

活细胞内人AGTR1-3'UTR的荧光标记及应激定位分析

张毅^{1,2,3,4,5,6#} 高星杰^{3,4,5,6#} 付雪^{3,4,5,6} 苏超^{3,4,5,6} 史雪彬^{3,4,5,6}

段中潮^{3,4,5,6} 付晓^{3,4,5,6} 何津岩³ 杨洁^{3,4,5,6*}

(¹天津医科大学药学院, 天津 300070; ²天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070; ³天津医科大学基础医学院, 天津 300070; ⁴天津医科大学基础医学研究中心, 天津 300070; ⁵天津市细胞与分子免疫学重点实验室, 天津 300070; ⁶教育部免疫微环境与疫病重点实验室, 天津市300070)

摘要 利用噬菌体衣壳蛋白MS2和带有序列特异性茎环结构(含有MS2蛋白结合位点)的RNA之间的高度亲和力, 对外源性人血管紧张素1型受体(angiotensin II receptor type 1, AGTR1) mRNA 3'端非翻译区(3'untranslated region, 3'UTR)片段进行红色荧光标记, 进而在活细胞(HeLa)内研究该mRNA片段的应激生物学行为。通过在pSG5空载体质粒上先后插入两个双链DNA目的片段AGTR1-3'UTR和24×MS2, 构建重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2, 并将该质粒与重组质粒pERFP/MS2和pEGFP/C1-G3BP共转染入Hela细胞。荧光显微成像结果显示, AGTR1-3'UTR-24×MS2 mRNA片段能够携带具有入核信号的MS2-RFP融合蛋白离开胞核进入胞浆, 而且在亚砷酸盐刺激下, 红色荧光标记的AGTR1-3'UTR-24×MS2 mRNA片段可在胞浆中形成与应激蛋白G3BP-GFP共定位的颗粒。该结果表明, 针对AGTR1-3'UTR片段的MS2-RFP荧光标记系统构建成功, 该荧光标记系统能有效避免假阳性的荧光信号。在细胞受到氧化应激时, AGTR1-3'UTR会被招募至胞浆中的应激颗粒结构中, 启示了AGTR1-3'UTR区域对于调控AGTR1 mRNA在细胞内的应激定位具有重要作用。

关键词 人血管紧张素1型受体; 3'端非翻译区; MS2标记; 重组质粒; 荧光标记

A Fluorescence Labeling System for the 3'UTR of Homo Sapiens AGTR1 mRNA and Its Application in the Subcellular Localization Analysis Under Cell Stress

Zhang Yi^{1,2,3,4,5,6#}, Gao Xingjie^{3,4,5,6#}, Fu Xue³⁻⁶, Su Chao^{3,4,5,6}, Shi Xuebin^{3,4,5,6},

Duan Zhongchao^{3,4,5,6}, Fu Xiao^{3,4,5,6}, He Jinyan³, Yang Jie^{3,4,5,6*}

(¹College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ²Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin 300070, China; ³Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ⁴Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ⁵Tianjin Key Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Tianjin 300070, China; ⁶Key Laboratory of Immunology Microenvironment and Disease of Ministry of Education of China, Tianjin 300070, China)

Abstract A MS2-tagged fluorescence labeling system for Homo sapiens angiotensin II receptor type 1 (AGTR1) 3' end untranslated region (3'UTR) was constructed, and the system was further applied to visualize the

收稿日期: 2013-11-14 接受日期: 2014-01-27

国家杰出青年科学基金(批准号: 31125012)、国家自然科学基金(批准号: 21305103、31100967、31170830、31370749)和中国博士后科学基金(批准号: 2013T60258)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 022-83336806, E-mail: yangji@tjmu.edu.cn

Received: November 14, 2013 Accepted: January 27, 2014

This work was supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (Grant No.31125012), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.21305103, 31100967, 31170830, 31370749) and the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2013T60258)

