

· 基础研究 ·

端粒酶 shRNA 慢病毒载体的构建及转染人类胚胎干细胞 *

曾思聪 周 葭 卢光琇[△]

(中南大学生殖与干细胞工程研究所 人类干细胞国家工程研究中心 湖南 长沙 410078)

摘要 目的: 构建端粒酶 shRNA 慢病毒载体及建立端粒酶稳定干扰的人类胚胎干细胞系。方法: 将端粒酶基因特异性 shRNA 靶序列与慢病毒载体 PLKO.1-puro 连接、转化、挑取阳性克隆进行 PCR 及测序鉴定, 利用包装细胞 293T 获得重组的慢病毒, 感染人类胚胎干细胞, 分为干扰组 ShTert、载体组 vector 和野生型组 wt, Realtime-PCR 检测端粒酶 mRNA 的表达。结果: 经 PCR 和 DNA 测序鉴定, 成功构建端粒酶特异性 shRNA 慢病毒载体, 并感染人类胚胎干细胞; 经检测 shTert 组端粒酶 mRNA 表达较 vector 和 wt 组明显降低, vector 组和 wt 组之间无明显差异。结论: 通过成功构建的端粒酶特异性 shRNA 慢病毒载体对人类胚胎干细胞的转染实现了对端粒酶 mRNA 的调控。

关键词: 人类胚胎干细胞 慢病毒载体 转染

中图分类号: Q95-3, Q291, Q75 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)08-1401-03

Construction of telomerase shRNA lentivirus vector and transfection of human embryonic stem cells*

ZENG Si-cong, ZHOU Di, LU Guang-xiu[△]

(Institute of Human Reproduction & Stem Cell Engineering, National Center of Human Stem Cell Research and Engineering, Central South University, Changsha, China 410078)

ABSTRACT Objective: To construct telomerase shRNA lentivirus vector and the human embryonic stem cell system stably interfered by telomerase. **Methods:** Telomerase gene-specific shRNA's Target sequence and PLKO.1-puro lentiviral vector were connected and transformed. The positive clones were selected and the shRNA constructor was identified by PCR reaction and DNA sequencing. The recombinant lentivirus was obtained by packaging cells 293T. Human embryonic stem cells were infected, divided into interference group (ShTert), vector group (vector) and wild-type group (Wt). Expression of telomerase mRNA was examined by Realtime-PCR. **Result:** PCR and DNA sequencing showed that the telomerase-specific shRNA lentiviral vector was constructed successfully and infected in human embryonic stem cells. After testing, expression of telomerase mRNA in shTert group was significantly lower than that in vector and wt groups. There wasn't significant difference between vector and wt group. **Conclusion:** The telomerase shRNA lentivirus vector has been successfully constructed and human embryonic stem cells have been transfected and finally the regulation of telomerase mRNA has been achieved.

Key words: Human embryonic stem cells, Lenti-virus vector, Transfection

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, Q291, Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)08-1401-03

前言

人类胚胎干细胞具有高度自我更新、长期增殖及多向分化潜能, 研究和利用人类胚胎干细胞在当前生物医学领域越来越受到重视, 然而有效转染人类 ES 细胞却成为了该领域的瓶颈问题之一。人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 改造的慢病毒载体 (lentivirus vector) 既可感染分裂细胞, 也可感染非分裂细胞, 如神经细胞、干细胞等, 还具有整合到宿主细胞基因组、稳定长效转染、感染效率高等优点, 是干细胞基因功能研究和基因治疗中不可多得的优良载体。端粒是存在于染色体末端的 TTAGGG 重复片段, 与端粒相关蛋白一起形成时间有序的结构维护染色体组的稳定性, 端粒 DNA 主要功能有: 第一, 保护染色体不被核酸酶降解; 第二, 防止染色体相互融合; 第三, 为

