

## 核糖体蛋白 RPS3a 腺病毒载体的构建和体外表达

吴红媛<sup>1,2</sup>, 厉建中<sup>2</sup>, 张俊平<sup>2</sup> (1. 福建中医药大学, 福建 福州, 350122; 2. 第二军医大学药学院生化药理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 构建核糖体蛋白 RPS3a 的腺病毒表达载体, 并进一步验证其在细胞中的表达。方法 应用 RT-PCR 从人胚肾 HEK293 细胞的总 RNA 中反转录并扩增出 RPS3a 基因, 并将 RPS3a 亚克隆到穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中, 酶切及测序鉴定后, 再将含 RPS3a 基因的重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-RPS3a 进行 Pme I 酶线性化处理, 转化到含有骨架质粒的 BJ5183 感受态菌, 进行同源重组。鉴定后, 经 Pac I 线性化转染 HEK293 细胞, 包装重组腺病毒。病毒感染 NIH3T3 细胞, Western blot 分析 RPS3a 蛋白的表达。结果 证实 pAdTrack-CMV-RPS3a 及 pAdEas-RPS3a 质粒构建正确; Western blot 检测病毒感染的 NIH3T3 细胞总蛋白, 与 pAd-GFP 阴性对照组相比, RPS3a 蛋白表达量显著提高。结论 成功构建了能表达 RPS3a 基因的重组腺病毒载体, 为进一步研究其生物学功能奠定基础。

**[关键词]** RPS3a; 腺病毒; 构建; 表达

**[中图分类号]** R318.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0347-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.007

## Construction and expression of adenovirus expressing ribosomal protein RPS3a

WU Hong-yuan<sup>1,2</sup>, LI Jian-zhong<sup>2</sup>, ZHANG Jun-ping<sup>2</sup> (1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct the recombinant adenovirus expression vector containing ribosomal protein RPS3a and detect its expression in NIH3T3 cells. **Method** The RPS3a gene was obtained by RT-PCR, total RNA was extracted from human HEK293 cell as the template. The cDNA fragments were cloned into the shuttle vector pAdTrack-CMV. After identified by enzyme digested and DNA sequence analysis, the product pAdTrack-RPS3a was lineared by PmeI and transformed into competent E. Coli BJ5183 carrying backbone plasmid pAdEasy-1 for homologous recombination. The identified positive recombinant adenoviral plasmid was then lineared by PacI and transfected into 293 cells for packaging and amplifying. Western blotting was used to detect the expression of RPS3a protein in the NIH3T3 cells infected with adenovirus. **Results** The pAdTrack-RPS3a and pAd-RPS3a plasmids had been successfully constructed. Protein expression was markedly increased in the NIH3T3 cells infected with Ad-RPS3a compared to that with control Ad-GFP. **Conclusion** The recombinant adenovirus harboring the RPS3a gene was successfully constructed, which could provide a useful tool for further investigating its biological function.

**[Key words]** RPS3a; adenovirus; construction; expression

核糖体蛋白是核糖体的重要组成部分。近年来的研究表明,核糖体蛋白除了在蛋白合成中起重要作用外,不同的核糖体蛋白还有凋亡、DNA 修复、转录等核糖体外功能,如 RPS7 作为转录调节子,结合并调控维生素 D 受体-类视色素 X 受体的转录激活; RPS3 与 NF- $\kappa$ B P65 同二聚体和 P65-P50 异二聚体结合调控某些基因的表达,此外还具有 DNA 修复内切酶和诱导凋亡的功能; RPL11 与 Myc 结合抑制基因转录等<sup>[1]</sup>。核糖体蛋白 RPS3a 组成核糖体 40S 亚基,分子量为 29.8KD。人、大鼠和小鼠

RPS3a、TU-11、Fte-1、13T 和 nbl 基因序列显示具有同源性<sup>[2,3]</sup>。研究发现, RPS3a 也具有核糖体外功能,如 RPS3a 与 Bcl-2 共同作用抑制多聚(ADP-核糖)聚合酶活性<sup>[4]</sup>、与 EB 病毒编码的 EBNA-5 作用诱导病毒无限繁殖和激活 B 细胞<sup>[5]</sup>。为进一步研究 RPS3a 的功能,笔者采用重组腺病毒 AdEasy 系统,构建携带人 RPS3a 的重组腺病毒表达载体,并检测其在 NIH3T3 细胞中蛋白表达水平。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 人胚肾 HEK293 细胞、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 和含腺病毒骨架质粒的 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌株为本实验室保存。反转录试剂盒购自 Promega;限制性

