

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0333-05

Caspase-3 在 Apoptin 基因诱导 Hela 细胞凋亡中的作用

曹 婧¹, 赵洪礼^{2*}, 黄 敏¹, 戈全治², 宁安红¹(1. 大连医科大学微生物学教研室, 大连 116027, 2. 沈阳军区联勤部 疾病预防控制中心 分子生物学实验室, 沈阳 110034)

[摘 要] 目的: 研究 Caspase-3 在 Apoptin gene 诱导 Hela 细胞凋亡中的作用。方法: 用含有 Apoptin 基因的真核表达载体 pcDNA3.1 瞬间转染体外培养的 Hela 细胞; Hela 细胞瞬间转染后 0、24、48、72 和 96 h, 分为正常的 Hela 细胞对照组, pcDNA3.1 质粒转染对照组和实验组。分别采用 RT-PCR、DNA 凝胶电泳、流式细胞术检测 Hela 细胞的凋亡; 以比色法检测 Caspase-3 的相对活性。结果: 以转染后 24、48 和 72 h Hela 细胞的总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 均可扩增出 Apoptin cDNA, 正常 Hela 细胞和空载体转染细胞均为阴性表明 Apoptin 已在转染细胞中表达; Apoptin 基因瞬间转染的 Hela 细胞可出现典型的细胞凋亡所具有的 DNA 梯状带, 表明有凋亡发生; FCM 检测发现, 以 Apoptin 基因转染后 48 h, 在 DNA 直方图上的 G₁ 峰前, 即出现 1 个明显的亚 2 倍体峰(亚 G₁ 峰, 即凋亡峰), 并随着转染时间延长而增强。细胞凋亡率与对照组相比较差异显著($P < 0.05$)。Hela 细胞经 pcDNA3.1 质粒转染后 24 h 实验组 Caspase-3 的活性开始升高, 72 h 达高峰, 明显高于正常细胞对照组和 pcDNA3.1 对照组($P < 0.01$)。结论: Apoptin 基因可通过激活 Caspase-3 诱导 Hela 细胞凋亡。

[关键词] 肿瘤特异性凋亡基因; 凋亡; Caspase-3; 基因治疗

[中图分类号] R459.9 [文献标志码] A

Role of Caspase-3 in Apoptin-induced apoptosis of Hela cells

CAO Jing¹, ZHAO Hong-li^{2*}, HUANG Min¹, GE Quan-zhi², Ning An-hong¹(1. Department of Microbiology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Laboratory of Molecular Biology, Center of Disease Prevention and Control, PLA Shenyang Military Area Command, Shenyang 110034, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role of Caspase-3 in Apoptin gene-induced apoptosis of Hela cells. **Methods:** Hela cells were transiently transfected with recombinant pcDNA3.1 plasmid containing Apoptin gene. This study was divided into normal control group, pcDNA3.1 transfected group, and experimental group. The apoptoses of Hela cells were measured by DNA agarose electrophoresis, RT-PCR and flow cytometry. The relative activity of Caspase-3 was determined by colorimetric assay instantly at 24, 48, 72, and 96 h after transfection. **Results:** The cDNA of Apoptin gene was detected by RT-PCR in the total RNA of the Hela cells transfected with pcDNA3.1 at 24, 48 and 72 h after transfection, but not in that of normal Hela cells and pcDNA3.1 transfected Hela cells. The DNA ladder, indicator of apoptosis cells, was found in Hela cells transfected with pcDNA3.1 at 24, 48 and 72 h after transfection. FCM analysis found that the sub-G₁ peak (apoptosis peak) in the graph of Hela cells transfected with pcDNA3.1 at 48 h. These results showed that Apoptin gene induced apoptosis in Hela cells *in vitro*; the apoptosis rate was significantly higher than that of control group as time went by. Caspase-3 activity began to rise at 24 h and reached the peak at 72 h in Hela cells after pcDNA3.1 transfection, but not in normal Hela cells and pcDNA3.1 transfected Hela cells. **Conclusion:** Apoptin gene can induce apoptosis of Hela cells *via* activation of Caspase-3.

