

文章编号:1005-6947(2008)03-0250-03

· 基础研究 ·

携带 SKP2 基因的 shRNA 表达质粒的构建与鉴定

任金帅, 程石, 宋茂民

(首都医科大学附属北京天坛医院 普通外科, 北京 100050)

摘要:目的 构建含人 SKP2 基因不同位点的一系列 shRNA 真核表达质粒, 并进行酶切鉴定、测序。方法 设计合成 3 对 SKP2 基因干扰寡核苷酸序列, 形成双链后将其依次连入带有 U6 启动子的 pSIREN-RetroQ 载体, 构建成能产生 SKP2 短发卡 RNA 的质粒。结果 构建的核苷酸序列经鉴定构建成功, 能成功的克隆入带有 pSIREN RetroQ 的载体中。结论 成功构建并鉴定了针对人 SKP2 基因 3 个不同位点的 shRNA 的真核表达质粒, 为 SKP2 为靶点的肿瘤基因治疗研究奠定了基础。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(3): 250-252]

关键词: 质粒; pSIREN-RetroQ 载体; SKP2; RNA 干扰; 胰腺肿瘤/治疗

中图分类号: R 73-36 **文献标识码:** A

Construction and appraisal of SKP2 gene shRNA expression plasmid

REN Jinshuai, CHENG Shi, SONG Maomin

(Department of General Surgery, Beijing TianTan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To construct and appraise a series of shRNA eukaryotic expression plasmid which contains vary spots of human SKP2 gene. **Methods** Three pairs of hairpin-like oligonucleotide sequences specific for human SKP2 gene were designed and synthesized. They were cloned into the eukaryotic expression pSIREN-RetroQ plasmid. The recombinated plasmids were confirmed by PCR and sequencing. **Results** The shRNA sequences were constructed successfully, and could be inserted into the eukaryotic expression vector pSIREN-RetroQ. **Conclusions** Three shRNA transcribing plasmids pSIREN-RetroQ are successfully constructed, and form a basis for research in cancer gene target therapy against SKP2 gene.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(3): 250-252]

Key words: Plasmids; pSIREN-RetroQ Vector; SKP2; RNA Interference; Plasmids; Pancreatic Neoplasms/ther

CLC number: R 73-36

Document code: A

泛素-蛋白酶体途径是真核细胞中选择性地降解短寿命蛋白的重要途径。S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase-associated protein 2, SKP2) 是此途径中的一个重要组件, 也是决定细胞周期素依赖性激酶抑制因子 p27 降解的关键蛋白。近年来, 在实体瘤的研究中发现 SKP2 是癌蛋白, 能促进癌

细胞的细胞周期进展, 与多种恶性肿瘤的发生和发展过程密切相关^[1]。因此, 有效抑制 SKP2 基因的表达可望为胰腺癌的治疗提供一个新的途径。本研究拟构建以 SKP2 基因为靶向的表达载体, 为利用 SKP2 shRNA 表达载体抑制肿瘤生长奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 E. coli DH5 α 购自中国医学科学院基础研究所; 质粒载体 clontech RNAi-ready pSIREN-retroQ vector 购自美国 BD Clontech 公司, 其上

基金项目:北京市优秀人才专项培养经费资助项目。

收稿日期:2007-11-23; **修订日期:**2008-02-04。

作者简介:任金帅,男,首都医科大学附属北京天坛医院博士研究生,主要从事肝胆疾病基础与临床方面的研究。

通讯作者:宋茂民 E-mail:doctorrjs@163.com

游含有 U6 启动子启动目的基因的表达,末端含有嘌呤霉素 (puromycin) 的抗性基因,作为筛选标志,序列中同时含有 BamH I 和 EcoR I 双酶切位点作为标记。T4 DNA ligase 酶为美国 Ambion 公司产品;小量质粒提取试剂盒、限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 购自日本 Takara 公司。

1.2 SKP2shRNA 的设计与合成

针对 SKP2 mRNA 全序列 [GenBank (基因库) 序列号 NM_005983.2 和 NM_032637.2] 和 Yoshiyuki 等^[2] 的文献报道,在 Reynolds 设计原则^[3] 的基础上,设计合成 3 对 SKP2 基因干扰寡核苷酸序列以及 1 对阴性对照寡核苷酸序列,即 SKP2 A, SKP2 B, SKP2 C 及 SKP2 N, 经过 BLAST 数据库分析未发现同源序列。其中每条序列包括:两端酶切位点序列,两条反向互补排列的 19ntSKP2 特异序列,中间加上 loop 环 9 个核苷酸序列以及作为终止信号的 6 个胸腺嘧啶核苷。序列如下。