**[基金项目]** 国家自然科学基金(91013014)。

**[作者简介]** 吴红媛(1988-),女,硕士研究生。E-mail: xingfude.women@163.com。

**[作者简介]** 张俊平。E-mail: jpzhang08@hotmail.com。

内切酶 Sal I、Hind III 和 T4 连接酶购自 Takara;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于捷瑞公司;Trizol 试剂和 lipofectamine2000 购于 Invitrogen;KOD-Plus 高保真 PCR 试剂购于 Toyobo,RPS3a 多克隆抗体购于 Abnova,引物由上海生工生物工程公司合成。

## 1.2 主要方法

**1.2.1 RT-PCR 扩增 RPS3a cDNA** Trizol 法提取人胚肾 HEK293 细胞总 RNA。在反转录反应体系中以 1 μg 总 RNA 为模板,以随机引物合成 cDNA,取 1 μl cDNA 产物为模板进行 PCR 扩增。扩增引物根据 RPS3a 序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,并分别在正义链引物 5'端加 Sal I 酶切位点,反义链 5'端加 Hind III 酶切位点,RPS3a 正义链引物:5'-GAA GTC GAC GCC ACC ATG GCG GTT GGC AAG AAC A-3';反义链引物:5'-GAT AAG CTT AAA CAG ATT CTT GGA CTG G-3'。PCR 扩增条件:94 ℃热启动 4 min 后,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 50 s,30 个循环,72 ℃反应 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.2 穿梭质粒 pAdTrack-CMV-RPS3a 的构建与鉴定** 采用限制性内切酶 Hind III 和 Sal I 酶切 PCR 产物和 pAd Track-CMV 载体,酶切完全后,进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,并胶回收 pAd Track-CMV 载体质粒和 RPS3a,用 T4 连接酶 16 ℃连接过夜,将连接产物转化感受态 DH5α 菌,涂布于卡那霉素抗性 LB 平板上,37 ℃过夜。挑取单克隆分别在 LB 中 37 ℃培养,用质粒小抽试剂盒提取质粒并酶切鉴定,阳性克隆进一步测序鉴定。

**1.2.3 重组腺病毒载体 pAdEasy-RPS3a 的构建** pAdTrack-CMV-RPS3a 质粒经 Pme I 酶切线性化后,转化含有骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌。在卡那霉素 LB 培养基平板筛选转化菌,然后挑选形态较小的克隆,接种在卡那霉素 (30 mg/ml) LB 培养基上,37 ℃培养过夜。抽提质粒,经 Pac I 酶切鉴定正确后,再将质粒转化 DH5α 感受态细胞进行稳定扩增,以大量制备重组腺病毒质粒。

**1.2.4 重组腺病毒 pAd-RPS3a 的包装与扩增** 重组腺病毒质粒经 Pac I 酶切完全后,酚-氯仿-异戊醇 (25 : 24 : 1) 抽提,乙醇沉淀纯化后,溶于无菌蒸馏水中。

HEK293 细胞 ( $1 \times 10^6$ ) 接种于 6 孔板中,培养过夜达 70% 左右融合度时,按照 Lipofectamine 2000 说明书将上述酶切完全的重组腺病毒质粒 pAd-RPS3a 和对照质粒 pAd-GFP 转染细胞包装病毒。转染 48 h 后,荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。待细胞大部分感染并从底部脱落时,收集细胞及培养液,液氮/37

℃反复冻融 3 次,离心收集上清于 -80 ℃保存。取部分上清继续感染 HEK293 细胞,扩增病毒。

**1.2.5 Western blot 检测重组腺病毒 Ad-RPS3a 的表达** 用 Ad-RPS3a 和 Ad-GFP 分别转染 NIH3T3 细胞,72 h 后收集细胞,并用 Western 及 IP 裂解液 (Beyotime 公司) 裂解细胞提取细胞蛋白,BCA 法进行蛋白定量。样品加入  $5 \times$  Protein loading Dye,沸水浴 5 min 后,经 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白用电转仪 (Bio-Rad 公司) 转移至硝酸纤维素 (Nitrocellulose, NC) 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,尔后 RPS3a 多克隆抗体 (1 : 1000) 和 β-actin (1 : 1000) 经 4 ℃孵育过夜,再加入带有荧光标记二抗山羊抗兔/鼠 (1 : 5000) 于室温孵育 1 h,  $1 \times$  PBST (含 0.1% Tween-20) 洗涤后,Odyssey 激光成像系统进行扫描。