[Key words] Apoptin gene; apoptosis; Caspase-3; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 333-337]

细胞凋亡(apoptosis)是一种机体为维护正常组织形态、体积及功能而与细胞增殖相平衡的主动自杀过程; 凋亡发生异常, 会导致细胞无限增殖而致肿瘤发生。在对凋亡机制的研究中, 陆续发现了一些与诱导细胞凋亡的酶类, 其中胱天蛋白酶(caspase)是细胞凋亡的关键分子, 细胞凋亡的形态变化是一

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助课题(20042046)。Supported by Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 20042046)

[作者简介] 曹 婧(1963-), 女, 辽宁省大连市人, 硕士, 副教授, 主要从事微生物学方面的研究。

* Corresponding author. Tel: (024) 23052091; Email: zhaohongli221@hot-mail.com

系列 caspase 活化并水解底物的结果。近年来研究发现肿瘤特异性凋亡基因(Apoptin)可通过独立于 p53 作用途径的、不被 Bcl-2 过量表达所抑制的方式,特异性地诱导人类多种肿瘤细胞和转化细胞的凋亡,但并不作用于正常细胞^[1-2]。本课题前期克隆和构建了 Apoptin 基因真核表达载体,并证明该载体对人肿瘤细胞具有明显的凋亡诱导作用^[3-4]。本研究进一步探讨 Apoptin 基因在诱导 HeLa 细胞凋亡时 Caspase-3 的活性作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Lipofectmina、凋亡细胞 DNA 提取试剂盒购于 Invitrogen 公司;二碘化丙啶(PI)和 RT-PCR 试剂盒为 Sigma 公司产品;Caspase-3 底物 AC-DEVD-pNA 为 Alexls 公司产品。Elite 流式细胞仪(FCM)为 Coulter 公司产品。550 型酶标免疫测定仪为 Bio-Rad 公司产品。其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 质粒和细胞

质粒 pcDNA3 本室构建,将 Apoptin 基因克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 中。碱变性法提取质粒 DNA,PEG 沉淀法进行纯化,所得质粒 DNA 含量为 2 g/L,纯度达到电泳纯^[6]。HeLa 细胞引自军事医学科学院,本室传代保存,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 5% CO₂、37 °C 传代培养。

1.3 pcDNA3 瞬间转染 HeLa 细胞

参照 Lipofectmina 转染说明书进行,简要步骤为:转染前 24 h,将 HeLa 细胞重铺在 T25 培养瓶中,待长至底面积 80% 时进行转染。将 10 μg 质粒 pcDNA3 DNA 和 20 μl Lipofectmina 各加入 500 μl 无血清 DMEM 中,振荡 5 min,将两者混合即成转染液。室温静置 20 min,无血清 DMEM 洗细胞 2 次,加入 5 ml 无血清的 DMEM,逐滴加入转染液,边加边轻轻混合,置 37 °C 孵育 8 h。弃去转染液,换含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液培养。分别于转染后 24、48 和 72 h 观察并取转染细胞进行鉴定。设正常细胞对照组和 pcDNA3.1 质粒转染对照组。

1.4 RT-PCR 鉴定转染效果

取 1 × 10⁶ 个转染不同时间的 HeLa 细胞,按异硫氰酸胍一步法提取总 RNA,作为 RT-PCR 的模板,用 RT-PCR 扩增 Apoptin cDNA^[5]。