#These authors contributed equal to this work

*Corresponding author. Tel: +86-22-83336806, E-mail: yangji@tjmu.edu.cn

网络出版时间: 2014-04-29 15:33

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0376.html>

subcellular localization of *AGTR1*-3'UTR under stress. The labeling system utilized the strong affinity between sequence-specific RNA stem-loops (MS2 protein binding sites) and the bacteriophage capsid protein MS2. The recombinant plasmids pSG5/*AGTR1*-3'UTR/24×MS2, which could be transcribed into *AGTR1*-3'UTR-24×MS2 mRNAs but not further into proteins in HeLa cells, were constructed by being successively inserted into two dsDNA fragments *AGTR1*-3'UTR and 24×MS2, and further verified by enzyme digestion and order-checking. Then the plasmids were co-transfected with recombinant plasmids pERFP/MS2 and pEGFP/C1-G3BP into HeLa cells. According to the results from fluorescence microscopy, *AGTR1*-3'UTR-24×MS2 mRNAs were found in cytoplasm together with the fusion protein RFP-MS2 that contained a nuclear localization signal sequence. The red fluorescence from MS2-tagged *AGTR1*-3'UTR was found highly co-localized with the green fluorescence from GFP-G3BP (a marker of stress granules under cell stress induced by arsenite). The results demonstrated that a fluorescence labeling system for Homo sapiens *AGTR1*-3'UTR was constructed successfully and expressed effectively. The subcellular co-localization of G3BP and *AGTR1*-3'UTR in stress granules indicated that the entrance of *AGTR1* mRNAs into stress granules was modulated by the 3'UTR.

Key words AGTR1; 3'UTR; MS2-tagged; recombinant plasmid; fluorescence labeling

UTR(untranslated regions)即非翻译区,是信使RNA(mRNA)分子两端的非编码片段。5'-UTR从mRNA起点的甲基化鸟嘌呤核苷酸帽延伸到AUG起始密码子,3'-UTR从编码区末端的终止密码子延伸到多聚A尾巴(Poly-A)的末端。尽管该区域不被翻译,然而,其对于改变mRNA在细胞中的位置、决定mRNA的稳定性和半衰期以及调控细胞应激下的翻译效率有重要作用^[1]。通过对某特定mRNA的5'UTR或3'UTR进行标记,可以藉此了解该mRNA在细胞内的分布和运动、研究该mRNA与其他蛋白质的相互作用以及进一步探索细胞周期、细胞应激等生命活动的机制^[2-3]。MS2荧光标记是近几年新兴的活细胞内RNA荧光标记技术,其基本原理如下:真核细胞内共转染两种质粒,其中第一种质粒仅转录为mRNA,该mRNA带有目的片段和具有MS2蛋白特异结合作用的茎环序列,第二种质粒表达噬菌体鞘蛋白MS2与荧光蛋白的融合蛋白,通过该mRNA片段和MS2蛋白之间的高度亲和作用,实现目的mRNA片段的活细胞内荧光标记及实时动态分析^[4]。

血管紧张素受体(angiotensin receptors, AGTR)是以血管紧张素作为配体的G蛋白偶联受体,是肾素-血管紧张素系统的重要组成部分。它有4种亚型,其中I型受体(angiotensin II receptor type 1, AGTR1)被研究得最为清楚,已知AGTR1可引起血管收缩、外周去甲肾上腺素活度升高、血管平滑肌细胞增生、肾血流减少、肾素分泌抑制、肾小管重吸收钠增加,影响醛固酮和血管升压素分泌,调节交感神经活动度、

心脏收缩能力、中枢渗透压感受器和细胞外基质合成等多种生理活动^[5]。然而,关于AGTR1自身的翻译调控和应激生物学行为的研究却相对不足。考察*AGTR1* mRNA在细胞应激中的运动和变化对研究细胞应激的自我保护机制以及进一步了解*AGTR1*自身在细胞信号通路中的地位和作用有重要意义^[6-7]。

研究发现,应激蛋白如多功能蛋白Tudor-SN可与*AGTR1* mRNA的3'UTR结合,进而调控该基因的翻译及稳定性^[8]。为了进一步研究3'UTR区域对于调控*AGTR1* mRNA的亚细胞分布和应激生物学行为的作用,本文利用MS2-RFP荧光标记系统对活细胞内*AGTR1*-3'UTR片段进行红色荧光标记,可以对外源*AGTR1*-3'UTR进行有效的荧光定位,为深入研究*AGTR1* mRNA的细胞应激生物学行为提供便利工具。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达质粒Stratagene pSG5 Vector(216201)购自Agilent公司, pCR4/24×MS2SL-stable(31865)购自Addgene公司, pERFP/MS2由美国Eric M. Poeschla教授馈赠, pEGFP/C1-G3BP由法国Jamal Taz教授馈赠,人*AGTR1* cDNA质粒hAT1R-B(SC108918)购自美国Origene公司,其载体为pCMV6-XL4、HeLa细胞来自本实验室储存, DH5a感受态细菌(大肠杆菌)购自上海闪晶分子生物科技有限公司。

