

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.015

DPC4/Smad4 基因 RNA 干扰靶点设计和慢病毒载体制备*

仲丽丽¹ 周忠光^{2Δ} 白云² 李洋² 张维嘉³

(1 黑龙江中医药大学附属第一医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150040; 2 黑龙江中医药大学 黑龙江 哈尔滨 150040;

3 哈尔滨市第一医院骨外科 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要 目的:DPC4/Smad4 基因 RNA 干扰靶点的设计和 RNA 干扰靶点慢病毒载体制备。**方法:**针对 DPC4/Smad4 基因序列,并利用网站设计程序,依据 RNA 干扰序列设计的原则,设计多个 RNA 干扰靶点序列。根据设计经验和设计软件将其进行评估测定,选择最佳动力学参数靶点进入其后续的实验流程;生工生物合成含干扰序列的 DNA oligo,具有严格的检测体系(PAGE 纯化体系),其两端含酶切位点粘端,直接连入酶切后的 RNA 干扰载体上。将连接好的产物转入制备好的细菌感受态细胞,并且对长出的克隆进行酶切鉴定。然后挑选出阳性克隆测序,进行测序比对后,鉴定阳性的克隆即为构建成功的目的基因 RNA 干扰慢病毒载体。将构建的慢病毒载体以及辅助包装载体质粒共转染到 293T 细胞。收获含有病毒的细胞培养上清,浓缩后进行滴度测定,并检测其感染性。另外应用荧光实时定量 PCR 检测在感染的 293T 细胞中敲减效果。**结果:**成功构建 DPC4/Smad4 shRNA 的慢病毒载体 LVshSmad4,并成功制备 DPC4/Smad4 shRNA 慢病毒,三株病毒感染细胞后均具有有效的敲减效应,其中 SH1 最为显著。**结论:**DPC4/Smad4 基因 RNA 干扰靶点的成功设计和 RNA 干扰靶点慢病毒制备,为以后探讨 DPC4/Smad4 基因与肿瘤的相关性治疗提供了实验基础。

关键词:DPC4/Smad4 ;RNA 干扰 ;慢病毒**中图分类号:**Q75,Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1456-04

Construction and Design of Lentiviral shRNA targeting DPC4/Smad4 Gene*

ZHONG Li-li¹, ZHOU Zhong-guang^{2Δ}, BAI Yun², LI Yang², ZHANG Wei-jia³

(1 Pathology Department of the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040,

China; 2 Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China;

3 Bone Surgery of the First Hospital of Harbin, Harbin, Heilongjiang, 150010, China)

ABSTRACT Objective: Construction and design of lentiviral shRNA targeting DPC4/Smad4 gene. **Methods:** Web-based program was used to analyze the DPC4/Smad4 sequence for the shRNA target sites and design RNA interference sequence which fit the designing principles. Based on the designing software evaluation, the sequences with the best dynamic parameters were selected for synthesis of DNA oligonucleotide with sense-loop-antisense structure and restriction enzyme sticky ends. DNA oligos were PAGE purified and inserted into the shRNA lentiviral vector cutted with restriction enzymes. The product was transformed into the competent cells. The resulting bacterial clones were screened and identified by the restriction enzyme digestion analysis. The positive constructs were further confirmed by sequencing. The resulting lentiviral construct were co-transfected with helper plasmids into 293T cells to make the virus. The virus-containing supernatant was collected, condensed and tested for virus titer by infection of 293T cells. In addition, the cDNA was prepared from the infected 293T cells for analysis of the knockdown effect of the shRNA lentivirus. **Results:** LVshSmad vectors were confirmed by restriction analysis and DNA sequencing; The lentiviral particles were prepared and showed effective infection capacity and knockdown effects. **Conclusion:** Lentiviral shRNA targeting DPC4/Smad4 gene is successfully constructed and can be used for the further DPC4/Smad4-targeted tumor therapy.

Key words: DPC4/Smad4; RNA interference; Lentivirus**Chinese Library Classification:** Q75, Q78 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)08-1456-04

前言

Deleted in pancreatic carcinoma locus 4(DPC4) 基因编码产物为 Smad4 蛋白。Smad4 为 Smads 蛋白家族成员之一。Smads 蛋白家族共有 8 个成员,其中有 6 种 Smads 蛋白即 Smad2~7 参与 TGF-β 信号传导过程。而 DPC4/Smad4 蛋白在 TGF-β 信

号传导途径中处于中枢地位。Smad4 在信号传导途径中处于中枢性的地位。活化的 RSmads 与 Smad4 结合成寡聚合物,将 TGFβ 的信号传递到细胞核内,调节靶基因的转录并诱导下游基因的表达式^[1]。近年来,由于 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术的出现,为研究内源性的基因功能和信号转导途径提供了强有力的研究工具和方法。我们在已经获取

