

smad4 shRNA 真核表达质粒的构建及鉴定

吴 鹏¹, 田 媛¹, 桂伶俐², 陈 刚¹, 卢运萍¹, 周剑锋³, 马 丁¹

Construction of Eukaryotic Vector Expressing shRNA of smad4 Gene

WU Peng¹, TIAN Yuan¹, GUI Ling-li², CHEN Gang¹, LU Yun-ping¹, ZHOU Jian-feng¹, MA Ding¹

1. Department of Gynaecology and Obstetrics of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China, 2. Department of Anesthesiology, 3. Department of Hematology

Corresponding author: MA Ding, E-mail: dma@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract :Objective To explore the feasibility of selective inhibiting smad4 expression using smad4 short hairpin RNA (shRNA) interference. **Methods** Three 19bp reverse repeated motifs targeting of smad4 gene were synthesized and cloned into eukaryotic expression plasmid pGenesil-1 containing U6 shRNA promoter and termination signal of RNA polymerase. The recombinant plasmids pGenesil-shRNA1, 2, 3 and pGenesil-con were transfected into HeLa cells respectively by lipofectamine reagent. The alteration of smad4 expression was examined by RT-PCR and Western blot. **Results** It was verified by partial nucleotide sequencing and restriction endonuclease digestion that the constructed eukaryotic vector expressing shRNA of smad4 was correct. shRNA2 in pGenesil-smad4 cells knocked down the expression of smad4 mRNA and protein dramatically compared with untransfected and control cells. **Conclusion** The shRNA can efficiently suppress smad4 expression in HeLa cells. The results of the study lay the foundation for further studying on biological functions and potential application of smad4.

Key words :Cervical cancer; shRNA; smad4

摘 要:目的 针对 smad4 基因的不同部位,构建不同 smad4 shRNA 表达质粒载体,在转录后水平抑制 smad4 的表达,对其克隆进行鉴定并挑选出抑制效率最高的克隆。方法 用 DNA 重组技术将针对人 smad4 基因不同部位所设计的 3 对 shRNA 序列克隆到真核表达质粒 pGenesil-1 中,构建 smad4 shRNA 表达载体 pGenesil-smad4-shRNA1、2、3。脂质体介导转染人宫颈癌细胞株 HeLa,经 G418 筛选抑制 smad4 表达的稳定细胞克隆。结果 3 个 smad4 shRNA 表达载体 pGenesil-smad4-shRNA1、2、3 经限制性酶切及序列分析证明基因插入正确。RT-PCR、Western blotting 均证实:3 种 shRNA 重组质粒中 pGenesil-smad4-shRNA2 可明显降低细胞内 smad4 mRNA 丰度及 smad4 蛋白表达。结论 成功构建了 smad4 shRNA 表达载体 pGenesil-smad4-shRNA1、2、3,并筛选出特异而高效地阻断 smad4 表达的克隆。此实验结果为进一步研究 smad4 蛋白分子的生物学功能及应用奠定了基础。

关键词:宫颈癌; shRNA; smad4

中图分类号:R737.33 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)08-0553-04

0 引言

TGF- β / smads 信号转导通路是由 TGF- β 超家族、TGF- β 受体、smads 蛋白家族及其核内转录调节因子组成的肿瘤抑制通路。通路中任何元件异常都可以引起 TGF- β / smads 信号转导紊乱,从而导致肿瘤的发生。而 smad4 是调节转录和 TGF- β 抗增殖应答的核心分子,在肿瘤中的灭活表明它是抑癌基

因,smad4 突变或表达丢失与多种肿瘤的发生有关。因此,我们构建了针对 smad4 的特异性短发夹状 RNA (shRNA) 真核表达载体,转染宫颈癌细胞株 HeLa,得到了基因表达抑制作用较强的永久干涉细胞克隆,为研究宫颈癌细胞的恶性生物学行为奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达质粒载体 pGenesil-1 购于武汉晶赛生物技术有限公司,宿主菌 DH5 为北京天为时代公司产品。宫颈癌细胞株 HeLa 购于中国典型物保藏中心。各工具酶为 Takara 公司产品;Lipfectinamine2000 脂质体转染试剂盒为 Invitrogen 公司

