

PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA 重组干扰质粒的构建及鉴定

闫琦¹, 丁航², 王文强^{1,3}, 侯敢^{1,2*} (1. 广州市红十字会医院, 广东广州 510010; 2. 广东医科大学, 广东东莞 523000; 3. 广东省妇幼保健院, 广东广州 510010.)

摘要: 目的 构建Survivin shRNA 重组干扰质粒。方法 设计并构建针对4个靶点的Survivin shRNA 重组干扰质粒, 并转染至A549细胞, qRT-PCR、Western blot 检测Survivin表达。结果 4个PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA 质粒中Survivin mRNA 及蛋白水平均明显降低, 其中PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-2 质粒中Survivin表达更低。结论 成功构建了4个PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA 质粒。

关键词: Survivin; 质粒; RNA 干扰; A549 细胞

中图分类号: R 34

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 04-0374-05

Construction and identification of PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA recombinant interference plasmid

YAN Qi¹, DING Hang², WANG Wen-qiang^{1,3}, HOU Gan^{1,2*} (1. Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510010, China; 2. Guangdong Medical University, Dongguan 52300, China; 3. Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 510010, China)

Abstract: **Objective** To construct recombinant surviving-targeting shRNA expressing plasmid. **Methods** Four recombinant survivin-targeting shRNA plasmids were designed and constructed, and then transfected into A549 cells. Survivin expression was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Survivin mRNA and protein levels were significantly decreased in 4 PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA plasmids, especially in PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-2 plasmid. **Conclusion** Four PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA plasmids are successfully constructed.

Key words: survivin; plasmid; RNA interference; A549 cells

Survivin 是凋亡蛋白抑制因子家族 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 中凋亡抑制作用最强的因子, 具有抑制肿瘤细胞凋亡、促进细胞增殖和肿瘤间质血管形成的作用, 目前已成为肿瘤早期诊断和治疗的新靶点^[1]。RNA 干扰 (RNA interfere, RNAi) 是指双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱导的、保守的、同源 mRNA 降解的现象, 目前广泛应用于肿瘤及癌症治疗研究^[2]。本研究依据 RNAi 原理, 合成针对人 Survivin 基因的 shRNA, 选择人类肺腺癌细胞株 A549 为研究对象, 在 mRNA 水平和蛋白表达水平检测 Survivin 基因表达水平的变化, 为进一步研究 Survivin 基因在肿瘤治疗中的作用提供载体工具。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

人肺腺癌细胞 (A549) 由广东医科大学生生化教研室

提供。PGP-U6-GFP-neo 质粒由上海吉玛公司提供。兔源 Survivin (N111) pAb 一抗及 P- 山羊抗兔 IgG 抗体二抗均购自 Bioworld 公司, FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒与 SYBR Green Real time PCR Master Mix 购自天根公司。Trizol RNA 分离试剂、脂质体 Lipofectamine TM2000 购自 Invitrogen 公司。DNA Extraction Kit Ver. 5.0 购自 Takara 公司。EZ DNA Methylation-Gold Kit TM 购自 Zymo Research 公司。PCR 引物上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 shRNA 干扰序列的设计合成 本实验共设计了4个针对 Survivin 基因的干扰靶点, 如表 1。待插入的空质粒带有 Bam HI 和 Bbs I 酶切位点。用 T4 连接酶把经过双酶切的质粒和干扰靶点连接到一起, 构建 PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-1、PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-2、PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-3、PGP-U6-

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2018A030310111)

作者简介: 闫琦 (1988-), 女, 硕士研究生, 主管技师, E-mail: 59677977@qq.com

通信作者: 侯敢 (1963-), 女, 硕士生导师, 教授, E-mail: 414786517@qq.com

GFP-neo-survivin-shRNA-4 重组质粒, 简称 shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3、shRNA-4。

表 1 针对Survivin 基因的 4 个干扰靶点

序号	碱基序列	碱基数/nt	GC 含量
1	CCGCATCTCTACATTCAAGAA	21	42.8%
2	GCGCTTTCCTTTCTGTCAAGA	21	47.6%
3	GCACCACTTCCAGGGTTTATT	21	47.6%
4	GCACTTCAGACCCACTTATTT	21	42.8%