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81173599)

作者简介:仲丽丽(1979-),女,博士研究生,主治医师,主要研究方向:中药抗肿瘤的研究。15804505163。

Δ 通讯作者:周忠光,电话:13936249360, E-mail: zzg5709@163.com

(收稿日期:2013-11-14 接受日期:2013-12-10)

DPC4/Smad4 基因的 RNAi 有效的靶序列的基础上,进行设计、构建和鉴定表达 DPC4/Smad4 基因的 shRNA 的慢病毒载体,为以后研究 DPC4/Smad4 在肿瘤细胞中的作用机制和针对基因的治疗奠定科研基础。

1 材料与方法

1.1 载体及试剂

pLenR-GPH Vector 载体、DL2000 ladder Marker、琼脂糖、MgCl₂、dNTP、Primer 均购自 Western Biotechnology 公司, *Bam*H I、*Eco*R I、*Kpn* I、Taq polymerase 购自 Takara 公司, T4 DNA ligase、T4 DNA ligase buffer 购自 NEB 公司, BSA 购自 Sigma 公司, NucleoBond Xtra Midi Plus 购自 MACHEREY-NAGEL 公司, AxyPrep 质粒小量制备试剂盒购自 Axygen 公司, 高效感受态细胞制备试剂盒购自 Sagon 公司。引物: West-

ern Biotechnology

DEPC;Sigma

1.2 仪器

(1) 实时荧光定量 PCR 仪: Realplex.2s, Eppendorf 公司(2) 测序仪: ABI3730, Invitrogen 公司 (3) 凝胶成像仪: GenSens1500, 博迅仪器公司(4) 稳压 DNA 电泳仪: PowerPac 200, BioRad 公司(5) 荧光倒置显微系统: BMI 3000, Leica 公司(6) 超高速离心机: optima L-90k, Beckman 公司 (8) 超净工作台: SW-CJ-2FD, 博迅仪器 (9) 电热恒温振荡培养序: SPX-100B-D, 博迅仪器公司

1.3 实验方法

1.3.1 siRNA 设计 根据公司多年的设计经验和设计软件进行评估测定,选择最佳的动力学参数靶点进入后续实验流程;

表 1 siRNA 靶点序列

Table 1 siRNA target sequence

No.	Gene	Species	Seq	起始位置	GC 含量
SH1 Mature Sense	Smad4(DPC4)	Homo sapiens	CGAGTTGTATCACCTGGAATT	941-961	42.9 %
SH2 Mature Sense	Smad4(DPC4)	Homo sapiens	GTAATTCATACCATGCCGATT	2153-2173	42.9 %
SH3 Mature Sense	Smad4(DPC4)	Homo sapiens	TACCATACAGAGAACATTGGA	754-774	38.1 %
NC	通用序列		TTCTCCGAACGTGTCACGT		

1.3.2 DNA 合成片段 生工生物合成含干扰序列的 DNA oligo, 具有严格的检测体系(PAGE 纯化体系), 其两端含酶切位点粘端, 直接连入酶切后的 RNA 干扰载体上。将连接好的产物

转入制备好的细菌感受态细胞, 并且对长出的克隆进行酶切鉴定。

表 2 DNA 合成序列(加入酶切位点)

Table 2 Synthesized DNA Oligo Sequence (with restriction sites)

NO.	5'	LOOP	Loop	LOOP	3'
SH1-F	GATCCCAGTTGTATCACCTGGAATTCTTCTGTGAGAAATCCAGGTGATACAACCTCGTTTTTG				
SH1-R	AATTCAAAAACGAGTTGTATCACCTGGAATTCTTGACAGGAAGAATCCAGGTGATACAACCTCGG				
SH2-F	GATCCGTACTTCATACCATGCCGATTCTTCTGTGAGAAATCGGCATGGTATGAAGTACTTTTTG				
SH2-R	AATTCAAAAAGTACTTCATACCATGCCGATTCTTGACAGGAAGAATCGGCATGGTATGAAGTACG				
SH3-F	GATCCTACCATACAGAGAACATTGGACTTCTGTGATCCAATGTTCTCTGTATGGTATTTTTG				
SH3-R	AATTCAAAAATACCATACAGAGAACATTGGATCTGACAGGAAGTCCAATGTTCTCTGTATGGTAG				

