大鼠 Pdcd4 基因真核载体的构建与表达

钟　波　李　静　吕社民　侯　伟　刘海燕　金巧艳　魏　伟

摘　要　目的　构建大鼠程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4, Pdcd4)基因真核表达载体,为进一步研究该基因的功能提供条件。**方法**　提取 E3 大鼠肺组织总 RNA,RT－PCR 扩增大鼠 Pdcd4 基因全长 cDNA;经过双酶切、连接等反应,构建 pEGFP－C1－Pdcd4 重组表达载体。将该载体转染大鼠巨噬细胞系 NR8383 细胞,通过 RT－qPCR 与 Western blot 法检测 NR8383 细胞 Pdcd4 基因的表达。**结果**　RT－PCR 扩增的大鼠 Pdcd4 全长 cDNA 为 1410bp;pEGFP－C1－Pdcd4 重组真核表达载体中插入片段与 NCBI GenBank 文库中大鼠 Pdcd4 cDNA 的序列完全一致;倒置荧光显微镜下观察转染后 NR8383 细胞中绿色荧光蛋白的表达确定转染成功;RT－qPCR 与 Western blot 法检测 NR8383 细胞中 Pdcd4 基因的表达水平明显上调。**结论**　成功构建 pEGFP－C1－Pdcd4 重组真核表达载体,为进一步研究 Pdcd4 基因的作用机制奠定基础。

关键词　程序性细胞死亡因子 4　基因重组　pEGFP－C1 载体　支气管哮喘

中图分类号　R3　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2019.10.014

Construction and Expression of Rat Pdcd4 Eukaryotic Vector. *Zhong Bo, Li Jing, Lv Shemin, et al. Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Shaanxi 710004, China*

Abstract　Objective　To construct eukaryotic vector of rat programmed cell death 4 (Pdcd4) for further function study. **Methods**　Total RNA was isolated from E3 rat lung tissue. Then Pdcd4 DNA fragments were obtained by PCR amplification with specific primers after reverse transcription. After digestion with Hind Ⅲ and Xho Ⅰ the fragments were ligated into pEGFP－C1 vector cleaved with the same restriction endonucleases to generate pEGFP－C1－Pdcd4 recombinant vector. The integrity of constructed vector was confirmed by PCR and the sequencing analysis. NR8383 cells, a rat macrophage cell line, were transfected with pEGFP－C1－Pdcd4 recombinant plasmid or pEGFP－C1 empty vector. Twenty－four hours after the transfection, cells were harvested and Pdcd4 was detected by RT－qPCR and Western blot. **Results**　Pdcd4 cDNA contains 1410bp. The recombinant eukaryotic expression vector pEGFP－C1－Pdcd4 was determined by PCR and was consistent with the theoretical value. No mutated base sequence was found by sequencing analysis. Pdcd4 was upregulated markedly after recombinant plasmid transfection. **Conclusion**　The recombinant eukaryotic vector pEGFP－C1－Pdcd4 is successfully constructed.

Key words　Programmed cell death 4; Gene recombination; pEGFP－C1 vector; Asthma

程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4, Pdcd4)基因最初被发现与细胞的程序性死亡有关[1]。该基因在大鼠定位于 1q55, cDNA 全长为 1410bp,所编码的蛋白质共含个 469 氨基酸。笔者在之前的研究中应用抑制性消减杂交技术筛选出 Pdcd4 作为抗原诱导肺部炎症上调表达的差异表达基因[2]。为进一步研究该基因的功能,以 E3 大鼠为研究对象,克隆其肺组织 Pdcd4 基因并构建 pEGFP－C1－Pdcd4 重组真核载体,为揭示该基因的功能建立基础。

材料与方法

1. 菌株与载体:所用感受态 DH5α 大肠杆菌菌种、真核表达载体 pEGFP－C1 均为西安交通大学医学部基础医学院分子生物学系实验室保存。本研究选用含有绿色荧光蛋白及 Hind Ⅲ与 Xho Ⅰ酶切位点的 pEGFP－C1 质粒作为重组载体。其结构与多克隆位点如图 1 所示。

