

白介素 1 受体相关激酶 4 重组过表达质粒 pcDNA3.1 – IRAK4 的构建及转染

袁 园 廖海含 吴青青 卞洲艳 杨 政 代亚文 唐其柱

摘 要 **目的** 构建重组过表达质粒 pcDNA3.1 – IRAK4 并检验其在 H9c2 细胞中的表达。**方法** 在全球科学家质粒共享非盈利组织 Addgene 申请到 pDONR223 – IRAK4 质粒菌种,摇菌提取质粒后测序。设计引物将目的片段扩增并跑胶回收。将目的片段 PCR 扩增产物和空质粒 pcDNA3.1 采用 BamH I 和 EcoR I 酶切,构建重组表达质粒。将重组质粒使用两种转染试剂转染入 H9c2 细胞中,并借助 Western blot 法检测 IRAK4 蛋白在 H9c2 细胞中的表达。**结果** 重组过表达质粒经菌落 PCR、序列测定证实,扩增基因片段 IRAK4 与基因数据库中序列一致,并且含有终止密码子。转染入 H9c2 细胞中能够过表达,表明 IRAK4 重组过表达质粒构建成功。**结论** 成功构建 IRAK4 基因过表达重组质粒,获得外源性 IRAK4 转染的 H9c2 细胞。

关键词 IRAK4 基因转染 质粒

中图分类号 R542.2;R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.012

Construction of Recombinant IRAK4 Overexpressed Plasmids and Validation of Their Transfection to H9c2 Cardiomyoblasts. Yuan Yuan, Liao Haihan, Wu Qingqing, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To construct the recombinant IRAK4 overexpressed plasmids and transfect them in H9c2 cardiomyoblasts. **Methods** pDONR223 – IRAK4 plasmids in Bacteria were provided for free by Addgene. Vector NTI was used to design the special primer of IRAK4, which expanded the genetic segment of IRAK4 by RT – PCR. The augment segment of IRAK4 and plasmid pcDNA3.1 were digested with endonuclease BamH I and EcoR I, then to connect. The recombinant overexpressed plasmid was transfected into H9c2 cardiomyoblasts, then to assay the expression of IRAK4 protein by Western blot. **Results** The augment segment was the IRAK4 genetic segment with stop codon identified by RT – PCR, electrophoresis and sequence identification, which was in accordance with the sequence published in the gene bank, and the recombinant plasmid can overexpress in the H9c2 cardiomyoblasts, showing that the recombinant plasmid of IRAK4 was constructed successfully. **Conclusion** The recombinant plasmid of IRAK4 was successfully constructed and transfected into H9c2 cardiomyoblasts.

Key words IRAK4; Gene transfection; Plasmid

白介素 1 受体相关激酶 4(interleukin – 1 receptor – associated kinase – 4, IRAK4)是 IRAKs 家族成员之一,是 Toll 样受体/白介素 – 1 (Toll – like receptor/Interleukin – 1 receptor, TIR)) 家族信号通路中的重要成员之一。IL – 1、IL – 18 和 IL – 33 受体等激活时^[1-3],TIRs 募集骨髓分化因子 88 蛋白质(myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88),MyD88 可募集 IRAK4 并激活 IRAK4^[4],IRAK4 可磷酸化 IRAK1、IRAK2 和 IRAK – M,继而激活肿瘤坏死因子联合受体 6 (TNF receptor – associated factor 6,

Traf6)、转化生长因子 – β 激活的激酶 – 1 (TGF β – activated kinase 1, TAK1)、NF – κ B 和 JNK^[5,6]。IRAK4 在固有免疫系统中扮演重要角色,目前研究证实固有免疫和心血管系统疾病密切相关。为了研究 IRAK4 在心血管系统的作用,本研究采用 RT – PCR 扩增获赠质粒中 IRAK4 基因片段并且在其序列中加上酶切位点和终止密码子,构建 IRAK4 基因过表达重组质粒,转染 H9c2 细胞。

材料与方法

1. 实验材料:H9c2 细胞株购自中国科学院上海声明科学研究院细胞资源中心。DMEM 培养基和胎牛血清购于美国 GIBCO 公司。pDONR223 – IRAK4 (Addgene plasmid #23749) 为 William Hahn & David Root 所赠。BamH I 酶、EcoR I 酶、Solution 1、dTNP Mixture、5 × PrimeSTAR 和 PrimeSTAR HS DNA Poly-

