

# 锌指转录因子snai1高表达质粒构建和稳定株的筛选

周传文, 李倩君

## Construction of zinc finger transcription factor snai1 expressing vector and screening of stably transfected cell clone

Zhou Chuan-wen, Li Qian-jun

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies demonstrated that Snai1 has been shown to negative interact with E-cadherin in tumor tissue and combine with CDH1 promoter region box motif, thus, suppress the CDH1 genetic transcription.

**OBJECTIVE:** To construct snai1 eukaryotic expression vector and to establish a stable transfective cell line.

**METHODS:** Complete exon sequence based on the sequence of snai1 in the GenBank was designed and inserted into the plasmid Pmd-18T, recombining the plasmid Pmd-18T/snai1, which was transformed into *E.coli* DH5 and selected with ampicillin. The positive clones containing the recombinant Plasmid Pmd-18T/snai1 were sequenced and digested by restriction endonucleases *EcoRI* and *XhoI*. The digestion product of *EcoRI* and *XhoI* was purified and inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) to construct pcDNA3.1(+)/Snai1, which was identified by sequencing and transfected into adenocarcinoma of colon HT-29 cells. The HT-29 cells with stable expression of snai1 were selected by G418 and confirmed by RT-PCR and Western blot.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)/snai1 was constructed successfully. HT-29 cells stably expressing snai1 were selected by G418 with 600 mg/L at 21 days. The successful construction of the plasmid of pcDNA3.1(+)/snai1 could significantly up-regulate the expression of snai1 in colon neoplasms cells HT-29.

Zhou CW, Li QJ. Construction of zinc finger transcription factor snai1 expressing vector and screening of stably transfected cell clone. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(41): 7687-7690. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 研究表明 Snai1 和 E-钙黏素在肿瘤组织中有负向表达关系, 且与 Snai1 与 CDH1 启动子区 box 盒结合, 抑制 CDH1 基因转录。

**目的:** 构建针对 snai1 的高表达载体, 建立稳定转染的细胞株。

**方法:** 根据 GenBank 中 snai1 的基因序列人工合成 snai1 全序列, 将合成好的序列装入 Pmd-18T 载体并转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 进行阳性克隆筛选。测序验证重组克隆中基因序列正确后, 用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切 Pmd-18T/snai1 质粒, 将所得的 snai1 全基因片段转入 pcDNA3.1(+)空质粒, 构建 pcDNA(+)/snai1 真核表达质粒, 同时构建阴性对照质粒, 并分别对结肠腺癌细胞 HT-29 进行转染, 最后利用 G418 进行稳定表达株的筛选, 并采用 RT-PCR 和 Western blot 鉴定宿主细胞内 snai1 基因的表达情况。

**结果与结论:** 成功构建了真核表达质粒 pcDNA(+)/snai1, 顺利转染结肠癌细胞 HT-29 后于 600 mg/L G418 浓度时筛选 21 d 得到 snai1 基因稳定表达株, 构建的 snai1 基因正义表达质粒 pcDNA3.1(+)/snai1 转染宿主细胞后可促进 snai1 基因的表达。

**关键词:** 锌指转录因子 snai1; 表达质粒; 感受态细胞; 结肠癌; 转染

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.021

周传文, 李倩君. 锌指转录因子 snai1 高表达质粒构建和稳定株的筛选[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7687-7690. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

上皮向间质转化(epithelial-mesenchymal Transition, EMT)是多细胞生物胚胎发生过程中, 以上皮细胞极性丧失及其间质特性的获得为主要特征的生理过程。

Snai1是锌指蛋白转录因子, 可以介导上皮细胞向间充质细胞的转化, 在转录水平上抑制E-钙黏素的表达, 促进肿瘤细胞的侵袭和复发、转移。

E-钙黏素是属于钙黏素族典型的钙黏素亚

族中的一员, 是一种钙依赖性黏附分子, 广泛存在于各类上皮细胞中。

已有文献报道, Snai1和E-钙黏素在肿瘤组织中有负向表达关系, 且与Snai1与CDH1(E-钙黏素编码基因)启动子区box盒结合, 抑制CDH1基因转录有关<sup>[1]</sup>, 实验拟构建人型Snai1高表达质粒pcDNA3.1(+)/Snai1, 并进行真核表达稳定株的筛选。