1.5 琼脂糖凝胶电泳鉴定凋亡细胞 DNA 片段化

取 1 × 10⁶ 个转染不同时间的 HeLa 细胞,加入 500 μl 细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、10 mmol/L EDTA、150 mmol/L NaCl、5 g/L SDS 及 400

mg/L 蛋白酶 K),于 50 °C 作用 3 h,振荡。加入等体积的平衡酚、氯仿-异戊醇抽提后,以 2 500 × g 离心 10 min,加 2.5 倍无水乙醇沉淀。用 70% 乙醇沉淀、干燥,将 DNA 溶于 40 μl TE 液中,加入 20 μl 10 g/L RNase,37 °C 水浴 30 min。取 30 μl DNA,行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,细胞凋亡时可出现 DNA 片段化的梯形条带。

1.6 流式细胞术检测 Apoptin 基因诱导 HeLa 细胞的凋亡

转染后 24、48 和 72 h,收集各组细胞于离心管中,PBS 洗 2 次,加 -4 °C 预冷乙醇振荡、固定,4 °C 保存过夜;用 PBS 洗 2 次弃固定液;200 μl RNA 酶(RNaseA)振散,于 37 °C 水浴中 30 min 后,加 800 μl PI 染色液,混匀,于 4 °C 避光 30 min。PI 可与凋亡细胞结合,在荧光照射下发红光。400 目尼龙网过滤后,用 Elite 流式细胞术(FCM)检测每份样品中的 10 000 个细胞,观察激发波长 488 nm 处的红色荧光。

1.7 酶标免疫测定仪测定 Caspase-3 的活性

收集转染后 0、24、48、72 和 96 h 细胞,测定 Caspase-3 的活性。各组细胞按文献[6]的方法处理,加入 Caspase-3 的底物 AC-DEVD-pNA,使其终浓度为 50 μmol/L,置 37 °C 孵育 1 h 后,转移至 96 孔酶标板中,用酶标免疫测定仪测定波长 405 nm 的光密度值 D_{405} ,以此来表示 Caspase-3 的相对活性。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 8.0 软件进行统计,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 转染细胞中 Apoptin mRNA 的表达

以 HeLa 细胞转染后 24、48 和 72 h 的总 RNA 为模板,经 RT-PCR 均可扩增出 Apoptin cDNA,表明 Apoptin 已在转染细胞中表达。正常 HeLa 细胞和空载体转染细胞均为阴性(图 1)。

2.2 Apoptin 诱导 HeLa 细胞凋亡的电泳检测

Apoptin 转染 HeLa 细胞后,电泳可见细胞凋亡所具有的 DNA 梯状条带,表明有凋亡发生(图 2)。

2.3 Apoptin 诱导 HeLa 细胞凋亡的 FCM 检测

FCM 检测发现,以 Apoptin 基因转染后 48 h,在 DNA 的 G₁ 峰前,即出现 1 个明显的亚 2 倍体峰(亚 G₁ 峰,即凋亡峰),并随着转染时间延长而增强。Apoptin 基因转染后 24、48 h,以及正常 HeLa 细胞、pcDNA3.1 质粒转染组的细胞凋亡率分别为 (4.65 ± 0.3)%、(35.32 ± 0.54)%、(3.30 ±

0.42)% 和 $(3.42 \pm 0.51)\%$, 转染 48 h 细胞凋亡率与对照组细胞相比较差异显著 ($P < 0.05$, 图 3)。

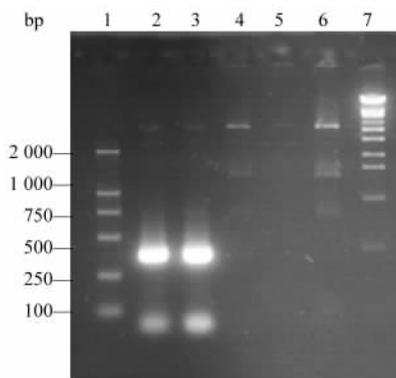


图 1 Apoptin 瞬间转染 Hela 细胞后 Apoptin mRNA 表达

Fig. 1 Apoptin mRNA expression in Hela cells after transfection by RT-PCR

1,7: DNA marker; 2: RT-PCR product at 24 h after transfection; 3: RT-PCR product at 48 h after transfection; 4: Non-transfected Hela cells; 5,6: Lysate of pcDNA3.1 plasmid transfected Hela cells

