

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)05-0393-04

ATM 基因 siRNA 真核表达载体的构建及其对转染宫颈癌细胞株 ATM 表达的抑制作用

魏莉¹, 辛晓燕¹, 王健¹, 雷迎锋², 薛小平²(第四军医大学¹: 西京医院妇产科; 基础部微生物学教研室 陕西 西安 710033)

Construction of eukaryotic expression plasmid expressing siRNA targeting ATM gene and its inhibitory effect on ATM expression in transfected human cervical carcinoma cells

WEI Li¹, XIN Xiao-Yan¹, WANG Jian¹, LEI Ying-Feng², XUE Xiao-Ping²¹Department of Obstetrics & Gynecology, Xijing Hospital,²Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To study inhibitory effect of siRNA on ATM expression in human cervical carcinoma cells and to determine the feasibility of RNAi application in gene-therapy of cervical cancer. METHODS: Hairpin siRNA templates were designed based on ATM gene sequence and mRNA structure and was cloned into pSuppressor vector. Siha cells were transfected by pSuppressor-ATM with electroporation and the non-transfected cells and non-specific siRNA transfected cells were used as controls. The inhibitory effect of ATM mRNA was detected by semi-quantitative RT-PCR and Western-blot, and the inhibitory effect of ATM protein expression was detected by FCM and immunofluorescence. RESULTS: Semi-quantitative RT-PCR, Western-blot, FCM and immunofluorescence all revealed a potent inhibition of the expression of ATM in the transfected Siha cells. CONCLUSION: The plasmid vector was successfully constructed. Transient transfection can significantly decrease the ATM level in transfected cells.

【Keywords】 ATM; RNA interference; cervical neoplasms; transfection

【摘要】目的: 研究特异性 siRNA 对宫颈癌 ATM 基因的抑制效果以及用 RNAi 效应对宫颈癌做基因治疗的可行性。

收稿日期 2004-09-24; 修回日期 2004-11-18

通讯作者: 辛晓燕. Tel. (029) 83375391 Email. gynob@fmmu.edu.cn

作者简介: 魏莉(1979-), 女(汉族), 湖北省孝感市人. 住院医师, 硕士生(导师辛晓燕). Tel. (029) 83375391 Email. wei-li@fmmu.edu.cn

方法: 构建可表达人 ATM 基因 siRNA 的重组真核表达质粒 pSuppressorNeo-ATM, 电穿孔法转染 Siha 宫颈癌细胞株. 应用 RT-PCR, Western blot, 流式细胞术、免疫荧光法等方法检测转染的宫颈癌细胞中 ATM 基因的表达水平. 结果: RT-PCR, Western-blot 均表明瞬时转染 pSuppressorNeo-ATM 的宫颈癌细胞中 ATM 基因的表达受到明显抑制, 流式细胞术、免疫荧光法检测表明 ATM 蛋白含量明显下降. 结论: pSuppressorNeo-ATM 质粒构建成功, 瞬时转染宫颈癌细胞后可以明显抑制 ATM 基因的表达.

【关键词】 ATM 基因; RNA 干扰; 宫颈癌; 转染

【中图分类号】 R969.4 **【文献标识码】** A

0 引言

RNA 干扰(RNA interference RNAi)能在低于反义核酸几个数量级的浓度下,使目标基因表达降到极低水平甚至完全剔除,从而产生缺失突变体表型,比基因敲除技术更快更简单^[1]. 小分子干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs)是介导 RNAi 反应的效应物. 合成 siRNA 的方法之一是将编码 siRNA 的 DNA 序列克隆入载体中,再将重组载体转染入哺乳动物细胞中,使其在细胞中转录出 siRNA^[2,3]. 毛细血管扩张-共济失调突变基因(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)在新的抗肿瘤治疗中成为一个颇具魅力的靶点,而通过 RNAi 效应抑制肿瘤细胞中 ATM 基因的表达是可行策略之一. 我们首先构建了可表达人 ATM 基因 siRNA 的重组真核表达质粒 pSuppressorNeo-ATM,并转染宫颈癌细胞,观察 siRNA 对宫颈癌细胞 ATM 基因表达的特异性抑制效应.