端粒酶提供底物, 解决 DNA 复制的末端隐缩, 保证染色体的完全复制。端粒、着丝粒和复制原点是染色体保持完整和稳定的三大要素。在大多数哺乳动物细胞中, 端粒酶, 一种反转录酶, 是维持端粒的主要途径, 它通过以 RNA 为模板将端粒序列再每次细胞复制周期添加到染色体末端, 以弥补由于末端复制问题造成的端粒缩短^[1]。它由蛋白质和 RNA 两部分组成核糖蛋白复合体, 蛋白质部分具有逆转录酶的活性, 称为 Tert; RNA 部分是一段模板序列, 指导合成端粒 DNA 的重复序列片段称为 Terc, 两部分共同作用调节端粒酶的活性高低。为了研究端粒酶对胚胎干细胞端粒长度维持的作用和端粒酶与胚胎干细胞多能性的联系, 我们针对 Tert 基因构建了端粒酶 RNAi 慢病毒载体并建立端粒酶稳定干扰的人类胚胎干细胞系, 为下一步的研究奠定基础。

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2007CB948103); 中国高技术发展研究计划 (863 计划) (2006AA02A102); 湖南省科技计划项目 (2008FJ3133)

作者简介: 曾思聪 (1981-), 女, 博士研究生, 主要从事端粒研究。 (电话) 15243684694; E-MAIL: sicong520@hotmail.com。

周葭 (1982-), 女, 博士, 主要从事胚胎干细胞研究

[△] 通讯作者: 卢光琇 (1939-), 女, 博士生导师, 主要从事生殖遗传、胚胎干细胞研究。 (电话) 0731-82355100;

(电子邮箱) lugxdirector@yahoo.com.cn。

(收稿日期: 2011-01-22 接受日期: 2011-02-18)

1 材料与方法

1.1 主要实验材料、试剂和仪器

人类胚胎干细胞系来自于我们研究所建立的 chHES-90。高糖 DMEM、胎牛血清 FBS、胰蛋白酶为 Gibco 公司产品, β -巯基乙醇、lipofectamine TM 2000 为 Invitrogen 公司产品, 质粒小量提取和胶回收试剂盒为 Takara 公司产品, bFGF、嘌呤霉素盐酸盐为 Sigma 公司产品, shRNA 序列以及 PCR 引物均为 Takara 公司合成, 载体质粒 PLKO.1-puro、包装质粒 pCMV Δ 8.2 和包膜质粒 pCMV-VSVG 由美国华盛顿大学 Qin Yang 实验室惠赠, AgeI、EcoRI 和 T4 连接酶为 NEB 公司产品。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 293T 细胞培养常规培养在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的高糖 DMEM 2 mM L-谷氨酰胺 5% CO₂ 37 °C 100% 湿度细胞培养箱中。人类胚胎干细胞培养在鼠成纤维细胞制备

的饲养层细胞上, 培养基采用 DMEM/F12 添加 15% 的替代血清、0.1 mM β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸以及 4 ng/ml bFGF。将制备好的鼠饲养层细胞取出, 吸除旧的鼠胚胎成纤维细胞培养基, D-PBS 洗一次 2 ml/孔。于每孔中添加 2 ml 新鲜人胚胎干细胞培养基。用机械切割的方法将人胚胎干细胞在体式镜下切割成小块, 用 tip 将人胚胎干细胞轻轻吹起, 按适当比例传到新制备的饲养层细胞上。传代后第一天不换液, 加 1ml 新鲜培养基。以后每天换 2.5~3 ml 新鲜培养基, 每隔六天传代一次。

1.2.2 shRNA 慢病毒载体的构建 按图 1 所示设计合成 shRNA 序列(序列见表 1), 退火后与经 Age I 和 EcoR I 双酶切后胶回收的 PLKO.1-puro 载体质粒进行连接。得到的克隆先进行 PCR (引物序列见表 1) 鉴定, 再进行测序检测, 构建成功的载体命名为 PLKO.1-puro-Tert。

