

人源 NOVA1 蛋白的真核表达及其抗低氧活性鉴定

李华玲^{1,*}, 吕贝^{1,*}, 孔玲¹, 陈欣虹¹, 朱素娟²

1 扬州大学 医学院 生物化学教研室, 江苏 扬州 225001

2 扬州大学 生技学院 生物化学教研室, 江苏 扬州 225009

李华玲, 吕贝, 孔玲, 等. 人源 NOVA1 蛋白的真核表达及其抗低氧活性鉴定. 生物工程学报, 2016, 32(4): 507-517.

Li HL, Lü B, Kong L, et al. Eukaryotic expression of human NOVA1 protein and identification of its anti-hypoxia activity. Chin J Biotech, 2016, 32(4): 507-517.

摘要: 构建人 *NOVA1* 基因的真核表达载体 pCMV-Myc-*NOVA1*, 转染 PC12 细胞后筛选最佳转染条件, 进而结合细胞免疫组织化学研究 NOVA1 蛋白在 PC12 细胞中的表达分布, 并探究其抗低氧活性。根据 NCBI 数据库 *NOVA1* 基因序列设计上下游引物, 以 pCR4-TOPO-*NOVA1* 载体为模板采用聚合酶链式反应扩增获得 *NOVA1* 基因的全长 cDNA 编码序列, 限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切后插入 pCMV-Myc 真核表达载体, 酶切及直接测序验证后采用脂质体转染法转染入 PC12 细胞, 针对转染比例和转染时间进行优化, 进而采用实时定量 PCR 和 Western blotting 检测 NOVA1 蛋白的表达, 最后采用细胞免疫组织化学检测 NOVA1 蛋白在 PC12 细胞中的表达定位及其抗低氧活性。通过酶切和直接测序验证, 成功构建了真核表达载体 pCMV-Myc-*NOVA1*; 质粒和 Lipo2000 最佳转染比例为 1:2.5, 最佳转染时间为 72 h; 最佳转染条件下 NOVA1 基因和蛋白的表达水平显著增加, 转染 pCMV-Myc-*NOVA1* 质粒后, NOVA1 蛋白主要分布于细胞核和细胞质; 过表达 NOVA1 的 PC12 细胞增殖活性明显增加。本文采用分子克隆的方法成功构建了 *NOVA1* 基因的真核表达载体, 通过条件优化实现了高效表达并测定过表达 NOVA1 蛋白具有明显的抗低氧活性, 不仅为深入揭示 NOVA1 蛋白的作用机理提供了重要参考, 而且为 NOVA1 蛋白潜在的药物开发提供了重要技术支撑。

关键词: 人源 NOVA1 蛋白, 真核表达载体, 转染, 分布, 抗低氧

Received: July 28, 2015; **Accepted:** October 22, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81100862, 8167050872, 2015CXJ070).

Corresponding author: Sujuan Zhu. Tel: +86-514-87979022; E-mail: hlli@yzu.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (Nos. 81100862, 8167050872, 2015CXJ070) 资助。

网络出版时间: 2016-01-06

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160106.1103.001.html>

Eukaryotic expression of human NOVA1 protein and identification of its anti-hypoxia activity

Hualing Li^{1,*}, Bei Lü^{1,*}, Ling Kong¹, Xinhong Chen¹, and Sujuan Zhu²

1 Department of Biochemistry, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China

2 Department of Biochemistry, Life Science College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: The aim of this study was to construct the eukaryotic expression vector of pCMV-Myc-NOVA1 based on NOVA1 gene, and to screen the optimum expression condition after transfecting to PC12 cells, and further to explore the distribution of NOVA1 protein in PC12 cells using cell immunohistochemistry, and to identify its anti-hypoxia activity. According to the NOVA1 gene sequence of NCBI database, we designed the upstream and downstream primers, and performed polymerase chain reaction (PCR) to amplify the full length cDNA coding sequence using pCR4-TOPO-NOVA1 as a template. The products were digested by restriction endonuclease *Sal* I and *Xho* I, and conjugated to the eukaryotic expression vector of pCMV-Myc followed by validating by digestion and direct sequencing. Subsequently, the validated pCMV-Myc-NOVA1 was transfected to PC12 cells followed by optimizing of transfection ratio and transfection time, and identified by qPCR, Western blotting and cell immunohistochemistry respectively. After validation by digestion and direct sequencing, the eukaryotic expression vector of pCMV-Myc-NOVA1 was correctly constructed. The optimum transfection ratio of plasmid to Lipo 2000 was 1:2.5, and the optimum transfection time was 72 h. At the optimum transfection condition, the expression level of NOVA1 mRNA and protein significantly increased, and after transfection of pCMV-Myc-NOVA1, NOVA1 protein mainly distributed in cell nucleus and cytoplasm. After 6 h hypoxia, the cell proliferation activity was significantly increased compared to that of the control and pCMV-Myc group. Our findings provided a reference for exploring the mechanism of NOVA1, and also a technical support for potential drug development of NOVA1.