SKP2 A 核苷酸序列: 5'-gatccgGGGAGTGA-CAAAGACTTTGttcaagaga-CAAAGTCTTTGCTACTCCC-cttttg-3'; 3'-gcCCCTCACTGTTTCTGAAACaagtctt-ctGTTTCAGAAACAGTGAGGG gaaaaacttaa-5' 针对 220 ~ 238 bp 位置。SKP2 B 核苷酸序列: 5'-gatccgGAG-GAGCCCACAGTGAGAttcaagagaTCTCACTGTCTGGGCT-CCTCcttttg-3'; 3'-gcCTCTCGGGCTGTCACTCTaagtctct-AGAGTGACAG-CCCGAGGAGgaaaaacttaa-5' 针对 130

~ 148 bp 位置。SKP2 C 核苷酸序列: 5'-gatcc-gATCGAGAGAACCTTTCAGGttcaagaga-CCTGGAAAGT-TCTCTCGATcttttg-3'; 3'-gcTAGCTCTCTTTGAAAGGTC-CaagtctetGGACCTTTCAGAGAGCTA gaaaaacttaa-5' 针对 263 ~ 281 bp 位置。SKP2 N 核苷酸序列: 5'-gatccgGGT-TAACGTGAAGAC-GTGAttcaagagaTCACGTCTTCACGT-TAACCTcttttg-3'; 3'-gcCCAATTGC-ACTTCTGCCTaagt-tctctAGTGCAGAAGTGCAATTGGgaaaaacttaa-5'。

1.3 质粒表达载体的构建

首先将合成的两条寡核苷酸等量混合,使体系在 94℃ 变性 3 min 后,将退火产物(双链寡核苷酸)与线性化的 pSIREN-RetroQ 质粒载体连接;各取 5 μL 连接产物转化感受态细胞 E. coli DH5α, 涂布于含氨苄青霉素的琼脂平板上,37℃ 恒温培养过夜。从每个培养皿上各挑取 3 个单菌落接种于 3 mL 含氨苄青霉素抗性的 LB 培养液中,37℃ 恒温摇床培养过夜。用试剂盒小量提取质粒,并做 BamH I 和 EcoR I 酶切鉴定。根据引物设计原则,设计合成引物,进行菌落多聚酶链反应(PCR)扩增,鉴定阳性克隆。引物设计序列: pSIREN-F1 为 5'-TGGATGTGGAATGTGTGCGA-3'; pSIREN-R1 为 5'-TTTGTACACCCTAAGCCTCC-3'。电泳图片见图 1-2。对于 PCR 鉴定阳性的克隆再进行测序鉴定,最后大量制备测序鉴定构建正确的重组质粒。

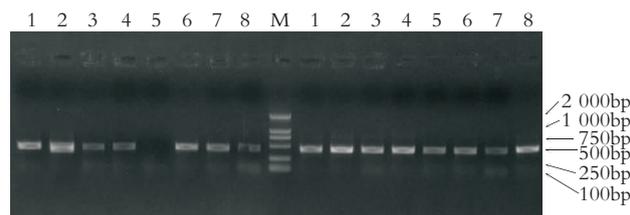


图1 菌落 PCR 扩增产物电泳图 M: DNA Marker DL2000; 1~8: 随机选取菌落 PCR 扩增产物

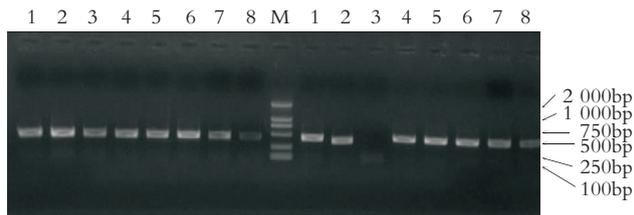


图2 菌落 PCR 扩增产物电泳图 M: DNA Marker DL2000; 1~8: 随机选取菌落 PCR 扩增产物

1.4 阳性克隆鉴定

用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 对重组质粒进行双酶切及 BamH I 单酶切鉴定,电泳观察插入子及载体片段的相对分子质量;同时进行测序鉴定。

2 结果

2.1 SKP2-shRNA 质粒载体的构建、电泳结果

提取的质粒 SKP2 A, SKP2 B, SKP2 C 及 SKP2-N 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,可见到一条明确的 6.4 kb 条带,且亮度较高(图 3),证明构建的核苷酸序列成功克隆入载体中。

2.2 酶切鉴定

pSIREN-SKP2-A, pSIREN-SKP2-B, SIREN-SKP2-C 及 pSIREN-SKP2-N 质粒经 BamH I 和 EcoR I 双酶切,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯观察被切下的辅助序列大约有 100 bp(图 3)。证明该逆转录病毒载体已被 BamH I 和 EcoR I 线性化,克隆的 DNA 序列正确。pSIREN-SKP2-A, pSIREN-SKP2-B, pSIREN-SKP2-C 及 pSIREN-SKP2-N 质粒经 BamH I 单酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯观察被切下的片断大约 6.5 kb(图 4)。