表 1 shRNA 及 PCR 引物序列
Table 1 Sequences of shRNA and PCR primers

名称 Name	序列(5'-3') Sequences	Tm(°C)
ShTert-F	CCGGCCTGCGTTTGGTGGATGATTCTCGAGAAATCATCCACCAAACGCAGGTTTTTG	-
ShTert-R	AATTCAAAACCTGCGTTTGGTGGATGATTCTCGAGAAATCATCCACCAAACGCAGG	-
PLKO-F	AGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTAT	56
PLKO-R	TTGTATGCTCTGTTGCTATTATGTC	56

1.2.3 慢病毒颗粒的包装 293T 细胞长至 80%-90% 时, 进行三质粒共转染, 按 3.5 cm 细胞培养皿计算: 1 μ g PLKO.1-puro 或者 PLKO.1-puro-Tert、0.89 μ g pCMV Δ 8.2、0.11 μ g pCMV-VSVG (Δ 8.2:VSVG=8:1) 和 250 μ L 无血清无抗生素高糖 DMEM、于一无菌 EP 管中混匀后, 室温静置 5 min, 10 μ L lipofectamine TM 2000 和 240 μ L 无血清无抗生素高糖 DMEM, 于一无菌 EP 管中混匀后, 室温静置 5 min, DNA 与脂质体混匀后, 室温静置 30 min, 逐滴加入 3.5 cm 培养皿中。18 h 后, 换新鲜 20% FBS 的高糖 DMEM 培养液。48 h 后, 收集培养皿中含病毒培养液, 1500 rpm 离心 5 min, 吸取上清通过 0.45 μ m 一次性针头滤器 (millipore) 过滤, 即得病毒原液, -80 °C 保存。

1.2.4 感染人类胚胎干细胞 取病毒原液按 1:4 稀释感染人类胚胎干细胞 chHES-90, 设端粒酶干扰组 ShTert、空载体组 vector 和野生型组 wt, 48 h 后, 换含 2.5 μ g/mL 嘌呤霉素的新鲜培养液。

1.2.5 shRNA 干扰效率的检测 收集 ShTert 组、vector 组和 wt 组细胞, 抽提总 RNA, DNase I 处理后逆转录得到的 cDNA 进行 realtime-PCR 分析。

2 结果

2.1 shRNA 慢病毒载体的构建及鉴定

PLKO.1-puro 载体质粒经 Age I 和 EcoR I 双酶切后胶回收, 与 shRNA 序列退火后的片断进行连接, 得到的克隆先进行 PCR 检测, 空载体 PCR 产物大小为 185 bp, 而成功插入 shRNA 序列的 PCR 产物大小为 243 bp, PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳, 可以初步确定序列插入成功 (图 1A), 再挑选阳性克隆进行测序验证, 结果提示插入序列与实验设计完全一致 (图 1B), 综上所述, 我们成功构建了 shRNA 慢病毒载体 PLKO.1-puro-Tert。

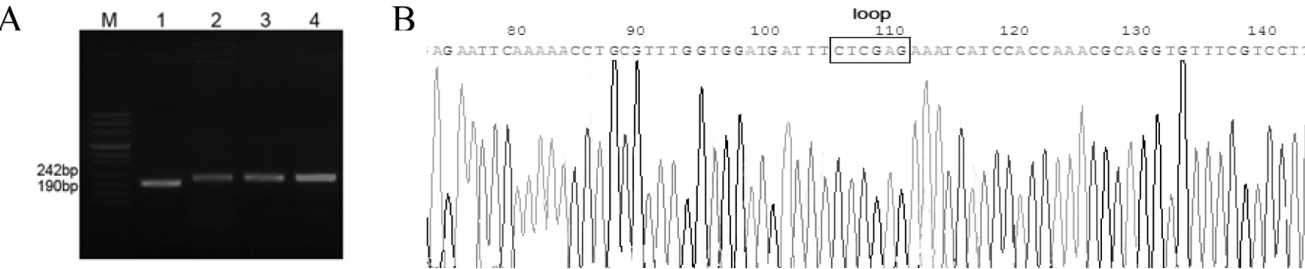


图 1 shRNA 慢病毒载体鉴定图

Fig.1 Identification of the shRNA recombinant vector

(A) shRNA 慢病毒载体 PCR 鉴定图: 分别以空载体 PLKO.1-puro 和阳性克隆为模板进行 PCR 扩增, 空载体 PCR 产物大小为 185bp (泳道 1), 阳性克隆 PCR 产物大小为 243bp (泳道 2、3、4) (B) shRNA 慢病毒载体测序图。