## 2 结果

**2.1 PCR 扩增 RPS3a** PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见大小为 800 bp 左右的 DNA 片段 (图 1),大小与预期 RPS3a,795 bp 相一致。

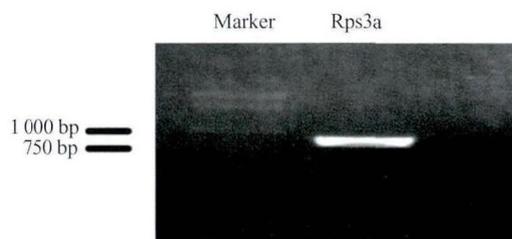


图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 RPS3a PCR 产物

**2.2 穿梭质粒 pAdTrack-CMV-RPS3a 的鉴定** 穿梭质粒 pAdTrack-CMV 与目的片段 RPS3a 连接后,转化 DH5α 感受态细胞,质粒用 Sal I 和 Hind III 双酶切,得到 9 kb 左右和 800 bp 左右的片段 (图 2),与预期结果一致。阳性克隆进一步测序鉴定,其序列正确 (如图 3)。

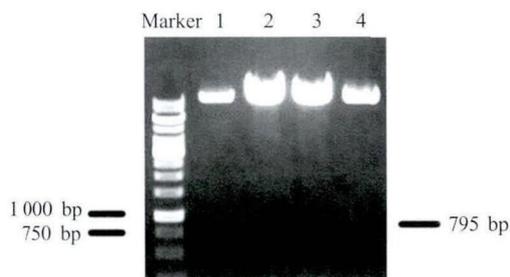


图 2 穿梭质粒 pAdTrack-CMV-RPS3a 的 Sal I/Hind III 双酶切鉴定

Query 1	TTTAGCACCTGTCTCGTCCCCAGTGGCTTTCCAGAACTACTGCCTTCACCATGAAGCTC	60
Sbjct 747	TTTAGCACCTGTCTCGTCCCCAGTGGCTTTCCAGAACTACTGCCTTCACCATGAAGCTC	688
Query 61	CATGAGCTTTCCCAATTCAAACCTTGGGCTTCTTCAGCATTITTTACTTTTTCTAACGAAGAC	120
Sbjct 687	CATGAGCTTTCCCAATTCAAACCTTGGGCTTCTTCAGCATTITTTACTTTTTCTAACGAAGAC	628
Query 121	ATCATGGAGAGGATAAATAGATTGGCAAGCCTTTCTATGTCTTTCCAATGCTGTCTGG	180
Sbjct 627	ATCATGGAGAGGATAAATAGATTGGCAAGCCTTTCTATGTCTTTCCAATGCTGTCTGG	568
Query 181	AATCAATTTATTGACCACTTCTTTCAAGTCATTGTCTGCACCTCTCGGGTCATGATTC	240
Sbjct 567	AATCAATTTATTGACCACTTCTTTCAAGTCATTGTCTGCACCTCTCGGGTCATGATTC	508
Query 241	CATCATCTTCTTCCGGATTTGGCGGACCTGTTGGTGCTGAGCATAAGAGGTCTTCCGTAT	300
Sbjct 507	CATCATCTTCTTCCGGATTTGGCGGACCTGTTGGTGCTGAGCATAAGAGGTCTTCCGTAT	440
Query 301	CTGATTGTTGCGTTTTTTAGTAAAACCAACACAGAACAGACGAAGCAAGTAACCATCGGT	360
Sbjct 447	CTGATTGTTGCGTTTTTTAGTAAAACCAACACAGAACAGACGAAGCAAGTAACCATCGGT	388
Query 361	AGTCTTGACATCAACGTGAGCTTCAATCATTGTCTGCCATTTTTTGACCATGGAACACAT	420
Sbjct 387	AGTCTTGACATCAACGTGAGCTTCAATCATTGTCTGCCATTTTTTGACCATGGAACACAT	420
Query 421	TTTGTACGGGTAAGATCCATGCCATGGAAGTTAGTCAGGCAGTTTTTACCCTGAACATC	480
Sbjct 327	TTTGTACGGGTAAGATCCATGCCATGGAAGTTAGTCAGGCAGTTTTTACCCTGAACATC	480
Query 481	TTCAGTAATCAGCTTGAATTTTTCTAAATGCAACTTCATCATTCTGCAAATCAGCAAGACT	268
Sbjct 267	TTCAGTAATCAGCTTGAATTTTTCTAAATGCAACTTCATCATTCTGCAAATCAGCAAGACT	540
Query 541	CACITCAAACACACGACCCTTGAGACCATCAGATGCAATTTGGTTCCTTGGGTCCTGGT	208
Sbjct 207	CACITCAAACACACGACCCTTGAGACCATCAGATGCAATTTGGTTCCTTGGGTCCTGGT	600
Query 601	GACGAGCGTCTTTCCAATATTTCTTATATTGAACATAGCAGGTGCTTTCACATCATACCA	148
Sbjct 147	GACGAGCGTCTTTCCAATATTTCTTATATTGAACATAGCAGGTGCTTTCACATCATACCA	660
Query 661	ATCTTTCTTAGAAAATGGATCAACCACCTTCTTCTTGGCTCCCTTTTTGCCGCCTTTCGT	88
Sbjct 87	ATCTTTCTTAGAAAATGGATCAACCACCTTCTTCTTGGCTCCCTTTTTGCCGCCTTTCGT	720
Query 721	AAGGCGCTTGTCTTGCCAACCGCCAT	747
Sbjct 27	AAGGCGCTTGTCTTGCCAACCGCCAT	1
Query 61	AGGCAGTAGTTCTGGAAAAGCCACTGGGGACGAGACAGGTGCTAAAGTTGAACGAGCTGA	120
Sbjct 83	AGGCAGTAGTTCTGGAAAAGCCACTGGGGACGAGACAGGTGCTAAAGTTGAACGAGCTGA	142
Query 121	TGGATATGAACCACCAGTCCAAGAATCTGTTTAA	154
Sbjct 143	TGGATATGAACCACCAGTCCAAGAATCTGTTTAA	176