1.2.2 细胞培养与转染 用含有 10%(体积分数)胎牛血清的OPTI-MEM 培养液置于 37 °C, 5%(体积分数) CO₂ 培养箱中常规培养人肺腺癌细胞株 A549 细胞, 取对数生长期的细胞用于实验。将细胞以 4×10⁵ 个细胞/孔的密度接种六孔板。实验设置 5 组: shRNA-1 组、shRNA-2 组、shRNA-3 组、shRNA-4 组、空白对照组。每组设 3 个复孔。采用 Invitrogen 公司的脂质体 LipofectamineTM2000 介导质粒转染细胞, 144 μL 无血清培养基加入 6 μL LipofectamineTM2000 (总体积 150 μL) 室温静置 5 min, 145 μL 无血清培养基加入 3 μg 质粒(总体积 150 μL)。混合质粒 DNA 和 LipofectamineTM2000 的稀释液(共 300 μL)。轻轻混匀并在室温下静置 20 min。将混合液 300 μL 均匀的加入平板中, 未转染的空白对照组加入 300 μL OPTI-MEM 培养液。4 h 后换液, 换入含血清但不含双抗的 1640 培养液, 继续培养, 48 h 时收集细胞。

1.2.3 Survivin mRNA 表达的检测 转染 48 h, Trizol 法提取总 RNA, 用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA。Survivin 正向引物 P1: 5'-TGACGACCCATA GAGGAACA-3', Survivin 反向引物 P2: 5'-CGCACTT TCTCCGCAGTTTC-3', GAPDH 正向引物 P3: 5'-AGG GGTCTACATGGCAACTG-3', GAPDH 反向引物 P4: 5'-CGACCAC TTTGTCAAGCTCA -3'。按照 SYBR Green Real Time PCR Master Mix 说明书, PCR 总反应体系为 20 μL, 其中含 2×Super Real PreMix 12.5 μL, Primer1 (10 μmol/L) 0.5 μL, Primer2 (10 μmol/L) 0.5 μL, cDNA 模板 2 μL, RNase Free dH₂O 4.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 27 个循环。实验重复 3 次。由 PCR 反应曲线得到阈值循环数 (Ct), 以 GAPDH 为内参, 计算目的基因相对表达量 (RQ 值) = 2^{-ΔΔCt}。使用 Graphpad prim8.3 软件进行分析, 抑制率 = (空白对照组相对值 - 重组质粒组相对值) / 空白对照组相对值 × 100%, 取 3 次结果进行统计分析。

1.2.4 Western Blot 检测细胞总蛋白中 Survivin 的表

达情况 转染 72 h 后, 将对数生长期的 5 组细胞按蛋白抽提要求进行处理, 测定蛋白浓度后, 将样品用细胞裂解液稀释为同一浓度, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 条件: 浓缩胶电压 80 V, 30 min, 分离胶电压 120 V, 1 h, 随后将分离的蛋白质恒流 60 V 转移 60 min 转至 PVDF 膜上。在室温摇床上用 20 mL 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 将 PVDF 膜完全浸泡在溶液中。室温摇动封闭 3 h。将一抗(兔抗人 survivin) 用一抗稀释液稀释 1 : 500, 4 °C 摇床孵育过夜, PBS 洗膜 3 次。二抗(山羊抗兔 IgG-HRP) 稀释 1 : 5 000, 放入抗体孵育盒中并与膜接触。温和摇动, 室温孵育 1 h。再用 PBS 洗膜 3 次, 最后在暗室进行显影定影, 以 GAPDH 作为内参, 结果灰度值使用 Quantity One 软件进行分析。抑制率 = (空白对照组灰度相对值 - 重组质粒组灰度相对值) / 空白对照组灰度相对值 × 100%, 取 3 次结果进行统计分析。

1.3 统计学处理

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用 GraphPad Prime 8.3 软件、Quantity One 软件和 SPSS 26.0 软件进行处理, 多组均数之间比较采用单因素方差分析及 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 shRNA 表达质粒的 DNA 测序结果