(A) Result of PCR analysis: the size of PCR products with empty vector as template was 185bp, while the size of PCR products with shRNA recombinant vector as template was 243 bp. (Lane M: Marker; 1: PLKO.puro vector; 2-4: PLKO.1-puro-Tert); (B) Result of sequencing.

2.2 感染人类胚胎干细胞

嘌呤霉素筛选人类胚胎干细胞 24 h 后 ,对照 wt 组胚胎干细胞全部死亡 ,ShTert 和 vector 组均有约 30%细胞存活 ,继续培养得到端粒酶稳定干扰的人类胚胎干细胞系(图 2)。

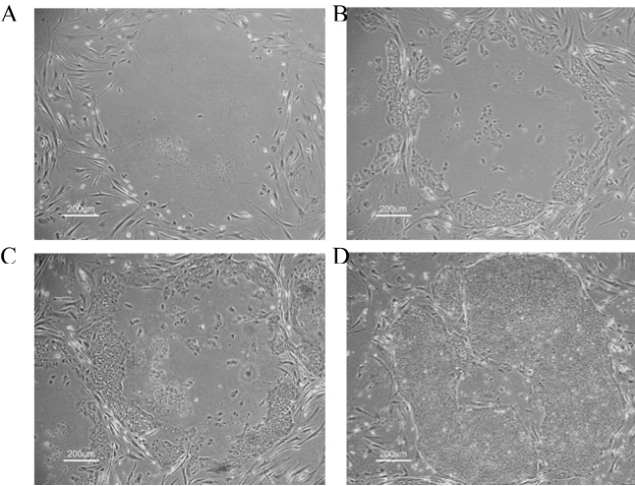


图 2 嘌呤霉素筛选人类胚胎干细胞图

Fig.2 lentivirus infected human embryonic stem cells.

(A)筛选 24 h 后 ,对照 wt 组胚胎干细胞全部死亡 (B)筛选 24 h 后 ,空载体 vector 组约 30%细胞存活 (C)筛选 24 h 后 ,ShTert 组约 30%细胞存活 (D)筛选 4 天后 ,ShTert 组细胞长满。

(A) wildtype ES cells under Neomycin selection medium for 24 hours; (B) vector control group under Neomycin selection medium for 24 hours; (C) ShTert group under Neomycin selection medium for 24 hours; (D) ShTert group grown in Neomycin selection medium up to 4 days.

2.3 shRNA 干扰效率的检测

收集 ShTert 组、vector 组和 wt 组细胞 ,抽提总 RNA 逆转录得到的 cDNA 进行 realtime-PCR 分析 ,经检测 ShTert 组端粒酶 mRNA 表达较 vector 和 wt 组明显降低 ,vector 组和 wt 组之间无明显差异。

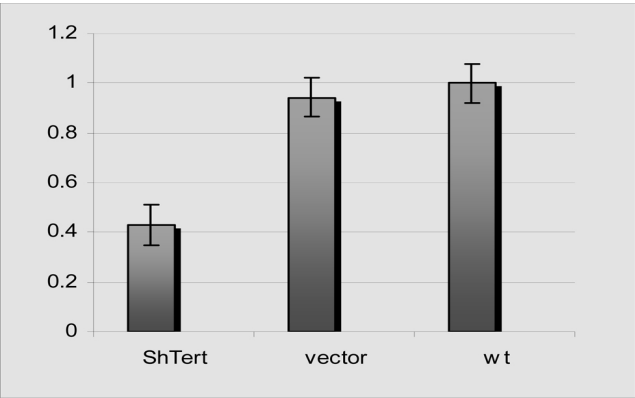


图 3 Real-time PCR 检测端粒酶基因干扰效率

Fig.3 Real-time PCR analysis of the Tert gene knock down efficiency.