Keywords: human NOVA1 protein, eukaryotic expression vector, transfection, distribution, anti-hypoxia

NOVA 蛋白家族是一类仅表达于中枢神经系统的 RNA 结合蛋白^[1-2], 作为神经副肿瘤性眼阵挛共济失调症 (Paraneoplastic opsoclonus myoclonus ataxia, POMA) 的抗原而被最早发现, 是第一个被确认的哺乳动物神经特异性的剪接因子^[3-4]。NOVA 蛋白是序列特异性的 RNA 结合蛋白, 通过其 KH 结构域与靶基因 mRNA 前体中的 YCAY 基序结合, 调控可变剪接过程^[5-6]。目前已发现的 NOVA 家族成员主要包括 NOVA1 和 NOVA2, NOVA1 蛋白主要定位于间脑、脑干、脊髓腹侧的运动神经元, NOVA2 蛋白主要定位于大脑皮质、海马和脊髓背侧神经

元^[7]。

NOVA1 蛋白于 1993 年被 Darnell 等发现, 因其与 hnRNP K、MER1 等蛋白均有 KH 结构域, 故而最初就被推测具有调控可变剪接的作用, 且 NOVA1 在进化上非常保守, 人类、大鼠、小鼠的 NOVA1 氨基酸序列的同源性达 99%, 如此强的保守性表明 NOVA1 功能的重要性^[8]。如今, 通过生物化学、交联与免疫共沉淀、微阵列芯片及生物信息学分析, 证明 NOVA 调控神经元转录产物的可变剪接, 而且神经元转录产物编码与神经的刺激及抑制有关的突触蛋白, 这表明 NOVA 作为一种调控蛋白, 它处于复杂的

等级体系网络的顶端^[9]。目前通过多种技术方法的综合运用,对 NOVA 靶基因的研究取得很大的进展,同时也对 NOVA 的功能有了更深刻的认识,但是 NOVA 与其他疾病的关系涉及较少,因此进一步研究 NOVA 与疾病的相关性变得尤为迫切。基于此,我们采用 PCR 扩增获得了 NOVA1 基因的 cDNA 编码序列,通过分子克隆技术成功构建了真核表达载体 pCMV-Myc-NOVA1,通过转染条件优化获得了高效表达 NOVA1 蛋白的细胞株,且发现 NOVA1 蛋白主要表达于细胞质和细胞核,并具有明显的抗低氧活性,为进一步研究 NOVA1 对神经细胞的调控,特别是低氧条件下的调控奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pCR4-TOPO-NOVA1 和 pCMV-Myc 载体均购自湖南长沙赢润生物技术公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞和 cDNA 反转录试剂盒购自天根生化科技有限公司;PC12 细胞由南京师范大学郭志刚教授惠赠;质粒小提试剂盒购自美国 Qiagen 公司;凝胶回收试剂盒购自日本 OMEGA 公司;限制性核酸内切酶 *Sal* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、DL 2000 DNA marker 均购自 TaKaRa 公司;阳离子脂质体 Lipofectamine-2000 购自美国 Invitrogen 公司;RNAiso Plus 试剂和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 染料法荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司;兔抗大鼠 NOVA1 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司;多聚赖氨酸、SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 数据库 NOVA1 (NM_002515.2) 基因全长编码序列,利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物对设计(表 1),引物序列由北京英骏公司合成,-20 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 NOVA1 基因 PCR 扩增

以 pCR4-TOPO-NOVA1 载体为模板,按照如下加样量进行加样:2 μ L 10 \times PCR 缓冲液;2 μ L dNTPs;2 μ L DNA;各 1 μ L 上下游引物;0.3 μ L Ex Taq, ddH₂O 定容至 20 μ L,样品混匀后按照如下 PCR 程序进行扩增:94 °C 5 min;94 °C 45 s,56 °C 45 s,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 10 min。PCR 扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,按照凝胶回收试剂盒所述步骤进行纯化回收,回收产物-20 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 pCMV-Myc-NOVA1 真核表达载体的构建及鉴定

将上述回收的 PCR 扩增产物和 pCMV-Myc 载体采用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xho* I 于 37 °C 水浴锅酶切 2 h,1% 琼脂糖凝胶电泳分离后按照凝胶回收试剂盒所述步骤进行纯化回收,回收产物采用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜。次日,全部转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布棒涂板后 37 °C 恒温箱孵育过夜待长出克隆。挑取单克隆摇菌并提取质粒后进行限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切,阳性克隆放大培养后直接送英骏公司测序。

1.2.4 PC12 细胞培养及转染

将液氮中冻存的 PC12 细胞复苏,采用含 100 mL/L 马血清、50 mL/L 胎牛血清的 DMEM

培养液稀释后,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养至对数生长期,消化后按照 3×10⁵ 细胞/孔的比例加入六孔,37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜,使细胞融合度达 80%–90%。按照 Lipofectamine-2000 说明书所述步骤,将空载体 pCMV-Myc 和 pCMV-Myc-NOVA1 转染入 PC12 细胞,设置为转染组作为空白对照,并于转染后 24 h、48 h、72 h 和 96 h 收集细胞进行总 RNA 和总蛋白提取。