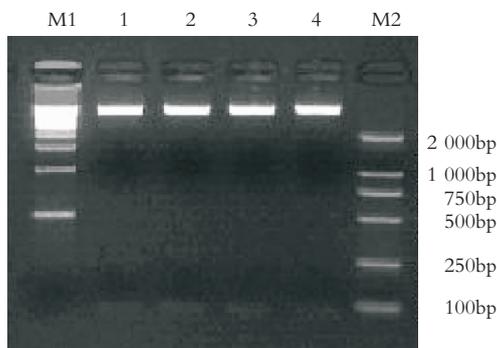


图 3 质粒 DNA BamH I/EcoR I 双酶切鉴定凝胶电泳图
1:SKP2 A; 2:SKP2 B; 3:SKP2 C; 4:SKP2 N; M1:DNA Marker DL(500 ~ 12 000); M2:DNA Marker DL 2 000

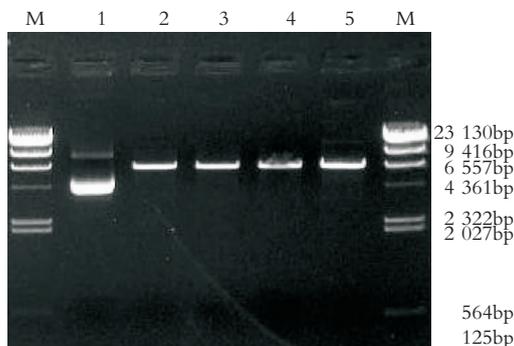


图 4 质粒 DNA BamH I 单酶切鉴定凝胶电泳图 M: λ -Hind III DNA Marker; 1:SKP2A 质粒对照; 2:SKP2A 质粒 BamH I 单酶切; 3:SKP2B 质粒 BamH I 单酶切; 4:SKP2C质粒 BamH I 单酶切; 5:SKP2N 质粒 BamH I 单酶切

2.3 测序鉴定

经 Takara 生物公司测序,进一步证实重组质粒载体序列正确。

3 讨论

RNA 干扰现象是生物在进化过程中一种保守的抵御转基因或外来病毒侵犯的防御机制。它以一个特异的 mRNA 降解为目标,不影响非同源 mRNA 的稳定性,是 mRNA 水平上令特定基因沉默的一种细胞通路。通过诱导序列特异性的 mRNA 降解,而产生相应的功能表型缺失,这一过程属于转录后基因沉默机制范畴。RNA 干扰能高效特异地干涉目标靶基因的表达,可作为一种简单有效的代替基因敲除的工具。

RNA 干扰中通常有化学合成、体外转录、核酸内切酶消化长链 RNA 及 siRNA 表达框架的 PCR 产物及载体介导等 5 种方式用于产生 siRNA。采用载体介导的方式在体内表达 shRNA 的干扰原理是首先化学合成一段编码 siRNA 正义和反义链模板,正义与反义序列之间由一段 loop 序列隔开,插入载体启动子下游,然后转入细胞,loop 序列可使转录出的 RNA 链折叠成发卡结构的小 RNA 分子,这些小 RNA 可被细胞内的 Dicer 酶切割为长 21 ~ 25 nt 的 siRNA,引起特定的基因沉默。载体在细胞内通过转录持续产生 siRNA,可延长 siRNA 作用时间并提高干扰效率。该法与化学合成法相比可以大幅度降低合成成本^[4-5]。

1995 年 Demetrick 等^[6]发现两种蛋白能与 S 期激酶 cyclinA-CDK2 相互作用,分别命名为 SKP1 和 SKP2。SKP2 基因定位于人 5 号染色体短臂上(5p13),分子质量约 45 kD。SKP2 由 F-box 序

列、“Linker”序列、蛋白-蛋白相互作用模块如亮氨酸重复序列结构域(leucine-rich repeat, LRR)依次连接构成。目前认为,肿瘤发生的共同特征是细胞周期调控机制的紊乱导致细胞的失控性生长,而 SKP2 能够降解某些调控细胞周期的周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKI),其在肿瘤治疗中的作用日益受到重视。

本实验针对 SKP2 基因编码区的不同部位设计了 3 条 shRNA 序列,并且克隆到载体中,成功构建了 SKP2 shRNA 真核表达载体。此结果为今后进一步对 SKP2 基因的肿瘤靶向治疗研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Yokoi S, Yasui K, Saito Ohara F, *et al.* A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(1):207-216.
- [2] Yoshiyuki K, Yutaka H, Shigeo K. Knockdown of Skp2 by siRNA inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo [J]. *J Dermatol Sci*, 2006, 42(3):215-224.
- [3] Reynolds A, Leake D, Boese Q, *et al.* *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3):326-330.
- [4] Yu JY, De Ruiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9):6047-6526.
- [5] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002, 296(5567):550-553.
- [6] Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH, *et al.* Chromosomal map-ping of the genes for the human CDK2/cyclinA-associated proteins p19 (SKP1A and SKP1B) and p45 (SKP2) [J]. *Cyto-genet Cell Genet*, 1996, 73(1-2):104-107.