

Syncytin 慢病毒干扰载体及 syncytin 沉默 Jurkat 细胞系的建立

郑志^{1,2)}, 牛华²⁾, 陶瑞²⁾, 张桂前²⁾, 范欣²⁾, 高玉红²⁾, 孙鹭²⁾

(1) 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650504; 2) 昆明理工大学附属昆华医院检验科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 构建 PGC-LV-syncytin 慢病毒载体并建立 Syncytin 基因表达下调的 Jurkat 细胞系. **方法** 利用 RNA 干扰序列软件设计并筛选有效干扰序列, 将构建好的 Syncytin 表达质粒与慢病毒包装质粒共转染至包装细胞 293T, 包装产生病毒颗粒后感染 Jurkat 细胞, 获得 Syncytin 稳定沉默的细胞系. 荧光显微镜下观察感染效率, 分别使用 Real time PCR 和 Annexin V-APC 单染法结合流式细胞仪检测目的基因表达水平和细胞凋亡率. **结果** 成功构建了具有 Syncytin 干扰效果的慢病毒载体及其稳定沉默的 Jurkat 细胞系. **结论** 该细胞系的构建为进一步研究 Syncytin 基因在白血病的功能提供了细胞模型.

[关键词] RNA 干扰; 慢病毒载体; Syncytin 基因; Jurkat 细胞系

[中图分类号] Q291 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0012-04

Construction of Lentiviral Vector of Syncytin and Establishment of Jurkat Cells with Syncytin Gene Silence

ZHENG Zhi^{1,2)}, NIU Hua²⁾, TAO Rui²⁾, ZHANG Gui-qian²⁾, FAN Xin²⁾, GAO Yu-hong²⁾, SUN Yi²⁾

(1) College of Life Science, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650504; 2) Dept. of Laboratory Medicine, Kunhua Hospital Affiliated to Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To construct PGC-LV-syncytin vector and establish Jurkat cell line with syncytin gene knockdown. **Methods** The targeting syncytin gene sequence was designed by the RNAi software, and were cloned into the PGC-LV vector. The positive clones were confirmed by both PCR and restriction enzyme digestion, finally by DNA sequencing. The lentivirus was then harvested and used to infect Jurkat cells. The infected efficiency was indicated by GFP and detected with fluorescent microscope. The expression level of syncytin gene of Jurkat cell line at mRNA was detected by Real-Time PCR, and then Annexin V-APC-labeled flow cytometry was used to detect cell apoptosis rates. **Results** A lentiviral vector with syncytin gene interference was constructed, and a Jurkat cell line stably expressing syncytin shRNA for syncytin knockdown was successfully established. **Conclusion** A lentiviral vector carrying the targeting gene syncytin has been successfully constructed, and a Jurkat cell line stably expressing syncytin shRNA has established with this lentiviral system, the cell line can be as a cell model for further research of role of syncytin in leukemia.

[Key words] RNAi; Lentiviral vector; Syncytin gene; Jurkat cell line

人类内源性逆转录病毒 (human endogenous retroviruses, HERV) 是几百万年前整合到人类基因组中, 并以孟德尔方式遗传至今的逆转录病毒的残

余物, 约占人类基因组 DNA 的 8%^[1]. 大多数 HERVs 在进化过程中由于突变、缺失等的积累失去了编码能力^[2,3], 但仍有少数 HERVs 的开放阅读

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81100377); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2013FB203, 2012FB096)

[作者简介] 郑志 (1986~), 男, 河南信阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事分子生物学研究工作.

[通讯作者] 孙鹭. E-mail: huludeng@126.com

框被完整保留了下来, 在一些特定的组织或分化发育的特定阶段表达. Syncytin 是 HERVs-W 家族的囊膜蛋白, 主要在胎盘中表达, 介导合胞滋养层的形成, 维持胎盘正常的生理功能^[4]. HERVs 已被证实与肿瘤形成密切相关, 如乳腺癌^[5]、慢性骨髓瘤白血病^[6,7], 研究发现 Syncytin mRNA 和 Syncytin 蛋白在 9 种白血病或淋巴瘤细胞系中均有表达^[8], 具有潜在的研究价值.