2. 细胞与实验动物:本研究使用大鼠巨噬细胞系 NR8383 细胞与 8 周龄近交系 E3 大鼠(SPF 级动物房繁育),均为西安交通大学医学部基础医学院生物化学与分子生物学系所保存。

3. 试剂:Trizol® Reagent、Lipofectamine 2000 购自

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81800017);陕西省自然科学基础研究计划项目(2017JQ8045);西安交通大学自由探索与创新项目(1191329843);西安交通大学第二附属医院院基金资助项目[YJ(QN)201504]

作者单位:710004　西安交通大学医学部第二附属医院小儿内科(钟波、李静、侯伟、刘海燕、金巧艳);7100061　西安交通大学医学部基础医学院生物化学与分子生物学系(吕社民);710004　西安交通大学医学部第二附属医院检验科(魏伟)

通讯作者:钟波,电子信箱:zhongbo728@xjtu.edu.cn

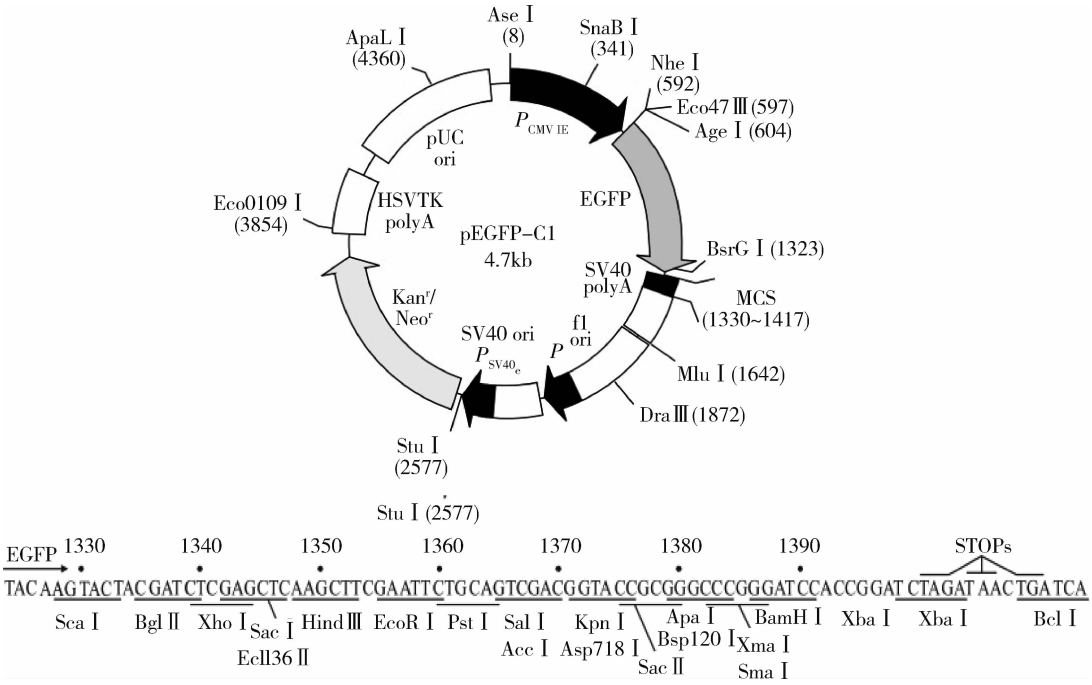


图 1　pEGFP－C1 载体结构和多克隆位点示意图

美国 Invitrogen 公司，RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit、限制性内切酶 Hind Ⅲ与 Xho Ⅰ购自加拿大 Fermentas 公司，质粒提取试剂盒购自北京天根生物技术公司，胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司，T4 DNA 连接酶购自美国 Sigma 公司，胰蛋白胨及酵母提取物购自英国 Oxoid 公司，高保真 Taq 酶、DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司，F12K 培养基、胎牛血清购自美国 HyClone 公司，其他试剂均为国产分析纯。6 孔板购自美国 Corning 公司，倒置相差显微镜及正置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

