

# piggyBac转座子调节pPiggyBac-Rb质粒的构建\*★○

潘雪珂<sup>1</sup>, 陈朝<sup>1</sup>, 田思佳<sup>1</sup>, Joseph M. Kaminski<sup>2</sup>○, 余克明<sup>1</sup>, 庄菁<sup>1</sup>

## Expression of exogenous Rb gene mediated by piggyBac transposon in retinoblastoma cells

Pan Xue-ke<sup>1</sup>, Chen Zhao<sup>1</sup>, Tian Si-jia<sup>1</sup>, Joseph M. Kaminski<sup>2</sup>○, Yu Ke-ming<sup>1</sup>, Zhuang Jing<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The introduction of exogenous Rb gene into retinoblastoma is an effective way to inhibit growth of the tumor. piggyBac transposon as a vector is safe and highly efficient, which is a potential vector on gene therapy.

**OBJECTIVE:** To explore the transfection efficiency and its effect on inhibiting retinoblastoma by transfecting human retinoblastoma cell line SO-RB50 with an exogenous Rb gene expression system mediated by piggyBac transposon.

**METHODS:** pPiggyBac-Rb plasmid that contains a piggyBac transposon sequence and express normal RB gene was constructed and used to transfect SO-RB50 cells alone or with pPiggyBac-helper. Coomassie brilliant blue staining, quantitative real-time PCR and immunofluorescence were adopted to evaluate the transfect efficiency of exogenous Rb gene mediated by piggyBac transposon. The viability of retinoblastoma cells was determined by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Transfection efficiency was the highest with help of piggyBac transposon. piggyBac transposon-mediated exogenous Rb gene integrated into genome and obtained a long-term and stable expression. It also had a remarkable inhibition effect on the viability of SO-RB50. All these indicate that piggyBac transposon is a potential vector for retinoblastoma gene therapy.

Pan XK, Chen Z, Tian SJ, Kaminski JM, Yu KM, Zhuang J. Expression of exogenous Rb gene mediated by piggyBac transposon in retinoblastoma cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(20): 3755-3758.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 外源性 Rb 基因的导入是抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖的有效途径, piggyBac 转座子介导的外源基因表达载体高效安全, 在基因治疗方面具有广阔的应用前景。

**目的:** 探讨 piggyBac 转座子介导的外源性 Rb 基因的转染效率及其对视网膜母细胞瘤细胞的抑制作用。

**方法:** 采用 RT-PCR 技术扩增 Rb 基因编码区 Rb cDNA, 定向插入到载体 pPiggyBac, 获得 PiggyBac 调节的 Rb 表达质粒 pPiggyBac-Rb; 通过单独转染或合并 pPiggyBac-helper 转染人视网膜母细胞瘤细胞 SO-RB50。

**结果与结论:** 考马斯亮蓝染色证明 piggyBac 转座子系统的转染效率最高, 荧光定量 PCR 以及免疫荧光实验证明其介导的目的基因 Rb 与宿主 SO-RB50 细胞基因组整合效率最高且可在细胞中长期稳定表达, MTT 实验证明经其所介导的外源性 Rb 基因表达对细胞活性影响最为显著。结果提示 piggyBac 转座子有可能成为视网膜母细胞瘤基因治疗的安全有效载体。

**关键词:** piggyBac 转座子; SO-RB50 细胞; 转染; Rb 基因; 基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.20.033

**缩略语:** RB, retinoblastoma, 视网膜母细胞瘤

潘雪珂, 陈朝, 田思佳, Joseph M. Kaminski, 余克明, 庄菁. piggyBac 转座子调节 pPiggyBac-Rb 质粒的构建[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20): 3755-3758. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

近年来, 人们发现一种新型转座子 piggyBac, 在哺乳动物细胞中, 该转座子介导的转染系统具有转染效率高的特点, 且避免了病毒载体潜在的危险性。目前研究表明视网膜母细胞瘤疾病是因视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)基因缺失或突变失活造成基因产物失活而诱导发生的<sup>[1]</sup>。基因治疗是肿瘤治疗的研究热点, 目前在视网膜母细胞瘤中已经有相关的报道<sup>[2-3]</sup>。但在基因治疗领域中, 载体的安全高效性一直是困扰研究者的难题之一<sup>[4-5]</sup>。本研究所采用的载体易纯化, 无免疫原性, 最重要的是可