收稿日期:2006-07-28;修回日期:2006-10-27
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371657);国家重大基础研究资助项目(2002CB513107)
作者单位:1. 430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科,2. 麻醉科,3. 血液内科
通讯作者:马丁, E-mail: dma@tjh.tjmu.edu.cn
作者简介:吴鹏(1979-),男,博士研究生,从事妇科肿瘤研究

表 1 smad4 和 18sRNA real time PCR 引物序列

Gene	primer sequence	length
smad4	Forward 5'- TGGCCTGTTTACAATGA GCTT-3'	85
	Reverse 5'-ACCAA TACTCA GGA GCA GGA TGA-3'	
	Probe 5-(FAM) CATTCCA GCCTCCCA TTTCCA (TAMRA)-3'	
18sRNA	Forward 5'- A GTCCCTGCCCTTTGACACA-3'	69
	Reverse 5'- GA TCCGA GGGCTCACTAAAC-3'	
	Probe 5-(FAM)CGCCGTCGCTACTACCGATTGG(TAMRA)-3'	

产品。

1.2 引物

smad4 和内参照 18s RNA 的 RT-PCR 引物序列见表 1。

1.3 smad4 短发卡式 RNA (shRNA) 的设计

采用 clontech 在线设计软件选择 smad4 cDNA 序列上 3 个部位作为目标序列,同时将选中的 shRNA 中的碱基序列打乱设计为阴性对照,对照序列经 BLAST 检测证实与 smad4 mRNA 及其他基因编码序列无同源性。为鉴定设计片段是否插入载体,polyT 后加上 sal I 的鉴定酶切位点。以上序列由上海英骏生物技术有限公司合成,序列见表 2:

表 2 smad4 shRNA 干扰序列

shRNA	Sense / antisense strands	Starting position
shRNA1	5'-CCA GCTACTTACCA TCA TA-3'	1002
	3'-TATGATGGTAA GTA GCTGG-5'	
shRNA2	5'-CCACCAA GTAA TCGT GCA T-3'	785
	3'-A TGCA CGA T TACTTGGTGG-5'	
shRNA3	5'-GGA TCA GTA GGTGGAA TA G-3'	1649
	3'-CTATTCCACCTACTGATCC-5'	

1.4 smad4 shRNA 表达质粒的构建

用 50 μl annealing buffer 溶解上述单链目的基因片段.各取 2 μl 单链和 16 μl annealing buffer, 94 退火自然冷却至室温。T4 DNA 连接酶将准备好的插入片段连接到纯化质粒 pGenesil-1 的 Bam H I 和 Hind III 之间,16 过夜,构建成对照载体 pGenesil-con 和 smad4 shRNA 表达载体 pGenesil-smad4 shRNA,转化至 DH5 感受态细菌,涂于含卡那霉素的培养板中,37 培养过夜。随机挑选卡那霉素抗性的转化克隆摇菌扩增。

1.5 smad4 shRNA 表达质粒的鉴定

提取的质粒经 sal I 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,判断酶切产物大小。并将阳性克隆送上海英骏生物技术公司测序,以鉴别插入片段是否含有碱基突变。

1.6 smad4 shRNA 转染 HeLa 细胞

用脂质体 Lipfectinamine 2000 将重组阴性对照载体 p Genesil-con、p Genesil-smad4-1、2、3 分别转染宫颈癌细胞株 HeLa,命名为 H/ CON, H/ shRNA1、2、3,并以 HeLa 细胞作为空白对照。在转染第 2 天将细胞以 1:10 的稀释比例传代培养,两天后用含 800 μg/ml G418 的选择培养液连续培养 2 周,隔天换液一次,有限稀释法挑选单个抗性细胞在 G418 (200 μg/ml) 下常规培养扩增。

1.7 流式细胞仪和荧光显微镜检测转染率

取 HeLa、HeLa/con 和 HeLa/shRNA1、2、3 细胞各 1 × 10⁶ 个,制成单细胞悬液后流式细胞仪检测 10⁴ 个细胞的相对荧光强度 (RFI) 和荧光表达率 (其激发波长 475 nm,发射波长 490 nm)。取细胞常规铺片,置于荧光显微镜下观察并计算转染率。转染效率 (%) = (发出绿色荧光的细胞数/可见光下总细胞数) × 100 %。