本研究成功构建 Syncytin 慢病毒干扰载体及其稳定沉默的 Jurkat 细胞系, 并通过实时定量 PCR 技术及流式细胞术检测细胞凋亡验证细胞系构建成功, 为进一步研究 Syncytin 蛋白在白血病发生发展过程中的作用机制提供了细胞模型.

1 材料与方法

1.1 材料

慢病毒包装系统由 PGC-LV、pHelper 1.0、pHelper 2.0 三种质粒组成, PGC-LV 载体带有 GFP 绿色荧光标签; PGC-LV 载体为慢病毒表达载体骨架结构, 经 Hpa I 和 Xho I 酶切, 由上海吉凯基因技术有限公司提供; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Hpa I、Xho I 均购自 NEB 有限公司; M-MLV 逆转录酶、dNTPs 购自 Promega; SYBR MASTER Mixture、Taq polymerase 购自 Takara 公司; RPMI 1640 液体培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; RNAiso Plus、Opti-MEM 购自 Takara 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; 无内毒素质粒大提试剂盒为天跟公司产品; 凋亡试剂盒为 eBioscience 公司产品; Real time PCR 仪 (日本 TAKARA 公司); 凝胶成像仪 (天能公司) 摄像分析, Nano Drop 分光光度仪 (Thermo 公司), 荧光显微镜 (奥林巴斯), CO₂ 培养箱 (日本三洋), 慢病毒包装 293T、人 Jurkat 细胞株由上海吉凯基因技术公司提供, 其他试剂均为进口或国产分析纯.

1.2 PGC-LV-syncytin 干扰表达载体的建立

利用序列设计软件, 遵循其设计原则参照 syncytin 基因序列 (基因号 NM_001130925), 体外设计出 syncytin 三条干扰序列: -sh1: 5'-GGAAATCT-CAGCTGCACAA-3'; -sh2: 5'-CCTCTAGCAGCTAT-AATAT-3'; -sh3: 5'-CCTCAGCCTATCGTTGTTT-3', 分别命名为: Syncytin-sh1, Syncytin-sh2, Syncytin-sh3. 同时设计并合成与 Syncytin 基因无同源性的序列为阴性对照, 序列: 5'-TTCTCCGAACGTGT-CACGT-3', 该被命名为 Syncytin-NC. 配制退火缓

冲液并加入合成的干扰序列单链 DNA Oligo 使其自动配对产生双链 DNA Oligo. 使用限制性内切酶 Hpa I/Xho I 分别酶切 PGC-LV 载体与双链 DNA Oligo, 酶切产物纯化回收后在 T4 连接酶作用下过夜连接, 连接产物至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布与含 Amp⁺ 的 LB 平板过夜培养, 挑选单克隆并通过 PCR 鉴定和酶切进行初步验证, 初步验证为阳性的克隆送样测序, DNA 测序结果经序列分析验证. 构建的慢病毒干扰载体命名为 PGC-LV-syncytin.

1.3 PGC-LV-syncytin 慢病毒载体的包装

利用天跟公司无内毒素质粒大量提取试剂盒提取 PGC-LV-syncytin、pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 工具载体, 紫外分光光度计测定质粒浓度. 参照 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 说明书转染 293T 细胞. 转染 48 h 后收集细胞液 4 $^{\circ}$ C、4 000 g 离心 10 min, 上清以 0.45 μ m 滤器过滤获得病毒粗提液, 浓缩病毒液分装保存并利用荧光法测定病毒液的滴度.