4. 引物：PCR 引物均由北京三博远志生物技术有限责任公司合成，序列信息如表 1 所示。

表 1　PCR 引物信息

名称	引物	序列(5′→3′)
Pdcd4 克隆	上游引物	CCGCTCGAGATGGATGTAGAAAACG
	下游引物	CCCAAGCTTTCAGTAGCTCTCAGGTTTAAG
Pdcd4 real－time PCR	上游引物	AACTATGATGATGACCAGGAGAAC
	下游引物	GCTAAGGACACTGCCAACAC
GAPDH	上游引物	CGGCAAGTTCAACGGCACAG
	下游引物	GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC

5. 实验方法

（1）E3 大鼠肺组织总 RNA 提取：将大鼠称重，按 1g/kg 体重乌拉坦（质量体积比为 20%）的剂量麻醉大鼠；经腹主动脉取血，从甲状软骨处剪断气管，分离肺组织，放入研钵中加液氮彻底研磨，加 Trizol 室温放置 5min，加入 1/5 体积三氯甲烷，混匀 15s，室温静置 10min，4℃ 12000r/min 离心 20min，取上层水相，加入等量预冷的异丙醇，混匀后 －20℃ 放置 2h，4℃ 12000r/min 离心 15min。弃上清，加入 1ml 预冷的 75% 乙醇，重新悬浮沉淀，7500r/min 离心 5min。弃上清，使剩余乙醇彻底挥发。20μl DEPC－H_2O 溶解 RNA，所得 RNA 溶液保存在 －80℃ 低温冰箱备用。微量核酸/蛋白定量仪上测定总 RNA 浓度，RNA 电泳鉴定总 RNA 的完整性。

（2）cDNA 反转录与 PCR 扩增 Pdcd4 cDNA 全长：按照 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作，反应体系 oligo（dT）18 引物 1μl，RNA 2μg，DEPC 处理水加至总体积 12μl，混匀、离心。70℃孵育 5min 后于冰上放置，加入 5×反应缓冲液 4μl，dNTP（10mmol/L）2μl，M－MLV 反转氯酶 1μl，核糖核酸酶抑制剂 1μl。混匀、离心，42℃ 孵育 1h，70℃ 10min 终止反应。建立 Pdcd4 全长扩增的反应体系：cDNA 0.5μl，Pdcd4 克隆上游引物 1μl，Pdcd4 克隆下游引物 1μl，高保真 Taq 酶 0.5μl，5×Taq 酶缓冲液 10μl，dNTP 4μl，H_2O 33μl。反应条件 95℃ 10min，30 个循环 95℃ 45s、57℃ 45s、72℃ 1.5min，循环结束，72℃ 延长 10min。生成的 PCR 扩增产物用

于后续酶切实验。

(3)重组质粒的构建与鉴定:①建立酶切 PCR 扩增产物反应体系:Hind Ⅲ 2μl, Xho Ⅰ 2μl, 10×M 缓冲液 3μl, PCR 扩增产物 20μl, H_2O 3μl。建立 pEGFP-C1 质粒载体反应体系:Hind Ⅲ 2μl, Xho Ⅰ 2μl, 10×M 缓冲液 5μl, pEGFP-C1 质粒 30μl, H_2O 11μl。37℃酶切过夜。将双酶切好的目的 DNA 片段和载体电泳鉴定,之后用胶回收试剂盒回收;②建立连接反应体系:DNA 片段 8μl, pEGFP-C1 载体 4μl, T4 DNA 连接酶 1μl, 10×连接缓冲液 2μl, H_2O 5μl, 16℃水浴连接过夜。取 5μl 连接产物加入 200μl DH5α 感受态细胞中,冰上放置 30min。42℃热激 90s,冰上放置 5min。加入 LB 培养基 1ml, 37℃摇床 150r/min 复苏 1h。离心 1min 后,弃掉上清 900μl,剩下的菌液混匀后涂布在含卡那霉素的 LB 固体培养基平板上,菌液吸收后,倒置放入 37℃培养箱中过夜培养。挑选单克隆菌落在 LB 培养液(含卡那霉素)中 37℃过夜扩增。次日经菌液 PCR 检测鉴定插入片段,并按照质粒提取试剂盒的说明步骤提取质粒。将经菌液 PCR 检测鉴定有插入片段的质粒测序送交生物公司测序,后至 NCBI 数据库行 BLAST 比对,确定插入片段无突变,表明克隆构建成功。

