基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0016-04

小鼠 STAT4,STAT6 基因 shRNA 真核表达质粒的构建及鉴定

杨 琴,符 州,田代印,刘恩梅,王莉佳,黄 英
(重庆医科大学附属儿童医院呼吸科,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建并鉴定小鼠信号转导子和转录激活因子 4(STAT4),信号转导子和转录激活因子 6(STAT6)具有发夹结构小干扰 RNA(shRNA)表达质粒。方法:根据 STAT4 和 STAT6 基因 mRNA 序列,在体外分别合成有小发夹结构的 2 条 STAT4 特异性寡核苷酸序列,2 条 STAT6 特异性寡核苷酸序列,退火后与线性化 pGenesil-3 质粒连接,转化感受态细胞 DH5α,扩增,纯化得到所需质粒。同时设计构建分别针对小鼠甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶(GAPDH)的干扰质粒作为阳性对照,不具有基因同源性的非特异性基因的质粒作为阴性对照序列。通过酶切后琼脂糖凝胶电泳和基因测鉴定纯化质粒分子量及插入片段的序列。结果:经限制性酶切和测序鉴定分析证实基因插入正确,与设计的序列完全相符。结论:成功构建了针对小鼠 STAT4,STAT6 基因的发夹结构小干扰 RNA 表达载体。为今后利用基因沉默技术从转录后水平抑制 STAT4,STAT6 的研究奠定基础。

【关键词】哮喘;信号传导子及转录激活因子;RNA 干扰;shRNA;质粒
【中国图书分类法分类号】R563.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-16

Construction and identification of vectors expressing short hairpin RNA targeting mouse STAT4 and STAT6 gene

YANG Qin, et al
(*Department of Respiratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct short-hairpin RNA(shRNA)expressing vectors aimed at mouse signal transducers and activators of transcription-4/6(STAT4/STAT6). *Methods*: Target sequences in the middle of STAT4 and STAT6 gene were selected, and then the complementary 65 mer oligonucleotides of each sequence were synthesized. After annealed, the inserts were ligated into the linearized pGenesil-3 plasmid. The plasmids were transformed into DH5α bacteria to amplify and then purified. GAPDH plasmid was constructed as a positive control and targeting none gene was served as a negative control. These purified plasmids were identified by gel electrophoresis after being cut with restriction enzyme and sequencing. *Results*: The results of gel electrophoresis and sequencing showed that the plasmids were identical with the positive control, and the sequences were identical with what we have inserted in. *Conclusion*: The vectors which can express siRNA hairpin aimed at STAT4/STAT6 gene have been constructed successfully and it lays the groundwork for the further study.

【Key words】Asthma; Signal transducers and activators of Transcription; RNAi; shRNA; Plasmid

在 $CD4^+$ 辅助性 T 细胞(Th 细胞)分化过程中有两类关键的转录因子,Th1 类和 Th2 类转录因子。其中 Th1 类转录因子 STAT4 和 Th2 类转录因子 STAT6,在 Th 细胞分化过程中起主要作用。Th1/Th2 平衡失调是目前比较公认的哮喘免疫学发病机制,但是关于 STAT4/STAT6 在 Th1/Th2 平衡紊乱中的调节机制目前仍不太清楚。国外研究已发现单独的 STAT4 或 STAT6 在哮喘机制中的作用,但对于 STAT4 和 STAT6 相互拮抗作用与 Th1/Th2 的失衡的关系,至今尚无报道。

本研究通过同时构建 STAT4/STAT6 靶向特异性的 shRNA 真核表达载体,为今后利用 RNA 干扰技术抑制 STAT4/STAT6 表达及作用,奠定了坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

pGenesil-3 质粒表达载体(武汉晶赛生物公司);T4 DNA Ligase、*BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Sal* Ⅰ (TaKaRa 公司);质粒提取试剂

作者介绍:杨 琴(1983-),女,硕士,
研究方向:哮喘 Th 失衡机制。
通讯作者:符 州,男,教授,E-mail: fu_zhou79@yahoo.com。
基金项目:国家自然科学基金资助(编号 30672268)。