1.4 Syncytin 基因稳定沉默的 Jurkat 细胞系的建立

利用上述实验中测定的最佳病毒滴度来感染 jurkat 细胞, 建立 Syncytin 稳定沉默的 jurkat 细胞系. 选取处于对数生长期的 jurkat 细胞, 病毒感染前 1 d 将细胞接种于 48 孔细胞培养板, 使细胞汇合度大约为 15%. 实验设置 A、B、C 3 组, A 组为实验组, B 组为阴性对照组, C 组为空白对照组. 每组 3 复孔. 根据每组细胞的 MOI 值来加入病毒. 感染 16 h 后更换细胞培养液. 病毒感染 72 h 后利用荧光显微镜观察各实验组中 GFP 表达情况, 细胞荧光率需达 80% 以上. 继续培养检测合格的细胞并保存种子.

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 syncytin 基因 mRNA 水平

利用 Takara 公司 RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂对 1.3 中的细胞提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测. 利用 Primer5.0 软件设计 Syncytin 上下游引物, 上游引物序列 5'-ATGCCCGCAACTGCTATC-3', 下游引物序列 5'-AGACAGTGACTCCAAGTCCTC-3', 扩增片段大小为 112 bp. 以 GAPDH 基因为内参基因, 上游引物序列 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 下游引物序列 5'-CACCTGTGCTGTAGCCAAA-3', 扩增片段大小为 112 bp. 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 59 $^{\circ}$ C 退火 15 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min. 对实验

数据进行统计学分析。

1.6 Annexin V-APC 单染法流式细胞仪检测细胞凋亡率

感染 5 d 后收集各组细胞培养上清培养, D-Hank's 洗涤后, 胰酶消化终止培养收集细胞于 5 mL 离心管, 每组 3 个复孔, 15 000 r/min 离心 5 min 弃上清, PBS 洗涤后 15 000 r/min 离心 5 min; 1 × binding buff 洗涤后 15 000 r/min 离心; 1 mL 1 × staining buffer 重悬细胞; 取细胞悬液 100 μL 加入 5 ul Annexin V-APC 染色, 室温避光 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡。记录并分析检测数据。

1.7 统计学处理

用 SPSS 统计软件进行数据分析。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGC-LV-syncyntin 干扰表达载体的鉴定

利用菌液 PCR 法对挑选的单克隆进行鉴定, PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像仪下观察条带, 电泳产物条带大小与扩增片段大小一致, 实验组 PCR 产物大小为 340 bp, 阴性对照组产物大小为 299 bp (图 1)。DNA 测序结果显示, 插入序列与合成的 shRNA 序列一致 (图 2), PGC-LV-syncyntin 载体构建成功。将各 shRNA 表达载体分别命名为 PGC-LV Syncyntin-sh1, PGC-LV Syncyntin-sh2, PGC-LV Syncyntin-sh3, 阴性对照命名为 PGC-LV NC。

2.2 Syncyntin 基因稳定沉默的 Jurkat 细胞系的鉴定

病毒感染 jurkat 细胞 48 h, 在荧光倒置显微镜下可见细胞都能发绿色荧光 (图 3A、B), 表明 Syncyntin 稳定沉默的 jurkat 细胞系构建成功。提取各实验组细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA, 以人 GAPDH 基因为内参基因, 用 qRT-PCR 对 Syncyntin 基因进行检测。试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 数据分析法分析。结果表明 Syncyntin 基因抑制效率为 35.5% (图 4), Syncyntin 基因稳定抑制的 jurkat 细胞系构建成功。

2.3 Annexin V-APC 单染法流式细胞仪检测细胞凋亡

采用 Annexin V-APC 单染后流式细胞仪检测各组细胞凋亡, 检测结果: 阴性对照组细胞凋亡发生率为 7.04%, PGC-LV syncyntin-sh3 转染组为

10.27%, 高于阴性对照组 ($P < 0.05$, 图 5), 表明干扰实验组细胞系细胞功能发生改变, 基因敲除成功。

3 讨论

Syncyntin 蛋白作为人类逆转录病毒在人类基因组中的遗迹并能在发挥生理功能而引起人们的兴趣, 但是 Syncyntin 如何参与肿瘤的发生却知之甚少。从结构上看, Syncyntin 蛋白的 373-397 残基是一个具有免疫抑制活性的多肽^[9], 其在细胞表面的大量表达可能有助于癌变细胞逃避免疫打击, 且其融合活性也许促进了细胞的迁移^[10]。