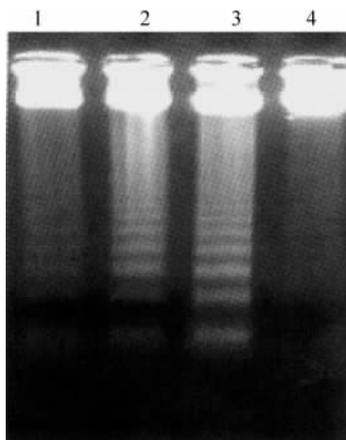


图 2 Apoptin 瞬间转染 Hela 细胞后不同时间凋亡细胞的 DNA 电泳

Fig. 2 Analysis of apoptosis DNA in Hela cells after transfection by agarose gel electrophoresis

1,2,3: Apoptosis DNA at 24,48,72 h after transfection respectively; 4: Non-transfected Hela cells

2.4 pcDNA3 转染后 Hela 细胞 Caspase-3 相对活性

Hela 细胞经 pcDNA3 质粒转染后 24 h, 实验组 Caspase-3 的活性开始升高, 72 h 达高峰, 明显高于正常细胞对照组和 pcDNA3.1 对照组 ($P < 0.01$, 表 1)。

3 讨论

Caspase 是参与诱导细胞凋亡的重要因素。

Caspase 家族存在于哺乳动物细胞中, 是与线虫细胞死亡蛋白 CED-3 相似的一类蛋白酶, 迄今已发现 16 个成员^[7], 均以无活性的前体形式存在, 一经激活, 将产生 Caspase 级联反应, 导致细胞凋亡。现今认为, Caspase 的激活与细胞凋亡需经两条不同的途径: 一条是通过与细胞表面的死亡受体结合, 激活 Caspase-8 后, 再活化下游的 Caspase(主要为 Caspase-3); 另一条是各种毒性物质刺激线粒体释放的细胞色素 C 激活 Caspase-9 后, 再活化下游的 Caspase(主要也为 Caspase-3)^[8-9], 说明这两条途径均需激活 Caspase-3。

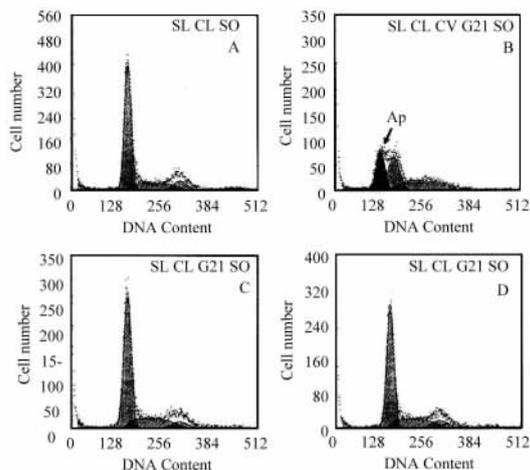


图 3 FCM 检测 Apoptin 基因诱导 Hela 细胞的凋亡

Fig. 3 Analysis of apoptosis in Hela cells induced by apoptin determined by FCMs

A, B: Apoptosis of Hela cells at 24, 48 h after transfection respectively; C: Normal Hela cells; D: Hela cells transfected with pcDNA3.1 plasmid

研究表明, Apoptin 能诱导人的肿瘤细胞和转化细胞发生凋亡, 但对人的正常细胞无凋亡诱导作用。因此, Apoptin 被认为是第一个真正意义上的可选择性诱导人肿瘤细胞凋亡、但不损伤正常细胞的凋亡蛋白。Apoptin 的发现对于研究肿瘤细胞特异的凋亡机制、建立肿瘤细胞特异性治疗方法具有重要意义^[10-15]。