1 材料和方法

1.1 材料 Siha 宫颈癌细胞株由西京医院妇产科实验室保存. 大肠杆菌 DH5 α 由第四军医大学微生物教研室提供, pSuppressorNeo 质粒由美国明尼苏达大学阎岩博士惠赠. 限制性内切酶 *Xho* I, *Xba* I, *Sal* I, *Bam* H I 及 T4 连接酶购自 TaKaRa 公司, ATM 抗体购自 Chemicon 公司, RPMI 1640 购自 Gibco 公司, 小牛血清、HRP 标记的羊抗兔二抗、DAB 显色剂等均购自

华美生物公司。ATM 基因 RNAi 寡核苷酸、ATM、GAPDH 基因 PCR 引物及基因序列均由上海博亚生物技术有限公司合成、测序。流式细胞仪为 BD 公司的 FACS Calibur 型。

1.2 方法

1.2.1 ATM 基因 RNAi 寡核苷酸的合成 按照

P1 5' TCGAGATTCATCTAATGGTGCTAgagtactgTAGCACCATTAGATGAATCTTTTT 3'

Xho I

P2 5' CTAGAAAAAGATTCATCTAATGGTGCTAcagtactcTAGCACCATTAGATGAATC 3'

Xba I

ATM RNAi 寡聚 DNA 序列随机重新排列,确定非特异 siRNA 寡聚 DNA 序列如下:P3 5' TCGA GTATACTTCATAGTGGTCAgagtactgTGACCACTATGAA GTATAC TTTTT 3'; P4 5'CTAGAAAAA GTATACTTC ATAGTGGTCAcagtactcTGACCACTATGAAGTATAC 3'.

1.2.2 重组质粒的构建和瞬时转染 用 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切质粒 pSuppressorNeo, 酶切产物胶回收并溶于超纯水中。ATM 基因 siRNA 寡核苷酸 P1、P2 退火后以 3:1 的比例与胶回收质粒进行连接。参照“分子克隆实验指南”2003:96-99 制作感受态细菌 DH5 α , 然后将连接产物转化感受态细菌 DH5 α 。次日随机挑取菌落,接种 LB 培养液,振荡培养过夜,碱裂解法小量快速抽提质粒,以 *Sal* I、*Bam*H I 加 *Xba* I、*Bam*H I 加 *Sal* I 酶切进行鉴定。根据片段大小判断重组克隆,并用 pSuppressorNeo 特有的测序引物进行测序。非特异 siRNA 寡聚 DAN 与 pSuppressorNeo 质粒的连接、克隆同上。Siha 细胞培养基为 100 mL/L FBS 的 RPMI 1640,培养条件为 50 mL/L CO₂, 37 $^{\circ}$ C。将处于对数生长期的细胞接种于 3 个细胞培养瓶中,当细胞生长密度为 80% 时,胰酶消化收取细胞并分别加入上述构建好的重组质粒,电穿孔法进行瞬时转染,48 h 后收取细胞待用。以上实验分为 3 组 siRNAs 组(转染 pSuppressorNeo-ATM 质粒,简称 Sina^{ATM})、正常对照组(Siha)、非特异 siRNAs 组(转染 pSuppressorNeo-nonspecific 质粒,简称 Sina^{ns})。

1.2.3 RT-PCR 检测瞬时转染细胞的 mRNA 选取甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参照,根据 GenBank 上发表的 ATM、GAPDH 序列,利用 DNAClub 软件分别设计了 ATM 引物 P5 5' GATGTTGTTGTC-CCTACTATGG 3', P6 : 5' GCTACACTGCGGTATA-AGCC 3' 扩增产物为 589 bp(8170~8759)。GAPDH 引物 P7 : 5' AGGTCCACCACTGACACGTT 3', P8 : 5' GCCTCAAGATCATCAGCAAT 3' 扩增产物为 310 bp。取 1 \times 10⁶ 瞬时转染 48 h 后的 Siha^{ATM}、Siha^{ns} 和 Siha 细胞,加入 Trizol 1 mL 试剂,抽提总 RNA,据反转录

RNAi 寡核苷酸设计原则^[4],在 ATM 的 cDNA 序列(GenBank 登录号 U33841)中选取特异性的序列(577~596),并引入两个酶切位点以确保引物退火后可以插入质粒 pSuppressorNeo 且读框正确,设计合成 ATM 基因 siRNA 寡聚 DNA 如下:

试剂盒说明进行反转录,以反转录的 cDNA 产物作为模板,用 P5、P6 及 P7、P8 分别对反转录产物进行 PCR。取反应液 5 μ L 行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

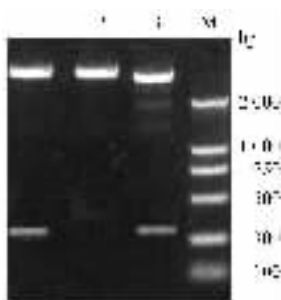
1.2.4 检测瞬时转染细胞 ATM 表达 分别收取 3 组细胞,PBS 离心洗涤,蛋白裂解液裂解蛋白,BCA 法蛋白定量,进行 SDS-PAGE 电泳,转移后分别与一抗(ATM 抗体)、二抗(HRP 标记的羊抗兔二抗)孵育,DAB 显色。分别收取瞬时转染的 3 组细胞,PBS 洗涤,加入 700 mL/L 乙醇固定,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日以 15 μ L Triton 放置 10 min 后,分别与一抗(ATM 抗体)、二抗(HRP 标记的羊抗兔二抗)孵育,加入 500 μ L PBS 溶液重悬,上机检测 ATM 蛋白表达量,以上试验均重复 3 次。分别收取瞬时转染的 3 组细胞,胰酶消化后制备细胞滴片,待细胞充分伸展后,冷丙酮 4 $^{\circ}$ C 固定,依次加入一抗(ATM 抗体)、荧光标记的二抗(羊抗兔 IgG),37 $^{\circ}$ C 湿盒放置 40 min,漂洗、缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察 ATM 蛋白的表达并拍照。同时以 DAPI 复染细胞核作为对照。

统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Kruskal-Wallis 检验进行组间比较,各组间两两比较采用 Will-oxon 检验,采用 SPSS 11.0 进行统计分析。

2 结果

2.1 人 ATM 基因 siRNA 重组质粒的构建及核酸序列分析 根据 pSuppressorNeo 使用说明,pSuppressorNeo 质粒经限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 双酶切后成为大小约为 3000 bp 的线状质粒,与具有 *Sal* I、*Xba* I 双酶位点的人工合成的 ATM 基因 siRNA 双链 DNA 连接,由于 *Xho* I 与 *Sal* I 酶切后产生的黏端相同,故可以连接,但连接后此酶切位点破坏,*Sal* I、*Xho* I 均不能再次切开。分别以 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切重组质粒及 pSuppressorNeo 质粒,电泳结果表明重组质粒 *Sal* I 酶切位点已被破坏。*Bam*H I 和 *Xba* I 酶切重组质粒后,电泳分别见 353 bp、3100 bp 片段,大小与预期相符。表明重组质粒确为 ATM 基因 siRNA 双链 DNA

与质粒 pSuppressorNeo 的重组体. 人工合成的 ATM 基因 siRNA 双链 DNA 与线性化 pSuppressorNeo 质粒已成功连接,被命名为 pSuppressorNeo-ATM(Fig 1). 以 pSuppressorNeo 特有的测序引物对 pSuppressorNeo-ATM 进行测序,测序结果与合成的 ATM RNAi 的序列完全一致.



1 : pSuppressorNeo/ BamH I / Sal I ; 2 : pSuppressorNeo-ATM / BamH I / Sal I ; 3 : pSuppressorNeo-ATM/ BamH I / Xba I ; M : DNA marker (DL2000).

Fig 1 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid

图 1 重组质粒 pSuppressorNeo-ATM 酶切鉴定

2.2 瞬时转染 Siha 细胞系 mRNA 3 组均扩增出了 GADPH 基因(约 310 bp 处),而且经扫描显示其含量基本相同,说明 3 组内参照 mRNA 的总量一致. 而在靶基因 ATM (约 590 bp)处, Siha 组与 Siha^{ns} 组均可见一条亮带, Siha^{ATM} 组无扩增条带. 表明特异性 siRNA 导入 Siha 细胞后可以明显降低 ATM RNA 的含量(Fig 2).