(4)细胞转染:转染共分 3 组:空白对照组、pEGFP-C1 组和 pEGFP-C1-Pdcd4 组,每组 3 个复孔。6 孔板中每孔接种 8×10^5 个 NR8383 细胞,加 2ml 10%胎牛血清 F12K 培养基培养,接种 24h 后将培养基换为 2ml 不含胎牛血清的 F12K 培养基。取无菌 EP 管加入脂质体 5μl 和 245μl 无血清培养基,混匀后 37℃孵育 5min。取无菌 EP 管,加入 2μg 质粒 DNA,加入无血清培养基至总体积为 250μl,每种质粒配 3 份,空白对照组只加无血清培养基 250μl,混匀后 37℃孵育 5min。各取一管脂质体与一管质粒混合,使总体积为 500μl,瞬时离心,37℃孵育 20min。将脂质体和质粒的混合物加入 6 孔板对应的孔中。24h 后倒置荧光显微镜下观察绿色荧光的表达以确定转染效率。同样的转染共重复 3 次,将 3 次的结果取平均值为最终结果。

(5)总 RNA 提取、cDNA 反转录与 RT-qPCR:转染 24h 后倒置荧光显微镜下可以观察到明显的绿色荧光表达,收集细胞于 1.5ml EP 管中,1000r/min 离心 10min,离心后取一半沉淀加入 1ml Trizol 并吹打数次。按前述步骤提取总 RNA, -80℃保存备用。测定总 RNA 浓度,电泳鉴定总 RNA 的完整性。按照前述的方法反转录合成 cDNA,产物保存于 -20℃备用。在 mRNA 水平检测细胞中 Pdcd4 在体 RNA 干扰的效率,反应体系:20 倍稀释的 cDNA 4μl、SYBR® Premix Ex TaqTM Ⅱ 4μl、Pdcd4 上游引物 0.5μl、Pdcd4 下游引物 0.5μl、H_2O 1μl,混匀、瞬时离心。反应条件 95℃ 1min, 40 个循环 95℃ 10s,退火温度 30s, 72℃ 30s,熔解曲线 41 个循环,55~95℃ 30s。引物信息见表 1,选 GAPDH 为内参,结果采用 ΔΔCt 法计算相对基因表达量。

(6)Western blot 法检测 Pdcd4 的表达水平:细胞离心后取另一半沉淀加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液,冰上放置 30min, 12000×g 4℃离心 20min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。常规方法制备分离胶、浓缩胶。将蛋白样品与 5×上样缓冲液混合,100℃保温 5min 使蛋白变性,取 50μg 蛋白上样,电泳分离后将蛋白质从凝胶中转移到 NC 膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 1h。Pdcd4(山羊抗大鼠)一抗使用浓度为 1∶200, β-actin 使用浓度为 1∶500, 4℃孵育过夜。1×TBST 洗膜 3 次×15min。Pdcd4(兔抗山羊)二抗使用浓度为 1∶5000, β-actin 使用浓度为 1∶1000, 26℃孵育 1h。1×TBST 洗膜 3 次×15min。ECL 显色,发光。

6.统计学方法:采用 Graphpad prism5 统计学软件对数据进行统计分析,所有计量资料数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组均数间的比较采用 t 检验,多组均数间比较采用 *One-way ANOVA*,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1.肺组织总 RNA 电泳鉴定:提取的肺组织总 RNA 经微量核酸蛋白定量仪和 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。总 RNA 电泳结果显示总 RNA 条带清晰, 28S∶18S 约为(1.5~2.0)∶1.0(图 2)。