Apoptin 诱导肿瘤细胞凋亡方式独特, 既不依赖 p53 途径, 又不受 bcl-2 的抑制。大多数化疗药物所诱导的肿瘤细胞凋亡是 p53 介导的, 正是由于 p53 的突变导致肿瘤细胞对化疗药物的敏感性降低, 影响了化疗的疗效。将 Apoptin 转染到 3 种 p53 缺失的肿瘤细胞中, 发现其诱导肿瘤细胞凋亡的能力与其在相应的表达野生型 p53 的细胞株中一致, 表明 Apoptin 诱导的肿瘤细胞

凋亡不需要 p53 介导。另外, p53 介导的肿瘤细胞凋亡能够被抗凋亡基因 bcl-2 的过表达所抑制。高表达 bcl-2 的血液肿瘤细胞(Dohh-2 和 EBV 转化的 JOB0-o)对 Apoptin 敏感, bcl-2 的高表达并不能抑制 Apoptin 诱导细胞凋亡的能力。而在 Apoptin 诱导 Sao-2 细胞凋亡的过程中, bcl-2

的高表达反而能促进 Apoptin 诱导细胞凋亡。头颈鳞状细胞癌来源的 UMSSC-14B 细胞中, bcl-xL 表达上调也不能影响 Apoptin 诱导细胞凋亡^[16-20]。研究 Apoptin 抗肿瘤其作用机制对临床应用具有实际意义。

表 1 pcDNA3 质粒转染后 Hela 细胞 Caspase-3 的相对活性($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Caspase-3 activity of Hela cells transfected with pcDNA3 plasmid($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Groups	Time of transfection (t/h)				
	0	24	48	72	96
Normal cells	0.047 ± 0.006	0.054 ± 0.011	0.045 ± 0.008	0.054 ± 0.007	0.046 ± 0.009
pcDNA3.1	0.041 ± 0.005	0.049 ± 0.012	0.048 ± 0.006	0.049 ± 0.009	0.042 ± 0.011
pcDNA3	0.048 ± 0.008	0.117 ± 0.011 *	0.240 ± 0.014 **	0.594 ± 0.047 **	0.331 ± 0.049 **

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal cells or pcDNA3.1 group

本研究在克隆了 Apoptin 的真核表达载体的基础上, 观察其诱导 Hela 细胞凋亡的作用。结果显示, 在 Apoptin 基因转染后 48 h, Hela 细胞出现明显的细胞凋亡特征, 而且凋亡细胞的数量与 Apoptin 的转染时间有关, 随着时间延长, Hela 细胞的凋亡比率明显增加。结果还显示 Hela 细胞经 Apoptin 基因转染后 24 h, Caspase-3 的活性开始升高, 72 h 达高峰, 并伴有明显的细胞凋亡出现, 实验组 Caspase-3 的相对活性明显高于正常细胞对照组和 pcDNA3.1 对照组。这一结果说明 Apoptin 基因诱导肿瘤细胞凋亡与 Caspase-3 的激活有关, 至于 Apoptin 是通过哪个途径激活 Caspase-3 还有待于进一步研究。另外除 Caspase-3 外, 有其他 Caspase 被活化, 值得进一步探讨。

[参考文献]

[1] Danen-van Oorschot AA, van Der Eb AJ, Noteborn MH. The chicken anemia virus derived protein Apoptin requires activation of caspases for induction of apoptosis in human tumor cells [J]. J Virol, 2000, 74(15): 7072-7078.

[2] Danen-van Oorschot AA, Fischer DF, Grimbergen JM, et al. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(11): 5843-5847.

[3] 聂晶, 崔旭红, 赵洪礼, 等. 肿瘤特异性凋亡基因黑色素瘤细胞凋亡诱导作用 [J]. 中国公共卫生, 2004, 20(1): 54-55.

[4] 贲松彬, 赵洪礼, 聂晶, 等. 肿瘤特异性凋亡基因诱导人淋巴瘤细胞凋亡的机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,

2005, 21(4): 527-529.

[5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning [M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989: 310-328.