图 3 酶切鉴定后的阳性克隆测序结果

2.3 重组腺病毒 pAd-RPS3a 载体的鉴定 重组穿梭质粒经酶切线性化转化 BJ5183 感受态菌,卡那霉素培养基平板长出菌落,挑取克隆,抽提质粒用 Pac I 酶切,电泳结果有 30 kb 和 3 kb 两个片段(图 4),与预期结果相符,说明穿梭载体和骨架质粒同源重组成功。

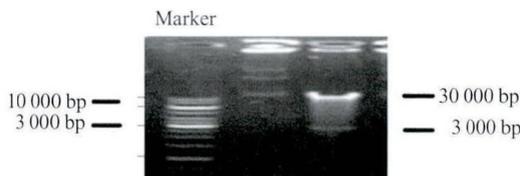


图 4 重组腺病毒载体 pAd-RPS3a Pac I 酶切鉴定结果

目的基因的重组腺病毒,重组腺病毒载体的图谱如图 5 所示。

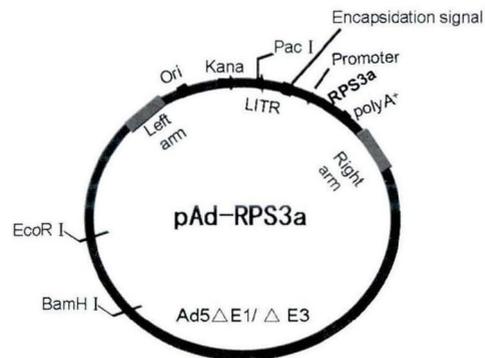


图 5 重组腺病毒载体 pAd-RPS3a 图谱

2.4 重组腺病毒 pAd-RPS3a 载体的图谱 AdEasy™ 重组腺病毒系统利用细菌内高度有效的同源重组机制及抗生素筛选,短期内便可获得表达外源

2.5 Western blot 检测 NIH3T3 细胞 RPS3a 蛋白表达 Western blot 分析显示,与对照组 Ad-GFP 相比,NIH3T3 细胞感染重组腺病毒 Ad-RPS3a 后 RPS3a

蛋白水平显著提高(图6)。

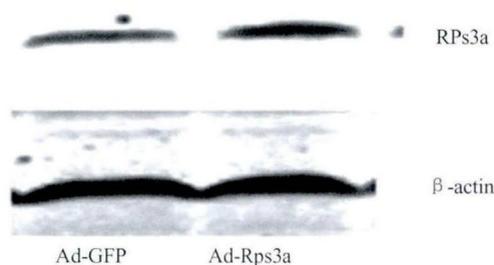


图6 Western blot 检测 RPS3a 在 NIH3T3 细胞的表达

### 3 讨论

核糖体蛋白 S3a 是由位于染色体 4 上的单基因编码<sup>[6]</sup>。研究表明核糖体蛋白质 S3a/nbl 与凋亡密切相关<sup>[7,8]</sup>。Song 等研究结果发现, RPS3a 与 Bcl-2 相互作用抑制 PARP 活性从而阻止细胞凋亡, 但当 S3a 缺失时, Bcl-2 不能抑制 PARP 活性影响凋亡<sup>[4]</sup>。另有研究发现, 放线菌素 D 可以引起持续高表达 nbl 的 HL-60 细胞的凋亡, 但不能促进低表达量 HepG2 细胞的凋亡<sup>[9]</sup>。此外发现用全反式维甲酸促 HL-60 细胞分化, 再用放线菌素 D 处理, 结果抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>。用低表达 RPS3a 的 NIH3T3 细胞建立 RPS3a 高表达稳转细胞系, 结果发现 RPS3a 高表达促进 NIH3T3 细胞成瘤, 而抑制升高的 RPS3a 表达则促进细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。但是 RPS3a 是否还有其他的核糖体外功能有待研究。

本研究在克隆人 RPS3a 基因基础上, 将其克隆至重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中, 再转化入含骨架质粒的 BJ5183 感受态菌进行同源重组, 成功构建了 pAd-RPS3a 的腺病毒表达载体。而后转染 HEK293 细胞, 进行腺病毒载体的包装与扩增, 并转染 NIH3T3 细胞验证。由于穿梭载体 pAdTrack-CMV 自身携带绿色荧光蛋白基因, 可重组至腺病毒骨架质粒 pAdEasy 中表达, 因此可通过观察 GFP 表达情况对病毒转染效率进行观察。本研究证明重组 RPS3a 腺病毒能成功在 NIH3T3 细胞中高表达, 该结果为进一步研究 RPS3a 功能提供了必要的物质

基础。

### 【参考文献】

[1] Lindstrom MS. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(2):167.

[2] Lecomte F, Szpirer J, Szpirer C. The S3a ribosomal protein gene is identical to the Fte-1 (v-fos transformation effector) gene and the TNF- $\alpha$ -induced TU-11 gene, and its transcript level is altered in transformed and tumor cells [J]. *Gene*, 1997, 186(2):271.

[3] Naora H, Nishida T, Shindo Y, et al. Antisense sequences of the nbl gene induce apoptosis in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60 [J]. *Leukemia*, 1998, 12(4):532.