基金项目:教育部博士点基金资助项目(优先发展领域)(20130141130010);湖北省医学领军人才培养工程专项基金资助项目
作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科
通讯作者:唐其柱,电子信箱:qztang@whu.edu.cn

merase 购自日本 TaKaRa 公司。所用的其他实验材料有:胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒(中国 Tiangen Biotech 公司)、感受态细胞 Trans1 - T1 (TransGen)、NE Buffer 4 和 Purified BSA (美国 Biolabs 公司)、蛋白定量 BCA 试剂盒(美国 Thermo scientific 公司)、IRAK4 抗体(美国 CST 公司)。

2. 实验方法:(1) pDONR223 - IRAK4 质粒菌种摇菌提质粒测序:使用大观霉素(50 μ g/ml)抗性的 LB 胶板,采用划线法将获赠的含质粒的菌种接种。37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑单个菌落进行液体培养,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12 ~ 18h。提取质粒送测序。(2)使用 PCR 扩增 pDONR223 - IRAK4 质粒中 IRAK4 片段:上游引物:5' - CGCGgatccGCCACCATGAACAAACCCATAACACCATCAA - 3',包括保护碱基、BamH I 酶切位点、Kozak 序列和 IRAK4 cDNA 上游序列互补序列。下游引物:5' - CCGGAATTCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGTAAGAAGCTGTCATCTCTTGCAAGC - 3',包括保护碱基、EcoR I 酶切位点、TAA(终止密码子)、HA 序列和 IRAK4 cDNA 下游序列互补序列。PCR 反应体系 50 μ l,分别为 5 $\times$ PrimeSTAR 10 μ l,dNTP 1 μ l,H₂O 36.3 μ l,上游引物 1 μ l,下游引物 1 μ l,PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μ l,模板 0.2 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3min,95 $^{\circ}$ C 变性 20s,58 $^{\circ}$ C 退火 20s,72 $^{\circ}$ C 延伸 80s,共 32 个循环。72 $^{\circ}$ C 5min,4 $^{\circ}$ C 保持。将 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行回收。(3) pcDNA3.1 - IRAK4 重组质粒构建和 DNA 测序鉴定:对 PCR 产物进行酶切。反应体系 50 μ l,分别为 Buffer 5 μ l,BSA 0.5 μ l,BamH I 1 μ l,EcoR I 1 μ l,PCR 产物 38 μ l,H₂O 4.5 μ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 3h。酶切产物通过 clean up,回收目的片段。对 pcDNA3.1 载体进行酶切。反应体系 50 μ l,分别为 Buffer 5 μ l,BSA 0.5 μ l,BamH I 1 μ l,EcoR I 1 μ l,pcDNA3.1 载体 11 μ l,H₂O 31.5 μ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 4h。将酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳进行回收。以 $\frac{\text{载体浓度} \times \text{载体体积} / \text{载体大小}}{\text{片段浓度} \times \text{片段体积} / \text{片段大小}} = 1/4$,载体体积 + 片段体 = 2.5 μ l,Solution 1 体积 2.5 μ l,计算连接体系中载体和目的片段的体积。连接条件:16 $^{\circ}$ C,2h。取 20 μ l 感受态,加入连接产物,混匀后置于冰上 30min,42 $^{\circ}$ C 水浴热击 90s,冰浴 2min,加入无抗性的 LB 培养基 400 μ l,37 $^{\circ}$ C 摇床,180r/min,摇 45min。涂板(有抗性),37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑菌落,进行菌落 PCR。反应体系 20 μ l,分别为 H₂O 8 μ l,2 $\times$ mix 10 μ l,上游引物