同时,为了获得质粒与脂质体的最佳转染比例,针对 pCMV-Myc-NOVA1 质粒和脂质体设置 3 个比例,分别为 1 : 2、1 : 2.5 和 1 : 3,于转染后的 72 h 收集细胞进行总 RNA 和总蛋白提取。

1.2.5 细胞总 RNA 提取及反转录

将上述收集的 PC12 细胞采用 PBS 洗两遍,加入 500 μL RNAiso Plus 试剂,反复吹打裂解细胞,然后将裂解液移入离心管;室温静置 5 min,4 °C、12 000×g 离心 10 min;吸取上清注入一新的离心管;每个离心管加入 100 μL 氯仿,剧烈振荡 15 s,然后静置 3 min 使其分层;4 °C、12 000×g 离心 15 min,小心吸取上层水相至一新的离心管,注意不要吸到中间白色蛋白层;每管加入 250 μL 异丙醇,颠倒混匀,-20 °C 放置 1–2 h;4 °C 条件下离心 (12 000×g, 20 min),吸弃上清;每管加 1 mL 75%乙醇 (用 DEPC 水配制),盖紧盖子,将沉淀弹起,4 °C、7 500×g 离心 5 min,离心后吸弃上清;再同样轻速离心一次,吸弃上清,静置 5–10 min,使残余液体挥发,注意不能时间过长或加热;每管加入 20 μL DEPC 水,使用紫外分光光度仪测定 RNA 纯度和浓度;RNA 合格后用作反转录模板,按照 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明书所

述步骤进行反转录,反转录体系为:2 μL 10×Fast RT 缓冲液;1 μL RT 酶混合液;2 μL 引物混合液,ddH₂O 定容至 10 μL,反转录程序为:42 °C 15 min→95 °C 3 min。

1.2.6 实时定量 PCR 检测

根据 GenBank 数据库 NOVA1 (Accession No. NM 002515.2)和 GAPDH (Accession No. NM 017008.4)基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物对设计 (表 1)。应用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量分析,参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 说明书提供的反应体系及条件进行实时定量 PCR 检测,反应体系为:12.5 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™];0.5 μL PCR 正向引物 (10 μmol/L);0.5 μL PCR 反向引物 (10 μmol/L);0.5 μL ROX Reference Dye II (50×);2 μL cDNA, ddH₂O 定容至 25 μL,PCR 反应程序为:95 °C 30 s→95 °C 5 s;60 °C 30 s;40 个循环。实验结束后针对 C_t 值采用 2^{-ΔΔC_t} 公式进行相对定量。

1.2.7 细胞总蛋白提取

将上述收集的 PC12 细胞采用 PBS 洗两遍,加入适量的细胞裂解液,然后放在冰上裂解 30 min;采用细胞刮将细胞碎片刮至一边,并转移至一预冷的 EP 管,12 000×g 离心 15 min;将上清转移至另一 EP 管,采用 BCA 蛋白定量检测试剂盒进行定量检测。

1.2.8 免疫印记检测

将上述定量的 35 μg 总蛋白采用 12%的 SDS-PAGE 进行分离,电泳结束后按照说明书所述步骤转印到 PVDF 膜;转膜结束后,将 PVDF 膜正面朝上放入 5%脱脂牛奶封闭液,摇床上封闭至少 30 min;封闭结束后,将 PVDF 膜正面朝

上放入一抗工作液,包括兔抗大鼠 NOVA1 多克隆抗体 (1 : 500 稀释) 和小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体 (1 : 2 000 稀释), 4 °C 冰箱孵育过夜。次日,采用 TBST 室温漂洗膜 3 次 (10 min/次);采用辣根酶标记山羊抗兔 IgG (1 : 5 000 稀释) 和山羊抗鼠 IgG (1 : 5 000 稀释) 室温孵育 45 min, TBST 洗 3 次 (10 min/次), 采用 ECL 化学发光液进行蛋白条带显影, 采集图片后利用 Image J 软件进行积分光密度分析, 以目的条带和内参条带的积分光密度比值作为蛋白强度指标。