1.8 转染细胞 smad4 mRNA 的检测

1.8.1 RT-PCR 检测 smad4 mRNA 水平

本实验以 18sRNA 作为内参照。TRIzol 提取细胞总 RNA,取 2 μg RNA 作逆转录,反应体系 25 μl, dNTP (10 mmol/L) 1 μl, random primer (0.3 μg/μl) 2 μl,逆转录酶 12U, RNA 酶抑制剂 20 U, 5 × 逆转录缓冲液 5 μl。42 1 h, 95 5 min 灭活逆转录酶,加无核酶水稀释 5 倍。在 stratagene MP3000 (美国 stratagene 公司) 实时荧光定量 PCR 仪上进行实时定量扩增:反应体系 25 μl,包含上、下游引物各 0.4 μmol/L, TaqMan 探针 0.2 μmol/L, 2 × TaqMan PCR 通用共同组分 (Takara 公司) 12.5 μl, 1 μl cDNA。PCR 反应条件为第一步:95 10 min 1 个循环;第二步:95 15 s, 60 15 s, 45 个循环。

1.8.2 RT-PCR 结果的分析

本实验参考文献^[1]采用相对定量来检测 smad4 在实验组和对照组表达的差异,采用 18 s RNA 作为内参照,根据 PCR 扩增曲线,得到每个样本的 Ct 值,根据公式: $Y = 2^{-Ct}$, $Ct = [实验组 (Ct_{目的} - Ct_{内参})] - [对照组 (Ct_{目的} - Ct_{内参})]$ 算出转染组相对于对照组的干扰效率。

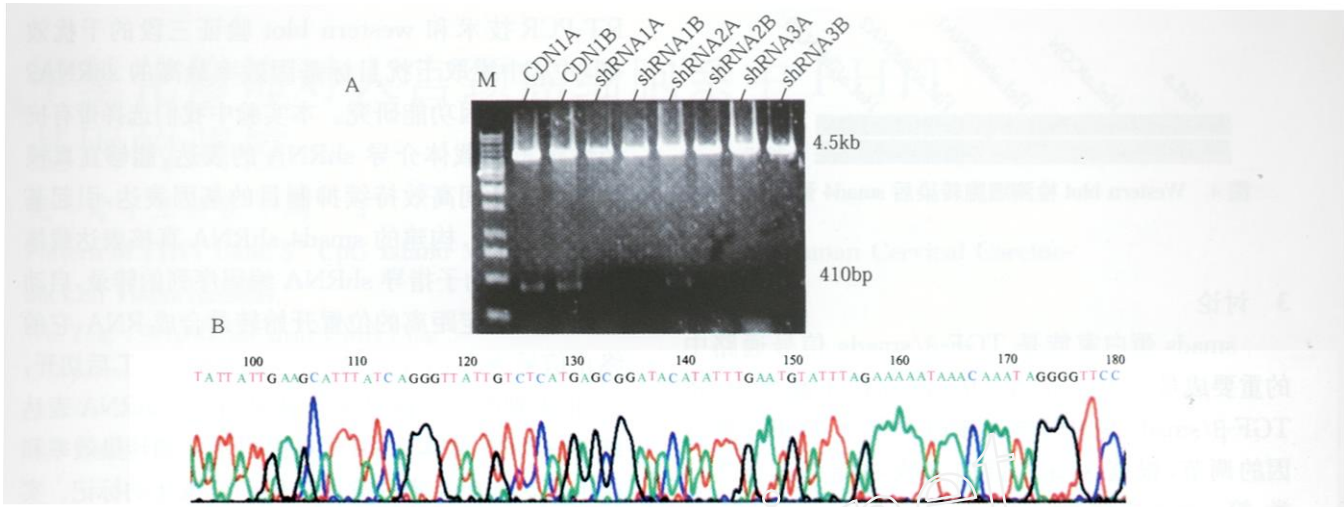


图 1 质粒鉴定重组

A: sal I 单酶切鉴定; B: 碱基测序鉴定

1.9 免疫印迹法检测 smad4 蛋白表达

将 HeLa 细胞和转染的 H/ CON、H/ shRNA1、2、3 细胞每组收集 1 ×10⁶ 个细胞,提取蛋白,Bradford 法定量,每孔 80 μg 上样量,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至 PVDF 膜,分别用兔抗人 β -actin(1:500)和鼠抗人 smad4 抗体(1:200)杂交,4 过夜后洗膜后再与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或鼠 IgG(1:1000)二抗孵育 2h,ECL 显色,暗室曝光显影成像。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件处理。组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 载体构建的鉴定