盒(TaKaRa 公司)；大肠杆菌 DH5α 由重庆医科大学儿研所免疫室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 shRNA 合成及质粒构建 根据 Genbank 中报道的 STAT4/STAT6 基因 mRNA 序列(STAT4：NM-011487，STAT6：NM-009284)，采用 Ambion 和 Qiagen 公司的 siRNA 设计软件，选择 GC 含量在30%～50%之间的 siRNA 编码序列，进行 Blast 同源性分析，选择与小鼠其他基因没有同源性的 siRNA 编码序列。

引物结构：*BamH* Ⅰ +Sense+Loop+Antisense+ 终止信号 + *Sal* Ⅰ + *Hind* Ⅲ

分别命名为质粒 mStat41、mStat42，mStat61 和 mStat62，另设计随机阴性对照 HK 序列，设计小鼠 GAPDH 作为阳性对照。

分别设计针对 STAT4 两对 shRNA 序列如下：

mStat41	AAATCCGGCATCTGCTAGCTC
mStat41-A	5'-GATCCATCCGGCATCTGCTAGCTCCTATGGACAGAGCTAGCAGATGCCGGATTTTTTTGTCGACA -3'
mStat41-B	5'-AGCTTGTCGACAAAAAAATCCGGCATCTGCTAGCTCTGTCCATAGGAGCTAGCAGATGCCGGATG -3'
mStat42	AATTGGATGAACAGTTGGGGC
mStat42-A	5'-GATCCGTTGGATGAACAGTTGGGGCCTATGGACAGCCCCAACTGTTCATCCAATTTTTTGTCGACA -3'
mStat42-B	5'-AGCTTGTCGACAAAAAATTGGATGAACAGTTGGGGCTGTCCATAGGCCCCAACTGTTCATCCAACG-3'

分别设计针对 STAT6 两对 shRNA 序列如下：

mStat61	AACATGGCCAGTGCCCTACTT
mStat61-A	5'-GATCCGCATGGCCAGTGCCCTACTTCTATGGACAAAGTAGGGCACTGGCCATGTTTTTTGTCGACA-3'
mStat61-B	5'-AGCTTGTCGACAAAAAACATGGCCAGTGCCCTACTTTGTCCATAGAAGTAGGGCACTGGCCATGCG-3'
mStat62	AAGGGAAACAGCATCTTGCCG
mStat62-A5	5'-GATCCGGGAAACAGCATCTTGCCGTTCAAGACGCGGCAAGATGCTGTTTCCCTTTTTTGTCGACA -3'
mStat62-B	5'-AGCTTGTCGACAAAAAAGGGAAACAGCATCTTGCCGCGTCTTGAACGGCAAGATGCTGTTTCCCG -3'

另设计随机阴性对照 pGenesil-3/HK 两对 shRNA 序列如下：

GACTTCATAAGGCGCATGC	
HK-1	5'-GATCCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTGTCGACA -3'
HK-2	3'-GCTGAAGTATTCCGCGTACGAAGTTCTGCCGTACGCGGAATACTTCAGAAAAAACAGCTGTTCGA-5'

设计小鼠 GAPDH 作为阳性对照

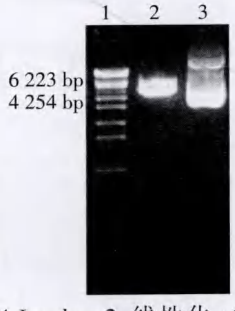
GAPDH-A	5'-GATCCGTGGATATTGTTGCCATCA TTCAAGACG TGATGGCAACAATATCCAC TTTTTTGTCGACA-3'
GAPDH-B	5'-AGCTTGTCGACAAAAAAGTGGATATTGTTGCCATCACGTCTTGAATGATGGCAACAATATCCACG -3'

1.2.2 单链目的基因片段的退火连接 各用 50 μl annealing buffer 溶解上述合成 2OD 单链目的基因片段。各取 2 μl 单链(即 2 μlRap1a1-A+2 μlRap1a1-B)，16 μl annealing buffer 混匀。94℃水浴退火自然冷却至室温。各取 1 μl 退火产物，99 μl H_2O 做 100 倍稀释。