0.5 μ l,下游引物 0.5 μ l,模板 1 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3min,95 $^{\circ}$ C 变性 20s,58 $^{\circ}$ C 退火 20s,72 $^{\circ}$ C 延伸 80s,共 32 个循环。72 $^{\circ}$ C 5min,4 $^{\circ}$ C 保持。琼脂糖凝胶电泳鉴定连接产物。挑的菌落进行摇菌过夜培养,提质粒送 DNA 测序。(4)重组质粒转染入 H9c2 细胞中:使用 6 孔板进行转染,细胞长至 70% ~ 80%,以两个剂量(2 微克/孔和 4 微克/孔)分别进行转染。转染步骤依照 FuGENE[®] HD Transfection Reagent 说明书。转染 36h,提蛋白鉴定转染结果。(5)Western blot 法检测:裂解细胞,离心去取上清。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量操作。使用分光光度计测出蛋白浓度,校正所有蛋白样品终浓度为适宜浓度,浓度过低样本弃用。加热变性保存。制胶、电泳、转膜、封闭、TBST 洗膜、一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜、TBST 洗膜、荧光二抗室温孵育 1h、TBST 洗膜,双通道荧光扫描仪扫描,分析结果。

3. 统计学方法:使用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组资料比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. pDONR223 - IRAK4 质粒测序鉴定:对获赠的质粒进行 DNA 测序鉴定,经过 BLAST 比对,显示 pDONR223 - IRAK4 质粒与目的基因序列一致,但无终止密码子。

2. PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定:设计 PCR 引物,将目的基因片段扩增出来,并且加上 HA,终止密码子和限制性内切酶位点。使用琼脂糖凝胶电泳鉴定显示,在 1000 ~ 2000kb 可以看到条带(图 1)。进行胶回收。

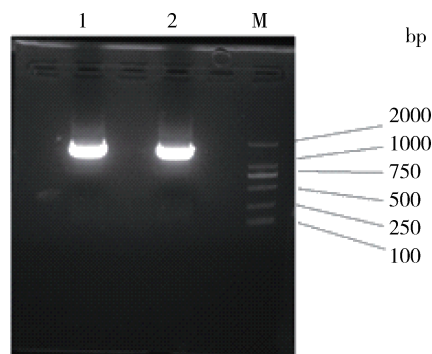


图 1 PCR 扩增产物
1,2. IRAK4;M. 标志物

3. pcDNA3.1 - IRAK4 重组质粒琼脂糖凝胶电泳

和 DNA 测序鉴定:使用琼脂糖凝胶电泳鉴定显示,载体酶切后,在 7000 ~ 4000kb 可以看到条带(图 2),连接后在接近 7000 标志物条带位置可以看到条带(图 3)。将重组质粒送 DNA 测序,显示重组质粒建立成功。

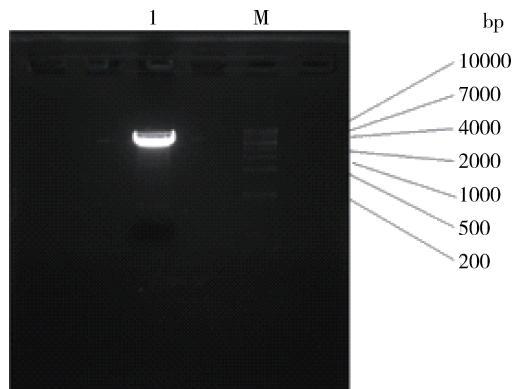


图 2 pcDNA3.1 + 载体酶切产物

M. 标志物;1. 载体酶切产物

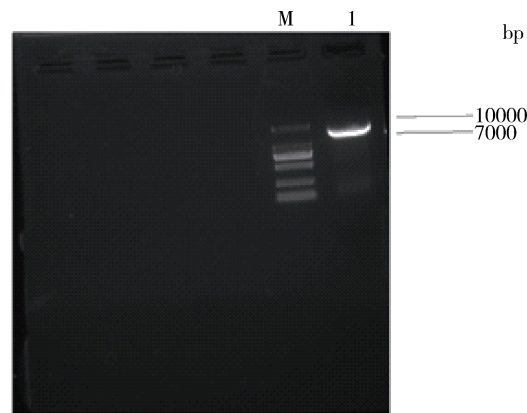


图 3 重组质粒 pcDNA3.1 + - IRAK4 鉴定

M. 标志物;1. pcDNA3.0 + IRAK4

鉴定:Western blot 结果显示,在 H9c2 细胞(6 孔板)中转染 pcDNA3.1 - IRAK4 重组质粒后,细胞中 IRAK4 的表达有显著上调,4 μ g 转染组细胞中 IRAK4 的表达是对照组的 2.15 倍(图 4)。

