基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0165-04

小鼠 MK 基因 siRNA 重组腺病毒载体的构建及鉴定

杨根岭,张晋平,徐 倩,谭冬梅,赖国旗,谭 毅
(重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建小鼠肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的死亡受体(Mouse killer,MK)基因干扰 RNA(Small interfering RNA,siRNA)重组腺病毒并在小鼠子宫基质细胞中鉴定其干扰作用。方法:人工合成靶向 MK 的 siRNA 干扰序列,将其克隆到穿梭载体 pSES-HUS 上,并与腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 在 BJ5183 细菌中进行同源重组,得到 pAdeasy-SES-HUS-MKsiRNA,在 HEK293 细胞中包装并扩增腺病毒颗粒。用纯化后的腺病毒混合液感染原代培养的小鼠子宫内膜基质细胞,RT-PCR 及 Western Blot 检测基质细胞中 MK 的 mRNA 及蛋白表达水平。结果:Adeasy-SES-HUS-MKsiRNA 混合液均效价为 6.8×10^{11} pfu/ml,感染原代培养的小鼠子宫内膜基质细胞 48 h 后,MK 的 mRNA 及蛋白水平均显著下调。结论:构建的 MK 干扰表达腺病毒能有效地抑制 MK 基因的表达,为进一步研究 MK 在小鼠子宫基质细胞的功能提供了有效的工具。

【关键词】Mouse killer 基因;RNA 干扰;重组腺病毒
【中国图书分类法分类号】Q953.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-19

Construction and identification of mouse killer gene siRNA recombinant adnovirnovius

Yang Gen-ling, et al
(*Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the recombinant adenovirus carrying a short interfering RNA (siRNA) targeting MK (mouse killer) gene and identify its inhibitive effect in mouse uterine stromal cells. *Methods*: The siRNA sequence targeting MK gene was synthesized and cloned into the shuttle plasmid pSES-HUS to generate the vector pSES-HUS-MKsiRNA, which was later homogenously recombinanted with the adenovirus backbone plasmid pAdeasy-1 in Ecoli BJ5183.Then the recombinant adenovirus was transfected into HEK293 cells to be packaged and amplified. The primarily cultured mouse stromal cells were infected with this purified adenovirus and the expression levels of MK mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western Blot. *Results*: The recombinant adenoviral vector containing MK siRNA was correctly constructed with an average titer of 6.8×10^{11} pfu/mL.Both the MK mRNA and protein levels were signifcantly decreased in the uterine stromal cells after 48 hours of infection with MK siRNA recombinant adenovirus. *Conclusion*: The generated recombinant adenovirus Adeasy-MK-siRNA was demonstrated to significantly abrogate the expression of MK at mRNA and protein level in mouse uterine stromal cells.

【Key words】Mouse killer gene; RNA interference; Recombinant adenovirus

TRAIL(TNF related apoptosis inducing ligand)是 TNF 家族成员,能够通过内源性(线粒体)和外源性(死亡受体)两种途径诱导肿瘤细胞凋亡而不会对正常组织细胞的生长产生影响,因此近年来被认为是一种极具潜力且安全的抗肿瘤因子[1]。TRAIL 通过靶细胞表面的受体来执行其功能,在人类已发现有 5 种 TRAIL 受体[2],DR4、DR5、DcR1、DcR2 和 OPG(Osteoprotegerin),其中 DR4、DR5 为死亡受体,含胞内死亡结构域(Death domain,DD)和依赖 Caspase 途径的凋亡信号的识别结构。DR5(Death receptor 5)是 1997 年 Pan 等克隆发现的含有死亡结构域的 TRAIL 受体,属于 I 型膜蛋白,可与 TRAIL 结合诱导细胞凋亡。近年来发现一些抗 DR5 单抗特异性地作用于 DR5, 与 TRAIL 一样通过细胞内凋亡途径诱导肿瘤细胞凋亡[3],它既不受 TRAIL 其它受体及护骨素的影响,同时,在体内比 TRAIL 更稳定[4]。在小鼠也发现 5 种 TRAIL 受体,其中 TRAI 的死亡受体(Mouse killer,MK)与人类的 DR5 是同系物,是唯一可诱导细胞凋亡的 TRAIL 受体。本课题组在前期工作中发现 MK 在小鼠胚胎植入后的子宫上皮细胞及蜕膜基质细胞中呈高表达,推测 MK 在小鼠蜕膜过程中对上皮细胞和蜕膜细胞的增殖和凋亡具有一定作用,进一步推测 MK 可能在胚胎植入过程中发挥着重要作用。为