携带大片段目的基因在宿主中长期表达。

本文构建了 piggyBac 转座子调节的 pPiggyBac-Rb 质粒, 该质粒必须在 pPiggyBac-helper 共同转染下, 转座子才能激活, 实验通过单独转染或合并 pPiggyBac-helper 转染视网膜母细胞瘤细胞 SO-RB50, 探讨 piggyBac 转座子调节的转染系统在 SO-RB50 细胞中的转染效率及外源性 Rb 基因对 SO-RB50 细胞活性的影响<sup>[6-7]</sup>。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞体外水平观察。

**时间及地点:** 于 2010-09/2011-06 在中山眼科中心国家重点实验室完成。

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Manoa Biosciences, Inc. Honolulu, Hawaii, 96822, USA

Pan Xue-ke★, Studying for master's degree, State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China xuekepan@163.com

Corresponding author: Yu Ke-ming, Doctor, Chief physician, State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China yukeming66@126.com

Corresponding author: Zhuang Jing, Doctor, Associate professor, State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China zhuangj@mail.sysu.edu.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30970923\*

Received: 2012-01-18  
Accepted: 2012-02-22

<sup>1</sup> 中山大学中山眼科中心, 广东省广州市 510060;  
<sup>2</sup> Manoa Biosciences, Inc. Honolulu, Hawaii, 96822, USA

潘雪珂★, 女, 1987年生, 安徽省黄山市人, 汉族, 中山大学在读硕士, 主要从事视网膜母细胞瘤基因治疗的研究。  
xuekepan@163.com

通讯作者: 余克明, 博士, 主任医师, 中山大学中山眼科中心, 广东省广州市 510060  
yukeming66@126.com

并列通讯作者: 庄菁, 博士, 副教授, 中山大学中山眼科中心, 广东省广州市 510060

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)20-03755-04

收稿日期: 2012-01-18  
修回日期: 2012-02-22  
(20120118003/M · W)

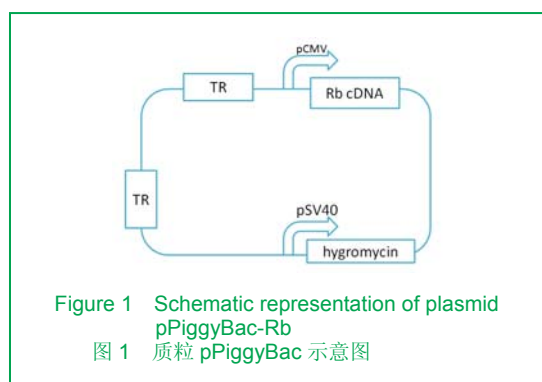
**材料:** 人视网膜母细胞瘤细胞SO-RB50由中山眼科中心病理科建系并提供, 人胚肾细胞HEK293由中山眼科中心重点实验室购买并提供, 质粒 pPiggyBac, pPiggyBac-Helper, pPiggyBac-Rb由本实验室构建保存。

#### 主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器                      | 来源                   |
|----------------------------|----------------------|
| 高糖 DMEM, 羊抗兔二抗             | 美国 Invitrogen 公司     |
| 胎牛血清                       | 杭州四季青公司              |
| 青-链霉素抗体、考马斯亮蓝、噻唑蓝          | 广州威佳生物科技有限公司         |
| FuGENE 6 转染试剂              | 美国 Roche 公司          |
| 二甲基亚砷、碘化丙啶                 | 美国 MP Biomedicals 公司 |
| 荧光定量 PCR 试剂盒, RT-PCR 试剂盒   | 宝生物工程(大连)有限公司        |
| Rb 一抗                      | 武汉博士德生物工程有限公司        |
| Axioplan 2 imaging 免疫荧光显微镜 | 蔡司公司                 |
| ABI PRISM 7000 荧光定量 PCR 仪  | 美国 ABI 公司            |

#### 实验方法:

**质粒pPiggyBac-Rb的构建:** 通过RT-PCR反应得到Rb cDNA片段, 将此片段用Kpn I及Xho I酶切, 将酶切后片段与pcDNA3.1进行连接, 得到质粒pcDNA3.1-Rb。将此质粒用Nru I酶切后的产物与质粒pPiggyBac经Kas I及ΔBst I酶切后的产物进行连接得到质粒pPiggyBac-Rb。质粒结构见图1。