4. pcDNA3.1 - IRAK4 重组质粒转染 H9c2 细胞的

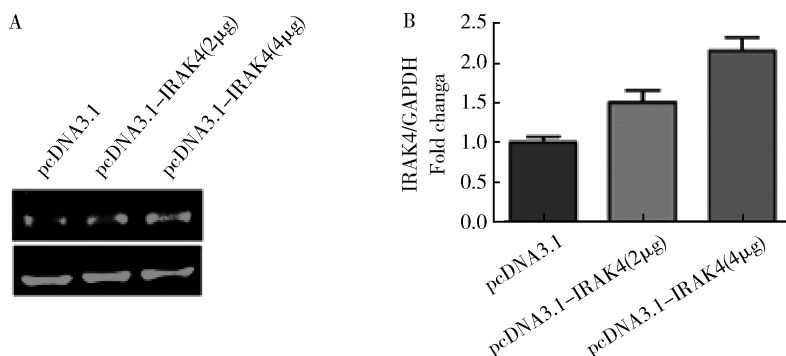


图 4 重组质粒 pcDNA3.1 + - IRAK4 在 H9c2 细胞蛋白表达情况

讨 论

人类 IRAK4 基因位于第 12 号染色体上。是 TIR 信号通路主要的信号分子^[5]。相关研究显示其与免疫、炎症、肿瘤和心血管疾病密切相关^[7-10]。本研究使用 pDONR223 - IRAK4 质粒、pcDNA3.1 质粒,首先采用高保真酶将基因片段扩出,并在同时加入酶切位点和终止密码子,使用双酶切法将其克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 + 上,建立 pcDNA3.1 + - IRAK4 重组质粒,并成功转染 H9c2 细胞,为后续研究提供可转染的质粒。pcDNA3.1 + 载体是真核表达载体,有高效增强子 SV40,且在目的基因前有强大的基因启动结构 T7 PCMV,使目的基因的表达得以保证,有可能随着宿主细胞分裂,随细胞遗传给子代细胞,可在一定程度上保证目的基因稳定传给新增殖的细胞。

用转染 H9c2 细胞的重组质粒的载体时,借鉴前人经验,以 pcDNA3.1 + 作为载体^[11]。

基因治疗在多个人类疾病中的研究已经实现突破^[12,13]。通过基因治疗增加人心脏肌浆网钙 ATP 酶 2a(SERCA2a)活性治疗心力衰竭已经进入二期临床试验^[14]。这促进了利用基因转染方式对基因在疾病中功能的研究。脂质体转染法,是利用带正电荷的脂质体囊泡结合 DNA,结合细胞膜并进入细胞。这种转染方式简单便捷,重复性好,虽然其不适合于很多原代培养的细胞,但其仍然是细胞生物学和相关研究领域使用最为广泛的方法^[15]。在本实验中,笔者使用商业试剂以脂质体转染的方法转染传代细胞系 H9c2 细胞,重复性好,转染效果佳,为进一步研究 IRAK4 在 H9c2 细胞中的功能做了良好的前期工作。