## 1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

Department of Gastroenterology, Huaian First Hospital (the First People's Hospital of Huaian), Nanjing Medical University, Huaian 223300, China

Zhou Chuan-wen, Associate chief physician, Department of Gastroenterology, Huaian First Hospital (the First People's Hospital of Huaian), Nanjing Medical University, Huaian 223300, China  
zhou\_cw1967@sina.cn

Received: 2010-07-09  
Accepted: 2010-08-03

南京医科大学附属淮安第一医院(淮安市第一人民医院)消化科, 江苏省淮安市 223300

周传文, 男, 1967年生, 江苏省淮安市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事消化科方面的研究。  
zhou\_cw1967@sina.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2010)41-07687-04

收稿日期: 2010-07-09  
修回日期: 2010-08-03  
(20100709001/YJ·Z)

**时间及地点:** 于2010-02/06在南京医科大学公共卫生学院实验室完成。

**材料:**

**载体及细胞:** 结肠腺癌细胞株HT-29购自中国典型培养物保藏中心<sup>[2-4]</sup>; 克隆载体PMD-18T购自Takara公司<sup>[5-6]</sup>; 真核表达载体pCDNA 3.1(+)<sup>[7-8]</sup>、大肠杆菌DH5 $\alpha$ <sup>[9]</sup>购自Invitrogen公司。

**试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
Premix Taq、胶回收试剂盒、两步法 RT-PCR 试剂盒、引物	大连 Takara 公司
E.Z.N.Aplasmid Miniprep Kit I 质粒提取试剂盒	北京 TIANGEN 公司
DNA 连接酶	英国 New England Biolabs 公司
限制性内切酶 <i>Xho</i> I 和 <i>Apa</i> I , TRIZOL , Lipofectamine <sup>TM</sup> 2000、Opti-MEM <sup>®</sup> 低血清培养基	美国 Invitrogen 公司
BCA 蛋白检测试剂盒	南京 KeyGen 公司
蛋白相对分子质量标记、预染蛋白相对分子质量标记、硝酸纤维素膜、DAB 显色试剂盒	英国 Millipore 公司
兔抗人 <i>Snai1</i> 多克隆抗体, 鼠抗人 E-钙黏素单克隆抗体	美国 Abcom 公司
辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG 抗体	美国 Jackson 公司
AG 22331 紫外分光光度仪	德国 Eppendorf 公司
Applied Biosystems-2720 PCR 扩增仪	美国 A&B 公司
Power-pac 200 PCR 电泳仪	美国 Bio-RAD 公司
GDS-8000 PCR 成像仪	美国 UVP 公司
DYY-8C 型电泳仪	北京六一仪器厂

**方法:**

***Snai1*基因扩增:** 根据GenBank中查得的*Snai1*全基因序列(基因登录号 GenBank : AF155233.1), 并由Invitrogen生物技术公司合成全部外显子编码序列, 在其5'端分别添加EcoRI和XhoI限制性酶切位点<sup>[10]</sup>。

***Snai1*原核表达载体的构建:** 分别采用EcoRI和XhoI进行双酶切和琼脂糖凝胶电泳回收目的条带, 经T<sub>4</sub> DNA连接酶在16 °C条件下将*Snai1*基因插入PMD-18T质粒DNA, 连接产物转化感受态细胞DH5 $\alpha$ , 涂布于含Amp抗性的LB平板上(含50 g/L的氨苄青霉素), 37 °C恒温培养过夜。

从培养皿上挑选5个单克隆菌落接种于3 mL含Amp抗性的LB培养基中, 37 °C, 250 r/min条件下恒温摇床培养过夜。用试剂盒小量提取质粒后, 用EcoRI和Xho I 双酶切质粒, 酶切产物行1.2%琼脂糖凝胶电泳, 鉴定正确的质粒命名PMD-18T/*snai1*。

将含PMD-18T/*snai1*的细菌至于37 °C, 250 r/min

条件下恒温摇床培养过夜, 取0.8 mL菌液加0.2 mL无菌甘油, 至于-80 °C冻存, 取1管冻存菌液送至大连Takara生物技术公司进行基因测序鉴定<sup>[11-13]</sup>。