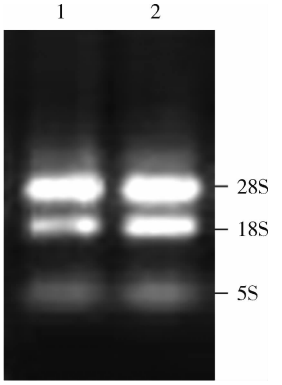


图 2　电泳检测肺组织总 RNA

1.2μl 大鼠肺组织总 RNA 上样;2.3μl 大鼠肺组织总 RNA 上样

2. 重组质粒的构建与鉴定：首先以大鼠肺组织 cDNA 为模板，用特异性引物 PCR 获得 Pdcd4 的 cDNA 全长，与 pEGFP－C1 质粒载体同时双酶切，双酶切后的 Pdcd4 cDNA 片段大小约 1400bp，pEGFP－C1 载体在酶切之前表现为两种条带，酶切之后形成线性化条带，大小均一（图 3A）。

将 pEGFP－C1 载体片段和 Pdcd4 cDNA 连接后转化入大肠杆菌，涂平板过夜培养后见平板长满菌落，随机挑取 10 个单独菌落行过夜培养扩增，次日行菌液 PCR 检测，部分克隆结果见阳性条带（图 3B），片段大小约 1400bp，这些克隆为阳性克隆，取相应质粒送公司测序，测序结果显示未见变异重组质粒构建成功。

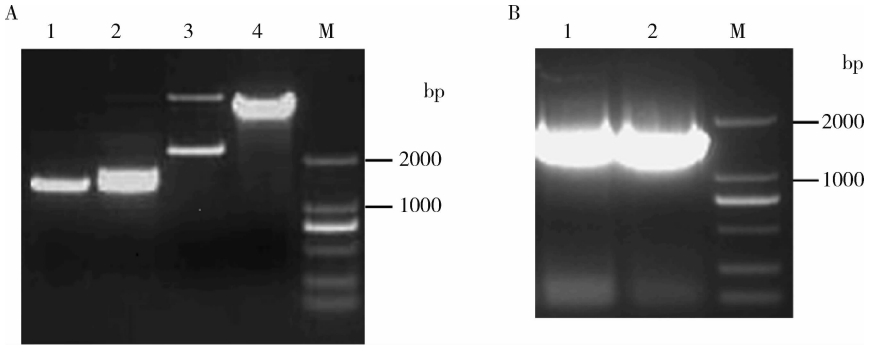


图 3　双酶切与菌液 PCR 电泳结果

A. Pdcd4 全长 cDNA 与 pEGFP－C1 质粒载体的双酶切电泳鉴定：1. Pdcd4 全长 cDNA 双酶切前；2. Pdcd4 全长 cDNA 双酶切后；3. pEGFP－C1 质粒载体双酶切前；4. pEGFP－C1 质粒载体双酶切后；M. DL2000 DNA marker；B. 菌液 PCR 产物电泳鉴定：1、2. 随机排选不同克隆的菌液 PCR 产物；M. DL2000 DNA marker

3. NR8383 细胞转染：将构建好的重组 pEGFP－C1－Pdcd4 质粒和对照空载体质粒 pEGFP－C1 分别转染大鼠巨噬细胞系 NR8383 细胞，24h 后于荧光倒置显微镜下观察转染效率，可以看到细胞中有明显的绿色荧光的表达（图 4），转染成功。