1.2 试剂及仪器

快速限制性内切酶FastDigest® EcoR I(FD0274)、

*Bam*H I(FD0054)、*Bgl* II(FD0083)及T4 DNA连接酶(EL0011)均购自Fermentas公司, 2×Taq PCR Green Mix(PER007)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, T/A载体pEASY/T1 Simple Cloning Kit(CT111-01)购自北京全式金生物技术有限公司, 琼脂糖凝胶/PCR产物纯化试剂盒购自Biomiga公司, 质粒快速小提试剂盒购自北京索莱宝公司, Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司, 去内毒素质粒提取试剂盒购自Omega公司。含DAPI细胞荧光封片液(sc-359850)购自Santa Cruz公司。用于DNA凝胶电泳分析及回收的琼脂糖(GA005-100G)为Genview公司生产, 熔点88 °C。引物由北京六合通公司合成, 基因测序工作由北京天一辉远生物科技有限公司完成。

共聚焦激光扫描显微镜为Vivascope 1500(美国Lucid公司)产品, 倒置荧光显微镜Olympus IX71(日本Olympus公司), 显微数码摄影机购自日本Nikon公司, 琼脂糖凝胶的切胶在BIO-RAD Gel Doc™ XR+凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司, 配置紫外灯波长为302 nm)上进行。

1.3 目的片段AGTR1-3'UTR双链DNA的获取

以含有人AGTR1 cDNA序列的质粒hAT1R-B为模板, 针对AGTR1 mRNA的1 430~1 993 bp(564 bp, 3'UTR区域)序列设计含有EcoR I和BamH I限制性内切酶位点的引物序列(表1), PCR扩增条件为: 95 °C预变性5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 45 s, 72 °C 30 s, 共33个循环; 72 °C延伸10 min。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 302 nm紫外灯下切割含有目的条带(约570 bp)的凝胶块, 利用凝胶回收试剂盒回收该片段。按T/A载体说明书将回收DNA片段与T/A载体连接, 转化感受态细菌, 在含有氨苄青霉素、卡那霉素、X-gal和IPTG的LB平板上筛选克隆。挑取白色阳性克隆, 摇菌扩增并提取质粒。以EcoR I和BamH I对提取质粒进行酶切, 以凝胶回收试剂盒回收并纯化得到目的片段AGTR1-3'UTR双链DNA(约570 bp)。

由于在TaqDNA聚合酶作用下的PCR产物两侧

3'端通常会含单个脱氧腺苷酸(A), 利用其与T/A载体末端T之间的A-T互补性可将其连接于T/A载体, 能够进一步提高PCR产物克隆的效率, 而且T/A载体上酶切后的目的条带纯化更加容易, 所以本工作中没有直接将含有AGTR1-3'UTR的PCR产物酶切应用, 而是将该PCR产物先连接于T/A载体上、进一步扩增后再酶切应用。

1.4 目的片段24×MS2双链DNA的获取

商品化的pCR4/24×MS2SL-stable质粒中含有能够表达连续的24个MS2结合位点茎环状mRNA的DNA序列(长度约1.3 Kb)。将pCR4/24×MS2SL-stable质粒转化入感受态细菌, 在含有氨苄青霉素的LB培养基中摇菌扩增并提取质粒。以BamH I和Bgl II对提取质粒进行双酶切, 凝胶回收试剂盒回收并纯化得到目的片段24×MS2双链DNA(约1.3 Kb)。

1.5 重组真核表达质粒pSG5/AGTR1-3'UTR的构建及鉴定

商品化的空载质粒pSG5是由pKCR2载体和Stratagene pBS载体结合而成、能在真核细胞中高拷贝表达的质粒。该质粒长约4.1 Kb, 选择标记基因为氨苄抗性, 含有SV40早期启动子和多腺苷酸化信号促进体内表达, T7噬菌体启动子有利于在体外转录克隆的插入物, T7启动子下游含有EcoR I、BamH I和Bgl II限制性内切酶识别位点。将空载质粒pSG5转化入感受态细菌, 在含有氨苄青霉素的LB培养基中摇菌扩增并提取质粒。以EcoR I和BamH I对提取质粒进行酶切, 凝胶回收试剂盒回收并纯化得到线性pSG5质粒载体(约4.1 Kb)。

按说明书将线性pSG5质粒载体与具有相同黏性末端的AGTR1-3'UTR双链DNA片段用T4连接酶连接, 产物转化入感受态细菌, 在含有氨苄青霉素的LB平板上筛选克隆。挑取阳性克隆, 摇菌扩增并提取重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR(约4.7 Kb)。