随机挑选卡那抗性的转化克隆,每种重组体各挑取 2 个克隆,提取质粒,由于 p Genesis1 载体上含有 sal I 酶切位点,加上插入片断上引入的 sal I 酶切位点,采用 sal I 酶切即可鉴定是否成功插入设计序列。如图 1A 所示:p Genesis1-con,p Genesis1-smad4 shRNA1、2、3 均含有 410bp 的插入片断。将 p Genesis1-con,p Genesis1-smad4 shRNA1、2、3 各挑取一个克隆送测序,测序结果证实设计序列正确插入载体中且无突变,重组载体克隆成功,见图 1B。

2.2 重组质粒转染效率的检测

HeLa 细胞转染 48 小时后,荧光显微镜检测显示与未转染的 HeLa 细胞相比,实验组 HeLa/ shRNA1、2、3 和对照组 HeLa/ con 细胞中均有较大比例的细胞表达绿色荧光蛋白,见图 2,流式细胞术检测 HeLa/ shRNA1、2、3 和对照组 HeLa/ con 转染效

率分别为 58.2%、64.6%、57.3% 和 56.1%,证实重组质粒获得较高转染效率。

2.3 转染前后 smad4 mRNA 表达的变化

转染细胞 HeLa/ shRNA2、3 与对照细胞 HeLa/ con 相比,smad4 mRNA 表达下降,以 HeLa/ shRNA2 明显 ($P < 0.01$),而实验组 HeLa/ shRNA1 与对照组 HeLa/ con 和 HeLa 细胞相比无明显差异 ($P > 0.05$),各组间内参照 18sRNA 表达未见明显差异 ($P > 0.05$),见图 3。

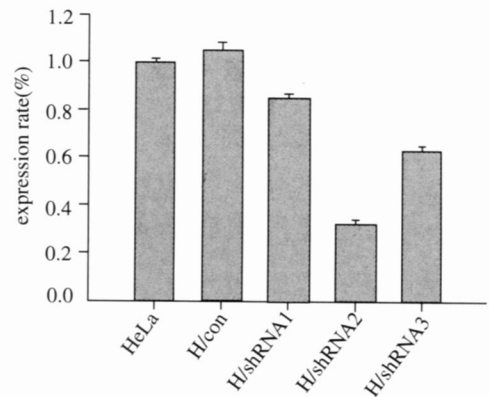


图 3 real time PCR 检测转染后 smad4 mRNA

2.4 smad4 shRNA 对 HeLa 细胞 smad4 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,五组细胞 β -actin 表达强度基本一致,转染细胞 HeLa/ shRNA2、3 smad4 蛋白表达相对于 HeLa/ con 及 HeLa 两组细胞表达强度减弱,见图 4,尤以 HeLa/ shRNA2 组明显,而 HeLa/ shRNA1 与对照相比无明显差异,故选择 HeLa/ shRNA2 组进行下一步细胞生物学效应检测。