**细胞培养:** 视网膜母细胞瘤细胞SO-RB50及人胚肾细胞HEK293用含体积分数为10%胎牛血清及1%青-链霉素的高糖DMEM培养液, 置37℃含体积分数为5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

**细胞转染:** 选取对数生长期细胞SO-RB50接种至6孔板, 调整细胞浓度至每孔 $1 \times 10^5 L^{-1}$ , 培养18 h后进行转染。实验分3组, 为保证每组DNA量的一致性, 第1组转染质粒pPiggyBac及

pcDNA3.1, 各1 μg; 第2组转染质粒pcDNA3.1及质粒pPiggyBac-Rb, 各1 μg; 第3组转染质粒 pPiggyBac-Rb 及 pPiggyBac-Helper, 各1 μg。转染试剂FuGENE6: DNA为3:1, 在94 μL无血清培养液中加入6 μL FuGENE6, 每组加入总DNA量为2 μg, 混匀后加入细胞转染。48 h后加入Hygromycine (500 mg/L)进行筛选。对各组转染后经Hygromycine筛选的SO-RB50细胞进行观察照相且进行考马斯亮蓝染色对活细胞进行计数。

**荧光定量PCR:** Hygromycine筛选后, 提取转染后各组SO-RB50细胞的DNA进行荧光定量PCR。PCR扩增反应总体积20 μL, 取2×SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL, 上下游引物各0.4 μL, Dye 0.4 μL, 模板DNA 1.2 μL, 加水至20 μL。引物序列, Copy-1: 5'-TTT TCT GGA TTC ATC GAC TGT G-3', Copy-2: 5'-AGA ACT CGT CAA GAA GGC GAT A-3'。引物Copy-1及Copy-2之间的扩增片段在质粒pPiggyBac-Rb启动子及Rb cDNA之间, 通过此片段的扩增可确定外源性Rb基因整合至细胞基因组。以RnaseP<sup>[8]</sup>为内参, RnaseP是一种核糖核酸酶, 单拷贝存在于细胞核中, 常用来作为DNA荧光定量PCR实验的内参, 其上游引物序列: 5'-CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG-3', 下游引物序列: 5'-TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG-3'。反应条件: 95℃预变性3 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 40个循环。扩增在机器上进行。在每个循环的延伸阶段收集荧光信号, 将检测的临界点设定在PCR扩增过程中荧光信号由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环数值(即CT值), 记录其数值并得到相应的扩增曲线。

**免疫荧光:** 将转染后经Hygromycine筛选的各组SO-RB50细胞混悬液均匀涂在防脱载玻片上, 甲醇固定20 min, 山羊血清封闭30 min, 加入一抗Rb1(浓度1:100), 阴性对照组以PBS代替一抗, 4℃过夜孵育。洗去未特异结合一抗, 避光加入羊抗兔二抗(浓度1:500), 室温孵育1 h, 洗去未特异结合二抗, 孵育DAPI, 室温10 min, 清水洗去多余DAPI, 加入抗荧光淬灭剂封固。在荧光显微镜下观察。

**MTT检测细胞活性:** 取各组转染后经Hygromycine筛选的SO-RB50细胞, 以每孔500个细胞数接种至48孔板, 每组设3个复孔, 培养24 h。每孔加入噻唑蓝(5 g/L) 50 μL, 继续培养4 h后终止培养, 去培养液后每孔加入200 μL 二