1.2.9 免疫组化

按照 2×10^5 /mL 的接种密度将 PC12 细胞悬液滴在六孔板中多聚赖氨酸包被的盖玻片上, 细胞培养箱培养 15–30 min, 再加入适量培养基继续培养过夜。然后将六孔板置于冰上, 吸弃培养液, PBS 洗 5 min \times 3 次, 吸弃残留 PBS, 空气干燥, 当细胞表面微潮湿时加入 4% 多聚甲醛, 固定 30 min; 固定结束后, 吸弃 4% 多聚甲醛, ddH₂O 洗 5 min \times 1 次, PBS 洗 5 min \times 1 次; 加入 3% H₂O₂ (现用现配), 室温孵育 30 min 以灭活内源性过氧化氢酶, 然后 PBS 洗 5 min \times 3 次; 加入 0.3% TritonX-100, 通透细胞 30 min, 然后 PBS 洗 5 min \times 3 次; 5% BSA 室温封闭 20 min, 然后倾去, 勿洗; 将玻片用镊子小心取出, 放在湿盒内, 滴加兔抗大鼠 Noval 多克隆抗体 (1 : 100 稀释), 4 °C 孵育过夜; 将湿盒取出, 室温平衡 60 min, PBS 洗 5 min \times 3 次; 滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 20 min, PBS 洗 5 min \times 3 次; 滴加 SABC 试剂, 37 °C 孵育 20 min, PBS 洗 5 min \times 4 次; DAB 室温显色, ddH₂O 洗 2–3 次终止显色; 依次在 75%、85%、95%、100%

酒精中脱水, 最后经二甲苯透明; 中性树胶封片, 光学显微镜下观察拍照, 采用 Image Pro Plus 软件进行统计分析。

1.2.10 PC12 细胞缺氧模型的建立

PC12 细胞消化后, 按照 1×10^4 细胞/孔的比例接种于 96 孔板, 置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h; 将细胞放入缺氧小室中, 通入 95% N₂, 5% CO₂ 混合气体 1–2 min 后关紧出气口, 继续通 4 min 后关紧进气口; 缺氧小室移入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱, 分别缺氧 0 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h。收集细胞后采用 MTT 检测细胞增殖活性。

1.2.11 MTT 检测

向上述处理后单细胞加入 MTT 溶液 (5 mg/mL), 20 μ L/孔, 继续孵育 4 h, 终止培养, 吸弃上清。每孔加入 150 μ L DMSO 振荡 5 min, 使结晶充分溶解。选择 490 nm 波长, 酶联免疫检测仪测定各孔 OD 值 (空白对照为不加细胞只加培养液, 空白孔调零)。记录结果: 试验结果以细胞存活率表示, 细胞存活率 = (试验组光吸收值/对照组光吸收值) \times 100%。

1.2.12 统计学处理

实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 19.0 for windows 统计软件进行分析, 两样本采用 *t* 检验, 采用 One way-ANOVA test 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性, 即有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 pCMV-Myc-NOVA1 真核表达载体的构建及鉴定

设计的引物序列如表 1 所示。如图 1A 所示, 可见 1 500 bp 有特异的核酸条带, 与预期

NOVA1 基因的编码序列大小一致；双酶切后 pCMV-Myc 载体和 *NOVA1* 基因均出现了特异性条带，条带大小分别为 3 800 bp 和 1 500 bp，与预期基本一致（图 1B）；构建完成的质粒经双酶切后出现了明显的两条带，条带大小分别为 1 500 bp 和 3 800 bp（图 1C），说明目的基因 *NOVA1* 正确插入载体。

表 1 *NOVA1* 基因编码区扩增引物序列

Table 1 Primers sequence for *NOVA1* gene encoding region amplification

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>NOVA1</i>	Forward TAC <u>GTCGACT</u> ATGATGGCG GCAGCTCCC
	Reverse TCC <u>CTCGAGT</u> CAACCCACT TTCTGAGG

The underline indicates the *Sal* I and *Xho* I site.

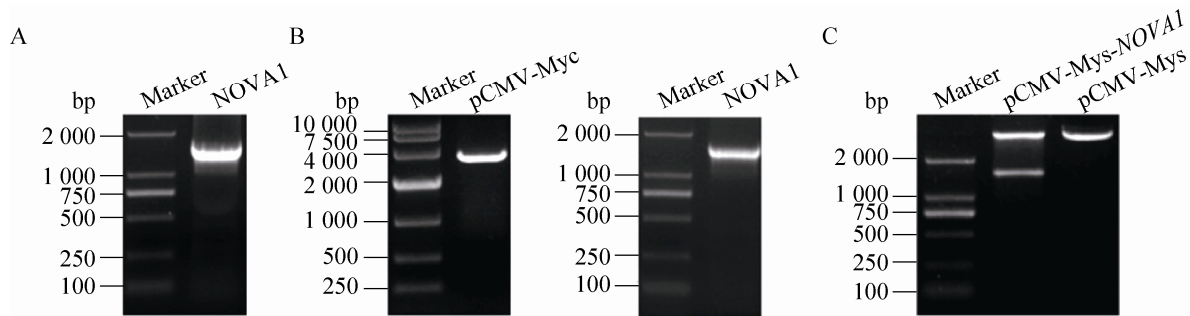


图 1 pCMV-Myc-*NOVA1* 真核表达载体的构建及鉴定

Fig. 1 Construction and identification of eukaryotic expression vector pCMV-Myc-*NOVA1*. (A) Identification of *NOVA1* PCR product by 1% agarose gel electrophoresis. (B) Identification the digested product of pCMV-Myc and *NOVA1* gene by 1% agarose gel electrophoresis. (C) Identification the digested product of pCMV-Myc-*NOVA1* and pCMV-Myc by 1% agarose gel electrophoresis.