用EcoR I和BamH I对重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR进行单、双酶切, 并以1.0%的琼脂糖凝胶电泳验证片段的大小。同时, 对重组质粒进行基因测序鉴定。

1.6 重组真核表达质粒pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2的构建及鉴定

以BamH I和Bgl II对上述质粒pSG5/AGTR1-3'UTR进行酶切, 凝胶回收试剂盒回收并纯化得到线性质粒pSG5/AGTR1-3'UTR(约4.7 Kb)。将该线

表1 本实验所用的PCR引物序列
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
Upstream	5'-CGA ATT CTC CAC CAA GAA GCC TGC ACC ATG-3'
Downstream	5'-CC GGA TCC GCA ACT TGA CGA CTA CTG CTT A-3'

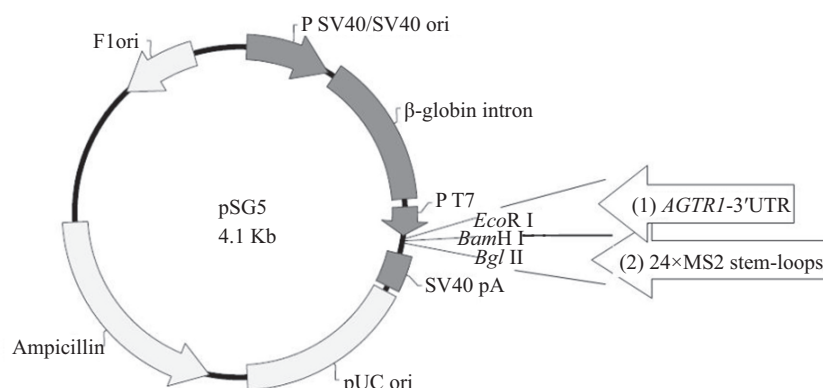
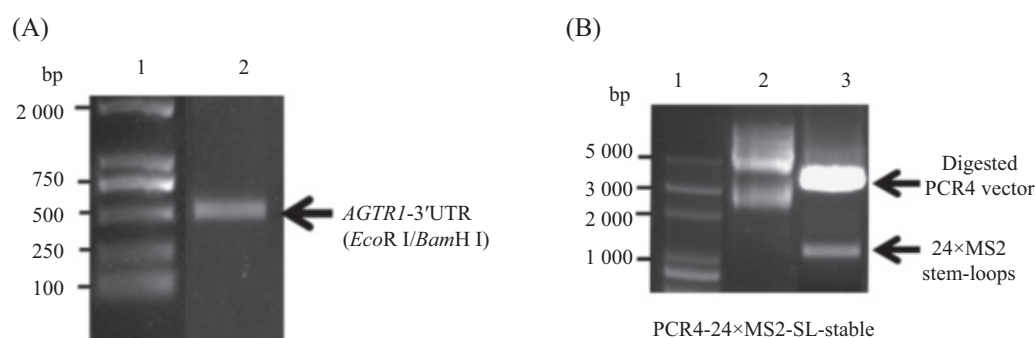


图1 pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2重组质粒图谱

Fig.1 Information of the recombinant pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2 plasmids



A: *AGTR1*-3'UTR的PCR产物凝胶电泳图(1: 分子量marker; 2: PCR产物, 带有*EcoR* I和*Bam*H I酶切位点的*AGTR1*-3'UTR片段); B: pCR4/24×MS2-SL-stable质粒及酶切产物凝胶电泳图(1: 分子量marker; 2: pCR4/24×MS2-SL-stable 质粒; 3: pCR4/24×MS2-SL-stable的*Bgl* II/*Bam*H I酶切产物)。
A: *AGTR1*-3'UTR (1: marker; 2: PCR product for *AGTR1*-3'UTR with Endonuclease sites of *EcoR* I and *Bam*H I); B: pCR4/24×MS2-SL-stable (1: marker; 2: pCR4/24×MS2-SL-stable plasmid; 3: digestion products of pCR4/24×MS2-SL-stable by *Bgl* II/*Bam*H I).