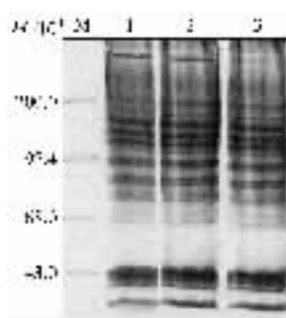
1 : ATM gene PCR product by P5 and P6 in Siha^{ns} cell ; 2 : GADPH gene PCR product by P7 and P8 in Siha^{ns} cell ; 3 : ATM gene PCR product by P5 and P6 in Siha^{ATM} cell ; 4 : GADPH gene PCR product by P7 and P8 in Siha^{ATM} cell ; 5 : ATM gene PCR product by P5 and P6 in Siha cell ; 6 : GADPH gene PCR product by P7 and P8 in Siha cell ; M : DNA marker (DL2000).

Fig 2 mRNA in transiently transfected Siha cells by RT-PCR

图 2 瞬时转染 Siha 细胞系 mRNA 的 RT-PCR 检测

2.3 瞬时转染 Siha 细胞系 ATM 表达 Siha^{ATM} 组 ATM 蛋白的表达量较 Siha 组与 Siha^{ns} 组均有明显降低. 表明构建的 RNAi 载体导入 Siha 细胞后可以明显降低 ATM 在蛋白水平的表达量(Fig 3 , 4 , Western Blot). Siha 组细胞 ATM 蛋白细胞阳性表达率为

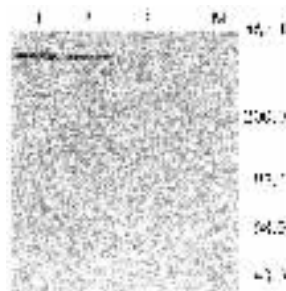
(99.18 ± 0.12)% , Siha^{ns} 组 (97.78 ± 0.23)% , Siha^{ATM} 组 (31.44 ± 1.56)% . 经统计学分析 Siha^{ATM} 组与 Siha 组、Siha^{ATM} 组与 Siha^{ns} 组间 ATM 蛋白表达量之间差异均有显著性(*P* < 0.01). Siha^{ns} 组与 Siha 组 ATM 蛋白表达量之间差异无显著性(*P* > 0.01). Siha^{ATM} 组细胞 ATM 蛋白细胞阳性表达率较其他两组均有显著降低(Fig 5). Siha 组与 Siha^{ns} 组免疫荧光呈强阳性染色,红色荧光主要位于细胞核,而 Siha^{ATM} 组细胞表达明显降低(Fig 6).



M : Protein marker ; 1 : Siha cell ; 2 : Siha^{ns} cell ; 3 : Siha^{ATM} cell.

Fig 3 ATM protein in transiently transfected Siha cells by SDS-PAGE

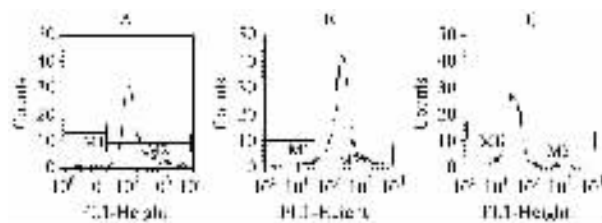
图 3 瞬时转染 Siha 细胞系 ATM 蛋白的 SDS-PAGE 检测



1 : Siha cell ; 2 : Siha^{ns} cell ; 3 : Siha^{ATM} cell ; M : Protein marker.

Fig 4 ATM protein in transiently transfected Siha cells by Western-blot

图 4 瞬时转染 Siha 细胞系 ATM 蛋白的 Western-blot 检测



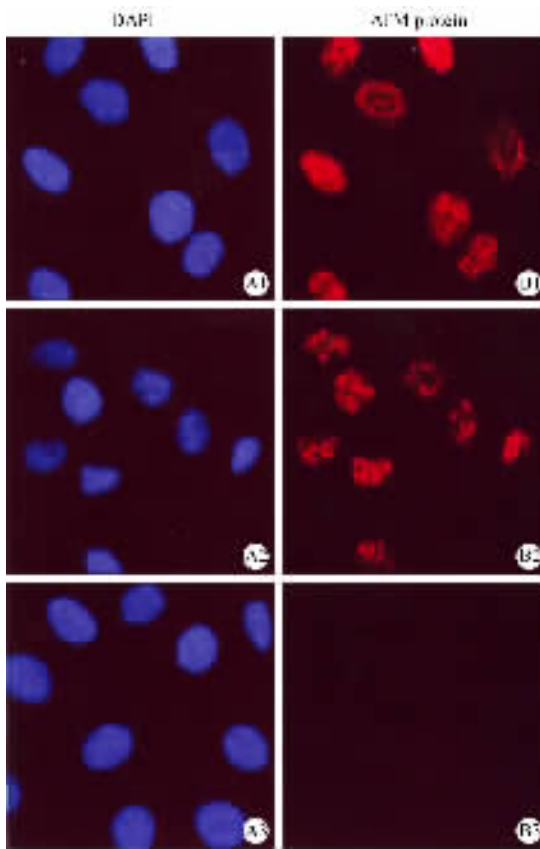
A : Siha cell ; B : Siha^{ns} cell ; C : Siha^{ATM} cell.