作者介绍:杨根岭(1984-),男,硕士,
研究方向:胚胎植入与肿瘤侵袭相似性研究。
通讯作者:谭 毅,男,研究员,E-mail:tanyee66@hotmail.com。
基金项目:国家自然科学基金(编号 30770816)。

了更好研究 MK 在胚胎植入过程中的作用，我们设计针对小鼠 MK 基因的有效干扰序列，构建重组腺病毒干扰载体，并用“鸡尾酒”的方法在小鼠子宫内膜基质细胞中检测其干扰效果，为研究胚胎植入过程中胚胎滋养层细胞对子宫内膜的适度侵袭提供了有效的工具。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级昆明小鼠，6~8 周龄，体量 20~25 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，合格证号为【SCXK(渝)2007-0001】；载体 pSES-HUS，pAdeasy-1 由重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室和重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室惠赠；限制性内切酶 *Sfi* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ、T4 DNA 连接酶、Taq 聚合酶、DNA Marker、dNTP、RT-PCR 试剂盒均购自 Takara 公司，MK 的干扰序列，MK 引物和 β-actin 内参引物由 Takara 公司合成；限制性内切酶 *Pac* Ⅰ和 *Pme* Ⅰ购自 New Eng land Bio Lab 公司；DNA 纯化试剂盒购自 Omega 公司；质粒提取试剂盒购自 Promega 公司；Lipofectamine™2000 Reagent 转染试剂盒、TRIZOL、DMEM/F12 无酚红培养基、活性炭处理胎牛血清和胶原酶购自 Invitrogen 公司；膜蛋白提取试剂盒购自凯基生物发展有限公司；MK 多克隆抗体、β-actin 山羊抗小鼠多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司；辣根酶标记兔抗山羊二抗购自京中杉公司；ECL 化学发光法检测试剂盒，购自碧云天公司。应用 Dharmacon'siRNA Design 软件设计了 3 个针对 MK 基因(NM-020275)的潜在的 siRNA 靶点的干扰序列，与一个随机序列 control(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 pSES-HUS-MK siRNA 载体的构建 将靶向 MK 的干扰序列与对照(见表 1)退火成双链 DNA 片段后，分别克隆到 *Sfi* Ⅰ酶切、纯化后的 pSES-HUS 质粒中，转化 DH5α 后，氨苄青霉素选择性培养基筛选阳性克隆，用 U6 和反义引物进行菌液 PCR，筛选出目的干扰质粒[5]。限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ和 *EcoR* Ⅴ双酶切鉴定正确后送测序，获得含小干扰 RNA(siRNA)表达框的腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS-MKsiRNA(图 1)。

1.2.2 pAdeasy-SES-HUS-MK siRNA，pAdeasy-SES-HUS-control 与 pAdeasy-SES-HUS 载体的构建 用 $CaCl_2$ 法将 pAdeasy-1 转化到 BJ5183 感受态大肠杆菌中，然后将 pSES-HUS-MKsiRNA、pSES-HUS-control、pSES-HUS 质粒用 *Pme* Ⅰ酶切、线性化后，分别转化到 BJ-easy 感受态细菌中，卡那霉素与链霉素抗性培养基筛选阳性克隆，提取质粒 *Pac* Ⅰ酶切鉴定。鉴定正确的质粒转化 DH5a 感受态细菌，提取质粒、纯化备用。