甲基亚砷, 置摇床上低速振荡10 min, 在酶标仪上检测波长490 nm处的各组吸光度值。

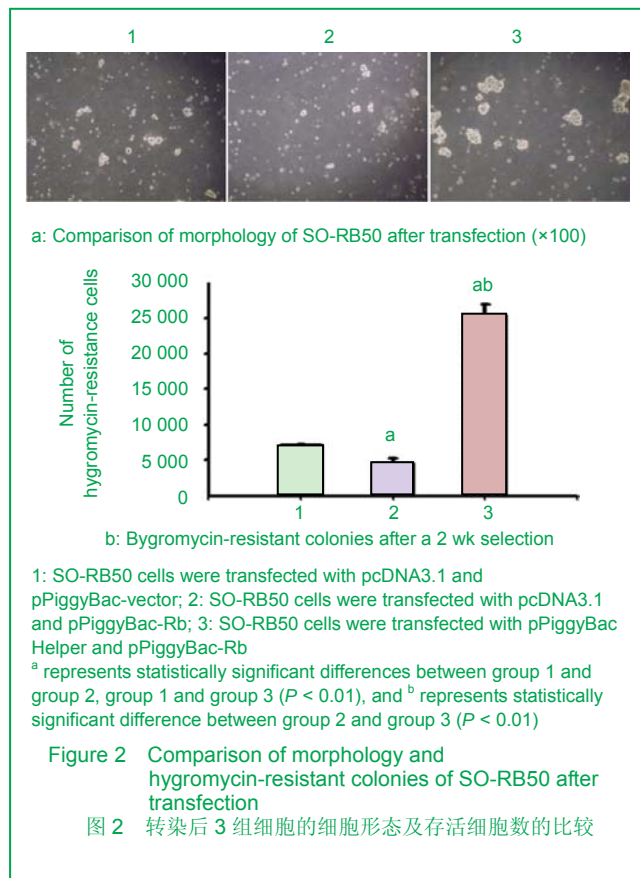
**主要观察指标:** 应用转座子技术将外源性Rb基因转染至SO-RB50细胞, 通过观察转染后细胞克隆数, 生长状态, 细胞活性及外源性Rb的表达情况来证明piggyBac转座子的高效安全性。

**统计学分析:** 所有实验均重复3次, 由第一作者采用SPSS 11.5软件分析, 数据记录用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据进行t检验(两组之间比较)和单因素方差分析(ANOVA, 3组之间比较), 以 $P < 0.01$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

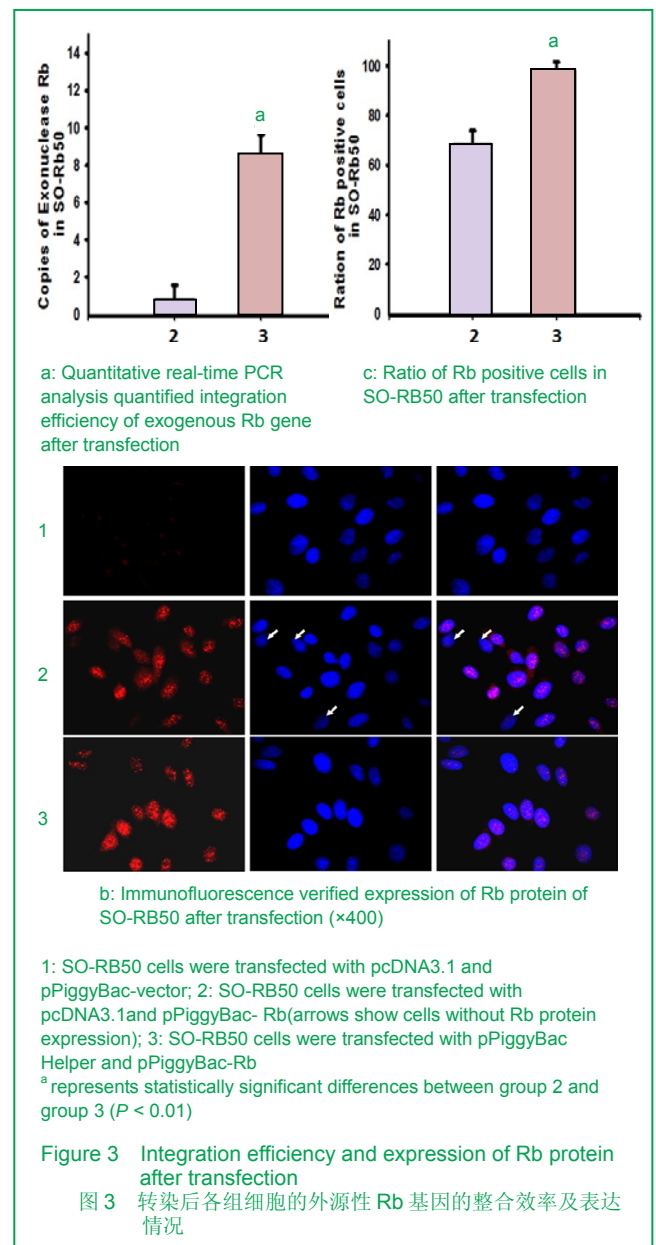
**2.1 转染后各组细胞经筛选后的细胞状态及活细胞克隆数** 从转染后细胞的照相结果可以得出第3组细胞数最多, 第2组细胞数最少, 而第1组的细胞数介于两者之间, 见图2a。