***Snai1*真核表达质粒的构建:** 选择测序正确含PMD-18T/*snai1*菌液进行培养扩增, 用试剂盒小量提取质粒, 利用紫外分光光度仪检测抽提产物的浓度, 按PMD-18T/*snai1*质粒(150 mg/L) 7  $\mu$ L, Buffer EcoR I 5  $\mu$ L, 100 $\times$ 牛血清白蛋白0.5  $\mu$ L, Eco I 1  $\mu$ L, Xho I 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 35.5  $\mu$ L配成50  $\mu$ L酶切体系, 在37 °C条件下酶切2 h。

对酶切产物进行1.2%琼脂糖凝胶电泳, 切胶、将pCDNA3.1载体按pCDNA3.1载体(180 mg/L)6  $\mu$ L, Buffer EcoR I 5  $\mu$ L, 100 $\times$ 牛血清白蛋白0.5  $\mu$ L, Eco I 1  $\mu$ L, Xho I 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu$ L配成50  $\mu$ L酶切体系, 在37 °C条件下酶切2 h; 对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶、回收6 100 bp左右的大片段线性载体。

将目的基因和pCDNA3.1载体的酶切产物按目的基因(200 mg/L)2  $\mu$ L、酶切pCDNA3.1载体(180 mg/L) 3  $\mu$ L、10 $\times$  Ligase Buffer 1  $\mu$ L、Ligase 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L配成10  $\mu$ L反应体系, DNA连接酶16 °C作用1 h; 将连接产物送至Takara生物技术公司进行基因测序, 分析克隆序列组成及其阅读框架的正确性。将检测正确的链接产物命名为pCDNA3.1/*snai1*, 将其转化感受态细胞DH5 $\alpha$ , 得到含pCDNA3.1/*snai1*融合蛋白表达系统的工程菌。

取10  $\mu$ L工程菌接种于3 mL含Amp抗性的LB培养基中, 37 °C、250 r/min恒温摇床培养过夜, 取0.8 mL菌液(对数生长期), 加0.2 mL无菌甘油, 混匀后至于-80 °C冻存。

按同样方法设计阴性对照组, 命名为pCDNA3.1/mock, 经证实其对细胞基因不产生任何调节作用。

**结肠癌HT-29细胞筛选浓度和维持浓度的确定:** 将结肠癌细胞HT-29按2 $\times$ 10<sup>5</sup>溶于500  $\mu$ L 1640完全培养基(含体积分数10%小牛血清, 100 U/mL青霉素和100 U/L链霉素)接种于24孔板。

将G418按终浓度为0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000 mg/L加于24孔板各空中, 于37 °C, 5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养10 d, 已导致细胞全部死亡的最低浓度为基准, 筛选时比该浓度高一个级别, 维持浓度为筛选浓度的一半。

预实验证实500 mg/L的G418在培养10 d时使细胞全部死亡, 则筛选浓度确定为600 mg/L, 维持浓度为300 mg/L。

**细胞转染及*Snai1*蛋白稳定表达株的筛选:** 按Lipofectamine<sup>TM</sup>2000说明书, 转染前1 d, 将细胞以4 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔接种于24孔板, 每孔加500  $\mu$ L无双抗培养基使

其在转染时融合度达到90%以上。转染当天按粒DNA( $\mu\text{g}$ ): Lipofectamine<sup>TM</sup>2000=1:2~1:3接种于每孔; 本实验中针对24孔板即使用0.8  $\mu\text{g}$  DNA, 2.0  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>TM</sup>2000; 转染后将24孔板置于37  $^{\circ}\text{C}$ , 全积分数5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养6 h, 换完全培养基培养至24 h, 按1:10传代接种于新的24孔板中, 同时加筛选浓度的G418, 培养10 d后, 利用套环法及有限稀释法将存活菌落接种于96孔板获得稳转单克隆, 同时将完全培养基中G418浓度改为维持浓度继续培养<sup>[14]</sup>。

真核表达RT-PCR鉴定: 引物由Takara公司设计并合成:

引物	序列	长度(bp)
人源性 Snai1	forward 5'-TTC TTC TGC GCT ACT GCT GCG-3', reverse 5'-GGG CAG GTA TGG AGA GGA AGA-3'	881
E-钙黏 素	forward 5'-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA-3', reverse 5'-TGA CTC CTG TGT TCC TGT TA-3'	500
GAPDH	forward 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3' reverse 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'	189