1.2.3 质粒 pGenesil-3 的线性化和纯化回收 *BamH* Ⅰ+*Hind* Ⅲ双酶切质粒 pGenesil-3，1%琼脂糖凝胶回收大片段。显示在 DNA Marker 6 223 bp 和 4 254 bp 之间有明显条带，符合质粒 pGenesil-3 的4 842 bp 大小。说明可用做下一步连接之用。

1.2.4 稀释退火片段分别与线性化 pGenesil-3 质粒表达载体的连接 连接反应条件：稀释退火片段 1 μl，线性化 pGenesil-3质粒载体 1 μl，10 × Ligase Buffer 1 μl，T4 DNA Ligase 1 μl，H_2O 6 μl，22℃水浴反应过夜。

1.2.5 转化感受态细胞 各取 5 μl 过夜连接产物转化感受态细胞 DH5 a，分别涂布于含 Kanar 抗性(终浓度为 30 μg/ml)的 LB 平板上，37℃恒温箱培养过夜。



1. 入 EcoT-14 Imarker；2. 线性化 pGenesil-3 质粒；3. 环状 pGenesil-3 质粒，环状质粒较线性化质粒泳动速度快

图 1 pGenesil-3 质粒双酶切 1%琼脂糖凝胶电泳

1.2.6 阳性克隆的筛选和质粒纯化 从每个培养皿上各挑取 3 个单克隆菌落接种于 3 ml 含 Kanar 抗性(终浓度为 30 μg/ml)的 LB 培养液中，37℃恒温摇床(250 r/min)培养过夜。

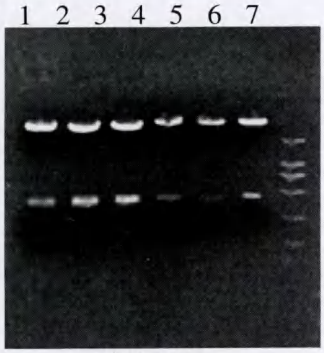
1.2.7 质粒的鉴定 用小提试剂盒小量提取质粒(TaKaRa

公司），并分别用 *Sal* Ⅰ做酶切鉴定：质粒分别用 *Sal* Ⅰ做酶切鉴定，反应条件如下：质粒 DNA 8.5 μl，10×H Buffer 1 μl，*Sal* Ⅰ 0.5 μl，37℃水浴反应 3 h。鉴定成功后由武汉晶赛生物公司测序。

2 结　果

2.1 经酶切鉴定分析质粒 pGenesil-3 的多克隆位点（MCS）

*Hind*Ⅲ-ShRNA-*BamH* Ⅰ-U6Promotor-*EcoR* Ⅰ-*Sal* Ⅰ-*Xba* Ⅰ-*Dra*Ⅲ。质粒 pGenesil-3 中有 *Pst* Ⅰ的酶切位点，插入目的基因片段之后，*Pst* Ⅰ酶切位点被取代，故不能被 *Pst* Ⅰ所酶切。在插入的目的基因片段里，我们分别设计了一个 *Sal* Ⅰ的酶切位点，插入在质粒 pGenesil-3 的 *BamH* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ之间，如若插入正确，质粒就能被 *Sal* Ⅰ酶切出一条约400 bp 的 DNA 小带。经酶切鉴定分析，质粒 mStat41、mStat42、mStat61 和 mStat62 均符合设计要求。