图2 *AGTR1*-3'UTR和24×MS2两条目的片段的获取

Fig.2 Acquisition of two target fragments: *AGTR1*-3'UTR and 24×MS2

性质粒载体与具有相同黏性末端的24×MS2双链DNA片段用T4连接酶连接,产物转化感受态细菌,在含有氨苄青霉素的LB平板上筛选克隆。挑取阳性克隆,摇菌扩增并提取重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2(约6.0 Kb)。

将构建的重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2分别进行(1)*EcoR* I和*Bam*H I; (2)*EcoR* I和*Bgl* II; (3)*Bam*H I和*Bgl* II三组双酶切,并以1.0%的琼脂糖凝胶电泳验证片段的大小。同时,对重组质粒进行基因测序鉴定(图1)。

1.7 HeLa细胞的转染及荧光显微镜观察

以去内毒素质粒提取试剂盒提取无内毒素重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2。HeLa细胞接种至铺有盖玻片(用于激光共聚焦观察)的12孔板中,置于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,37℃、5%CO₂培养箱中培养至细胞80%汇合。细胞转染分

实验组与对照组,其中实验组质粒包括5 μg pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2、5 μg pERFP/MS2和5 μg pEGFP/C1-G3BP;对照组质粒包括5 μg pSG5/AGTR1-3'UTR、5 μg pERFP/MS2和5 μg pEGFP/C1-G3BP。按Lipofectamine 2000产品说明书进行转染。转染后48 h,给予0.5 mmol亚砷酸盐处理1 h,将12孔板内盖玻片取出,并以细胞荧光封片液过夜封片处理,最后以激光共聚焦显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 目的片段*AGTR1*-3'UTR和目的片段24×MS2的获取

利用表1中所设计的引物以含*AGTR1* cDNA序列质粒为模板进行PCR扩增,再以1.0%的琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物,观察到与目的片段长度相符(约570 bp)的荧光条带(图2A),连入T/A载体进一步提

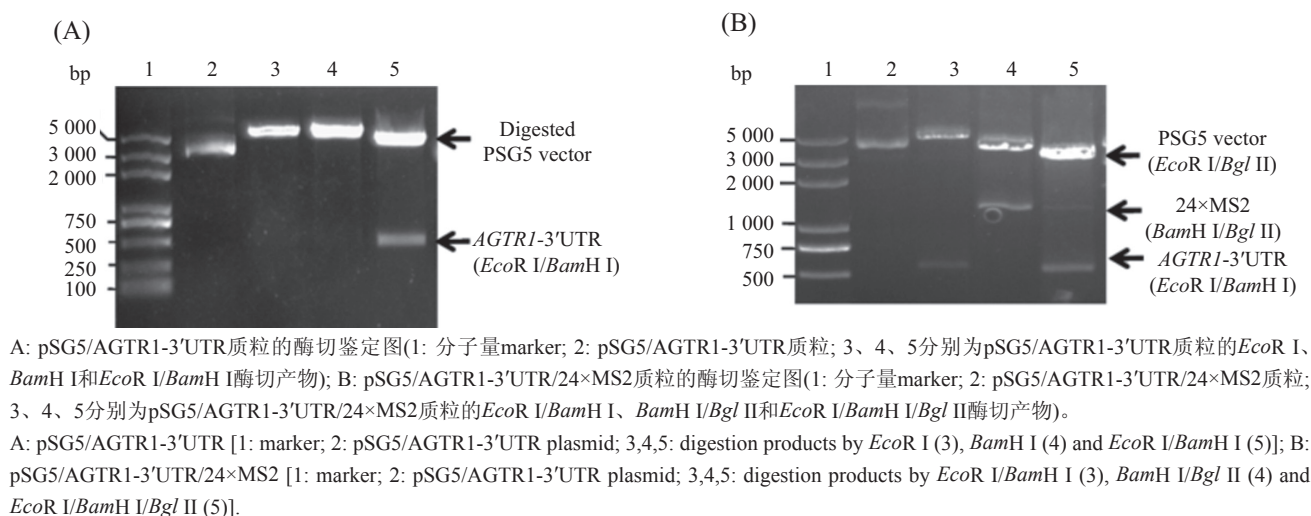


图3 重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR和pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2的酶切鉴定

Fig.3 Identification of the recombinant plasmids pSG5/AGTR1-3'UTR and pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2 by enzymatic digestion

高克隆效率, 酶切纯化回收后用于后续的连接反应。

采用 *Bam*H I、*Bgl* II双酶切从质粒pCR4/24×MS2SL-stable切下目的片段24×MS2, 经1.0%的琼脂糖凝胶电泳, 可在1.3 Kb左右出现条带(图2B), 纯化回收后用于后续的连接反应。

2.2 重组真核表达质粒pSG5/AGTR1-3'UTR的鉴定

将构建的重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR分别进行EcoR I和BamH I的单、双酶切, 经1.0%的琼脂糖凝胶电泳, 产生的条带大小与预期相符(图3A), 重组质粒基因测序结果也正确, 证明AGTR1-3'UTR DNA片段已成功插入到pSG5的多克隆位点上。