转染后各组SO-RB50细胞经Hygromycine筛选后, 用考马斯亮蓝对活细胞进行染色, 计数活细胞数。第1组的存活细胞数为7 090个, 第2组的存活细胞数为4 566个, 第3组的存活细胞数(即共转染pPiggyBac-Helper, 转座子被激活)为25 500个。经统计学分析后, 第1组与第2组, 第1组与第3组以及第2组与第3组之间的存活细胞数差异均具有显著性意义( $P < 0.01$ ), 见图2b。

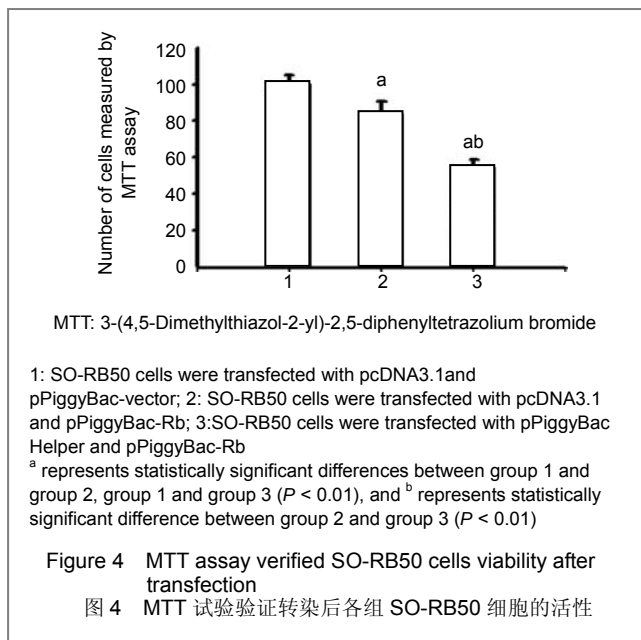


**2.2 转染后各组细胞的外源性Rb基因的整合效率及表达情况** 提取Hygromycine筛选后的各组SO-RB50细胞总DNA, 将引物设在质粒pPiggyBac-Rb的启动子及Rb cDNA之间, 以 RnaseP为内参, 采用荧光定量PCR的方法, 定量检测外源性Rb基因在细胞内的整合效率, 结果见图3a, 第3组细胞染色体中的目的片段拷贝数是第2组的10.8倍。经统计学分析, 两组目的片段拷贝数差异具有显著性意义( $P < 0.01$ )。

对各组细胞进行免疫荧光实验, 进一步确认Rb蛋白的表达情况。结果见图3b, 第3组所有具有Hygromycine抗性的细胞均为Rb蛋白表达细胞; 第2组仅有68.9%具有Hygromycine抗性的细胞表达Rb蛋白, 白色箭头表示该细胞具有Hygromycine抗性, 但Rb蛋白表达为阴性。图3c是根据细胞计数获得的柱形图, 经统计学分析, 第2组与第3组Rb蛋白表达量的差异具有显著性意义( $P < 0.01$ )。



**2.3 外源性Rb基因对细胞活性及生长的影响** 第3组转染后的细胞活性较第1组降低了5.8倍, 第2组细胞的活性则介于两者之间。经统计学分析后, 第2组与第1组, 第3组与第1组以及第2组与第3组之间细胞活性差异均具有显著性意义( $P < 0.01$ ), 见图4。



### 3 讨论

一直以来, 转座子因其在哺乳动物细胞中转染效率极低使其在这方面的应用受到限制, 而piggyBac转座子的出现使得转座子在哺乳动物细胞的应用成为可能<sup>[9]</sup>。Wu等<sup>[10]</sup>将piggyBac转座子与SB, Mos1, Tol2转座子做了系统的比较, 证明piggyBac转座子的转染整合效率高与其他3种转座子。康玉等<sup>[11]</sup>也证明piggyBac转座子可介导HSV-tk基因在不同妇科肿瘤细胞中得到稳定长期的表达。因此, 作者以piggyBac转座子系统作为将外源性Rb基因导入视网膜母细胞瘤细胞的载体, 通过实验证明了piggyBac转座子的高效性及其介导的外源性Rb基因在视网膜母细胞瘤细胞SO-RB50中可得到长期稳定表达, 为视网膜母细胞瘤的基因治疗寻找一种安全高效的载体。