RT-PCR在RNA水平上检测Snai1表达情况: 利用TRIZOL一步法提取总RNA<sup>[15-17]</sup>, 紫外分光光度仪测总RNA浓度和纯度。

取1  $\mu\text{L}$ 总RNA利用Invitrogen试剂盒进行反转录、扩增、检测Snai1表达情况。扩增条件: 预变性94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 变性94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 延伸54  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 退火72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30循环; 复性72  $^{\circ}\text{C}$  3 min。

Western-Blot在蛋白水平检测Snai1表达水平: 采用RIPA细胞裂解液提取HT-29细胞总蛋白。利用10% SDS-PAGE凝胶电泳1 h 30 min, 200 mA恒流、1 h 30 min将蛋白转至硝酸纤维膜上, 用含5%脱脂奶粉的TBST封闭硝酸纤维素膜1 h, 兔抗人Snai1多克隆抗体孵育4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST洗脱液洗脱10 min/次, 4次, HRP标记的羊抗兔IgG孵育1 h, TBST洗脱液洗脱10 min $\times$ 4次; DAB显影。

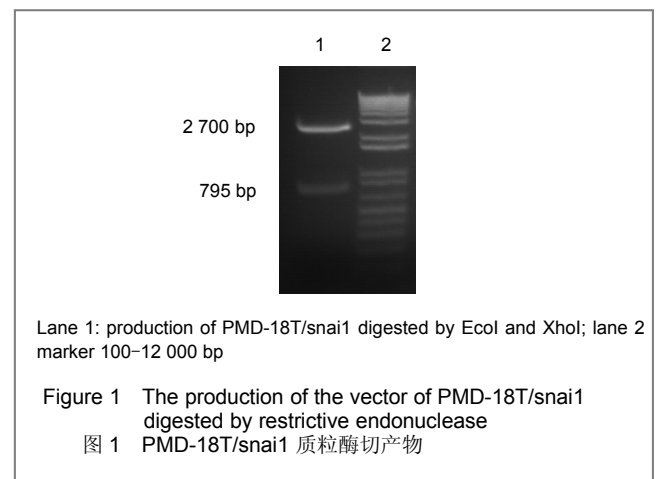
主要观察指标: 构建的Snai1真核表达质粒及HT-29细胞株Snai1蛋白的表达。