2.3 重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2的鉴定

将构建的重组质粒pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2分别进行(1)EcoR I和BamH I; (2)EcoR I和Bgl II; (3)BamH I和Bgl II三组双酶切, 经1.0%的琼脂糖凝胶电泳, 产生的条带大小与预期相符(图3B), 重组质粒基因测序结果也正确, 证明AGTR1-3'UTR和24×MS2的DNA片段均已成功插入到pSG5的多克隆位点上。

2.4 荧光显微镜下观察重组质粒的表达

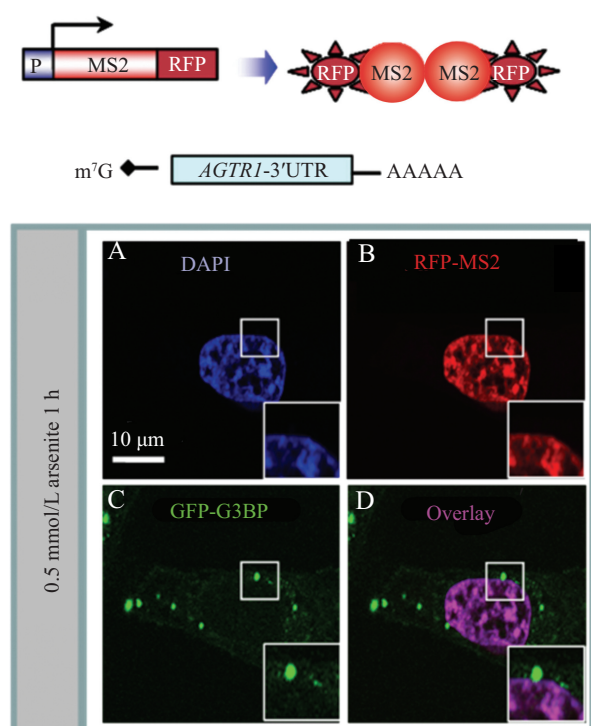
两组脂质体转染入Hela并培养48 h后, 在荧光显微镜下观察。对照组(图4): pSG5/AGTR1-3'UTR, pERFP/MS2和pEGFP/C1-G3BP三质粒共转染后, 当给予细胞亚砷酸盐氧化刺激时, 绿色荧光标记的应激颗粒标志蛋白G3BP可在胞浆内形成应激颗粒, 而RFP-MS2的红色荧光信号完全存在于细胞核内, 二者无共定位。由于此时的AGTR1-3'UTR mRNA不带

有茎环结构, 理论上其与RFP-MS2蛋白的亲合力可以被忽略, 因此, 单独分析此结果, 此时的RFP-MS2蛋白没有能够被AGTR1-3'UTR mRNA携带离开细胞核。

实验组(图5): pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2、pERFP/MS2和pEGFP/C1-G3BP三质粒共转染后, 当给予细胞亚砷酸盐氧化刺激时, 绿色荧光标记的应激颗粒标志蛋白G3BP可在胞浆中形成明显的应激颗粒, 该颗粒可与RFP-MS2的红色荧光共定位。由于RFP-MS2正是AGTR1-3'UTR-24×MS2 mRNA的荧光标记探针, 那么此时胞浆内的RFP-MS2应该是与AGTR1-3'UTR-24×MS2 mRNA共定位的, 所以, 此时胞浆内的应激颗粒标志蛋白GFP-G3BP、RFP-MS2蛋白、AGTR1-3'UTR-24×MS2 mRNA三者是共定位于应激颗粒的。

3 讨论

真核细胞在受到诸如氧化应激、热休克、紫外线照射及病毒感染等环境刺激时, 会在胞浆内形成颗粒状物质即应激颗粒, 同时, 细胞会通过特定机制中止mRNA的翻译, 并在多种蛋白因子的作用下将翻译中止的mRNA运输到应激颗粒中暂时储存起来, 以保护机体免受进一步损伤^[9-11]。应激颗粒中的mRNA被储存在异常中断的翻译起始复合物中, 随后其可能重新进入翻译起始或者发生降解^[12]。然而, 细胞应激过程中mRNA被运输及保护的具体机制尚不明确。借助mRNA的荧光标记系统, 可以使