成功的向重组质粒中插入了设计的 shRNA 的片段, 从测序结果(图 1~4) 可以看到插入的碱基序列与设计 shRNA 的片段的完全一致。(1) PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-1 部分测序结果(划线部分表示插入序列) 见图 1; (2) PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-2 部分测序结果(划线部分表示插入序列) 见图 2; (3) PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-3 部分测序结果(划线部分表示插入序列) 见图 3; (4) PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-4 部分测序结果(划线部分表示插入序列) 见图 4。

2.2 转染 A549 细胞中 GFP 的表达

转染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察 A549 细胞中 GFP 的表达见图 5。

2.3 A549 细胞 Survivin mRNA 表达

内参基因和目的基因扩增曲线指数增长长期平行, 扩增效率基本一致, 且溶解曲线为单一峰值, 结果采用 = 2^{-ΔΔCt} 进行分析。转染 48 h 后, 荧光定量 PCR 进一步精确检测 A549 细胞 Survivin 基因 mRNA 的表达, 结果见表 2。与空白对照组相比较, 转染干扰质粒组表达量

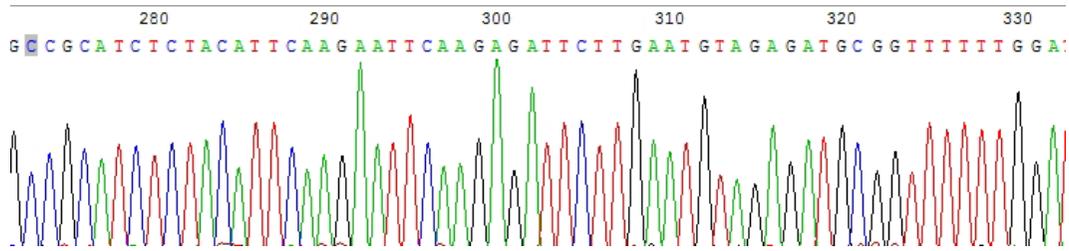


图1 PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-1 插入序列部分测序图

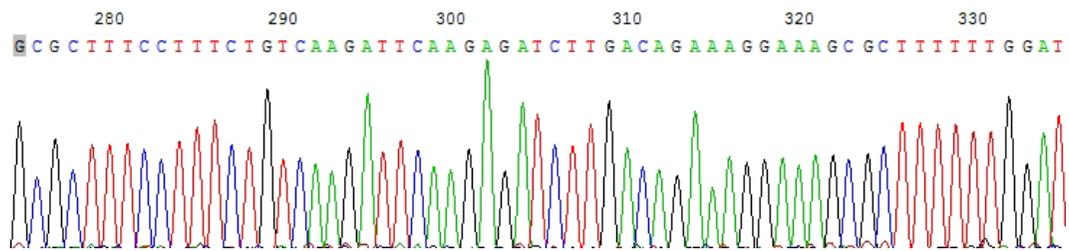


图2 PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-2 插入序列部分的测序图

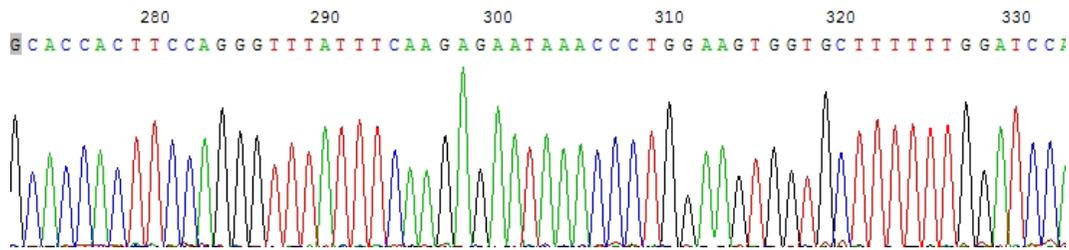


图3 PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-3 插入序列部分的测序图

