuan Z, Lehtinen MK, Merlo P, et al. Regulation of neuronal cell death by MST1-FOXO1 signaling[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(17): 11 285 - 11 292.
- [4] Delpire E, Gagnon KB. SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells[J]. *Biochem J*, 2008, 409(2): 321 - 331.

(下转第 99 页)