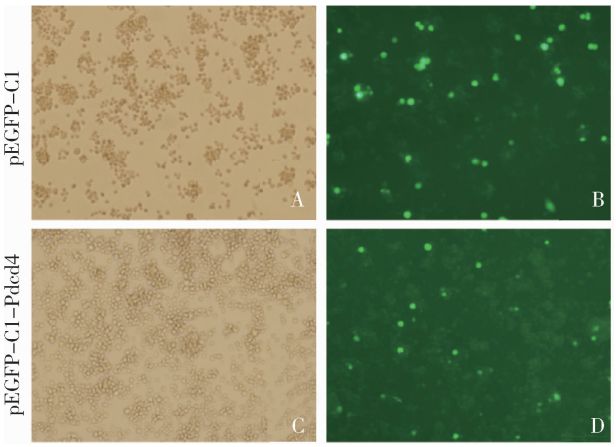


图 4　细胞转染后绿色荧光蛋白的表达（×100）

A、C. 细胞在光镜下的形态；B、D. 细胞在荧光显微镜下的形态及绿色荧光蛋白的表达

4. 检测 Pdcd4 的表达：转染 24h 后显微镜下可见细胞内有明显绿色荧光蛋白的表达，收集细胞，通过 real－time PCR 和 Western blot 法分别检测转染后细胞 Pdcd4 在 mRNA 水平与蛋白质水平的表达变化，在转染 pEGFP－C1－Pdcd4 质粒后，NR8383 细胞 Pdcd4 的表达与对照空载体 pEGFP－C1 组比较明显上调（图 5）。

讨　论

Pdcd4 基因是 1995 年由 Chen 等[3]在小鼠体内发现的与细胞凋亡有关的基因，在细胞发生程序性死亡时被诱导产生。Pdcd4 在不同的种属中有不同的名称，如在小鼠又名 MA－3 蛋白、拓扑异构酶抑制子抑制蛋白，在人类又被称为肿瘤性转化抑制剂、核抗原 H731、197/15a 蛋白，在大鼠被称为死亡上调基因蛋白[4]。

Pdcd4 蛋白质最显著的结构特征是在其 C 端有两个重要的螺旋结构域 MA－3，Pdcd4 MA－3 功能域通过一个保守表面区与真核翻译起始子 eIF4A 的 N 端功能域相互作用、发生结合，从而抑制核糖体复合物的形成和蛋白质的合成，促进细胞凋亡[5]。Waters 等[6]对 Pdcd4 的三维空间结构进行了研究，解析了 Pdcd4 的 C 端 MA－3 结构域的结构，找到了它与 eIF4A 相互作用的特征，并且对比了来自单个功能域和串联的 MA－3 部位的核磁共振谱的特点，发现 Pdcd4 MA－3（C）由三螺旋－转角－螺旋发卡结构组成。

本实验克隆了 E3 大鼠肺组织 Pdcd4 基因，将其

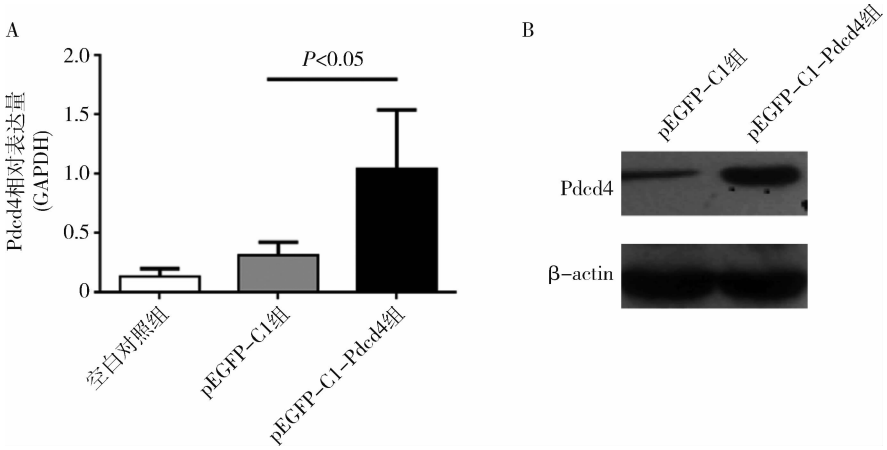


图 5　转染后 NR8383 细胞 Pdcd4 的表达

A. real - time PCR; B. Western blot 法

CDS 序列克隆至 pEGFP - C1 质粒中构建了重组真核载体 pEGFP - C1 - Pdcd4,通过酶切鉴定、基因测序和序列比对,验证了目的基因的正确性。pEGFP - C1 - Pdcd4 成功转染大鼠巨噬细胞系 NR8383 细胞并表达出绿色荧光蛋白,增加 NR8383 细胞中 Pdcd4 基因的表达。