2.2 pCMV-Myc-*NOVA1* 质粒的最佳转染时间

设计合成的定量 PCR 扩增引物如下表 2 所示。如图 2A 所示，与 pCMV-Myc-*NOVA1* 质粒转染 24 h 相比，转染 48 h、72 h 和 96 h *NOVA1* mRNA 表达水平显著增加，转染 48 h 到达峰值 (** $P < 0.01$)；随着转染时间的增加，*NOVA1* 蛋白的表达水平明显增加，转染 72 h 到达峰值（图 2B，** $P < 0.01$ ）。

2.3 pCMV-Myc-*NOVA1* 质粒与 Lipofecamine 2000 最佳转染比例

如图 3A 所示，随着 pCMV-Myc-*NOVA1* 质粒与 Lipofecamine 2000 转染比例的降低，

NOVA1 mRNA 的表达水平先增加后降低，二者的比例为 1 : 2.5 时，*NOVA1* mRNA 的表达水平最高，且存在显著性差异 (** $P < 0.01$ ，与 1 : 2 相比)。同样地，*NOVA1* 蛋白的表达水平随着二者转染比例的降低而增加，1 : 2.5 时达到最大值，且存在显著性差异 (** $P < 0.01$ ，与 1 : 2 相比)。

表 2 实时定量 PCR 鉴定引物序列

Table 2 Primers sequence of qRT-PCR identification

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>NOVA1</i>	Forward GGTCTCAGCCAAGCAGCAGCAA
	Reverse TTGCAGCAGTAGCAGCAGCCAG
<i>GAPDH</i>	Forward TGGATCTGACATGCCGCCTGGA
	Reverse AGGTCCACCACCCTGTTGCTGT

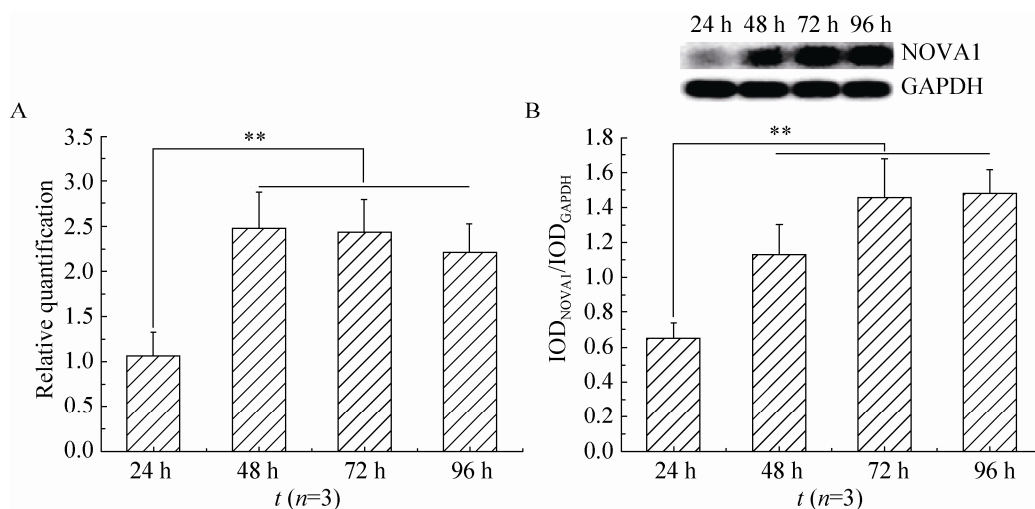


图 2 实时定量 PCR 和 Western blotting 检测不同转染时间 *NOVA1* mRNA 和蛋白的表达变化

Fig. 2 qPCR and Western blotting assay of the change of *NOVA1* mRNA and protein at different transfection time. (A) Histogram analysis of the change of *NOVA1* mRNA at different transfection time. (B) Western blotting and histogram analysis of the change of *NOVA1* protein at different transfection time.