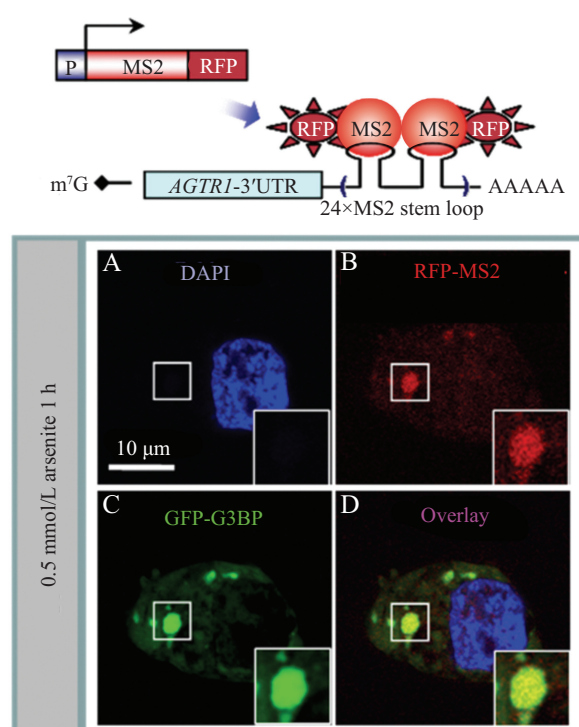
A: DAPI染色的细胞核; B: RFP-MS2融合蛋白(未与 $AGTR1$ -3'UTR结合); C: GFP-G3BP融合蛋白标记的应激颗粒; D: A、B、C的融合图。
A: nucleus stained by DAPI; B: RFP-MS2 fusion protein (not bind with $AGTR1$ -3'UTR); C: stress granules stained by GFP-G3BP fusion protein; D: merge of A, B and C.

图4 共转染pSG5/ $AGTR1$ -3'UTR、pERFP/MS2和pEGFP/C1-G3BP的Hela细胞荧光照片

Fig.4 Fluorescence photos of HeLa cells transfected with the recombinant plasmids pSG5/ $AGTR1$ -3'UTR, pERFP/MS2 and pEGFP/C1-G3BP under cell stress

mRNA的运动可视化, 为研究细胞应激状态下的自我保护机制提供有力工具。

现有的mRNA动态荧光标记方法大致分为以下三类: (1)荧光分子直接标记, (2)分子信标间接标记, (3)构建MS2-GFP荧光标记系统间接标记。其中直接标记法的缺陷在于通过注射或转染的手段向细胞内引入过量的RNA报告片段, 可能会压制内源片段的运动; 而分子信标法的不足在于该标记系统涉及了两个独立的核酸杂化事件及繁琐的数据分析工作^[13-14]。MS2-GFP标记系统利用了具有特异序列的茎环结构RNA片段和噬菌体鞘蛋白MS2之间的高度亲和作用, 通过在目标RNA序列中插入多重茎环片段作为MS2蛋白的结合位点, 可以使单个RNA片段上结合多个融合了GFP的MS2蛋白, 因此, 能够得到很高的灵敏度, 有研究表明24重茎环片段所提供的荧光信号就足以用来检测单个mRNA分子。除了检测mRNA分子, MS2标记系统还能标记RNA-蛋



A: DAPI染色的细胞核; B: RFP-MS2融合蛋白(与 $AGTR1$ -3'UTR结合); C: GFP-G3BP融合蛋白标记的应激颗粒; D: A、B、C的融合图。
A: nucleus stained by DAPI; B: RFP-MS2 fusion protein (bind with $AGTR1$ -3'UTR); C: stress granules stained by GFP-G3BP fusion protein; D: merge of A, B and C.

图5 共转染质粒pSG5/ $AGTR1$ -3'UTR/24xMS2、pERFP/MS2和pEGFP/C1-G3BP的Hela细胞荧光照片

Fig.5 Fluorescence photos of HeLa cells transfected with the recombinant plasmids pSG5/ $AGTR1$ -3'UTR/24xMS2, pERFP/MS2 and pEGFP/C1-G3BP under cell stress

白质复合物。Casolari等^[15]报道在活细胞内同时表达含茎环结构mRNA和MS2-GFP融合蛋白可以有效检测特定的信使核糖核蛋白体。另外, 向MS2-GFP融合蛋白内引入细胞核定位信号, 使其在未受其他作用力时定位于细胞核内, 在对胞浆内特定mRNA动态荧光成像时, 能够大幅提高信噪比^[16]。

