维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0897-03

小鼠 STAT4、STAT6 基因克隆及其真核表达质粒的构建

徐雪梅,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:分别克隆小鼠信号传导及转录活化因子-4(Signal transducers and activators of transcription-4,STAT4)、信号传导及转录活化因子-6(Signal transducers and activators of transcription-6,STAT6)基因全长 cDNA 序列,构建并鉴定其真核表达质粒 pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6。方法:采用 RT-PCR 方法从 BALB/c 小鼠脾脏组织中扩增 STAT4/STAT6 基因全长 cDNA,T/A 克隆到 pMD19-T 载体中,双酶切后将 cDNA 亚克隆入 pIRES2-EGFP 载体,构建 pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 质粒,经限制性内切酶鉴定并测序。结果:小鼠 STAT4/STAT6 基因 cDNA 正确克隆入 pIRES2-EGFP 表达载体,与 Genebank 中 STAT4/STAT6 基因序列一致。结论:成功构建 pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 表达质粒,为进一步研究 STAT4/STAT6 蛋白表达和相互作用奠定了基础。

【关键词】哮喘;信号传导及转录活化因子;克隆;真核表达质粒

【中国图书分类法分类号】Q71 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-13

Cloning of mouse signal transducers and activators of transcription-4/6 and construction of eukaryotic expression plasimid

XU Xue-mei,et al

(*Department of Respiratory,the Children's Hospital,Chongqing Medical University*)

【Ahstract】*Objective*:To clone mouse signal transducers and activators of transcription(STAT) 4 and STAT6 gene and construct a eukaryotic expression plasimid. *Methods*:The cDNA of mouse STAT4 and STAT6 gene amplified with RT-PCR from normal mouse spleen tissue were cloned into pMD19-T vector by T/A ligation. After double digested,STAT4/STAT6 cDNA fragment was suhcloned into pIRES2-EGFP vector to construct a eukaryotic expression plasimid. Restriction endonucleases analysis and sequencing were used to comform the recomhinant plasimid. *Results*:The full length STAT4/STAT6 cDNA was correctly inserted into eukaryotic expression plasimid,and its sequencing was consistent with reported sequence derived from Genebank. *Conclusion*:The successful construction of eukaryotic expression plasimid provides a basis for futher studies on the infection of STAT4/STAT6 interaction to the downstream cytokines.

【Key words】 Asthma;Signal transducers and activators of transcription;Clone;Eukaryotic expression plasimid

STAT4 和 STAT6 是在 Th 细胞分化过程中起主要作用的转录因子,分别影响 Th_0 细胞向 Th_1 或 Th_2 分化[1]。本研究旨在通过基因克隆和蛋白表达技术,体外表达 STAT4 和 STAT6 蛋白,为进一步研究 Th_1/Th_2 平衡打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料和试剂 小鼠购自重庆医科大学动物中心;总 RNA 抽提试剂盒(Genemego),M-MLV、大抽试剂盒(Tigene),Taq 酶、各种内切酶、DNA Fragment Purification Kit、Gel DNA Fragment Recovery Kit、DNA Ligation Kit、Wide Range DNA Marker、pMD19-T·Simple(TaKaRa),pIRES2-EGFP 及 DH5α 大肠杆菌均由重庆医科大学儿研所免疫室提供。

1.1.2 主要设备 台式冷冻离心机(德国 EPPENDOF),PCR 扩增仪、凝胶成像机分析系统(美国 BIO-RAD),蛋白核酸定量仪(日本 岛津),电子恒温摇床(美国 THERMO),恒温培养箱,-80℃冰箱。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 据 GeneBank 上 STAT4/STAT6 基因 mR-

作者介绍:徐雪梅(1982-),女,硕士,研究方向:小儿哮喘的发病机理和防治。

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项目(编号 30672268)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

NA 序列(STAT4:NM-011487,STAT6:NM-009284),扩增含起始密码和终止密码的 STAT4/STAT6 基因编码序列(CDS),分别在 5'和 3'端加上 *Xho* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ酶切位点。引物设计和合成由大连宝生物完成。

1.2.2 目的基因的获得 从小鼠新鲜脾脏标本按总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA,蛋白核酸定量仪检测总 RNA 浓度后,立即运用逆转录酶 M-MLV 合成 cDNA。以该 cDNA 为模板,进行巢式 PCR。反应条件:外引物,95℃ 2min,98℃ 10s,55℃ 15s,72℃ 2min50s,25 个循环后 72℃ 10min。内引物,95℃ 2min,98℃ 10s,55℃ 15s,72℃ 2min30s,30 个循环后 72℃ 10min。纯化,1%琼脂糖电泳初步鉴定(STAT4:2 247bp;STAT6:2 514bp)、拍照、-20℃保存。