1.2.3 重组腺病毒的包装与病毒滴度测定 重组质粒 pAdeasy-SES-HUS-MKsiRNA 用 *Pac* Ⅰ酶切、纯化后回收，按照 Lipofectamine™2000 Reagent 转染试剂盒说明书转染融合度为 50%~70%的 HEK293 细胞，12~14 d 后收集细胞，-80℃与 37℃反复冻融 4 次，裂解细胞以收获原始病毒颗粒，用病毒颗粒继续感染 HEK293 细胞使病毒大量扩增。重复上述步骤，最终收集 3 轮扩增的病毒上清液，经氯化铯梯度离心纯化，参照 Kaneto 等[6]的方法进行滴度测定后，分装保存于-80℃备用。

1.2.4 小鼠子宫原代基质细胞的分离培养及病毒感染 雌雄小鼠按 2:1 自然合笼，次晨发现阴栓者记为妊娠第 1 d。参照 Bany 等[7]方法，将妊娠 4 d 小鼠子宫纵向剪开后，剪成 4 mm×4 mm 片段，用 25 mg/ml 胰酶和 6 mg/ml 分散酶在 4℃和室温条件下分别处理 1 h，用移液枪吹打组织块，吸去含上皮的上清液，剩余组织用 0.5 mg/ml 胶原酶 37℃处理 30 min，450 g 离心 7 min，收集沉淀中的基质细胞，培养于含 10%热灭活胎牛血清的无酚红 DMEM 培养基 2 h 后，更换培养基，当基质细胞融合度达到 70%~80%时进行转染。试验设 pAdeasy-SES-HUS-MKsiRNA 干扰组、pSES-HUS-control 对照组和空白对照组，感染 48 h 后收获细胞进行检测分析。

1.2.5 RT-PCR 检测基质细胞 MK mRNA 水平变化 基质细胞感染重组腺病毒 48 h 后，提取细胞总 RNA，紫外分光光度计测定总 RNA 浓度，按照 TaKaRa RT-PCR 试剂盒进行反转录后，进行 PCR 反应。MK 的上下游引物分别是：5'-CCCAGCCCATAATCGTCC-3'、5'-ATGCCAAGATGCCCAAGC-3'，反应产物长度为 379 bp；内参 β-actin 的上下游引物分别是 5-'AGCCATGTACGTAGCCAT-3'、5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'，反应产物为 228 bp。反应条件为：94℃预变性 5 min，94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，共 30 个循环，最后 72℃

表 1 MK 潜在 siRNA 靶点及对照寡核苷酸序列

质粒名称		核苷酸序列
MK1	oligo1	5'-AGTGAAATCCGGAGGTTTATTTT-3'
	oligo2	3'-TTTTCACTTTAGGCCCTCCAAATA-5'
MK2	oligo1	5'-ACGACAGACATCTAGCACGATTTT-3'
	oligo2	3'-TTTTGCTGTCTGTAGATCGTGCTA-5'
MK3	oligo1	5'-ACCTTGGAAGCCGTGGAAGATTTT-3'
	oligo2	3'-TTTTGGAACCTTCGGCACCTTCTA-5'
对照组	oligo1	5'-AACGGCCGATATCGCGGCCGTTTT-3'
	oligo2	3'-TTTTTGCCGGCTATAGCGCCGGCA-5'

延伸 5 min。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定，比较干扰组与对照组及空白组 MK 基因 mRNA 水平的表达差异。