有多种 miRNA 可以影响 Pdcd4 的表达,主要包括 miR - 21、miR - 141、miR - 16、miR - 96、miR - 503 等[7~11]。这些 miRNA 通过对 Pdcd4 表达的调控,最终影响肿瘤细胞的增殖、浸润、转移及对化疗药物的反应等。近年来发现长链非编码 RNA(long non - coding RNAs, LncRNAs)也通过对 Pdcd4 表达的干预参与影响肿瘤的进展。例如,LncRNA CASC15 可以在 Pdcd4 基因的启动子区募集 zeste 基因增强子同源物、增加组蛋白 H3K27 的水平,沉默 Pdcd4 的表达,进而促进黑色素瘤的进展[12]。

综上所述,目前关于 Pdcd4 基因功能的研究主要集中于以上这些促进凋亡、抑制肿瘤的方面,笔者之前的研究发现 Pdcd4 是抗原诱导肺部炎症上调表达的差异表达基因,其差异表达来源于肺泡的巨噬细胞[2]。对于该基因在炎症中的作用文献报道较少,关于其在巨噬细胞中作用的文献更少。本研究成功克隆获得 E3 大鼠 Pdcd4 基因编码序列,即可直接用于后期 Pdcd4 基因的功能探索及上调表达等研究。

参考文献

1 Pisano A, Ceglia S, Palmieri C, *et al*. CRL3IBTK regulates the tumor suppressor pdcd4 through ubiquitylation coupled to proteasomal degradation[J]. J Biol Chem, 2015, 290(22):13958 - 13971

2 Zhong B, Yang X, Sun Q, *et al*. Pdcd4 modulates markers of macrophage alternative activation and airway remodeling in antigen - induced pulmonary inflammation[J]. J Leukoc Biol, 2014, 96(6):1065 - 1075

3 Chen Y, Bian Y, Zhao S, *et al*. Suppression of PDCD4 mediated by the long non - coding RNA HOTAIR inhibits the proliferation and invasion of glioma cells[J]. Oncol Lett, 2016, 12(6):5170 - 5176

4 Vikhreva PN, Shepelev MV, Korobko EV, *et al*. Pdcd4 tumor suppressor: properties, functions, and their application to oncology[J]. Mol Gen Mikrobiol Virusol, 2010, 2:3 - 11

5 Vikhreva PN, Kalinichenko SV, Korobko IV. Programmed cell death 4 mechanism of action: the model to be updated? [J]. Cell Cycle, 2017, 16(19):1761 - 1764

6 Waters LC, Veverka V, Bohm M, *et al*. Structure of the C - terminal MA - 3 domain of the tumour suppressor protein Pdcd4 and characterization of its interaction with eIF4A[J]. Oncogene, 2007, 26(34):4941 - 4950

7 Zhao J, Cao J, Zhou L, *et al*. MiR - 1260b inhibitor enhances the chemosensitivity of colorectal cancer cells to fluorouracil by targeting PDCD4/IGF1[J]. Oncol Lett, 2018, 16(4):5131 - 5139

8 Wang H, Li H, Zhang L, *et al*. Overexpression of MEG3 sensitizes colorectal cancer cells to oxaliplatin through regulation of miR - 141/PDCD4 axis[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106:1607 - 1615

9 Fu X, He Y, Wang X, *et al*. MicroRNA - 16 promotes ovarian granulosa cell proliferation and suppresses apoptosis through targeting PDCD4 in polycystic ovarian syndrome[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(2):670 - 682

10 Ma QQ, Huang JT, Xiong YG, *et al*. MicroRNA - 96 regulates apoptosis by targeting PDCD4 in human glioma cells[J]. Technol Cancer Res Treat, 2016, 16(1):92 - 98

11 Li L, Zhang X, Yi Z, *et al*. MiR - 503 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells by regulating PDCD4[J]. J Buon, 2018, 23(3):579 - 586

12 Yin Y, Zhao B, Li D, *et al*. Long non - coding RNA CASC15 promotes melanoma progression by epigenetically regulating PDCD4[J]. Cell Biosci, 2018, 8:42 - 55

(收稿日期:2018 - 12 - 18)

(修回日期:2019 - 01 - 28)