

## 草鱼 *TGF-β1*、*Smad4* 基因的克隆及真核过表达和 RNA 干扰表达载体的构建

张好放<sup>1,2</sup> 郁二蒙<sup>1</sup> 王广军<sup>1</sup> 余德光<sup>1</sup> 李志斐<sup>1</sup> 谢骏<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要** 为研究 *TGF-β1*/*Smad4* 信号通路在草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肌肉发育过程中的作用机制, 首先克隆了草鱼 *TGF-β1*、*Smad4* 基因开放阅读框 (ORF, Open reading frame) 序列各 1 134 和 1 644 bp。其次, 在 *TGF-β1*、*Smad4* 序列两端分别加上相应的酶切位点, 同时对 pcDNA3.1(+) 真核表达载体进行双酶切, 将带酶切位点的片段正向插入到真核表达载体 pcDNA3.1(+) 中, 构建 *TGF-β1*、*Smad4* 基因的真核过表达载体 pcDNA3.1(+)-*TGF-β1*、pcDNA3.1(+)-*Smad4*。另一方面, 根据 *TGF-β1*、*Smad4* 基因序列全长分别设计 3 对长度为 48 bp 的 shRNA, 然后将构建好的 shRNA 插入到载体 pRNA-U6.1/Neo 中, 即可成功构建 *TGF-β1*、*Smad4* 基因的 RNA 干扰表达载体 pRNA-U6.1/Neo-*TGF-β1* 和 pRNA-U6.1/Neo-*Smad4*。

**关键词** 草鱼; 克隆; 真核表达载体; RNA 干扰

中图分类号 S965.112; Q785

文章编号 1007-4333(2017)04-0120-09

文献标志码 A

## Cloning of *TGF-β1*, *Smad4* and construction of eukaryon and RNAi expression vector from *Ctenopharyngodon idellus*

ZHANG Haofang<sup>1,2</sup>, YU Ermeng<sup>1</sup>, WANG Gangjun<sup>1</sup>, YU Deguang<sup>1</sup>, LI Zhifei<sup>1</sup>, XIE Jun<sup>1\*</sup>

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** In order to study the regulation of *TGF-β1*/*Smad4* signaling pathways in regulating the growth of muscle in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), the ORF (open reading frame) sequences of *TGF-β1*, *Smad4* gene were cloned. The results demonstrated that full-length ORF of *TGF-β1* was 1 134 bp and the full-length ORF of *Smad4* was 1 644 bp. On one hand, Specific restriction sites were added to the both ends of ORF sequence and then the ORF sequences with enzyme sites were inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) which was double digested by restriction enzyme. Two eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)-*TGF-β1*, pcDNA3.1(+)-*Smad4* were constructed. On the other hand, according to *TGF-β1*, *Smad4* gene sequence, three pairs siRNA sequences which were consisted of 48 bp have been designed. Then the completed shRNA was inserted into the carrier pRNA-U6.1/Neo. RNA interference expression vectors pRNA-U6.1/Neo-*TGF-β1* and pRNA-U6.1/Neo-*Smad4* were successfully constructed.

**Keywords** *Ctenopharyngodon idellus*; clone; eukaryotic expression vector; RNA interference

*TGF-β* (Transforming growth factor beta) 是从人血小板当中成功提取的一类对细胞有刺激或抑制作用的多肽信号分子, 该类信号分子在发挥作用时

需经过膜受体的介导将信号传入细胞<sup>[1]</sup>, 再经过下游的调控蛋白 Smads 蛋白家族将信号传到细胞核内, 从而调节各种基因的表达<sup>[2]</sup>。*TGF-β*/smads 信

收稿日期: 2016-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31402312); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-17)