设计、实施、评估者: 周传文设计, 李倩君实施, 共同评估。

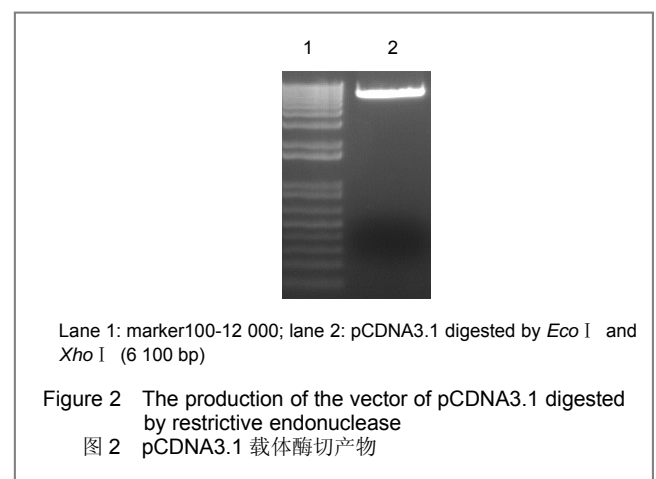
## 2 结果

### 2.1 Snai1真核表达质粒 PMD-18T/snai1质粒的酶

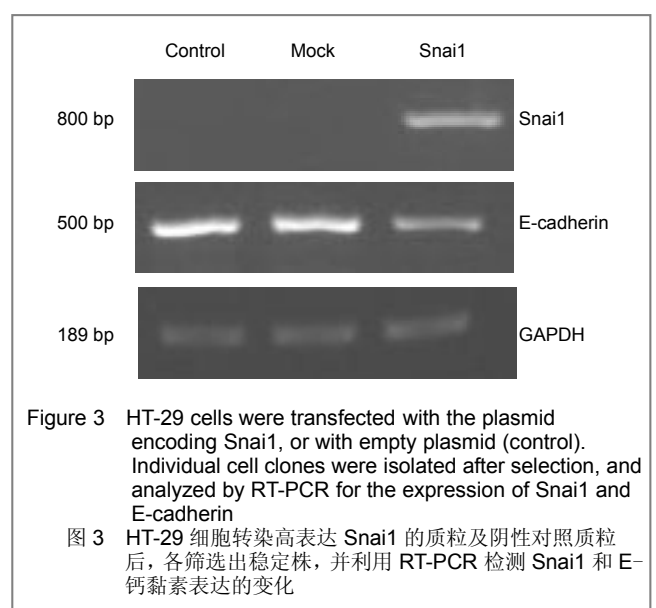
切产物, 见图1。



pCDNA3.1载体酶切产物, 见图2。

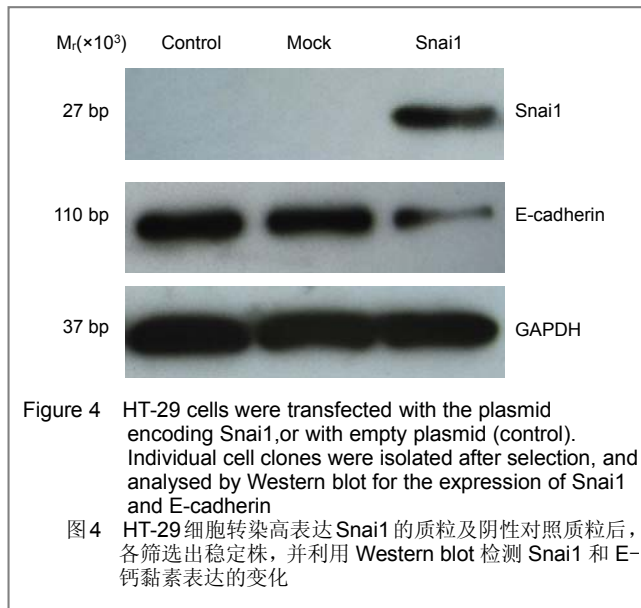


2.2 真核表达RT-PCR鉴定 HT-29细胞株在稳定转染pCDNA3.1/snai1质粒后, Snai1转录水平上升; 稳定转染pCDNA3.1/mock组无明显变化, 见图3。





**2.3 Snai1 蛋白表达** HT-29 细胞株在稳定转染 pCDNA3.1/*snai1* 质粒后, *Snai1* 蛋白表达量上升, E-钙黏素表达明显下降, 稳定转染 pCDNA3.1/mock 组无明显变化, 见图4。



### 3 讨论

E-钙黏素是钙黏素糖蛋白家族中的主要成员, 起细胞骨架作用, 被认为是肿瘤细胞发生局部侵袭、远处转移和血管浸润的抑制因子<sup>[1]</sup>。研究显示, *Snai1* 可以在上皮性肿瘤的进展中直接抑制 E-钙黏素的表达<sup>[18-19]</sup>, 因而促进转移的发生。本次试验表明, 细胞株 HT-29 细胞中存在 E-钙黏素 mRNA 的表达, 为检测到 *Snai1* mRNA 的表达, 在转染 *Snai1* 高表达质粒 pCDNA3.1/*snai1* 后, 可检测到 *Snai1* 表达, 而 E-钙黏素表达下降。说明在 HT-29 细胞中存在 *Snai1* mRNA 与 E-钙黏素 mRNA 负向表达关系。为进一步证实这种负向表达关系的存在及肿瘤细胞中 *Snai1* 的表达对肿瘤细胞间质标志物表达的调节以及肿瘤细胞体外侵袭力的改变的影响, 选择有 E-钙黏素表达, 而无 *Snai1* 表达的结肠癌细胞株 HT-29 稳定转染 *Snai1* 高表达质粒 pCDNA3.1/*snai1* 及阴性对照 pCDNA3.1/mock。结果发现, 随着 *Snai1* mRNA 表达的同时, E-钙黏素表达下降, 在稳定转染细胞株中, E-钙黏素表达显著下降。与 Cano 等<sup>[20]</sup> 的研究首次证明, *Snai1* 可以直接结合 E-钙黏素 CDH1 启动子, 下调 E-钙黏素的表达, 通过降低细胞间的黏附, 破坏正常组织形态, 促进肿瘤侵袭及临床研究表明, *Snai1* 和 E-钙黏素在很多上皮性癌(包括鳞癌、肝癌、黑色素瘤等)中存在