1.2.3 PCR 产物克隆和鉴定 将纯化后的 PCR 产物及 pMD19-T simple 载体进行 *Xho* Ⅰ/*Kpn* Ⅰ双酶切,电泳,A-garose Gel DNA faregment Recovery Kit 胶回收后,加 Ligation Solution Ⅰ,16℃,反应 30min,得到 pMD19-T- STAT4/STAT6 质粒,转化感受态大肠杆菌 DH5α,涂含氨苄青霉素的 LB 平板,进行蓝白筛选。挑取白色菌落,扩增、抽提,进行 PCR 检测并测序鉴定。测序引物为 BcaBEST Primer M13-47、BcaBEST Primer RV-M、CTB471 SEQF、CTB471 SEQR。测序由大连宝生物公司完成。

1.2.4 pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 质粒构建和鉴定 对 pMD19-T- STAT4/STAT6 质粒和表达载体 pIRES2-EGFP 进行酶切,胶回收酶切后的产物,用 Ligation Solution Ⅰ连接。产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,涂含卡那霉素的 LB 平板,挑取单克隆菌落摇菌培养,并用双酶切鉴定。

2 结 果

2.1 小鼠总 RNA 提取

提取出总 RNA 后,1.5%琼脂糖凝胶电泳,在紫外观测仪中可见 28S、18S、5S 3 条清晰的条带(图 1)。核酸蛋白定量仪测得 R 值为 1.83,浓度为 27.3 μg/ml。



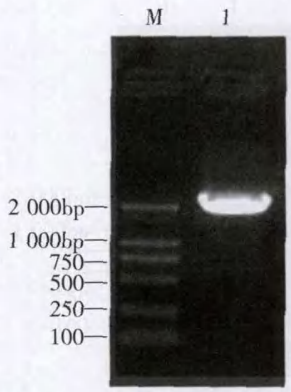
M. NDA Marker DL 2000;1. Total RNA

图 1 小鼠总 RNA

2.2 目的基因 RT-PCR 结果

研究设计 STAT4/STAT6 CDS 序列加酶切位点,总长分别为 2 247bp 和 2 514bp。PCR 产物 1%琼脂糖电泳,片断大小与预期设计基本一致(图 2,3)。

2.3 PCR 法检测 pMD19-T-STAT4/STAT6 质粒



M. Marker; 1. STAT4 gene segment

图 2 小鼠 STAT4 基因 PCR 产物



M. Marker; 1. STAT6 gene segment

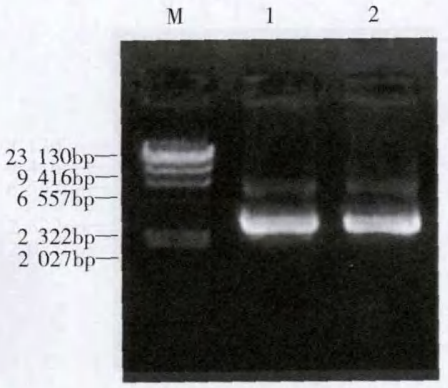
图 3 小鼠 STAT6 基因 PCR 产物

以重组的 pMD19-T-STAT4/STAT6 质粒为模板,扩增出含 STAT4/STAT6 CDS 区、起始密码与终止密码、*Xho* Ⅰ/*Kpn* Ⅰ酶切位点的基因片断,将扩增产物于 1%琼脂糖凝胶电泳。产物大小与预计值一致(图 4,5)。

2.4 pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 质粒的酶切结果

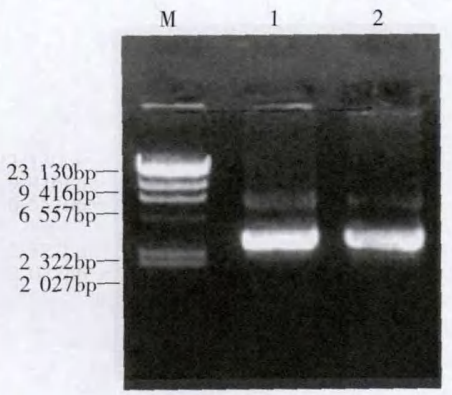
STAT4/STAT6 序列分别为 2 247bp 和2 514bp,pIRES2-EGFP 载体为 5.3kb,用 *Xho* Ⅰ/*Sma* Ⅰ双酶切 pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 质粒,酶切结果与预计相符(图 6)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