第一作者: 张好放, 硕士研究生, E-mail: zhanghaofang2009@163.com

通讯作者: 谢骏, 研究员, 主要从事健康养殖模式研究, E-mail: xiejunhy@hotmail.com

号通路作用于多种生物的各种组织,可参与细胞增殖分化<sup>[3-4]</sup>、基质的形成<sup>[5-6]</sup>、间质纤维化<sup>[7-8]</sup>等多种生物学事件。Mcpheeron 等<sup>[9]</sup>发现一种属 TGF-β 超家族的信号因子 GDF-8,基因敲除结果显示,GDF-8 基因缺陷型小鼠骨骼肌细胞大量增殖,说明 GDF-8 信号因子可参与调控骨骼肌细胞的增殖分化、机体的生长发育。最近有学者以小鼠为试验材料<sup>[10]</sup>,采用 Western blot 和免疫印迹方法研究发现,TGFβ1 和 TGFβ2 的过表达致使肌肉组织胶原蛋白表达量增高,同时指出细胞中存在一种转录抑制因子 Sharp-1 可阻碍 Smad3 转录,使 TGF-β1/smud4 信号途径功能受到抑制,可有效调控肌肉细胞增殖,使肌肉正常发育。在鱼类研究中,也有学者发现 TGF-β1/smud4 通路可能参与调控肌肉发育<sup>[11]</sup>,Funkenstein 等<sup>[11]</sup>学者研究 TGF-β/smads 通路在金头海鲷肌肉中作用机制时,发现一种新的信号因子 TGF-β6,且肌肉中 TGF-β6 基因表达量高于其他组织。这一结果表明 TGF-β/smads 信号通路可能调控鱼类肌肉发育,但其具体作用机制仍不清楚。

目前,研究 TGF-β1/smads 信号通路的主要技术有反义寡核苷酸技术<sup>[12]</sup>、RNA 干扰技术<sup>[13]</sup>等。反义寡核苷酸技术的出现大大加快了基因功能研究的进程,是近几年有关基因功能和细胞信号途径研究应用较为广泛的技术手段;但对于寡核苷酸片段不稳定在细胞内易被降解以及沉默效率低等问题仍需要进一步完善<sup>[14]</sup>。随后出现的 RNA 干扰技术(RNAi)则是在反义寡核苷酸技术基础上发展起来的一种由双链 RNA 介导的序列特异性基因沉默技术,该技术核心部分在于 siRNA 片段识别并结合核酶复合物形成 RNA 诱导沉默复合物(RISC),RISC 通过碱基互补定位到同源 mRNA 转录本上,后在核酶作用下将 mRNA 降解,从而阻断目的基因转录和翻译过程<sup>[15]</sup>;另一方面,结合到 mRNA 上的单链 siRNA 亦可作为引物在 RNA 聚合酶(RDRP)作用下产生更多的 siRNA 片段,使干扰作用持续不断的进行<sup>[16]</sup>;因此相比于反义寡核苷酸技术 RNA 干扰技术要更稳定、沉默效率更高,现已成为研究细胞内信号通路的良好工具<sup>[17]</sup>。Wu 等<sup>[18]</sup>在澳洲肺鱼的脑细胞系中应用 RNAi 技术研究了澳洲肺鱼 Mx 蛋白抵抗神经坏死病毒的作用机制。中国科学院水生生物研究所朱作言团队<sup>[19]</sup>利用在体内或体外合成的 siRNA 有效地引发斑马鱼体内靶基因的沉默并

表现出特异的表型缺陷。

草鱼属于鲤形目鲤科草鱼属,是世界上养殖产量最大的淡水鱼品种,仅仅中国的年产量就有 400 余万 t,不仅给发展中或欠发达区域提供了廉价蛋白质,而且也为世界优质动物蛋白质供应做出了巨大贡献<sup>[20]</sup>。目前针对草鱼肌肉发育机制和品质改良的研究报道较少,为研究 TGF-β/smads 信号通路对草鱼肌肉发育的作用机制,本试验选择该通路关键信号因子 TGF-β1、处于调控下游中枢地位的 *Smad4* 基因进行研究。首先,拟克隆草鱼 *TGF-β1*、*Smad4* 基因序列;其次,根据 *TGF-β1*、*Smad4* 基因序列,选择 pcDNA3.1(+)作为真核表达载体,分别构建真核过表达载体 pcDNA3.1(+)-*TGF-β1*、pcDNA3.1(+)-*Smad4*。最后,根据 *TGF-β1*、*Smad4* 基因序列分别设计 3 对长度为 48 bp 的 shRNA,将构建好的 shRNA 插入到载体 pRNA-U6.1/Neo 中,分别构建 RNA 干扰表达载体 pRNA-U6.1/Neo-*TGF-β1* 和 pRNA-U6.1/Neo-*Smad4*。本研究获得的草鱼 *TGF-β1*、*Smad4* 基因序列及其真核过表达载体和 RNA 干扰表达载体,旨在为下一步 TGF-β1/smud4 信号通路在草鱼肌肉发育中作用机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验用鱼

2015 年 8 月,在珠江水产研究所养殖基地取 4 尾体质健康的草鱼,体重为(1.00±0.10) kg,带回实验室解剖,取背部肌肉组织,将其至于-80℃冰箱中冻存备用。