对转染后经药物筛选存活细胞的考马斯亮蓝染色实验发现第3组细胞(即共转染pPiggyBac-Helper, 转座子被激活)具有Hygromycine抗性的细胞数明显高于第1组及第2组, 说明第3组的转染效率高于1, 2组, 由此可以得出piggyBac转座子介导的转染的高效性。结果同时表明, 第2组的细胞存活数却小于第1组, 这可能是由于外源性Rb基因转入后对细胞生长产生影响, 导致其细胞存活数反而小于第1组。

荧光定量PCR实验证明通过piggyBac转座子系统介导的外源基因可高效整合至宿主细胞基因组。免疫荧

光结果则证明了piggyBac转座子介导转入的目的基因可得到长期稳定的表达。国内张晓玮等<sup>[12]</sup>曾以脂质体Dosper介导Rb基因转染至裸鼠眼玻璃体腔RB移植瘤模型, 发现Rb蛋白的表达在4 d以后开始下降, 至20 d时, Rb蛋白的表达转为阴性, 这说明在介导外源性基因长期表达方面PB转座子优于脂质体载体。

为了验证外源性Rb基因的表达对细胞产生的影响, MTT实验结果显示, 经piggyBac转座子系统介导的外源性Rb基因转入后细胞活性与其他两组相比明显降低。陈大年等<sup>[13]</sup>指出外源性Rb基因转入后对肿瘤的抑制作用与Rb蛋白的表达关系密切, 并且脂质体介导的外源性Rb基因不能得到长期表达导致转染后外源性Rb基因对肿瘤生长随时间延长而越来越弱。而本实验结果显示piggyBac转座子却能介导外源性Rb基因长期表达, 因而可对细胞生长产生长期影响。

### 4 参考文献

- [1] Ren RJ, Li B, Yanke Xinjinzhan. 2003;23(2): 131-133. 任若瑾, 李彬. 视网膜母细胞瘤分子生物学研究进展[J]. 眼科新进展, 2003, 23(2): 131-133.
- [2] Chaum E, Hatton MP. Gene therapy for genetic and acquired retinal diseases. Surv Ophthalmol. 2002;47(5):449-469.
- [3] Smith AJ, Bainbridge JW, Ali RR. Prospects for retinal gene replacement therapy. Trends Genet. 2009;25(4):156-165.
- [4] Kumar-Singh R. Barriers for retinal gene therapy: Separating fact from fiction. Vision Res. 2008; 48(16): 1671-1680.
- [5] Li YW, Yao YB, Wan HS. Zhongguo Feiai Zazhi. 2008;11(6): 816-820. 李永文, 姚毅冰, 万海粟. “睡美人”转座子及其在肿瘤研究中的应用[J]. 中国肺癌杂志, 2008;11(6):816-820.
- [6] Ding S, Wu X, Li G, et al. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. Cell. 2005;122(3): 473-483.
- [7] Nakanishi H, Higuchi Y, Kawakami S, et al. piggyBac transposon-mediated long-term gene expression in mice. Mol Ther. 2010;18(4):707-714.
- [8] Zhuang J, Jiang G, Willers H, et al. Exonuclease function of human Mre11 promotes deletional nonhomologous end joining. J Biol Chem. 2009;284(44):30565-30573.
- [9] Feschotte C. The piggyBac transposon holds promise for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(41): 14981-14982.
- [10] Wu SC, Meir YJ, Coates CJ, et al. piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(41):15008-15013.
- [11] Kang Y, Sun QW, Yu WB, et al. Zhonghua Fuchanke Zazhi. 2010; 45(4): 292-297. 康玉, 孙庆文, 余文博, 等. 转座子piggyBac介导的HSV-tk基因在妇科恶性肿瘤细胞中长期稳定表达的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(4): 292-297.
- [12] Zhang XW, Chen DN, Luo CR, Yanke Yanjiu. 2002; 20(1): 23-26. 张晓玮, 陈大年, 罗成仁. 基因诱导视网膜母细胞瘤移植瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 眼科研究, 2002, 20(1): 23-26.
- [13] Chen DN, Zhang XW, Luo CR. Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi. 1999;16(4): 211-215. 陈大年, 张晓玮, 罗成仁. 视网膜母细胞瘤基因治疗的实验研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(4): 211-215.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 国家自然科学基金面上项目(30970923)。

**作者贡献:** 第一作者参与各实验的各个过程, 其他作者参与实验实施, 均经过系统培训。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。