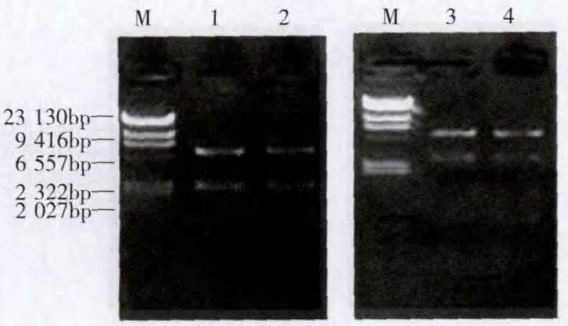
M. Marker; 1. pMD19-T simple-STAT4 plasmid 1; 2. pMD19-T simple-STAT4 plasmid 2

图 4 pMD19-T- STAT4 质粒 PCR 产物



M. Marker; 1. pMD19-T simple-STAT6 plasmid 1; 2. pMD19-T simple-STAT6 plasmid 2

图 5 pMD19-T-STAT6 质粒PCR 产物



M. Marker;1. pIRES2-EGFP-STAT4-1 酶切结果;2. pIRES2-EGFP-STAT4-2 酶切结果; 3. pIRES2-EGFP- STAT6-1 酶切结果; 4 pIRES2-EGFP- STAT6-2 酶切结果

图 6 pIRES2-EGFPSTAT4/STAT6质粒 *Xho* Ⅰ/*Sac* Ⅰ 双酶切

2.5 重组 pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 质粒测序结果

测序结果表明pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 序列与 Genebank 上 STAT4/STAT6 基因 mRNA 序列(STAT4 : NM-011487 , STAT6 : NM-009284)一致, pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 5'端起始密码(ATG)和 3'端终止密码(TGA)及两侧 *Xho* Ⅰ 和 *Kpn* Ⅰ 限制性内切酶的识别序列均正确,未见突变(图 7、8)。

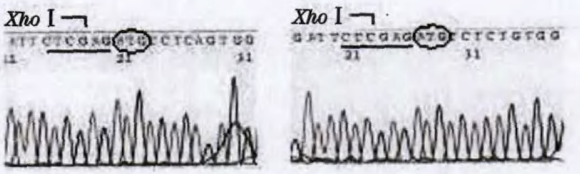


图 7 pIRES2-EGFPSTAT4/STAT6 质粒序列测序: *Xho* Ⅰ 和启动密码子

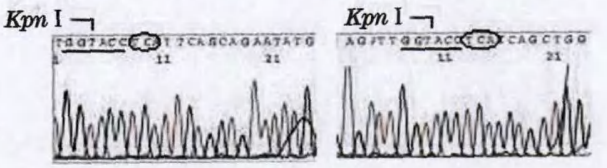


图 8 pIRES2-EGFPSTAT4/STAT6 质粒序列测序(反向): *Kpn* Ⅰ 和终止密码子

3 讨 论

STATs 是一种隐藏在胞浆里,能被众多的细胞外多肽类分子激活,参与基因转录调控的蛋白质家族。在干扰素对细胞基因表达诱导的研究中首次发现 STAT1,STAT2 后,迄今为止,STAT 家族共发现有 9 个成员,分子量 84~113ku,每个成员均含有约由 700~800 个氨基酸残基组成的类似结构[2]。

STAT6 能调节 Th_2 类免疫反应呈优势应答[3,4];并参与抗体的转换,促进 IgE 的产生[5];STAT4 基因在 CD_4^+ 细胞向 Th_1 方向分化的过程中也起非常关键的作用[6,7],但哮喘患者淋巴细胞内除存在 STAT4、STAT6 水平异常外,可能还有其他因素影响 Th_1/Th_2 平衡,若利用哮喘患淋巴细胞内自身表达的 STAT4、STAT6 研究其相互作用对 Th_1/Th_2 平衡的影响,势必会受到其他因素的干扰。因此,本研究拟建立一仅包括 STAT4、STAT6 及其相关因素的平台,排除非研究因素干扰,研究 STAT4、STAT6 相互作用在 Th_1/Th_2 失衡中的作用。