RNAi 技术能特异的结合到目的基因并终止其表达, 从而有效的抑制目的基因的表达。慢病毒载体通过病毒感染的方式将目的基因整合到宿主

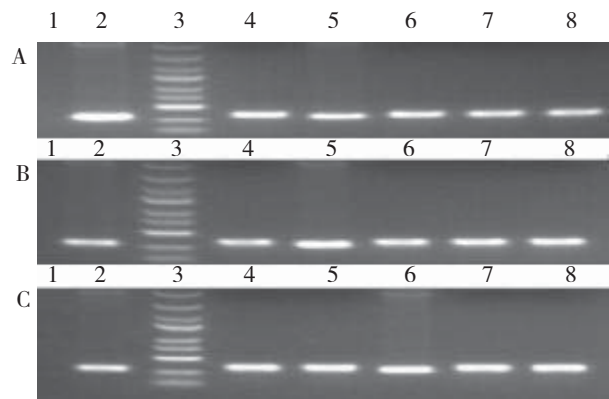


图 1 Syncyntin 的 PCR 电泳

Fig. 1 Electrophoresis of syncyntin PCR products

A:PGC-LV syncyntin-sh1; B:PGC-LV syncyntin-sh2; C: PGC-LV syncyntin-sh3; 1:阴性对照 (ddH₂O); 2:性对照 (空载体); 3:分子量标准; 4-8:重组转化子。

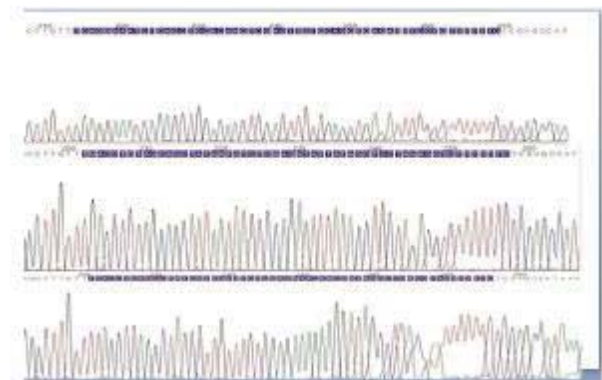


图 2 设计序列 PCR 测序图

Fig. 2 shRNA was confirmed by the DNA sequencing

A:PGC-LV syncyntin-sh1 测序序列; B:PGC-LV syncyntin-sh2 测序序列; C:PGC-LV syncyntin-sh3 测序序列

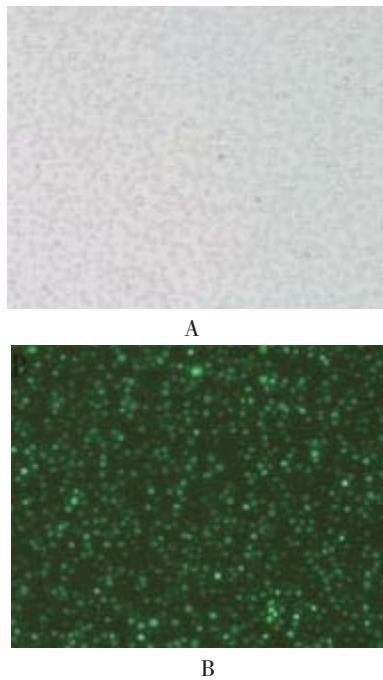


图 3 RNAi 干扰病毒干扰目的细胞 72 h 的明场及荧光照片 (MOI = 50, $\times 100$)

Fig. 3 Bright and fluorescence field of Jurkat cells 72 h after being transferred by shRNA at the concentration of (MOI = 50, $\times 100$)

A:明场照片; B:荧光照片.