[4] Song D, Sakamoto S, Taniguchi T. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity by Bcl-2 in association with the ribosomal protein S3a [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(3):929.

[5] Kashuba E, Yurchenko M, Szirak K, et al. Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 binds to Epstein-Barr virus-induced Fte1/S3a protein [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 303(1):47.

[6] Nolte D, Taimor G, Kalf-Suske M, et al. The human S3a ribosomal protein: sequence, location and cell-free transcription of the functional gene [J]. *Gene* 1996, 169(2):179.

[7] 孙阿萍, 马洪星, 郑寒松, 等. 细胞凋亡过程中核糖体蛋白 S3a 水平变化的研究(三) [J]. *黑龙江医药科学*, 2002, 25(1):1.

[8] Naora H, Nishida T, Shindo Y, et al. Association of nbl gene expression and glucocorticoid-induced apoptosis in mouse thymus in vivo [J]. *Immunology*, 1995, 85(1):6.

[9] Naora H, Nishida T, Shindo Y, et al. Constitutively enhanced nbl expression is associated with the induction of internucleosomal DNA cleavage by actinomycin D [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224(1):258.

[10] Russell L, Naora H, Naora H. Down-regulated RPS3a/nbl Expression during retinoid-induced differentiation of HL-60 cells: A close association with diminished susceptibility to actinomycin D-stimulated apoptosis [J]. *Cell Struct Funct*, 2000, 25(2):103.

[11] Naora H, Takai L, Adachi M. Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(3):741.

[收稿日期] 2012-12-31

[修回日期] 2013-05-20

(上接第 333 页)

[31] Yang Q, Botto LD, Erickson JD, et al. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002 [J]. *Circulation*, 2006, 113(10):1335.

[32] Wang X, Qin X, Demirtas H, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis [J]. *Lancet*, 2007;369(9576):1876.

[33] Spence JD. Homocysteine-lowering therapy: a role in stroke prevention [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(9):830.

[34] Antoniadis C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, et al. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(1):6.

[收稿日期] 2012-12-14

[修回日期] 2013-04-08