↑约 400 bp

1~6.质粒 mStat41、mStat42、mStat61、mStat62、HK、GAPDH *Sal* Ⅰ酶切结果；7. DL2000 Marker

图 2 pGenesil-3 质粒酶切 1%琼脂糖凝胶电泳

2.2 测量结果

送转化菌液 mStat41、mStat42、mStat61 和 mStat62 去测序，经测序：结果完全符合插入片段的设计要求，见图 3~6。

3 讨　论

STAT 蛋白家族是一组由数个有相同结构域构成的胞浆内蛋白质家族，能被众多的细胞外多肽类分子激活，参与基因转录调控。迄今为止，STAT 家族共发现有 9 个成员，分子量 84~113 kD，每个成员均含有约 700~800 个氨基酸残基组成的类似结构[1]。转录因子是调控和决定细胞因子产生的关键环节，Th1 类转录因子 STAT4 基因在 $CD4^+$Th 细胞向Th1 方向分化的过程中也起非常关键的作用[2,3]，Th2 类转录因子 STAT6 能调节 Th2 类免疫反应呈优势应答[4,5]，并参与促进抗体 IgE 的产生和转换[6]。Blease K 等[7]研究发现 STAT6 在过敏引起的呼吸道炎症中起重要作用。研究结果表明，STAT4 缺失小鼠模型体内存在一个更倾向 Th2 型的免疫环境[8,9]。但针对 STAT4/STAT6 基因干扰后的相互拮抗作用与 Th1 / Th2 失衡之间的关系，至今尚无报道。

短干扰 RNA (siRNA)可特异性抑制基因表达，已被广泛用于基因功能和靶位治疗等方面的研究[10]。目前尚不能完全明确决定 shRNA 干扰效果和干扰特异性的相关因素，但以下三方面可能与之有关：①序列的特异性：一个碱基的差异就可能直接影响干扰的效果和特异性[10]，已有多家生物公司和研究