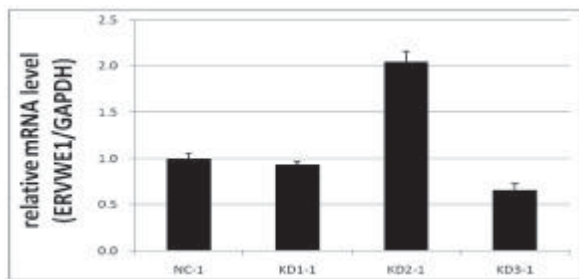


图 4 RT-PCR 检测 Jurkat 细胞 syncytin 的 mRNA 水平
Fig. 4 The expression of syncytin mRNA detected by real time PCR in Jurkat cells after knockdown of syncytin gene

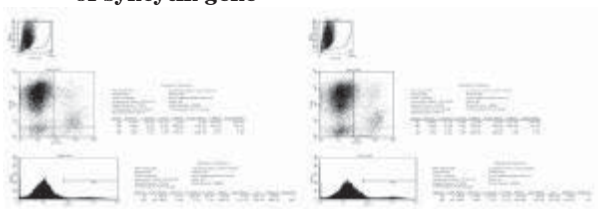


图 5 流式细胞仪检测 Jurkat 凋亡

Fig. 5 Cell apoptosis was detected by flow cytometry

A:阴性病毒对照组; B: PGC-LV syncytin-sh3 转染组.

细胞中,能更高效的表达所整合的目的序列.本实验体外设计 syncytin 基因的 shRNA 并合成双链结构,并将其连接到慢病毒表达载体上构建 PGC-LV-syncytin 重组表达载体.将 PGC-LV-syncytin 重组载体与其包装质粒共同转染至 293T 细胞.利用其产生的有感染能力的病毒颗粒来感染 Jurkat 细胞.感染慢病毒后的 Jurkat 细胞在荧光显微镜下 80%能发出绿色荧光. Real-Time PCR 检测结果表明基因表达被成功抑制, Annexin V-APC 结合流式细胞仪检测细胞凋亡显示细胞凋亡率有显著变化.上述结果显示,稳定沉默 syncytin 的 Jurkat 细胞系构建成功. Syncytin 稳定沉默的 Jurkat 细胞系的获得为更深入的研究 syncytin 在白血病肿瘤细胞中的调控作用及机制提供了可靠的体外细胞模型,为白血病肿瘤的基因治疗奠定基础.

[参考文献]

- [1] BELSHAW R, KATZOURAKIS A, PACES J, et al. High Copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection[J]. *Mol Biol Evo*, 2005, 22(4): 814 - 817.
- [2] LOWER S, LOWER J, KURTH R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(11): 5 177 - 5 184.
- [3] BANNERT N, KURTH R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(spl2): 14 572 - 14 579.
- [4] HARRIS J R. Placental endogenous retrovirus (ERV): structural, functional, and evolutionary significance [J]. *BioEssays*, 1998, 20(4): 307 - 316.
- [5] LARSSON L, HOLCK S, CHRISTENSEN I J. Prognostic role of syncytin expression in breast cancer [J]. *Human pathol* 2007, 38(5): 726-731.
- [6] BRODSKY I, FOLEY B, HAINES D, et al. Expression of HERV-K provirus's in human leukocytes [J]. *Blood*, 1993, 81(9): 2 369 - 2 374.
- [7] DEPIL S, ROCHE C, DUSSART P AND PRIN L. Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients [J]. *Leukemia*, 2002, 16(2): 254 - 259.
- [8] SUN Y, OUYANG D Y, PANG W, et al. Expression of Syncytin in leukemia and lymphoma cells [J]. *Leu Res*, 2010, 34(3): 1 195 - 1 202.
- [9] MI S, LEE X, LI X, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis [J]. *Nature*, 2000, 403(6 771): 785 - 789.
- [10] BLOND J L, LAVILLETTE D, CHEYNETNV, et al. An envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor [J]. *J Virol*, 2000, 74(7): 3 321 - 3 329.

(2014-04-17 收稿)