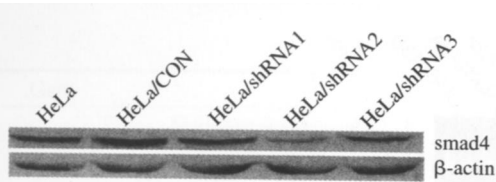


图 4 Western blot 检测细胞转染后 smad4 蛋白表达

3 讨论

smads 蛋白家族是 TGF- β / smads 信号通路中的重要成员,包括 smad 1-9,都存在于胞质中,将 TGF- β / smads 信号转导入核内并参与 TGF- β 靶基因的调节,根据 smads 蛋白家族功能将其分为 3 类:第 1 类为受体调节型 smads (receptor-regulated Smads, R-Smads),包括 Smad 1~3、5、8。第 2 类为通用调节型 smads (common mediator smads, Co-smads),包括 smad4。第 3 类为抑制型 smads (inhibitory smads, Ant-smads),包括 smad 6、7,其作用是抑制 TGF- β 信号转导。在这些 smad 分子中,smad4 分子在 TGF- β 信号转导途径中起着关键作用^[2],受体型 smads 分子接收细胞膜表面的信号后磷酸化,与 smad4 组成复合物后入核,从而启动一系列基因转录。因此 smad4 的功能缺失会导致 TGF- β 通路异常,而 TGF- β 信号转导异常和肿瘤发生发展密切相关^[3]。Hahn 等^[4]研究发现,TGF- β 信号途径中 smad4 蛋白的基因在胰腺癌中总的改变率约为 50%,其中纯合性缺失约 30%,突变约 20%。Yanagisawa 在肺癌中也发现了 smad4 的突变,另外有报道其在头颈部鳞癌,在葡萄膜黑色素瘤^[5]也有一定程度的缺失。

宫颈癌(cervical cancer)是最常见的妇女生殖系统肿瘤之一,死亡率位居妇科肿瘤之首,人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染,尤其是高危型 HPV 16 型感染与宫颈癌的发生密切相关^[6],研究证实 90% 以上的宫颈癌的发病与人乳头瘤病毒感染有关。Lee 等^[7]研究发现,HPV 癌基因 E7 通过与 smad2、3、smad4 相互作用阻断了 smad 的转录活性,并抑制 TGF- β 活性,从而导致 TGF- β 通路紊乱而引起肿瘤发生。

为进一步验证 smad4 对宫颈癌细胞恶性生物学行为的影响,本研究采用了 RNA 干扰技术特异性阻断 smad4 的表达。RNA 干扰作为一种简单、有效的代替基因敲除的遗传工具,近年来在基因功能研究中得到了广泛的应用,选择恰当的靶基因干涉位点及克隆载体是该技术的关键^[8]。我们设计的三段 shRNA 分别转染细胞,经过稳定筛选,采用

RT-PCR 技术和 western blot 验证三段的干扰效率,并从中挑取干扰目标基因效率最高的 shRNA2 片段进行基因功能研究。本实验中我们选择带有抗药性标志的载体介导 shRNA 的表达,能够在真核细胞中长时间高效持续抑制目的基因表达,引起基因表达下调。构建的 smad4 shRNA 真核表达载体使用 U6 启动子指导 shRNA 编码序列的转录,启动子在一个固定距离的位置开始转录合成 RNA,它的终止信号为 TTTTT,转录产物在第 2 个 T 后切开,Pol I 识别的终止信号终止转录,符合 shRNA 表达载体的要求,载体上 GFP 基因更为监测转染效率和稳定筛选和单克隆的挑取提供了可视化的标记。实验结果显示 shRNA2 获得较高的转染效率和 smad4 抑制效果。

本实验针对 smad4 的编码区不同部位选取了 3 条目标序列,抑制 smad4 表达的能力各不相同,其中 shRNA1 的抑制效果和对对照相比无明显差异,而 shRNA2 的干扰效率达到 70%,这种设计序列差异而导致干扰效率差异推测与目标 RNA 的空间结构及其与蛋白等高分子间的相互作用有关。

(本文图 2 见第 643 页)

参考文献:

- [1] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [2] Caestecker M P, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(17):1388-1402.
- [3] Kaklamani V G, Pasche B. Role of TGF-beta in cancer and the potential for therapy and prevention [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2004, 4(4):649-661.
- [4] Hahn S A, Schutte M, Hoque A T, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1 [J]. *Science*, 1996, 271(5247):350-353.
- [5] 李鹏程,张虹,丁正平等. TGF- β R 和 Smad4 蛋白在葡萄膜黑色素瘤中的表达[J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 32(1):35-36.
- [6] Tan SH, Leong L E, Walker PA, et al. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIIID [J]. *J Virol*, 1994, 68(10):6411-6420.
- [7] Lee DK, Kim BC, Kim IY, et al. The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor- β signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(41):38557-38564.
- [8] Yu J Y, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. *PNAS*, 2002, 99(9):6047-6052.