3 讨论

胚胎干细胞具有高活性的端粒酶 ,得以维持不断生长和繁殖。在成体细胞和成体干细胞中 ,端粒酶的活性都不足以在细胞复制和组织更新的周期中维持端粒的长度^[2]。端粒长度的

逐渐缩短导致其结构的不稳定 ,最终激活 DNA 损伤修复的程序 ,细胞走向衰老或者凋亡^[3]。依靠基因敲除和过表达的小鼠模型能够帮助我们理解端粒长度和端粒酶活性在胚胎干细胞中行为中所扮演的角色 ,在端粒酶缺失的小鼠中出现干细胞功能紊乱 ,组织器官不成熟失去更新能力 ,早衰等。而端粒酶的过表达则足以在体外维持细胞的永生 ,端粒酶过表达的小鼠则有表现出明显的长寿和相对较低的癌症发生。在过去的几年中 ,端粒酶在干细胞中所扮演的角色开始得到关注 ,在端粒酶缺失小鼠中 ,端粒缩短已经证实会导致皮肤干细胞功能的缺失 ,具体地说就是皮肤干细胞在有丝分裂过程中增殖和迁移出毛囊腔的能力在 G1 代 Terc-/- 小鼠中由于端粒小部分的丢失而减弱 ,在 G3 代的 Terc-/- 小鼠中由于端粒长度的大部分丢失而基本丧失迁移能力^[4]。除此之外 ,其他的一些细胞更新很快的组织 ,比如骨髓 ,肾脏 ,睾丸在端粒酶缺失 ,端粒缩短的小鼠中都表现出器官的萎缩^[5,6]。有观点认为 ,端粒酶在干细胞中的表达可以被看作是一种干细胞因子。综上所述 ,端粒和端粒酶在维持干细胞功能方面有着举足轻重的作用 ,目前 ,端粒和端粒酶在干细胞中的精确作用还未被了解 ,新的领域需要我们继续探索 ,同样 ,对于胚胎干细胞端粒作用的研究还处于起步阶段 ,进一步研究 ,也将有助于我们对于衰老和癌症发生的理解 ,建立端粒酶表达缺陷的人类胚胎干细胞系将有助于我们对端粒酶在胚胎干细胞分化 ,至瘤 ,维持全能性等多方面的研究。在我们的实验中 ,shRNA 序列被成功构建入慢病毒载体系统并且对胚胎干细胞进行感染。经过抗性筛选 ,慢病毒能有效地感染人类胚胎干细胞系 ,毒性小 ,并能建立稳定细胞系。实时定量结果证明 ,受到干扰的胚胎干细胞系端粒酶 mRNA 水平明显下降 ,显示我们的干扰达到了预期的效果。综上所述 ,以慢病毒载体为背景的 mRNA 干扰系统能够对于人类胚胎干细胞进行感染并且毒性小 ,具有良好的感染效果 ,干扰片段在胚胎干细胞中能够有效地发挥作用。对于难以进行基因修改操作和导入外源基因困难的人类胚胎干细胞 ,使用慢病毒系统实现调控是行之有效的方法之一。我们所建立的端粒酶表达受干扰的胚胎干细胞系将为我们进一步研究端粒酶对于胚胎干细胞维持多能性和基因组的稳定方向打下了良好的基础。

参考文献(References)

[1] Chan SR, Blackburn EH, Telomeres and telomerase [B]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2004, 359: 109-121

[2] Collins K, Mitchell JR, Telomerase in the human organism [J]. Oncogene 2002, 21: 564-579

[3] d'Adda di Fagnana F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP, A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence[J]. Nature 2003, 426: 194-198

[4] Flores I, Cayuela ML, Blasco MA: Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior [J]. Science 2005, 309: 1253-1256

[5] Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW II, Greider CW, DePinho RA: Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs[J]. Nature 1998, 392:569-574

[6] Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, DePinho RA: Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice[J]. Cell 1999, 96:701-712