1.3.3 LV-shRNA 载体的构建 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切 pLenR-GPH 载体以使其线性化(图 1), 将合成的编码 shRNA 的 DNA 引物稀释, 加入 50 μ L H₂O 溶解之后退火杂交, 将靶点片断于载体 *Bam*H I、*Eco*R I 位点进行连接, 连接好的产物转入制备好的细菌感受态细胞, 对长出的克隆进行酶切鉴定, 然后挑选出阳性克隆测序验证。shRNA 由 H1 启动子调控表达。

1.3.4 慢病毒载体的包装及滴度测定 将慢病毒包装系统中 3 种质粒共转染 293T 细胞, 48 小时后收集上清并浓缩, 于 -80℃ 保存。浓缩上清感染 293T 细胞, 在倒置显微镜下观察各孔中 GFP 的表达量, 病毒滴度为表达 GFP 的细胞数乘以相应稀释倍数。测定滴度为 5×10^{10} pfu/L, 说明病毒成功包装, 可有效地感染细胞。

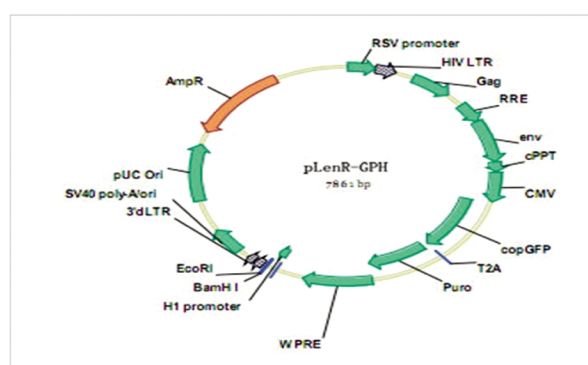


图 1 质粒 DNA 图谱

Fig 1 Plasmid DNA map

1.3.5 荧光定量 PCR 的操作 1) 先用随机引物将 RNA 反转录成 cDNA, 然后设计特异性的引物和 SYBR Green I 荧光染料进行荧光定量 PCR 检测。SYBR Green I 的最大吸收波长约为 497 nm, 发射波长最大约为 520 nm。2) 按荧光实时 PCR 试剂盒说明配制反应体系, 反应置于荧光定量 PCR 仪中, 设定程序: 预变性 94℃ 4 分钟, 94℃ 20 秒, 60℃ 30 秒, 72℃ 30 秒, 循环 35 次, 72℃ 检测荧光信号实时检测。荧光定量 PCR 数值分析采用 2- $\Delta\Delta$ CT (CT 代表循环阈值) 分析法。

2 结果

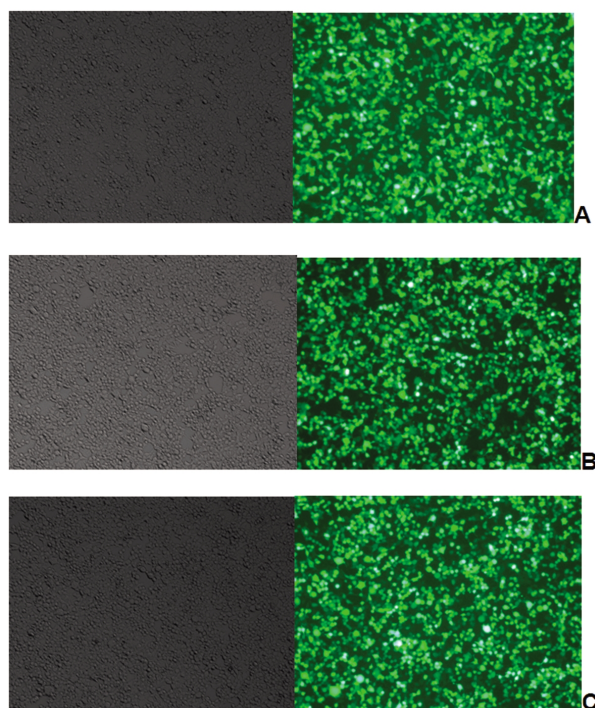


图 2 荧光显微镜下观察 shRNA 慢病毒包装 ($\times 100$)
Fig. 2 Fluorescence microscopy analysis of shRNA lentiviral vector transfection in 293T cells ($\times 100$)
A: SH1; B: SH2; C: SH3

2.1 shRNA 慢病毒的包装和滴度测定

DPC4/ SMAD4-SH1/SH2/SH3 慢病毒小量包装质粒转染 293T 细胞 23 小时后, 在荧光显微镜下同一视野的荧光和可见光照片对比, 可见大部分细胞发出荧光 (图 2), 说明转染成功。