#### 1.1.2 主要试剂

通用型总 RNA 抽提试剂盒、Gel Extraction Kit、Plasmid Mini Kit(广州美基生物公司);PrimeScript™ RT-PCR Kit、pMD19-T 载体、*E. coli* DH5α Competent Cells、DL2000 Marker、DL5000 Marker、LA Taq DNA 聚合酶、*EcoR* I、*Xho* I 和 T4 DNAligase(大连 TAKARA 生物公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 RNA 提取及 cDNA 的合成

草鱼肌肉组织总 RNA 提取方法参照 TAKARA 公司总 RNA 提取试剂盒说明书进行,琼脂糖凝胶电泳检测纯度,利用分光光度计测其总浓

度。cDNA 的合成也参照 TAKARA 公司 PrimeScript TMRT-PCR Kit 说明书进行;在 Rase Freed 的 PCR 管中配制预备混合液(总体积 10  $\mu$ L):Oligo dT primer(50 mmol/L) 1  $\mu$ L;dNTP Mi-xture(10 mmol/L) 1  $\mu$ L;RNA 2  $\mu$ L;RNase Free ddH<sub>2</sub>O 补至 10  $\mu$ L;65  $^{\circ}$ C,变性 5 min,冰上急冷;反转录反应体系:预备混合液 10  $\mu$ L;5  $\times$  primerscript buffer 4  $\mu$ L;RNase inhibitor(40 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L;Primerscript RTase(200 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L;RNase Free dH<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ L。扩增条件为:30  $^{\circ}$ C 10 min;42  $^{\circ}$ C 30 min;70  $^{\circ}$ C 15 min;4  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.2.2 带酶切位点的 *TGF- $\beta$ 1* 基因 ORF 片段的获得

*TGF- $\beta$ 1* 基因 GenBank 登录号为 EU099588.1,根据基因序列设计引物 P1(5'-3' ATGAGGGCAG AGAGTCTATTTTC)、P2(5'-3' CAGGAACAC-TTTGCAGTTCTTC),以反转录合成的 cDNA 为模板,PCR 扩增获得 *TGF- $\beta$ 1* 基因 ORF 片段,然后以 *TGF- $\beta$ 1* 基因 ORF 片段为模板,设计带酶切位点的引物 P1'(5'-3' **CC** AAGCTTATGAGGGCAG-AGAGTCTA TTT-C)、P2'(5'-3' **CC** CTCGAG TCAGGAA CACTTG CAGTTCTTC)(加粗的为保护碱基,带下划线为酶切位点),送上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 扩增获得两端分别带有 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点的目的片段。PCR 扩增条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,60  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,72  $^{\circ}$ C 总延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。其后,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并参照 OMEGA 胶回收试剂盒纯化回收目的片段。

将纯化后的带酶切位点的目的片段连接到 pMD19-T 载体上,连接体系:pMD19-T Vector 1  $\mu$ L,回收目的片段 4  $\mu$ L,Ligation Mix 5  $\mu$ L,总量 10  $\mu$ L。反应条件:16  $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,取 80  $\mu$ L 进行平板涂布,16 h 后挑单菌落;经菌落 PCR 阳性筛选后,送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

### 1.2.3 带酶切位点的 *Smad4* 基因 ORF 片段的获得

*Smad4* 基因 GenBank 登录号为 HQ596213.1,根据基因序列设计引物 P3(5'-3' ATGTCTATCA CAAACACGCCAC)、P4(5'-3' TCAGTCTAA

CGGCGTGGGGTC),以反转录合成的 cDNA 为模板,PCR 扩增获得 *Smad4* 基因 ORF 片段,然后以 *Smad4* 基因 ORF 片段为模板,根据目的基因和 T 载体序列设计带酶切位点的引物 P3(CGGAATTC-ATGTCTATCAAAACACGCCAC)、P4(CCTCGAG-TCAGTCTAACGGCGTGGG-GTC)(加粗的为保护碱基,带下划线为酶切位点),送上海生工生物工程股份有限公司合成。然后以反转录合成的 cDNA 为模板,PCR 扩增获得两端分别带有 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点的目的片段。PCR 扩增条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,63  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,72  $^{\circ}$ C 总延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并参照 OMEGA 胶回收试剂盒纯化回收目的片段。

将纯化后的带酶切位点的目的片段连接到 pMD19-T 载体上,连接体系:pMD19-T Vector 1  $\mu$ L,回收目的片段 4  $\mu$ L,Ligation Mix 5  $\mu$ L,总量 10  $\mu$ L。反应条件:16  $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,取 80  $\mu$ L 进行平板涂布,16 h 后挑单菌落;经菌落 PCR 阳性筛选后,送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