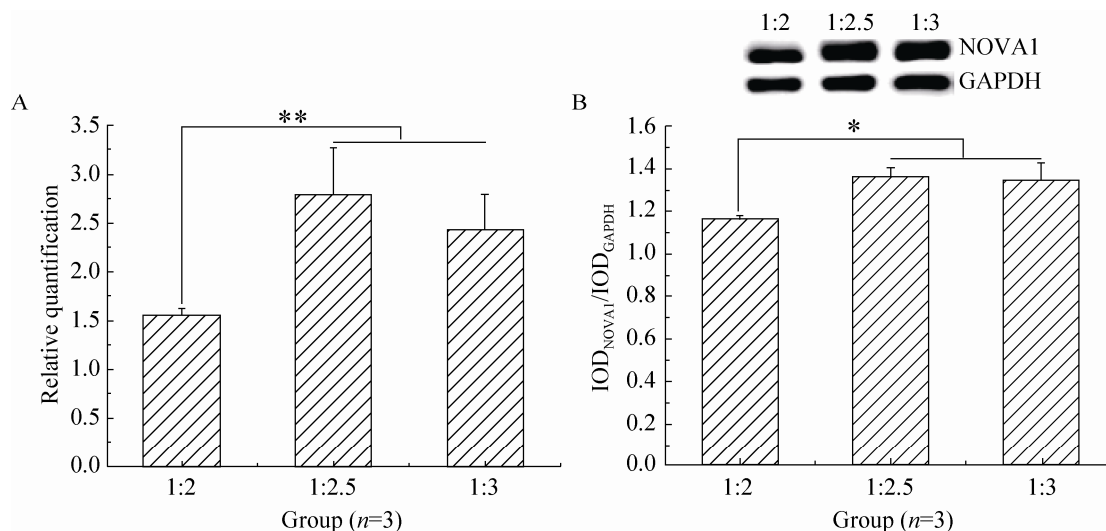


图 3 实时定量 PCR 和 Western blotting 检测不同转染比例 *NOVA1* mRNA 和蛋白的表达变化

Fig. 3 qPCR and Western blotting assay of the change of *NOVA1* mRNA and protein at different transfection ratio. (A) Histogram analysis of the change of *NOVA1* mRNA at different transfection ratio. (B) Western blotting and histogram analysis of the change of *NOVA1* protein at different transfection ratio.

2.4 *NOVA1* mRNA 和蛋白的表达水平显著增加

根据上述优化的最佳转染时间 (72 h) 和

最佳转染比例 (1 : 2.5), 采用实时定量 PCR 和 Western blotting 分别检测了 *NOVA1* mRNA 和蛋白的表达变化。实时定量 PCR 结果显示, 与

Control 和 pCMV-Myc 组相比, 转染 pCMV-Myc-NOVA1 质粒组 NOVA1 mRNA 的表达水平明显增加, 且存在显著性差异 (图 4A, $**P<0.01$)。同样地, 转染 pCMV-Myc-NOVA1 质粒后, NOVA1 蛋白表达水平也明显增加, 二者存在显著性差异 (图 4B, $**P<0.01$)。

2.5 转染 pCMV-Myc-NOVA1 质粒后 NOVA1 蛋白高效表达于细胞质和细胞核

如图 5 所示, Control 和 pCMV-Myc 组,

NOVA1 蛋白主要表达分布于细胞核, 且表达水平较低。转染 pCMV-Myc-NOVA1 组, NOVA1 蛋白主要表达分布于细胞核和细胞质, 且表达水平显著增加。

2.6 过表达 NOVA1 蛋白可显著增加 PC12 细胞的增殖活性

如图 6 所示, 与 Control 和 pCMV-Myc 组相比, 转染 pCMV-Myc-NOVA1 质粒的 PC12 细胞增殖活性随着时间的延长明显增加, 二者相比

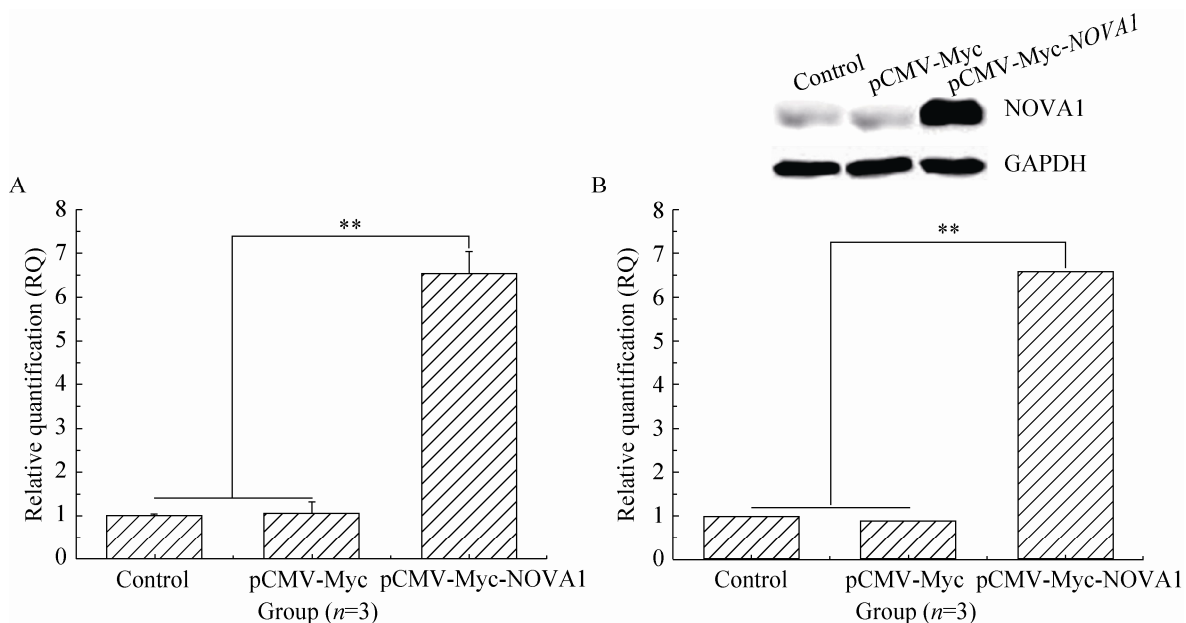


图 4 实时定量 PCR 和 Western blotting 检测 NOVA1 mRNA 和蛋白的表达变化

Fig. 4 qPCR and Western blotting assay of the change of NOVA1 mRNA and protein. (A) Histogram analysis of the change of NOVA1 mRNA. (B) Western blotting and histogram analysis of the change of NOVA1 protein.