2.2 荧光定量 PCR 结果分析

荧光定量 PCR 数据结果显示: shRNA 慢病毒感染 293T 细胞 50 小时, 细胞的侵染率 > 90% (图 3), SH1 组 shRNA 慢病毒对 DPC4 基因的沉默效果最好, 相对比值为 0.079 (表 3)。

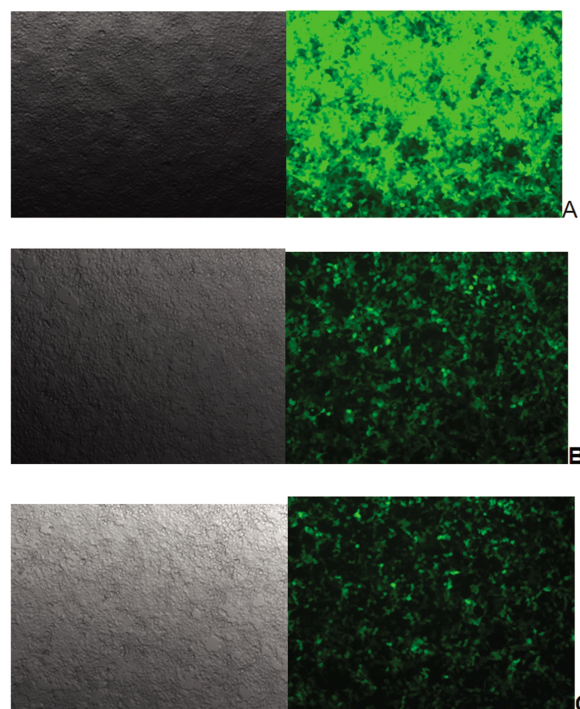


图 3 荧光显微镜下观察 RNAi 慢病毒感染 50h 后的 293T 细胞 ($\times 100$)
Fig. 3 Fluorescence microscopy analysis of 293T cells at 50h after shRNA lentivirus infection ($\times 100$)
A: SH1; B: SH2; C: SH3

表 3 DPC4 荧光定量 PCR 结果

Table 3 DPC4 fluorescence quantitative PCR results

No.	Ct1	Ct2	Ct3	Mean Ct	Copies	Δ Ct	$2^{-\Delta$ Ct	Ratio
A	22.1152	21.8207	21.9468	21.9609	1.44E+07	1.669	0.314	0.325
B	22.7997	22.5046	22.6406	22.6483	9.04E+06	1.880	0.272	0.282
SH1	24.0286	24.7321	24.5097	24.423467	2.73E+06	3.775	0.073	0.079
SH2	23.8835	24.2012	24.3324	24.139033	3.31E+06	3.045	0.121	0.129
SH3	23.5936	23.9217	23.569	23.694767	4.47E+06	2.788	0.145	0.153

3 讨论

DPC4 基因 (deleted in pancreatic carcinoma locus 4) 是近年来研究得较多的一种抑癌基因, Siard 等^[2]认为 DPC4 可能是一种独立的肿瘤抑制因子, DPC4 基因是在胰腺癌中首次被发现的, 命名为胰腺癌缺失基因 (DPC4)。普遍认为 DPC4 基因在胰腺癌中的变异率约为 50%, 而它在其它肿瘤总的变异率通常

小于 10%, 这表明 DPC4 是胰腺癌发生的较为特异的肿瘤抑制基因。DPC4/ Smad4 的变异可概括为以下 3 种情况: 1) 染色体杂合性缺失或纯合性缺失; 2) 基因突变; 3) 基因表达水平低下或缺乏^[3]。DPC4 定位于人类染色体 18q21.1, 编码蛋白 Smad4 是转化生长因子 - β (TGF- β) 信号转导中的关键分子, 通过与活化的 TGF- β 受体在胞内的结合而抑制肿瘤细胞的生长、转化^[4]。近年来对 TGF β /Smad 信号转导通路在恶性肿瘤中的研究是当

今的一大热点。Smad4 扮演着抑癌基因的作用, 沉默敲除或者恢复 Smad4, 然后再研究其下游调节基因的表达和生物学特性的改变, 这是倍受广大科研工作者重视的一个科研思路。