Fig 5 Detection of ATM protein by FCM

图 5 各细胞系 ATM 蛋白的流式细胞术检测

3 讨论

ATM 是毛细血管扩张-共济失调症(ataxia-telangiectasia , AT)的致病基因,当细胞受到 DNA 受损时,



A-1, A-2, A-3: DAPI dyeing of cell nuclei in Siha, Siha^{ns}, and Siha^{ATM} cells; B-1, B-2, B-3: ATM protein in Siha, Siha^{ns}, and Siha^{ATM} cells.

Fig 6 ATM protein in transiently transfected Siha cells IF × 400

图6 瞬时转染 Siha 细胞 ATM 蛋白的免疫荧光检测

ATM 蛋白将被激活,并磷酸化多种参与细胞周期调控和 DNA 损伤修复的蛋白,这些蛋白包括 p95, Brca1, p53 肿瘤抑制基因、细胞周期调控点激酶 chk2, SMC1, BLM 和 FANCD2 等^[5]。并且在细胞 DNA 受损时这些蛋白被 ATM 蛋白共同磷酸化是激活细胞周期调控程序以及启动细胞 DNA 修复所必须的。因此 ATM 蛋白是细胞受到 DNA 损伤时的重要调控因子。

RNAi 的重要步骤之一是构建真核表达载体,并使目标基因在真核细胞中表达降到极低水平甚至完全剔除。而构建载体的关键是选定合理的真核表达载体。siRNAs 的真核表达载体来源主要有三种:①

化学合成,②体外转录,③siRNAs 表达质粒在细胞内的转录,主要是 H1 和 u6 两种启动子来调控^[6]。我们采用 siRNAs 表达质粒在细胞内的转录方法,以 ATM 基因为靶基因,借助软件分析了其序列特征,依据 Tuschl 等关于 siRNAs 设计原则,添加了 Sal I, Xba I 双酶位点,最后设计并人工合成 ATM 基因 siRNA 双链寡核苷酸。同时,我们使用的 pSuppressorNeo 质粒的多克隆位点含有 Xho I, Xba I, 由于 Xho I 与 Sal I 酶切后产生的黏端相同,因此能将 ATM 基因 siRNA 双链寡核苷酸定向克隆入 pSuppressorNeo 的 Xho I 与 Xba I 位点间,从而使抑制 ATM 蛋白的表达成为可能。我们利用较为经济的电穿孔转染法,将重组载体 pSuppressorNeo-ATM 转入人源性宫颈癌细胞 Siha,并设立非特异的 siRNAs 转染的细胞和未转染的细胞为对照组。我们通过内标化 RT-PCR, Western-blot, 流式细胞术检测和免疫荧光证实,转染后细胞无论在 RNA 水平,或蛋白水平 ATM 含量均明显下降。本研究提示,利用 RNAi 技术可以显著地抑制宫颈癌细胞中 ATM 基因的表达,而 ATM 蛋白与宫颈癌细胞的生物学相关性, RNAi ATM 基因是否能够应用于未来宫颈癌的基因治疗,有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNA mediate RNA interferences in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001; 411(6836): 494-498.
- [2] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002; 296: 550-553.
- [3] Sui G, Soohoo C, Affar EB, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 5515-5520.
- [4] Tom T, Sayda E, Jens H, et al. The siRNAs user guide. <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/siRNAs.html>. October 11, 2002.
- [5] Cline SD, Hanawalt PC. Who's on first in the cellular response to DNA damage? [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003; 4: 361-372.
- [6] Hannon GJ. RNA interference [J]. *Nature*, 2002; 418(6894): 244-251.

编辑 王 睿