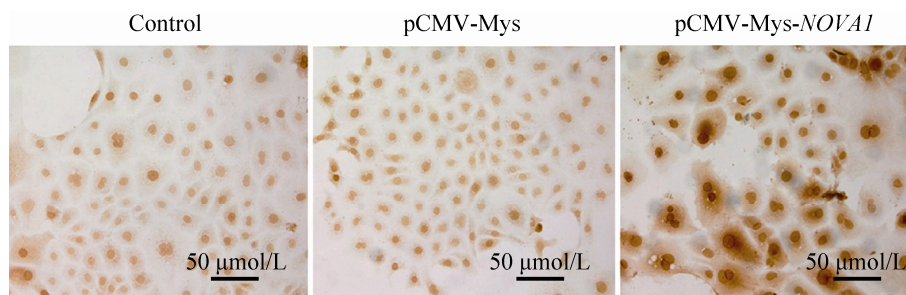


图 5 细胞免疫组化检测 NOVA1 蛋白亚细胞定位

Fig. 5 Cell immunohistochemistry detection subcellular localization of NOVA1 protein.

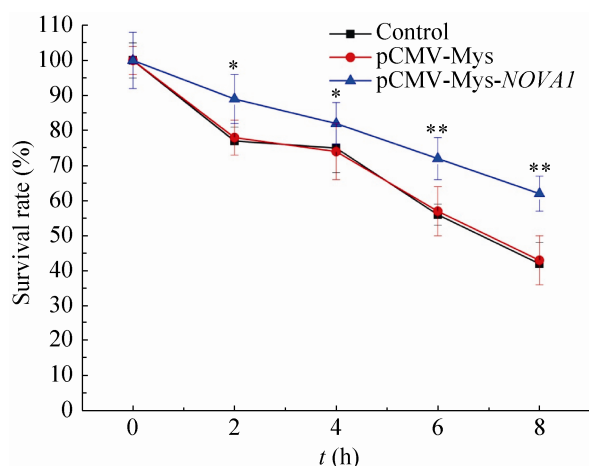


图 6 MTT 检测细胞增殖活性

Fig. 6 Cell proliferation activity assay by MTT ($n=3$).

具有显著性差异 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$).

3 讨论

在真核生物中,生物体需要很多不同的蛋白质以保证生命活动的进行,从有限的基因产生多种多样的蛋白质的一种关键机制是 pre-mRNA 的可变剪接,至少 75% 的蛋白质是经可变剪接产生的,不论是普遍表达还是组织特异性的 RNA 结合蛋白,可变剪接过程对其都是非常重要的,尤其是像大脑这样复杂的系统。许多研究发现在脑中确实存在着最大量的组织特异性剪接现象,如 NOVA 蛋白家族参与的可变剪接等^[8]。

NOVA 家族是一类特异性表达于脑组织的剪接因子,包括 NOVA1 和 NOVA2 两个成员,其中,NOVA1 于 1993 年被 Darnell 等发现,时隔 5 年,他们通过抗血清试验再次发现家族另一成员——NOVA2^[7]。在大鼠脑中,NOVA1 的表达几乎遍布整个脑区,有试验表明 NOVA1 对于运动神经元的发展与存活是至关重要的^[10]。实

验室前期研究表明 NOVA1 可能调节神经元的应激反应,且 NOVA1 与脑血管疾病的治疗过程中常发生的脑缺血再灌注损伤后的修复作用之间可能存在一定关系^[11],因此,为了深入揭示 NOVA1 的神经细胞保护功能,我们构建了其真核表达载体并实现了高效表达,以期为其新功能的开发提供重要技术参考。