明显的反向表达的结果相符。

综上, 本实验成功构建了 *Snai1* 高表达质粒, 并稳定转染结肠癌细胞株 HT-29, 证实了在结肠癌中 *Snai1* 与 E-钙黏素之间的负向表达关系。

### 4 参考文献

- [1] Olmeda D, Jordá M, Peinado H, et al. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene*. 2007; 26(13):1862-1874.
- [2] Feng YH, Tsao CJ, Wu CL, et al. Sprouty2 protein enhances the response to gefitinib through epidermal growth factor receptor in colon cancer cells. *Cancer Sci*. 2010. [In press]
- [3] Liu Q, Tong Y, Sze SC, et al. Tian Xian Liquid (TXL) induces apoptosis in HT-29 colon cancer cell in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Chin Med*. 2010;5(1):25.
- [4] Doleman JF, Eady JJ, Elliott RM, et al. Identification of the Eph receptor pathway as a novel target for eicosapentaenoic acid (EPA) modification of gene expression in human colon adenocarcinoma cells (HT-29). *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:56.
- [5] Qiao X, Wang LH, Li RS, et al. Shanxi Yike Daxue Xuebao. 2007;38(10):899-901. 乔晔, 王利华, 李荣山, 等. 肾上腺髓质素真核表达质粒的构建及其在大鼠近端肾小管上皮细胞中的表达[J]. 山西医科大学学报, 2007, 38(10):899-901.
- [6] Zhang H, Yang L, Guo J, et al. Development of one novel multiple-target plasmid for duplex quantitative PCR analysis of roundup ready soybean. *J Agric Food Chem*. 2008;56(14): 5514-5520.
- [7] Zhou Y, Luo W, Zheng L, et al. Construction of recombinant FGFR1 containing full-length gene and its potential application. *Plasmid*. 2010;64(1):60-67.
- [8] Jalilian B, Omar AR, Bejo MH, et al. Development of avian influenza virus H5 DNA vaccine and MDP-1 gene of *Mycobacterium bovis* as genetic adjuvant. *Genet Vaccines Ther*. 2010;8:4.
- [9] Nakagami G, Sanada H, Sugama J, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signals in an infected ischemic wound: an experimental study in rats. *Wound Repair Regen*. 2008;16(1):30-36.
- [10] Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*. 2005;103(8):1631-1643.
- [11] Kiyohara YB, Nishii K, Ukai-Tadenuma M, et al. Detection of a circadian enhancer in the mDbp promoter using prokaryotic transposon vector-based strategy. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(4): e23.
- [12] Banerjee S, Kumar J, Apte-Deshpande A, et al. A novel prokaryotic vector for identification and selection of recombinants: direct use of the vector for expression studies in *E. coli*. *Microb Cell Fact*. 2010;9:30.
- [13] Spadiut O, Posch G, Ludwig R, et al. Evaluation of different expression systems for the heterologous expression of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor* in *E. coli*. *Microb Cell Fact*. 2010;9:14.
- [14] Jin DY, Li MF. Beijing: Science Press, 1995:891. 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1995: 891.
- [15] Hoffmann G, Ijzer J, Brinkhof B, et al. Comparison of different methods to obtain and store liver biopsies for molecular and histological research. *Comp Hepatol*. 2009;8:3.
- [16] Pinto FL, Thapper A, Sontheim W, et al. Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Mol Biol*. 2009;10:79.
- [17] Glenn ST, Head KL, Teh BT, et al. Maximizing RNA yield from archival renal tumors and optimizing gene expression analysis. *J Biomol Screen*. 2010;15(1):80-85.
- [18] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):415-428.
- [19] Hou Z, Peng H, White DE, et al. 14-3-3 binding sites in the snail protein are essential for snail-mediated transcriptional repression and epithelial-mesenchymal differentiation. *Cancer Res*. 2010; 70(11): 4385-4393.
- [20] Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):76-83.