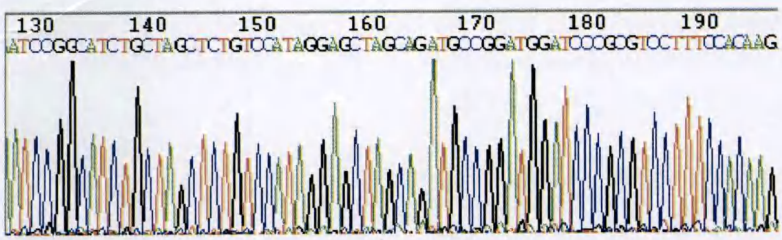


图 3　质粒 mStat41 shRNA

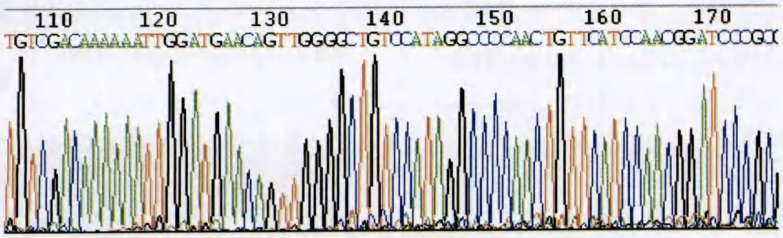


图 4　质粒 mStat42 shRNA

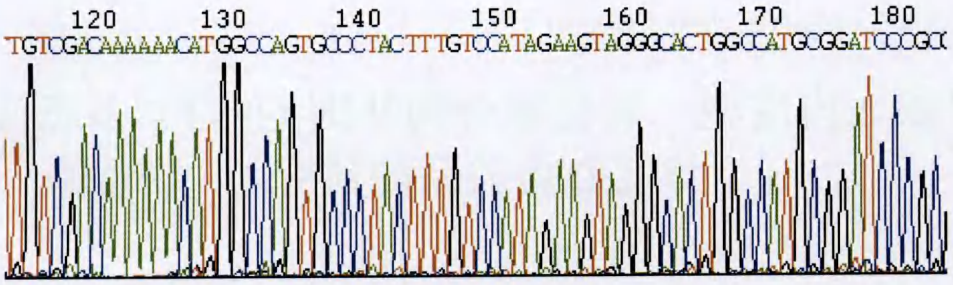


图 5 质粒 mStat61 shRNA

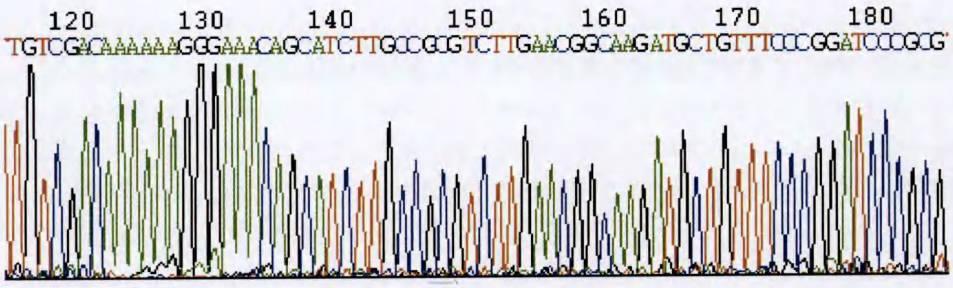


图 6 质粒 mStat62 shRNA

机构提供 shRNA 的设计程序，所设计的shRNA 编码序列必须经过 Blast 比对，以避免非特异性干扰；②序列长度：在哺乳动物体内，大于 30 nt 的双链 RNA 常产生非特异性基因抑制，所以shRNA 编码序列的长度一般要求以 19~29 nt 为宜[8]。③发卡环的长度：一般为 3~9 nt，但似乎 9 nt 的干扰效果更好[11]。所以，笔者在 U6 启动子后面设计了 19 nt 长度的 shRNA 编码序列，中间隔以 9 nt 的发卡环序列。设计 2 条 STAT4 特异性 shRNA 编码序列，2 条 STAT6 特异性 shRNA 编码序列，1 条不具有基因同源性的非特异性 shRNA 阴性对照序列和 1 条 GAPDH 阳性对照序列，与 pGenesil-3 质粒连接重组后，经酶切和基因测序鉴定，与设计要求完全一致。

本研究首次成功构建了 2 条干扰 STAT4 基因和 2 条干扰 STAT6 基因的质粒载体。从而为今后构建 STAT4/STAT6 沉默细胞株，研究 STAT4/STAT6 相互拮抗功能奠定了坚实的技术基础。

参 考 文 献

[1] Jammes E, Daamell J R, Jan M K, et al. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other estra cellar signaling proteins [J]. Science, 1994, 264(5164):1415-1421.

[2] Kaplan M H, Sun Y L, Hoey T, et al. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cell in stat4-deficient mice[J]. Natrue, 1996, 382(11):174-177.

[3] Thierfleder W E, Deursen J M V. Requirment for Stat4 in interleukin 12-mediated responses of nature killer and T cell[J]. Natrue, 1996, 382(11):171-174.

[4] Tomkinson A, Kanehiro A, Rabinnovithch N, et al. The failure of STAT6-deficient mice to develop airway eosinphilia and airway hyperresponsiveness is overcome by interleukin-5[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 1609(4):1283-1291.

[5] Akimoto T, Numata F, Tamura M, et al. Abrogation of bronchial Eosinophliic inflammation and airway hyperreactivity in singal transducers and activators of transcription(STAT) deficient mice[J]. J Exp Med, 1998, 187(9):1537-1542.

[6] Kuperman D, Schofield B, Wills-karp M, et al. Singnal transducer and activator of transcription factor 6 (stat6)-deficient Mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveneres and mucus production [J]. J Exp Med, 1998, 187(6):939-948.

[7] Blease K, Schuh J M, Jakubzick C, et al. Stat6-deficient mice develop airway hyperresponsiveness and peribronchial fibrosis during ckwnic fungal asthma [J]. Am J Pathol, 2002, 160(2):481-490.

[8] Chang H C, Zhang S, Kaplan M H, et al. Neonatal tolerance in the absence of Stat4-and Star6-dependent Th cell diferentiation[J]. J Immunol, 2002, 169(8): 4124-4128.

[9] Chitnis T, Salama A D, Grusby M J, et a1. Defining Thl and Th2 immune responses in a reciprocal cytokine environment in vivo [J]. J Immunol, 2004, 172(7):4260-4265.

[10] Shi Y. Mammalian RNAi for the masses [J]. Trends in genetics, 2003, 19(1):9-12.

[11] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296(5567):550- 553.

（责任编辑：冉明会）