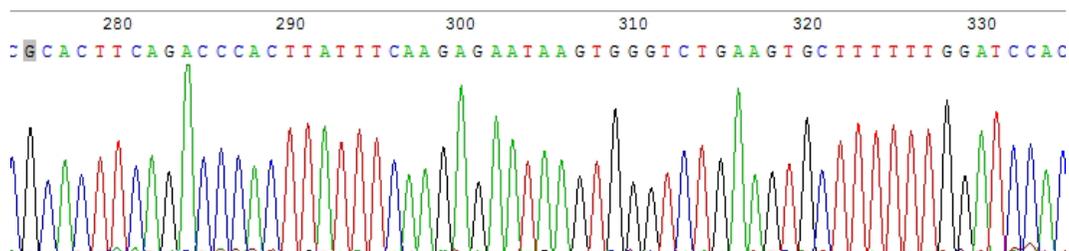


图4 PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-4 插入序列部分的测序图

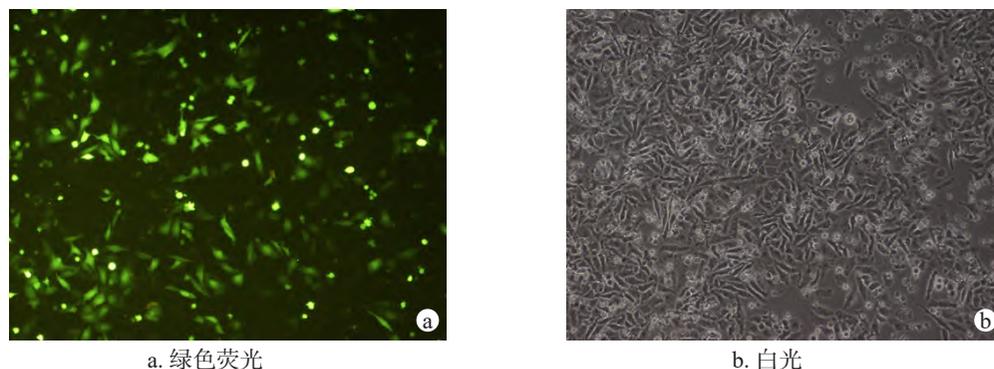


图5 转染48 h后荧光显微镜观察A549中GFP的表达

降低非常明显 ($P < 0.01$), 其中转染 PGP-U6-GFP-neo-Survivin-shRNA-2 质粒组 Survivin mRNA 抑制更为明显。

表2 转染48 h后survivin mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=30$)

序号	重组质粒	Survivin mRNA 相对表达量
1	shRNA-1	0.482±0.061 ^a
2	ShRNA-2	0.196±0.011 ^a
3	ShRNA-3	0.321±0.115 ^a
4	ShRNA-4	0.265±0.073 ^a
5	空白对照	0.992±0.043

与空白对照比较: ^a $P < 0.01$

2.4 Western blotting 检测转染细胞 Survivin 蛋白的表达

转染 72 h 后, Western blotting 检测 A549 细胞 Survivin 蛋白的表达情况见图 6, 与空白对照组相比较, 转染干扰质粒组表达量均有不同程度的降低。Survivin 目的蛋白的大小为 16.5 kD, 以 GAPDH 蛋白作为内参, 大小为 36 kD。

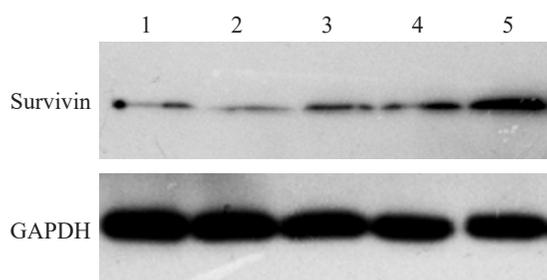


图6 Western blotting 检测A549细胞Survivin蛋白的表达

Western blotting 图片经 Quantity One 软件扫描分析, 比较各组 Survivin 与 GAPDH 蛋白光密度之比, 与空白对照组比较, 转染重组质粒组表达量均有不同程度的降低, 这其中转染 PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA-2 质粒组表达量减少更为明显 ($P < 0.01$), 见图 7。说明 PGP-U6-GFP-neo-shRNA-2 对 Survivin 基因的具有更好的干扰效果。