[编辑:周永红;校对:贺文]

特异性沉默 Eca109 细胞系 stathmin 基因 siRNA 表达载体的构建

(正文见 549 页)

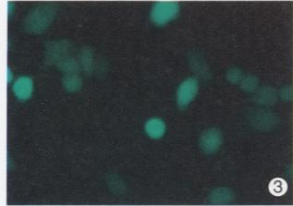


图 3 重组质粒 pSUPER-S 转染 Eca109 细胞 (× 400)

缺氧对骨肉瘤细胞系 MG-63 HIF-1 α 、p53、bcl-2 及细胞凋亡的影响

(正文见 568 页)

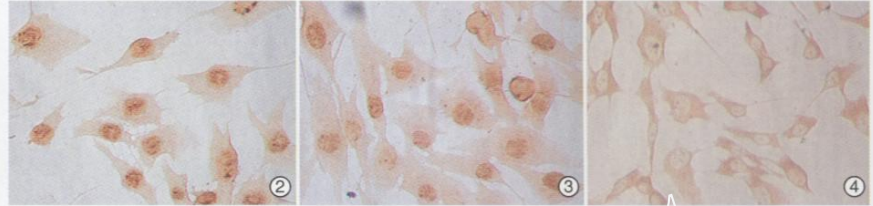


图 2 HIF-1 α 缺氧组 (SP × 200)

图 3 p53 缺氧组 (SP × 200)

图 4 bcl-2 缺氧组 (SP × 200)

smad4 shRNA 真核表达质粒的构建及鉴定

(正文见 553 页)

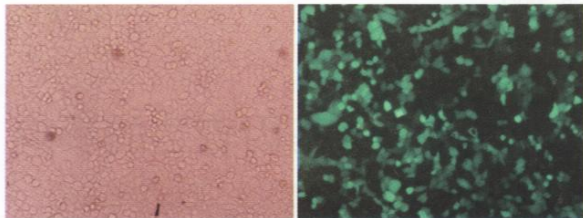
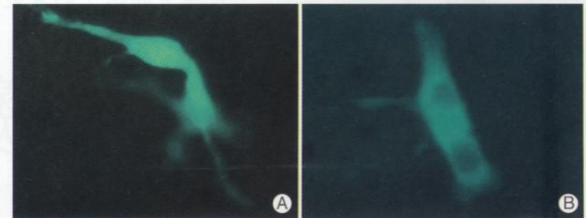


图 2 荧光显微镜观察 HeLa 细胞转染 shRNA 效率

S100A13 基因真核表达载体的构建及其在 COS-7 细胞中的表达

(正文见 576 页)



A. 阳性对照组 (× 400) B. 重组 S100A13 组 (× 400)

图 2 转染后细胞绿色荧光图片

食管鳞癌组织和淋巴结中 Paxillin 和 survivin 的表达及其意义

(正文见 590 页)

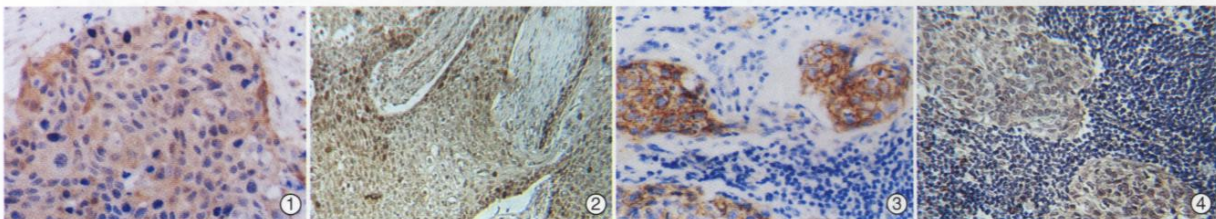


图 1 Paxillin 在食管鳞癌中的表达 (× 200)

图 2 survivin 在食管鳞癌中的表达 (× 200)

图 3 Paxillin 在转移的淋巴结中的表达 (× 200)

图 4 survivin 在转移的淋巴结中的表达 (× 200)