

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0184-03

· 短篇论著 ·

针对 ATM 基因 RNA 干扰质粒的构建及鉴定

Construction and identification of the RNA interference vector targeting ATM gene

郑爱青¹, 宋现让², 穆海玉¹, 王兴武², 魏玲² (1. 天津武警医学院附属医院肿瘤中心, 天津 300162; 2. 山东省肿瘤医院基础研究中心, 山东 济南 250117)

[摘要] **目的:** 构建针对 ATM 基因的 RNA 干扰表达质粒 pRiATM, 并观察其抑制 SPCA1 人肺癌细胞 ATM 表达的效果。**方法:** 构建针对 ATM 基因的短发夹状小干扰 RNA 真核表达载体 pRiATM, 并短暂转染 SPCA1 细胞, 采用荧光定量 RT-PCR 和 Western blotting 观察其抑制 SPCA1 细胞 ATM 表达的效果。**结果:** pRiATM1 和 pRiATM2 转染 SPCA1 细胞后, 与转染 pRiGFP 非特异性对照组相比, ATM mRNA 水平分别下降 86.4% 和 77.6% (两组均 $P < 0.01$)。与转染 pRiGFP 对照组相比, pRiATM1 组和 pRiATM2 组 ATM 蛋白表达水平分别是对照组的 4.3% 和 10.6% (均 $P < 0.01$), 以 pRiATM1 抑制 ATM 表达效果最显著。**结论:** pRiATM 质粒构建成功, 转染 SPCA1 细胞后可以明显抑制 ATM 基因的表达。

[中图分类号] R730.54 [文献标志码] A

ATM (ataxia-telangiectasia mutant) 基因是毛细血管扩张-共济失调症的致病基因。研究已证实 ATM 基因及其表达产物与细胞放射敏感性有关^[1]。本研究采用 DNA 载体细胞内表达小干扰 RNA (short interference RNA, siRNA) 技术, 构建干扰质粒 pRiATM, 并观察其抑制人 SPCA1 肺癌细胞 ATM 表达的效果。

1 材料与方法

1.1 主要材料

pSUPER 载体由 Rrummelkamp 博士惠赠, 是将 H1 RNA 启动子插入 PBSK 质粒的 EcoR I 和 Hind III 位点而成。大肠杆菌 JM109 由山东省肿瘤医院基础研究中心保存。ATM 抗体购自 Chemicon 公司, Lipofectamine 为 sigma 公司产品, 限制性内切酶购自 Promega 或 Takara 公司; CO₂ 培养箱为 Heraeus 公司的 HERA CELL240 型; 荧光定量 PCR 仪为 ABI 7000 型; Real Time PCR 试剂盒为大连宝生物公司。

1.2 寡核苷酸链 (ODN) 的设计与合成

根据 GenBank 中 ATM 核苷酸序列 (XM001138999), 用 Ambion 公司提供的 siRNA 筛选工具 siRNA target finder 查找并选择前面为 AA, 以 G 开始、GC 含量在 30% ~ 50% 的 19 nt (不包括 AA) 的 2 个核苷酸序列作为 siRNA 靶点。将选出的序列作 BLAST, 确认与其他基因无同源序列。2 个靶序列分别针对 ATM 基因的第 1 714 ~ 1 734 和 5 545 ~ 5 565 位点, 分别设计寡核苷酸链 (有下划线者为靶序列及反义靶序列), 单链 DNA 均为 59 nt, 5' 和 3' 端分别引入 BamH I 和 Hind III 酶切位点, 5' 端 19 nt 编码 siRNA 正义链, 3' 端 19 nt 与 5' 端 19 nt 反向重

复, TTTTT 为转录终止信号。ODNs 由上海生工生物技术服务有限公司合成: (1) 正义链 5'-GAT CCC C GT CAT ATA GGA AGT AGA GGT AGA GCC CTC TAC TTC CTA TAT GAC TTT TTG AA-3', 反义链 5'-AGC TTC AAA AAG TCA TAT AGG AAG TAG AGG GCT CTA CCT CTA CTT CCT ATA TGA CGG G-3'; (2) 正义链 5'-GAT CCC CGT GTT TAT GAT GCA CTT CCT AGA GCG GAA GTG CAT CAT AAA CAT TTT TGA A-3', 反义链 5'-AGC TTC AAA AAT GTT TAT GAT GCA CTT CCG CTC TAG GAA GTG CAT CAT AAA CAC GGG -3'。同时选择一 GFP 序列作为非特异性 RNA 干扰对照: 正义链 5'-GAT CCC CGC TGA CCC TGA AGT TCA TCT AGA GC GAT G AA CTT CAG GGT CAG CTT TTT GAA-3', 反义链 5'-AGC TTC AAA A A G CTG ACC CTG AAG TTC ATC CTC TTG A GAT GAA CTT CAG GGT CAG C GGG-3'。