1.2.6 Western Blot 检测基质细胞 MK 蛋白表达水平变化 提取重组腺病毒感染 48 h 后的基质细胞的膜蛋白进行 western blot 检测。每孔上样 30 μg，蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后，转移到 PVDF 膜上，依次加入 50 g/L 脱脂奶粉（室温封闭 1 h），1:200 MK 山羊抗鼠一抗（4℃ 孵育过夜），1:2 000 的 HRP 酶标兔抗羊二抗（室温孵育 2 h），TBST 缓冲液洗涤后加入化学发光剂显影。

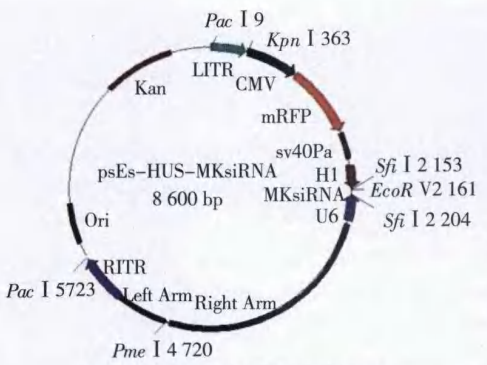
2 结 果

2.1 pSES-HUS-MKsiRNA 与 pSES-HUS-control 载体的构建

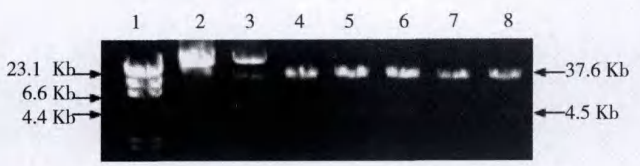
挑取菌液 PCR 验证正确的阳性克隆提取质粒，用 *Kpn* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ 双酶切鉴定，阳性克隆只能被 *Kpn* Ⅰ 单酶切，而 PSES-HUS 则被切成 6.8 kb 和 1.8 kb 左右的 2 条片段（图 2），与实验设计相符。选取电泳正确的质粒进行核酸测序，鉴定结果正确。

2.2 pAdeasy-SES-HUS-MK siRNA，pAdeasy-SES-HUS-control 与 pAdeasy-SES-HUS 载体的构建

pSES-HUS-MKsiRNA 与对照质粒经过 *Pme* Ⅰ 酶切后与 pAd-easy-1 在细菌 BJ5183 中进行同源重组，得到 pAd-SES-HUS-MKsiRNA 与对照重组子，经 *Pac* Ⅰ 酶切后形成大小 2 个片段，大片段约为 37.6 Kb，小片段约为 4.5 Kb。本实验采用释放了 4.5 Kb 片段的线性化的质粒进行转染（图 3）。



图Ⅰ pSES-HUS-MK siRNA 图谱



1. Marker;2. pAd-easy-1;3. pAd-SES-HUS-MKsiRNA;4. pAd-SES-HUS-MK1siRNA;5. pAd-SES-HUS-MK2siRNA;6. pAd-SES-HUS-MK3siRNA;7. pAd-SES-HUS-control;8. pAd-SES-HUS

图 3 重组腺病毒载体的 *Pac* Ⅰ 酶切鉴定

2.3 重组 Adeasy-SES-HUS-MKsiRNA 腺病毒的包装

pAdeasy-SES-HUS-MKsiRNA 与对照质粒分别经 *Pac* Ⅰ 酶切、纯化后转染 HEK293 细胞，24 h 后在荧光显微镜下可见少量红色荧光，72 h 后大约 80% 细胞发出红色荧光（图 4），12 d 时大部分细胞肿胀脱落。经过 3 轮大规模扩增和纯化，得到的重组腺病毒 Adeasy-SES-HUS-MKsiRNA 的效价分别为 6.5×10^{11} pfu/ml、7.2×10^{11} pfu/ml、6.7×10^{11} pfu/ml，Adeasy-SES-HUS-control 与 Adeasy-SES-HUS 的效价分别为 6.8×10^{11} pfu/ml、6.5×10^{11} pfu/ml。