(下转第 910 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

子密度降低。从而导致 T_2WI 和 PDWI 信号降低，T_1WI 信号增高。实验中部分损伤灶中央出现圆点状高信号(T_2WI,PDWI)或低信号(T_1WI)，并且在大体标本中损伤灶中央可见空洞，是否可推测与高温热效应和空化效应使组织碳化，空洞形成，周围组织液在空洞内积聚有关，尚待进一步研究。另外，就监控效力而言，T_2WI 和 PDWI 明显优于 T_1WI。分析原因认为 HIFU 辐照后损伤灶对 T_2 弛豫时间的影响较 T_1 弛豫时间更为明显，同时损伤灶内质子密度的改变显著，从而使得损伤灶在 T_2WI 和 PDWI 中较 T_1WI 更为清晰。但当辐照剂量过低。损伤面积小于 MRI 所能显示能力时。损伤灶于 MRI 图像上可无明显改变。本研究完全依托 MRI 作为 HIFU 治疗的导航手段，术中能清晰显示肝组织内血管，筋膜等解剖结构，术后即刻能准确评价组织损伤范围及程度，因此是一种高效且准确的监控方式。

但与超声监控相比，MRI 监控不能达到完全的实时成像是其不足，但实验中采用的快速自旋回波序列，可在数秒内完成一桢图像的采集，已能基本满足监控要求。当然，更快速成像序列的开发和利用是今后研究的一个方向。本研究结果可为今后进一步探索 MRI 监控 HIFU 治疗肝脏肿瘤提供一定的影像学基础。随着研究的深入，MRI 监控 HIFU 治疗必将成为一种有效手段。

参 考 文 献

[1] Ter Haar GR. High intensity focused ultrasound for the treatment of tumors[J]. Echocardiography,2001;18(4):317-322.

[2] 熊树华，王智彪，李发琪，等.高强度聚焦超声肝脏生物学焦域及超声监控[J]. 中国医学影像技术，2003;19(9):1113-1115.

[3] Hynynen K,Darkazanli A,Unger E,et al. MRI-guided noninvasive ultrasound surgery[J]. Med Phys,1993;20(1):107-115.

[4] Denis de Senneville B,Quesson B,Moonen CT.Magnetic resonance temperature imaging[J]. Int J Hyperthermia,2005;21(6):515-531.

[5] Tempany CM,Stewart EA,McDannold N,et al. MR imaging-guided focused ultrasound surgery of uterine leiomyomas:a feasibility study[J]. Radioligy,2003;226(3):897-905.

[6] Hynynen K,Pomeroy O,Smith DN,et al. MR Imaging-guided focused ultrasound surgery of fibroadenomas in the breast:a feasibility study[J]. Radiology,2001;219(1):176-185.

[7] Furusawa H,Namha K,Thomsen S,et al. Magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery of breast cancer:reliability and effectiveness[J]. J Am Coll Sura,2006;203(1):54-63.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 899 页)

根据 Genebank 中资料，本研究中的 STAT4/STAT6 均属于长片段序列(均在 2ku 以上)，采用一般的 RT-PCR 方法突变率高，目的产物量低。因此，本研究采用了扩增效率更高的巢式 PCR 的方法，先用外引物扩增出一条含有目的序列、长于目的序列的片断，再以该片断为模板，用内引物扩增包括酶切位点的目的基因全序列，提高了扩增的效率和特异性。PCR 产物 T/A 克隆到 pMD19-T 载体中，pMD19-T-STAT4/STAT6 经双酶切后，再将目的序列亚克隆入 pIRES2-EGFP 载体，并转染入感受态大肠杆菌 DH5α。通过扩增、抽提重组 pIRES2-EGFP-STAT4/STAT6 质粒并鉴定，证明已成功构建了 STAT4、STAT6 的真核表达质粒，为下一步蛋白的表达及其相互作用的研究奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

[1] Pemis AB,Rothman PB. JAK-STAT signaling in asthma[J]. J Clin Invest,2002;109(10):1279-1283.

[2] Jammes E,Daamell JR,Jan MK,et al. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other estracellar signaling proteins[J]. Science,1994;264(5164):1415-1421.

[3] Tomkinson A,Kanehiro A,Rabinnovithch N,et al. The failure of STAT6-deficient Mice to develop airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness is overcome by interleukin-5[J]. Am J Respir Crit Care Med,1999;160(4):1283-1291.

[4] Akimoto T,Numata F,Tamura M,et al. Ahrogation of bronchial Eosinophliic inflammation and airway hyperreactivity in singal transducers and activators of transcription(STAT)6- deficient mice[J]. J Exp Med,1998;187(9):1537-1542.

[5] 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 hyperresponsiveness and mucus production[J]. J Exp Med,1998;187(6):939-948.

[6] Kaplan MH, Sun YL. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cell in stat4-deficient mice[J]. Natrue,1996;382(6587):174-177.

[7] Thierfleder WE,van Deursen JM,et al. Requirment for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of nature killer and T cell[J]. Natrue,1996;382(6587):171-174.

(责任编辑：谭乐勤)