1.3 shRNA 表达质粒的构建

合成的 ODNs 用 T4 PNK 磷酸化后, 将每对互补的 ODNs 在 PCR 仪中 95 °C, 5 min, 室温 30 min, 退火, 分别形成具有 BamH I 和 Hind III 酶切位点的双链 DNA, pSUPER 质粒用 Bgl II 和 Hind III 双酶切, 电泳后回收 3.1 kb 载体片段, 与上述形成的双链 DNA 体外连接, 产生短的发夹结构 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 表达载体, 对应 3 个靶序列分别命名为 pRiATM1、pRiATM2、pRiGFP。转化大肠杆菌

[作者简介] 郑爱青 (1968-), 女, 山东潍坊人, 博士研究生, 主要从事肿瘤放射治疗方面的研究

[通讯作者] 宋现让, E-mail: sxr@vip.163.com

JM109, 氨苄青霉素筛选阳性克隆, 扩增转化菌, 少量抽提质粒 DNA, 再用 *Bgl* II 酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定。将初步鉴定正确的阳性克隆进行中量抽提, 送上海生工生物技术公司进行测序鉴定。

1.4 质粒的转染

将 SPCA1 细胞按 2×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 加入含 10% FCS 的 DMEM 培养液 2 ml, 37 °C、5% CO₂ 温箱中孵育 24 h, 待细胞达 50% ~ 80% 汇合。于转染前 1 h 弃去原培养液, 每孔加入 1.8 ml 无血清的 DMEM。共分 4 组: 未转染组、转染 pRiATM1 组、转染 pRiATM2 组、转染 pRiGFP 组。按 2 μg DNA 或 10 μl Lipofectamine 与 100 μl 无血清 DMEM 混合的比例, 分别将质粒与无血清 DMEM 混合后, 再与用无血清 DMEM 混合的 Lipofectamine 混合, 轻轻混匀, 室温放置 30 min, 以形成 Lip-DNA 复合物。每孔加入含 Lip-DNA 复合物的无血清培养液 200 μl, 温箱中孵育 5 h 后, 弃去原培养液, 每孔加入 2 ml 含 10% FCS 的 DMEM 培养液, 24 h 后进行 RNAi 表达效果的处理。

1.5 定量 RT-PCR 测定 ATM mRNA 的表达水平

用一步法提取 SPCA1 细胞总 RNA。用 Primer Express 软件(ABI 公司)设计 ATM 定量 RT-PCR 的上下游引物和探针, 上游引物为: 5'-GAA TAA TTC ATG CTG TTA CCA-3', 下游引物为 5'-GAA TAC TTT CCT CTA CTT CCT ATA T-3'; ATM 探针: FAM5'-TGA ATT AGG A GAT GAA ATT CTT C-3' TAMRA。用 20 μl 逆转录体系逆转录合成 cDNA: 5 × M-MLV Buffer 4 μl, random 6mers primer 1 μl, dNTP mix 1 μmol/L, M-MLV RTase 0.5 μl, RNase inhibitor 0.5 μl, 总 RNA 500 ng。42 °C 15 min, 95 °C 2 min。选择基因 *β-actin* 做内对照。定量 PCR 采用 25 μl 反应体系: 2 × master mix 12.5 μl, cDNA 模板 50 ng, ATM 引物 200 nmol/L, 探针 100 nmol/L; *β-actin* 引物 100 nmol/L, 探针 50 nmol/L。扩增条件为: 50 °C 2 min, 95 °C 15 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s; 40 循环。扩增结束后 SDS 分析计算 Ct 值和 Δ Ct, Δ ΔCt = 目的基因 Ct - 内对照基因 Ct, Δ ΔCt = Δ Ct_{目的基因} - Δ Ct_{标准值}。