本实验通过在商品化的pSG5载体(T7启动子)上先后插入两个目的片段: $AGTR1$ -3'UTR和24xMS2序列, 构建pSG5/ $AGTR1$ -3'UTR/24xMS2质粒(图1), 该质粒能够表达 $AGTR1$ -3'UTR-24xMS2 mRNA, 这是成功建立该荧光标记系统的关键步骤。将该质粒与商品化的表达MS2-RFP融合蛋白的质粒共转染入Hela细胞, 实现 $AGTR1$ -3'UTR在正常状态下和细胞应激条件下的活细胞内荧光定位分析。本实验中所采用pERFP/MS2重组质粒中含有SV40大T抗原的核定位信号, 能使其表达的MS2-RFP融合蛋白定位于细胞核。在本文图4的对照组荧光照片中, pSG5/

AGTR1-3'UTR质粒表达的AGTR1-3'UTR mRNA片段因没有连接特异结合MS2的24×MS2茎环序列,故MS2-RFP融合蛋白仅定位于胞核中。而图5的实验组中,pSG5/AGTR1-3'UTR/24×MS2质粒表达的AGTR1-3'UTR mRNA片段连接有24×MS2茎环序列,允许MS2-RFP融合蛋白的附着,因此,该mRNA携带MS2-RFP运动至胞浆,故在胞浆中可检测到红色荧光信号。另外,在给予HeLa细胞亚砷酸盐刺激以诱导细胞应激的条件下,标记AGTR1-3'UTR的红色荧光会形成颗粒状聚集体,并且该红色颗粒与应激颗粒标志蛋白G3BP形成的绿色荧光颗粒高度共定位,说明AGTR1-3'UTR片段可被招募于胞浆中与RNA代谢密切相关的细胞应激颗粒结构中,提示细胞应激可能是AGTR1 mRNA代谢调节的重要一环。

综上,本实验的研究结果显示,成功构建了针对AGTR1-3'UTR的MS2荧光标记系统,可以对外源AGTR1-3'UTR进行有效的荧光定位,为深入研究AGTR1 mRNA的细胞应激生物学行为提供便利工具。此外,该荧光标记系统的质粒还可与其它功能性的荧光重组质粒共转染,通过荧光共定位、RNA-蛋白共沉淀、光漂白-恢复及活细胞工作站等多种技术,研究该基因片段与特定蛋白因子的相互作用,不断发现新的结合伙伴及核酸代谢机制。

参考文献 (References)

- 1 Andreassi C, Riccio A. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol* 2009; 19(9): 465-74.
- 2 Rodriguez AJ, Condeelis J, Singer RH, Dichtenberg JB. Imaging mRNA movement from transcription sites to translation sites. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18(2): 202-8.
- 3 Hamilton RS, Davis I. RNA localization signals: Deciphering the message with bioinformatics. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18(2): 178-85.
- 4 Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, *et al.* Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol* 2003; 13(2): 161-7.
- 5 Plummer S, Tower C, Alonso P, Morgan L, Baker P, Broughton-Pipkin F, *et al.* Haplotypes of the angiotensin II receptor genes AGTR1 and AGTR2 in women with normotensive pregnancy and women with preeclampsia. *Hum Mutat* 2004; 24(1): 14-20.
- 6 Paukku K, Kalkinen N, Silvennoinen O, Kontula KK, Lehtonen JY. p100 increases AT1R expression through interaction with AT1R 3'-UTR. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(13): 4474-87.
- 7 Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: Possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(9): a012286.
- 8 Yamasaki S, Anderson P. Reprogramming mRNA translation during stress. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(2): 222-6.
- 9 Fitzpatrick T, Huang S. 3'-UTR-located inverted Alu repeats facilitate mRNA translational repression and stress granule accumulation. *Nucleus* 2012; 3(4): 359-69.
- 10 Kedersha N, Anderson P. Stress granules: Sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(6): 963-9.
- 11 Michel MC, Foster C, Brunner HR, Liu L. A systematic comparison of the properties of clinically used angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 2013; 65(2): 809-48.
- 12 Toshihiro I. Regulation of angiotensin II receptor expression. *Curr Pharm Des* 2013; 19(17): 3013-21.
- 13 Wu YR, Yang CJ, Moroz LL, Tan WH. Nucleic acid beacons for long-term real-time intracellular monitoring. *Anal Chem* 2008; 80(8): 3025-8.
- 14 Yoichiro F, Maki U, Yusuke O, Yuichiro W. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2007; 48(9): 1243-53.
- 15 Casolari JM, Thompson MA, Salzman J, Champion LM, Moerner WE, Brown PO. Widespread mRNA association with cytoskeletal motor proteins and identification and dynamics of myosin-associated mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS One* 2012; 7(2): e31912.
- 16 Zhang FL, Simon AE. A novel procedure for the localization of viral RNAs in protoplasts and whole plants. *Plant J* 2003; 35(5): 665-73.