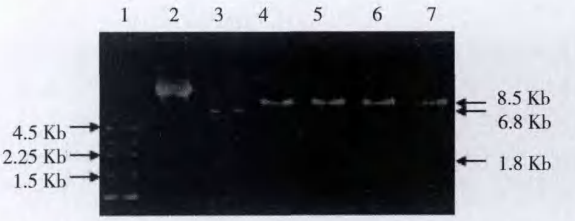
2.4 小鼠子宫基质细胞中 MK 基因 mRNA 和蛋白质的表达

包装完成的 MK 干扰病毒颗粒等体积混合后与对照分别感染基质细胞（图 5），48 h 后收集细胞提取总 RNA 及蛋白。RT-PCR 结果表明，干扰组与对照组和空白组相比，MK 基因 mRNA 量明显降低（图 6）；western blot 结果显示，干扰组的 MK 蛋白表达量显著减少（图 7）。

3 讨 论

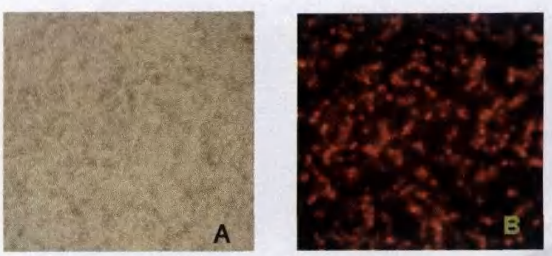
蜕膜是子宫内膜间质受蜕膜化诱导因子的刺激而增殖和再分化形成的一种特殊组织它对妊娠的建立和维持至关重要。在小鼠中，胚胎粘附诱导上皮下基质细胞增殖、分化为成熟的蜕膜细胞，并逐渐向周围扩展，形成的蜕膜细胞又依照同样的方向不断退化和死亡[9]，并被邻近的滋养层细胞或巨嗜细胞吞噬[10]。蜕膜细胞的增殖与退化是一个涉及多种因素的细胞凋亡过程，该过程与肿瘤的侵袭过程具有相似性，因此也成为了研究的热点。

MK 的 cDNA 区编码一 381 个氨基酸的蛋白，它含有一



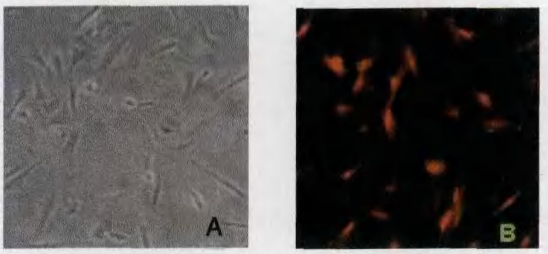
1. Marker;2. PSES-HUS-MKsiRNA;3. PSES-HUS;4. PSES-HUS-MK1siRNA;5. PSES-HUS-MK2siRNA;6. PSES-HUS-MK3siRNA;7. PSES-HUS-control

图 2 穿梭载体的 *Kpn* Ⅰ 和 *EcoR* Ⅳ 双酶切鉴定



A. 光镜下的 293 细胞；B. 80% 的 293 细胞发出红色荧光

图 4 转染 MK 干扰腺病毒 72 h 后的 HEK293 细胞（×40）



A. 基质细胞光镜图；B. 基质细胞荧光图

图 5　MK 干扰腺病毒感染 48 h 后的小鼠子宫基质细胞（×100）

个胞外半胱氨酸富集区，跨膜区和胞质死亡结构域。MK 表达依赖肿瘤抑制因子 p53 并能被 p53 和基因损伤因子上调，从而介导小鼠细胞的凋亡。MK 可以诱导人也可以诱导小鼠细胞凋亡，并可以抑制 NIH3T3 生长。TNF 超家族配体与受体间的相互作用触发细胞凋亡，受体与配体结合即形成三聚化与缔合分子形成 DISC，DISC 一旦形成即激活 Caspase 前体，随后 Caspase 级联反应介导凋亡。MK 具有快速诱导凋亡，抑制癌细胞生长的特点，鉴于胚胎植入与肿瘤侵袭的诸多相似性，加上我们课题组的前期发现，推测 MK 在胚胎植入过程中发挥着重要的作用，我们成功构建了 MK 干扰腺病毒，为进一步研究 MK 的功能提供了有效的工具。