[6] 赵洪礼, 王继群, 孙巍, 等. 现代基础医学常用实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002, 210-218.

[7] Grub S, Persohn E, Trommer WE, et al. Mechanisms of cyclosporine A-induced apoptosis in rat hepatocyte primary cultures [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 163(3): 209-220.

[8] Marks N, Berg MJ. Recent advances on neuronal caspase in development and neurodegeneration [J]. Neurochem Int, 1999, 35(3): 195-220.

[9] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within [J]. Science, 1998, 28(5381): 1312-1316.

[10] Peng DJ, Sun J, Wang YZ, et al. Inhibition of hepatocarcinoma by systemic delivery of apoptin gene via the hepatic asialoglycoprotein receptor [J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(1): 66-73.

[11] Natesan S, Kataria JM, Dhama K, et al. Anti-neoplastic effect of chicken anemia virus VP3 protein (apoptin) in Rous sarcoma virus-induced tumours in chicken [J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 10): 2933-2940.

[12] Li X, Jin N, Mi Z, et al. Antitumor effects of a recombinant fowlpox virus expressing Apoptin *in vivo* and *in vitro* [J]. Int J Cancer, 2006, 119(12): 2948-2957.

[13] Olijslagers SJ, Zhang YH, Backendorf C, et al. Additive cytotoxic effect of Apoptin and chemotherapeutic agents paclitaxel and etoposide on human tumour cells [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007, 100(2): 127-131.

[14] Noteborn MH, van der Eb AJ. Apoptin-induced apoptosis: potential for antitumor therapy [J]. Drug Resist Updat, 1998, 1(2): 99-103.

[15] Russo A, Terrasi M, Agnese V, et al. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy [J]. Ann Oncol, 2006, 17(Suppl 7): viii15-viii23.

- [16] Noteborn MH. Apoptin acts as a tumor-specific killer: potentials for an anti-tumor therapy[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005, 51(1): 49-60.
- [17] Song JS. Enhanced expression of Apoptin by the Myc-Max binding motif and SV40 enhancer for SCLC gene therapy[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(1): 51-55.
- [18] Schoop RA, Kooistra K, Baatenburg De Jong RJ, et al. Bcl-xL inhibits p53- but not Apoptin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell line[J]. Int J Cancer, 2004, 109(1): 38-42.
- [19] Danen-Van Oorschot AA, van der Eb AJ, Noteborn MH, et al. BCL-2 stimulates Apoptin-induced apoptosis[J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 457: 245-249.
- [20] Burek M, Maddika S, Burek CJ, et al. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent[J]. Oncogene, 2006, 25(15): 2213-2222.
- [收稿日期] 2007-05-10 [修回日期] 2007-07-11
- [本文编辑] 韩丹

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0337-01

· 研究简报 ·

携带沉默 *IGFIR* shRNA 和表达 *Wtp53* 的重组慢病毒的构建和鉴定

Lentiviral vector of insulin-like growth factor I receptor targeted-RNA interference expressing *Wtp53*: construction and identification

牛 坚¹, 李向农¹, 黄 建¹, 韩泽广² (1. 徐州医学院 附属第一医院 普外科, 徐州 221004; 2. 国家人类基因组南方研究中心, 上海 201203)

胰岛素样生长因子 I 类受体(insulin-like growth factor I receptor, IGFIR)的胞内信号转导涉及众多信号通路, 与多种肿瘤的发生、发展关系密切。p53 基因与 IGFIR 家族关系密切, 能够抑制 *IGFIR* 启动子活性及 mRNA 水平。本研究构建 *IGFIR* 基因 shRNA 和同时表达 *Wtp53* 慢病毒载体(pPRIME-*Wtp53*-shIGFIR), 感染肝癌 HEP3B 细胞, 观察能否下调 IGFIR 和上调 P53 蛋白水平, 为研究肝癌的基因治疗奠定基础。