参考文献

- Henderson C, Goldbach – Mansky R. Monogenic IL – 1 mediated autoinflammatory and immunodeficiency syndromes: finding the right balance in response to danger signals [J]. Clin Immunol, 2010, 135 (2): 210 – 222
- Koziczak – Holbro M, Littlewood – Evans A, Pollinger B, *et al.* The critical role of kinase activity of interleukin – 1 receptor – associated kinase 4 in animal models of joint inflammation [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60 (6): 1661 – 1671
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK – 4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK – kinase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99 (8): 5567 – 5572
- Warner N, Nunez G. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction [J]. J Immunol, 2013, 190 (1): 3 – 4
- Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC. IRAK – 4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity [J]. Trends Immunol, 2002, 23 (10): 503 – 506
- Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, *et al.* Severe impairment of interleukin – 1 and Toll – like receptor signalling in mice lacking IRAK – 4 [J]. Nature, 2002, 416 (6882): 750 – 756
- Park SH, Baek SI, Yun J, *et al.* IRAK4 as a molecular target in the amelioration of innate immunity – related endotoxic shock and acute liver injury by chlorogenic acid [J]. J Immunol, 2015, 194 (3): 1122 – 1130
- McElroy WT, Tan Z, Ho G, *et al.* Potent and selective amidopyrazole inhibitors of IRAK4 that are efficacious in a rodent model of inflammation [J]. ACS Med Chem Lett, 2015, 6 (6): 677 – 682
- Chaudhary D, Robinson S, Romero DL. Recent advances in the discovery of small molecule inhibitors of interleukin – 1 receptor – associated kinase 4 (IRAK4) as a therapeutic target for inflammation and oncology disorders [J]. J Med Chem, 2015, 58 (1): 96 – 110
- Maekawa Y, Mizue N, Chan A, *et al.* Survival and cardiac remodeling after myocardial infarction are critically dependent on the host innate immune interleukin – 1 receptor – associated kinase – 4 signaling: a regulator of bone marrow – derived dendritic cells [J]. Circulation, 2009, 120 (14): 1401 – 1414
- Xu F, Yu H, Liu J, *et al.* alphaB – crystallin regulates oxidative stress – induced apoptosis in cardiac H9c2 cells via the PI3K/AKT pathway [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40 (3): 2517 – 2526
- Greenberg B. Gene therapy for heart failure [J]. J Cardiol, 2015, 66 (3): 195 – 200
- Dey R, Pillai B. Cell based gene therapy against HIV [J]. Gene Ther, 2015, 22 (11): 851 – 855
- Greenberg B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, *et al.* Design of a phase 2b trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with advanced heart failure: the CUPID 2 trial (calcium up – regulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease phase 2b) [J]. JACC Heart Fail, 2014, 2 (1): 84 – 92
- Kaestner L, Scholz A, Lipp P. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25 (6): 1171 – 1176

(收稿日期:2015 – 09 – 16)

(修回日期:2015 – 10 – 15)

成年 OSAHS 患者呼吸紊乱程度与年龄及脑电觉醒反应的相关性分析

许义新 张琳 赵正卿 彭华 吴惠涓 庄建华 赵忠新

摘要 **目的** 探讨成年阻塞性睡眠呼吸暂停/低通气综合征 (obstructive sleep apnea – hypopnea syndrome, OSAHS) 患者中呼吸紊乱程度与脑电觉醒反应及年龄增长间的关系。**方法** 对 2005 年 1 月 ~ 2014 年 12 月入笔者医院神经科睡眠检查室行多导睡眠图监测的阻塞性睡眠呼吸暂停/低通气成年患者的睡眠情况进行回顾性分析,共入组 621 例,年龄 > 18 岁,睡眠呼吸暂停低通气指数 (apnea – hypopnea index, AHI) ≥ 5 次/小时,观察与睡眠呼吸暂停/低通气相关的脑电觉醒指数 (arousal index, ARI),采用相关性分析研究脑电觉醒反应与年龄、呼吸事件之间的关系。**结果** 621 例患者,男性 445 例,女性 176 例 (男:女为 2.53:1),患者年龄最小 19 岁,最大 84 岁,患者平均年龄 51.39 ± 12.13 岁;最小 AHI = 5.03,最大 AHI = 186.53,平均 AHI 33.84 ± 22.59 ;最小 ARI = 0,最大 ARI = 195.60,平均 ARI 23.45 ± 25.55 ;相关性分析 ARI、AHI 与年龄增长无相关性 ($P > 0.01$);ARI 与 AHI 呈线性相关,相关系数为 0.421,并且在各年龄组均有显著相关性。**结论** 睡眠呼吸暂停低通气指数对脑电觉醒反应程度有显著影响,呼吸紊乱指数越高,与相关脑电觉醒反应越明显,而年龄增长对呼吸事件相关的脑电觉醒反应没有明确的影响。

基金项目:上海市自然科学基金资助项目 (13ZR1450500)

作者单位:200003 上海,第二军医大学附属长征医院神经内科 (注:许义新、张琳为共同第一作者)

通讯作者:赵忠新,电子信箱:zhaozx@medmail.com.cn