1.6 Western blotting 检测 ATM 蛋白的表达水平

弃去 6 孔板中的培养液, 用冷 PBS 冲洗 2 次, 然后置于冰上, 加 200 μl 细胞裂解液于孔中, 20 min 后收集裂解液, 离心 10 min, 取上清液, 沸水浴加热变性 3 min。制备 SDS-PAGE 凝胶, 将样品点于凝胶加样孔中, 电泳 1.5 h。将样品转移到硝酸纤维素膜上, 置于封闭液中, 4 °C 冰箱孵育过夜, 将膜卷曲置

于离心管中, 用 PBS 冲洗, 在一抗(ATM 抗体)中孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 用二抗温育 30 min, DAB 显色, 用 EDTA 缓冲液终止显色反应。把膜放在暗盒内, 将 X 胶片放入暗盒感光、洗片, 以 *β-actin* 为内对照, 用 Multiimage light cabinet 和软件分析各条带的相对灰度。

2 结果

2.1 shRNA 表达质粒的构建和鉴定

用 *Bgl* II 酶切提取的质粒, 因 shRNA 表达质粒阳性克隆的 *Bgl* II 酶切位点破坏, 故不能被 *Bgl* II 切开, 以此筛选阳性克隆, 共得到 5 个阳性克隆(图 1)。经 DNA 测序证实, 干扰质粒构建成功。

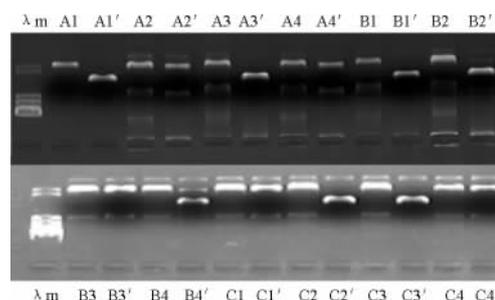


图 1 shRNA 表达质粒 *Bgl* II 的酶切鉴定

λm: DNA Marker; A1-A4, B1-B4, C1-C4: 对照质粒;
A2', A4', B3', C1', C4': 阳性质粒;
A1', A3', B1', B2', B4', C2', C3': 阴性质粒

2.2 pRiATM 转染 SPCA1 细胞 ATM mRNA 的表达

采用瞬时转染 SPCA1 细胞, 然后定量测定 ATM mRNA 表达水平。pRiATM 转染 SPCA1 细胞后, 与转染 pRiGFP 非特异性对照组相比, 针对两个不同序列的 RNA 干扰质粒均有显著的 RNA 干扰效果, 转染 pRiATM1 组和 pRiATM2 组 ATM mRNA 水平分别下降 86.4% 和 77.6% (均 $P < 0.01$)。

2.3 RNA 干扰对 ATM 蛋白表达的影响

为证实在 mRNA 水平上的基因沉默效果, 进一步用 Western blotting 检测了 ATM 蛋白的表达水平。Western blotting 结果显示, 与未转染组相比, 转染 pRiGFP 非特异性对照组 ATM 蛋白无明显表达变化; 而 pRiATM 转染 SPCA1 细胞后, ATM 蛋白表达量较未转染组或 pRiGFP 非特异性对照组均有明显下降, 表达水平分别是转染 pRiGFP 对照组的 4.3% 和 10.6% (均 $P < 0.01$), 以 pRiATM1 抑制 ATM 表达效果最显著(图 2)。

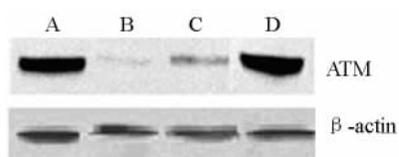


图2 pRiATM转染SPCA1细胞后ATM蛋白表达的改变

A: 未转染组; B: 转染 pRiATM1 组;
C: 转染 pRiATM2 组; D: 转染 pRiGFP 组

3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是当今生命科学界的研究热点,指双链 RNA(dsRNA)进入细胞后特异性阻断与其同源的基因表达的现象,具有高特异性、高效性、传递性及霎时间剂量依赖性等特征^[2],是抑制基因表达的有力工具,可同时抑制多个不同基因,而且抑制效果互不干扰。Elbashir^[3]模拟 dsRNA 在线虫中诱导 RNAi 的方法,采用人工合成 19~21 bp 的双链 RNA 在哺乳动物细胞内成功诱导 RNA 干扰。但体内应用 RNA 易被 RNase 降解,为解决这一问题,目前,利用 RNA 干扰在治疗白血病、艾滋病、乙型肝炎的研究中成功地下调了相关基因的表达^[4-6]。