我们采用 He 等[11]创建的 pAdeasy 腺病毒载体系统，通过细菌体内同源重组的方法，构建针对 MK 基因的 siRNA 重组腺病毒载体。该方法不但发挥了重组腺病毒高效、安全等优点，同时，还具有重组效率高、包装时间短等特点。腺病毒可感染一系列哺乳动物细胞，因此在大多哺乳动物细胞和组织中均可用来表达重组蛋白。腺病毒是研究原代非增殖细胞基因表达的最佳系统，它可以使转化细胞和原代细胞中得到的结果直接进行对比。腺病毒载体介导的 RNA 干扰克服了以往用质粒作为 siRNA 输送载体转染效率低的缺陷。实验中我们使用 RT-PCR，Western Blot 的方法在 mRNA 水平和蛋白质水平证实针对 MK 基因的干扰表达重组腺病毒有效地抑制了 MK 基因的表达。MK 干扰表达腺病毒还可用于动物实验，为进一步深入研究 MK 在胚胎植入中的功能及作用机理开辟新的途径。

参 考 文 献

[1] Wiley SR. Schooley K. Smolak P J. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity, 1995, 3(6):673-682.

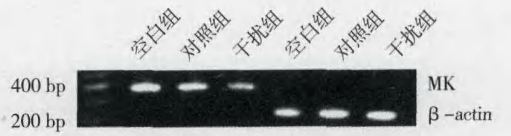


图 6　RNA 干扰 48 h 后小鼠子宫基质细胞中 MK mRNA 的表达变化

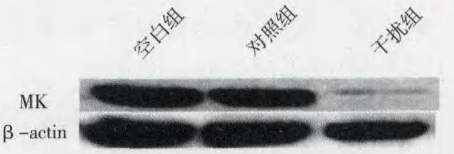


图 7　RNA 干扰 48 h 后小鼠子宫基质细胞 MK 蛋白的表达变化

[2] Pascal Schneider, Dian Olson, Aubry Tardivel, et al. Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J]. Biol Chem, 2003, 278 (7): 5444-5454.

[3] Ichikawa, Liu W, Zhao L. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxcity[J]. Nat Med, 2001, 7(8): 8945-8960.

[4] Duiker E W, Mom C H. The clinical trial of TRAIL[J]. Eur J Cancer, 2006, 4(2): 2233-2240.

[5] Luo Q, Kang Q, Song W X, et al. Selection and validation of optimal siRNA target sites for RNAi-mediated gene silencing[J]. Gene, 2007, 395 (12): 160-169.

[6] Kaneto H, Xu G, Song K H. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic β-Cell function through the induction of oxidative stress[J]. Biol Chem, 2001, 276(33): 31099-31104.

[7] Bany B M, Harvey M B, Schultz G A. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization [J]. J Reproduction Ferti, 2000, 120(1): 125-134.

[8] 谭　毅，谭冬梅，何明忠，等. 小鼠 SFRP-2 基因的克隆及重组腺病毒制备[J]. 肿瘤，2006，26(2)：135-138.

[9] Correia-da-Silva G, Bell S C, Pringle J H, et al. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy[J]. Placenta, 2004, 25 (6): 538-547.

[10] Abrahams V M, Kim Y M, Straszewski S L, et al. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy[J]. American Journal of Reproductive Immunology, 2004, 51 (4): 275-282.

[11] He T C, Zhou S B, Luis T, et al. A simplified system for generation recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-2514.

（责任编辑：关蕴良）