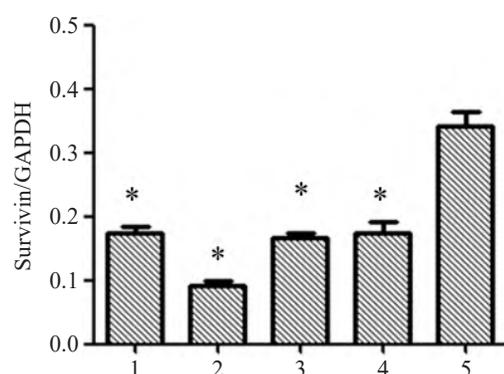


图7 不同重组质粒转染A549细胞Survivin蛋白的表达

3 讨论

Survivin 基因是凋亡抑制蛋白家族中分子量最小的成员, 也是目前发现最强的凋亡抑制因子^[3]。近年研究表明, Survivin 基因与肿瘤的发生、发展密切相关^[4], 尤其在肺癌、胃腺癌、大肠癌、子宫内膜癌等肿瘤组织中高度特异性表达, 其高表达与肿瘤的复发、浸润与转移密切相关^[5-8]。陈海伦等^[9]指出 Survivin 可能参与了宫颈癌的发生、发展过程, 其表达水平有助于宫颈癌的预后评估。

RNA 干扰 (RNAi) 技术是目前研究哺乳动物基因功能的重要工具, 它是指双链 RNA 产生的小 RNA 介导的特异性基因沉默现象, 具有高度专一性, 目前已广泛应用于生物医学等众多领域^[10]。赵立强等^[11]通过 siRNA 干扰沉默 Survivin 基因有效抑制了 CNE-2 细胞的增殖并诱导了细胞凋亡。秦静等^[12]发现基因沉默 Survivin 基因可以诱导视网膜母细胞瘤 HXO-RB44 细胞凋亡, 同时下调血管形成相关因子血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的表达, 进而抑制肿瘤新生血管形成。

本研究通过 RNAi 技术, 成功构建 PGP-U6-GFP-neo-survivin-shRNA 重组载体, 通过转染 A549 细胞株,

检测细胞中Survivin mRNA 和蛋白的相对表达水平,结果显示,重组质粒组Survivin mRNA 和蛋白相对表达水平均明显低于空白对照组,为进一步研究Survivin 基因在肿瘤治疗中的作用提供了载体工具。

参考文献:

- [1] 殷海森, 赵新颖, 苏长青. 以Survivin 为靶标的肿瘤治疗策略[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(3): 342-348.
- [2] 王伟伟, 刘妮, 陆沁, 等. RNAi 技术的最新研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(11): 35-40.
- [3] WIEDEMUTH R, KLINK B, TÖPFER K, et al. Survivin safeguards chromosome numbers and protects from aneuploidy independently from p53[J]. Mol Cancer, 2014, 13: 107.
- [4] JUTZY J M S, KHAN S, ASUNCION-VALENZUELA M M, et al. Tumor-released survivin induces a type-2 t cell response and decreases cytotoxic T cell function, in vitro[J]. Cancer microenviron, 2013, 6(1): 57-68.
- [5] 石琼, 张明辉, 胡思钦, 等. Survivin 基因在肺癌中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(8): 1598-1600, 1550.
- [6] 刘满华. 胃腺癌组织中Livin与Survivin的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (11): 2648-2650.
- [7] 陈菊华, 王一理, 张宏伟. 大肠癌组织中Survivin、MSH2、MSH6 表达及其临床意义[J]. 中国医师杂志, 2020, 22(2): 228-232.
- [8] 冯海利, 侯亮, 梁海峰. 子宫内腺癌中Smac、Bcl-2、Survivin 和 Bax 基因的表达及临床意义 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2016, 23(12): 1443-1446.
- [9] 陈海伦, 宏小翠, 罗幸波, 等. Survivin 和Maspin 在宫颈鳞癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 广东医科大学学报, 2019, 37(2): 142-145.
- [10] 冯小艳, 张树珍. RNAi 作用机制及应用研究进展 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(5): 1-8.
- [11] 赵立强, 马志超, 陈鑫莘, 等. siRNA 沉默Survivin 基因对鼻咽癌CNE-2 细胞凋亡的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(5): 1686-1691.
- [12] 秦静, 周海燕, 张坚, 等. Survivin 基因沉默下调血管形成相关因子表达抑制视网膜母细胞瘤侵袭性及其分子机制研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(18): 3182-3185.

版权声明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊编辑部已将《广东医科大学学报》的文献数据在中国知网、万方数据-数字化期刊群、中教数据库等以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付(在收取发表费时折扣),作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我编辑部上述声明。

本刊编辑部