当细胞遭受电离辐射、药物等各种因子造成 DNA 损伤后,导致 ATM 激酶快速激活,作为直接感受 DNA 双链断裂损伤信号的上游分子,以其激酶活性,依次催化多种在 DNA 损伤识别、修复及细胞周期检测点的一系列重要功能底物蛋白的磷酸化。ATM 功能丧失可引起细胞对电离射线的高度敏感,照射后引起细胞周期控制缺陷和染色体不稳定性。在一些缺少 ATM 的细胞系,对放射线的敏感性增加大约 4 倍。在 ATM 突变体的转基因小鼠,低至 4 Gy 的射线即可致命^[7]。研究发现,ATM 至少可通过两个途径发挥作用:一是 ATM 作为 p53 的上游调控蛋白,通过磷酸化 p53 的 15 位丝氨酸(ser15)活化 p53^[8];二是 ATM 通过 G₁/S 和 G₂/M 细胞周期检测点发挥作用^[9]。ATM 通过控制 G₁/S 检测点,防止 DNA 受损的细胞进入 S 期的 DNA 复制;通过控制 G₂/M 检测点,防止受损的 DNA 和未完成复制的 DNA 进入有丝分裂。ATM 通过 Chk2 控制 G₁ 和 G₂ 期阻滞。

ATM 在 DNA 损伤修复机制中的上游地位,决定了以 ATM 为靶基因进行放射增敏基因治疗的策略是可行的。本研究采用 siRNAs 表达质粒在细胞内的转录方法,以在 DNA 损伤修复过程中起关键作

用的 ATM 基因为靶基因,构建干扰质粒,实验结果表明 H1 RNA 启动子能有效启动 shRNA 的表达,pRiATM 转染 SPCA1 细胞后,与对照组相比,针对两个不同序列的 RNA 干扰质粒均有显著的 RNA 干扰效果,ATM mRNA 水平分别下降 86.4% 和 77.6%,以 pRiATM1 抑制 ATM 表达效果最显著。RNA 干扰作用受多种因素的影响。本研究证实了肿瘤细胞中 RNAi 作用受靶序列的影响,我们按靶序列选择原则选择了 2 个针对 ATM 基因的序列,发现不同靶序列的 ATM RNA 干扰质粒在同一细胞作用不同。这可能是由于目前 siRNA 靶序列的设计原则尚不成熟,靶序列的选择仍有很大的随机性。

综上所述,采用质粒介导的方法能有效地在肿瘤细胞实现 RNA 干扰,本实验为在临床前动物模型中发展肺癌放射增敏基因治疗策略奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] Gueven N, Keating KE, Chen P, *et al.* Epidermal growth factor sensitizes cells to ionizing radiation by down-regulating protein mutated in ataxia-telangiectasia[J]. *J Biol Chem.* 2001, 276(12): 8884-8891.
- [2] 柳永蕾,宋现让. 乏氧诱导因子-1 与肿瘤乏氧的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 11(3): 229-232.
- [3] 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.
- [4] Withey JM, Harvey AJ, Crompton MR. RNA interference targeting of Bcr-Abl increases chronic myeloid leukemia cell killing by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin[J]. *Leuk Res*, 2006, 30(5): 553-560.
- [5] Leonard JN, Schaffer DV. Computational design of antiviral RNA interference strategies that resist human immunodeficiency virus escape[J]. *J Virol*, 2005, 79(3): 1645-1654.
- [6] Zhang XN, Xiong W, Wang JD, *et al.* siRNA-mediated inhibition of HBV replication and expression[J]. *World J Gastroenterol.* 2004, 10(20): 2967-2971.
- [7] Spring K, Ahangari F, Scott SP, *et al.* Mice heterozygous for mutation in *Atm*, the gene involved in ataxia-telangiectasia, have heightened susceptibility to cancer[J]. *Nat Genet*, 2002, 32(1): 185-190.
- [8] Kurz EU, Lees-Miller SP. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways[J]. *DNA Repair.* 2004, 3(8-9): 889-900.
- [9] Buscemi G, Perego P, Carenini N, *et al.* Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks[J]. *Oncogene.* 2004, 23(46): 7691-7700.

[收稿日期] 2006-10-16

[修回日期] 2007-01-20

[本文编辑] 王莹