基因重组及质粒转染是一种研究特定基因的有效的分子生物学技术,通过质粒转染、过表达及免疫荧光成像等技术,在研究基因表达、蛋白质在细胞内定位和信号转导等方面起着重要的作用^[12-13]。因此,我们选取了能携带目的基因靶向性高效表达,并且容易操作的真核表达载体 pCMV-Myc 作为 NOVA1 基因的载体。基因转染的方法包括病毒转染法及非病毒转染法。其中,病毒转染法风险大,且病毒的免疫原性高、容量小、制备困难、成本较高^[14-15]。脂质体转染是目前细胞转染最为普遍的方法之一。虽然脂质体的转染效率低于病毒载体,但它安全性较高、能够多次转染且操作简单、无免疫原性、不仅能感染分裂中的细胞,还能感染不分裂细胞、能携带不同大小的外源基因。因此,脂质体有望成为基因治疗中的基因转染载体^[16-17]。脂质体介导基因转染的效率与细胞的状态、脂质体的结构、质粒的浓度、DNA 和脂质体的比例及转染时间以及靶细胞的选择性作用有关^[18]。大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞 (PC12 细胞) 是由大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤分离并建立的细胞系^[19-20],它具有神经细胞的特性,可稳定传代,因而很多研究人员将其作为体外研究神经系统疾病的理想细胞模型。因此,本研究将构建并验证成功的重组质粒 pCMV-Myc-NOVA1,利用脂质体转染法转染入 PC12 细胞,采用实时

定量 PCR 和 Western blotting 检测其表达效果, 筛选最佳作用时间和最佳转染比例, 进而确定其细胞表达分布。

通过研究发现, *NOVA1* mRNA 和蛋白的表达水平明显增加, 且最佳转染时间为转染后 72 h, 最佳转染比例为 1:2.5。同时, 过表达 *NOVA1* 蛋白不仅高效表达于细胞质, 而且高效表达于细胞核, 且过表达 *NOVA1* 蛋白的细胞增殖活性明显增加。因此, 本研究一方面为 *NOVA1* 蛋白的表达提供了重要技术支撑, 另一方面为其新功能的开发提供了重要参考, 具有一定的应用价值。

REFERENCES

- [1] Buckanovich RJ, Yang YY, Darnell RB. The onconeural antigen Nova-1 is a neuron-specific RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies. *J Neurosci*, 1996, 16(3): 1114–1122.
- [2] Yang RB, Mark MR, Gray A, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature*, 1998, 395(6699): 284–288.
- [3] Yang YYL, Yin GL, Darnell RB. The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(22): 13254–13259.
- [4] Buckanovich RJ, Posner JB, Darnell RB. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron*, 1993, 11(4): 657–672.
- [5] Buckanovich RJ, Darnell RB. The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(6): 3194–3201.
- [6] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25–29.
- [7] Fletcher CF, Okano HJ, Gilbert DJ, et al. Mouse chromosomal locations of nine genes encoding homologs of human paraneoplastic neurologic disorder antigens. *Genomics*, 1997, 45(2): 313–319.
- [8] Han L, Li ZF, Ren CH, et al. NOVA, a nervous system specific splicing factor: research progress. *Bull Acad Milit Med Sci*, 2008, 32(6): 571–574 (in Chinese).
韩冷, 李稚锋, 任长虹, 等. 神经系统特异性剪接因子 NOVA 研究进展. *军事医学科学院院刊*, 2008, 32(6): 571–574.
- [9] Ule J, Ule A, Spencer J, et al. Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse. *Nat Genet*, 2005, 37(8): 844–852.
- [10] Jensen KB, Dredge BK, Stefani G, et al. Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron*, 2000, 25(2): 359–371.
- [11] Li HL, Sun CQ, Wang Y, et al. Dynamic expression pattern of neuro-oncological ventral antigen 1 (Nova1) in the rat brain after focal cerebral ischemia/reperfusion insults. *J Histochem Cytochem*, 2013, 61(1): 45–54.
- [12] Li WS. The construction of eukaryotic expression vector of human Dickkopf-1 and the initial study in SHG₄₄[D]. Suzhou: Soochow University, 2009 (in Chinese).
李文帅. Dickkopf-1 的真核表达载体构建及其对 SHG₄₄ 的作用[D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [13] Liu YP. Experimental study on construction of eukaryotic expression vectors of NOV gene and its effect on neural-oriented differentiation of dermal multipotent stem cells in rats[D]. Chongqing: Third Military Medical University of Chinese P.L.A, 2008 (in Chinese).

- 刘雁平. NOV 基因真核表达载体的构建及其在大鼠真皮多能干细胞成神经分化中的作用研究 [D]. 重庆: 中国人民解放军第三军医大学, 2008.
- [14] Zhang SB, Xu YM, Wang B, et al. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Contr Rel*, 2004, 100(2): 165–180.
- [15] Nicolazzi C, Garinot M, Mignet N, et al. Cationic lipids for transfection. *Curr Med Chem*, 2003, 10(14): 1263–1277.
- [16] Zandi E, Chen Y, Karin M. Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science*, 1998, 281(5381): 1360–1363.
- [17] May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, et al. Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex. *Science*, 2000, 289(5484): 1550–1554.
- [18] Kim YJ, Kim TW, Chung H, et al. The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipid emulsion with various oils. *Int J Pharm*, 2003, 252(1/2): 241–252.
- [19] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73: 2424–2428.
- [20] Rudy B, Kirschenbaum B, Greene LA. Nerve growth factor-induced increase in saxitoxin binding to rat PC12 pheochromocytoma cells. *J Neurosci*, 1982, 2: 1405–1411.

(本文责编 陈宏宇)