重组慢病毒 pPRIME 系统由 pPRIME、psPAX2 和 pMD2G 3 种质粒组成。IGFIR 特异性 siRNA 片段为 5'-GCTCACGGTCATTACCGAG-3', 其小发夹 RNA 的 DNA Oligo 为: 5'-CGCGCCCGCTCACGGTCATTACCGAGTTCAAGAGACTCGGTAATGACCGTGAGCTTTT TG GAAA-3' (内含 *Mlu* I 和 *Cla* I 酶切位点)。与经 *Mlu* I 和 *Cla* I 双酶切后的 pPRIME 载体连接, 转化 DH5 α 大肠杆菌, 挑取重组阳性克隆行 *Eco*R I 和 *Cla* I 双酶切及测序鉴定。Primer Premier 5.0 软件设计两端带有酶切位点(*Pme* I、*Spe* I)且扩增片段能覆盖整个 *Wtp53* 基因的引物。以表达 *Wtp53* 的肝癌细胞 HEPG2 的 cDNA 为模板, 扩增 *Wtp53*, 并插入到经 *Pme* I、*Spe* I 酶切后的 pPRIME-shIGFIR 质粒载体中, 经 PCR、测序鉴定 pPRIME-shIGFIR-*Wtp53*。制备慢病毒包装系统中 3 种质粒 DNA 溶液(pPRIME-shIGFIR-*Wtp53* 15 μ g, psPAX2 7.5 μ g, pMD2G 7.5 μ g), 脂质体 2000 转染 293T 细胞培养, 收集上清液, 高速离心, 悬浮病毒颗粒沉淀, -70 $^{\circ}$ C 低温冻存待用。取 96 孔板 1 块, 每孔加 293T 细胞 1×10^4 个, 待测病毒用 DMEM 液稀释为 $10^{-6} \sim 10^{-1}$ 等, 培养 36 ~ 48 h。镜检观察 CEP 现象, 按公

式计算: 病毒滴度(pfu/ml) = 每孔细胞数 \times 病毒稀释倍数 $\times 10$ / 加入病毒量(ml)。10 MOI pPRIME-shIGFIR-*Wtp53* 感染 HEP3B 细胞, 加入 polybrene 达 6 mg/L, 72 h 后检测相关指标。取 40 μ g 细胞裂解液进行 SDS-PAGE。一抗 10 ml (1:1 000 稀释) 室温孵育 2 h, 二抗 10 ml (1:5 000 稀释) 孵育 2 h, PVDF 膜用 ECL 化学发光试剂盒处理并在暗室显影。

结果显示: (1) pPRIME-shIGFIR 酶切产物 300 bp (插入片段为 64 bp), pPRIME 空载体产物 236 bp 为对照, 结果与预期相符。测序表明合成的 IGFIR shRNA 寡核苷酸链序列插入正确, 慢病毒重组载体命名为 pPRIME-shIGFIR。(2) 表达载体 pPRIME-shIGFIR-*Wtp53* 转化 DH5 α 大肠杆菌, 挑取重组, 行 RT-PCR 鉴定, 片段大小为 389 bp, 结果与预期相符。测序表明合成的 *Wtp53* 寡核苷酸链序列插入正确, 命名为 pPRIME-shIGFIR-*Wtp53*。(3) Western blotting 检测发现, 重组慢病毒转染后细胞内 IGFIR 表达下降, P53 蛋白表达上升。(4) 重组慢病毒滴度为 4.58×10^9 pfu/L。

本研究在筛选出 IGFIR 基因 RNAi 的有效靶序列和克隆 *Wtp53* 基因后, 成功构建 pPRIME-*Wtp53*-shIGFIR 慢病毒载体, 为进一步的研究奠定了基础。

[关键词] 小干扰 RNA; IGFIR; p53; 慢病毒

[中图分类号] R73-57 [文献标志码] D

[收稿日期] 2007-03-20 [修回日期] 2007-07-31

[本文编辑] 韩丹