自从 RNA 干扰(RNAi)技术的出现, 它已经成为了一种新的反向遗传学手段而被广泛地应用于基因功能的分析、信号转导通路的研究以及基因的治疗^[5-9]。RNAi 是指在真核细胞中引入双链 RNA(dsRNA), 从而使与引入的 dsRNA 序列同源的基因 mRNA 产生特异性降解。因为 RNAi 对靶基因表达的抑制具有特异性和高效性, 所以该技术在疾病相关基因的功能研究及药物的作用机制中发挥着十分重要的作用^[10]。但是质粒介导的 RNAi 有一定的局限性而且转染率也较低, 基因抑制表达作用也较弱, 持续时间短, 也不适合用于体内的实验研究^[11]。而慢病毒载体是一种复制缺陷型的逆转录病毒载体, 是以 HIV1 为基础之上发展起来的, 具有较多的优势^[12,13]。能够转染分裂期细胞和非分裂期细胞, 而且也能将病毒的遗传物质整合到宿主的基因组, 将其用于肿瘤的基因治疗^[14]。慢病毒载体 RNAi 作用较持久, 同时也扩大了载体感染细胞的范围, 目前是很有前途的基因治疗载体。最近, 用慢病毒载体介导 RNAi 的几项体内外的实验研究更加显示了 RNAi 技术在内源性基因功能的研究和治疗是具有前瞻性的重大意义^[15-20]。本实验通过荧光定量 PCR 方法证实, 设计包装的 3 种序列的慢病毒载体均可明显 " 沉默 " 293T 细胞中的 DPC4 基因表达, 其中 SH1 序列沉默表达效果最佳, 可被应用于后续实验之中。

综上所述, 本实验成功构建了 3 种针对 DPC4 /Smad4 基因 RNA 干扰靶点慢病毒载体, 慢病毒包装后可成功转染至人 293T 细胞中, DPC4 基因 " 沉默 " 效果明显。通过比较沉默 SH1 序列效果最佳, 为以后探讨 DPC4/Smad4 基因与肿瘤的相关性治疗提供了实验基础。

参考文献(References)

- [1] Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1 [J]. Science, 1996, 271(5247):350
- [2] Siard C, Kim S, Mirtosis C, et al. In testinal tumorigenesis in compound mutant mice of both DPC4 (Smad4) and Apc genes [J]. J Biol Chem, 2000, 275(7):2063-2072
- [3] Koliopanos A, Avgerinos C, Paraskeva C, et al. Molecular aspects of carcinogenesis in pancreatic Cancer [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2008, 7(4):345-356
- [4] Imamura T, Kanai F, Kawakami T, et al. Proteomic analysis of the TGFbeta signaling pathway in pancreatic carcinoma cells using stable RNA interference to silence Smad4 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318(1): 289-296
- [5] Jazag A, Ijichi H, Kanai F, et al. Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factorβ [J]. Oncogene, 2005, 24(4): 662-671
- [6] Ijichi H, Otsuka M, TatEishi K, et al. Smad4-independent regulation of p21/WAF1 by transforming growth factorβ [J]. Oncogene, 2004, 23(5): 10043-10051
- [7] Shen W, Tao GQ, Li DC, et al. Inhibition of pancreatic carcinoma cell growth in vitro by DPC4 gene Transfection[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(40): 6254-6260
- [8] Angaji SA, Hedayati SS, Poor RH, et al. Application of RNA interference in treating human diseases[J]. J Genet, 2010, 89(4):527-537
- [9] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. Nature, 2001, 411(6836):494-498
- [10] Kaur P, Nagaraja G M, Asea A. Combined lentiviral and RNAi technologies for the delivery and permanent silencing of the hsp25 gene [J]. Methods Mol Biol, 2011, 787: 121-136
- [11] Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral Vector integration[J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(6): 687-696
- [12] AARON C. LOGAN, et al. Factors Influencing the Titer and Infectivity of Lentiviral Vectors[J]. Human Gene Therapy, 2004, 15:976-988
- [13] Qiu JF, Zhang ZQ, Wang Y, et al. Lentivirus -mediated RNAi knock-down of VEGFA in RKO colorectal cancer cells decreases tumor formation and growth in vitro and in vivo [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5 (4):290-298
- [14] Heilbronn R, Weger S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics[J]. Hand Exp Pharmacol, 2010, (197):143-170
- [15] Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(10): 1343-1349
- [16] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: Lentivirus vectormediated druginducible RNA interference[J]. J Virol, 2003, 77(16): 8957-8951
- [17] Hui EK, Yap EM, An DS, et al. Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoterdriven and lentivirusmediated delivery of siRNA [J]. J Gen Virol, 2004, 85(7): 1877-1884
- [18] Numnum TM, Makhija S, Lu B, et al. Improved anti-tumor therapy based upon infectivity-enhanced adenoviral delivery of RNA interference in ovarian carcinoma cell lines[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(1): 34-41
- [19] Eger SA, Hirsch HA, et al. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer[J]. Mol Cell, 2010, 39(4):493-506
- [20] Adlakha YK, Saini N. MicroRNA-128 downregulates Bax and induces apoptosis in human embryonic kidney cells [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(8):1415-1428