## 1.3 *TGF- $\beta$ 1*、*Smad4* 基因真核过表达载体的构建

### 1.3.1 *TGF- $\beta$ 1* 基因 ORF 片段正向插入表达载体

将测序符合要求的菌液提取质粒并进行双酶切,双酶切体系:*Hind* III 1  $\mu$ L,*Xho* I 1  $\mu$ L,10 $\times$ M buffer 2  $\mu$ L,10 $\times$ buffer 2  $\mu$ L,质粒 2  $\mu$ g,加无菌水补至 20  $\mu$ L。反应条件:37  $^{\circ}$ C,4 h。将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,利用 OMEGA 胶回收试剂盒纯化回收目的片段。以同样条件对 pcDNA3.1(+) 载体进行双酶切并纯化回收备用。然后,如图 1 所示,将 *TGF- $\beta$ 1* ORF 片段正向插入到 pcDNA3.1(+) 载体中,连接 pcDNA3.1(+) 载体和目的片段,连接体系:10 $\times$ T4 DNA Ligase buffer 4  $\mu$ L,回收目的片段 4  $\mu$ L,pcDNA3.1(+) 酶切片段 1  $\mu$ L,T4 DNA Ligase 1  $\mu$ L。反应条件:16  $^{\circ}$ C 连接过夜。

### 1.3.2 *Smad4* 基因正向插入表达载体

如图 2 所示,以同样的条件,利用 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶对 *Smad4* 基因片段和 pcDNA3.1(+) 载体进行双酶切、连接后送至海生工生物工程股份有限公司测序。

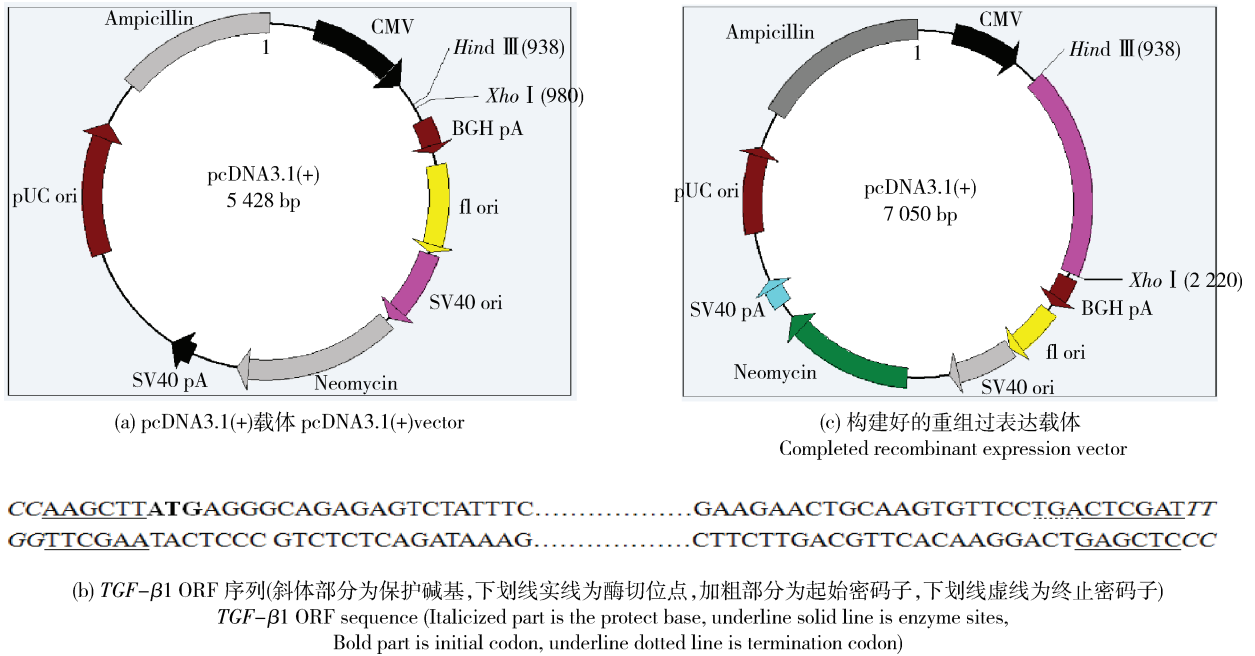


图 1 *TGF-β1* 基因的过表达载体构建

Fig. 1 Construction of overexpression vector of *TGF-β1* gene

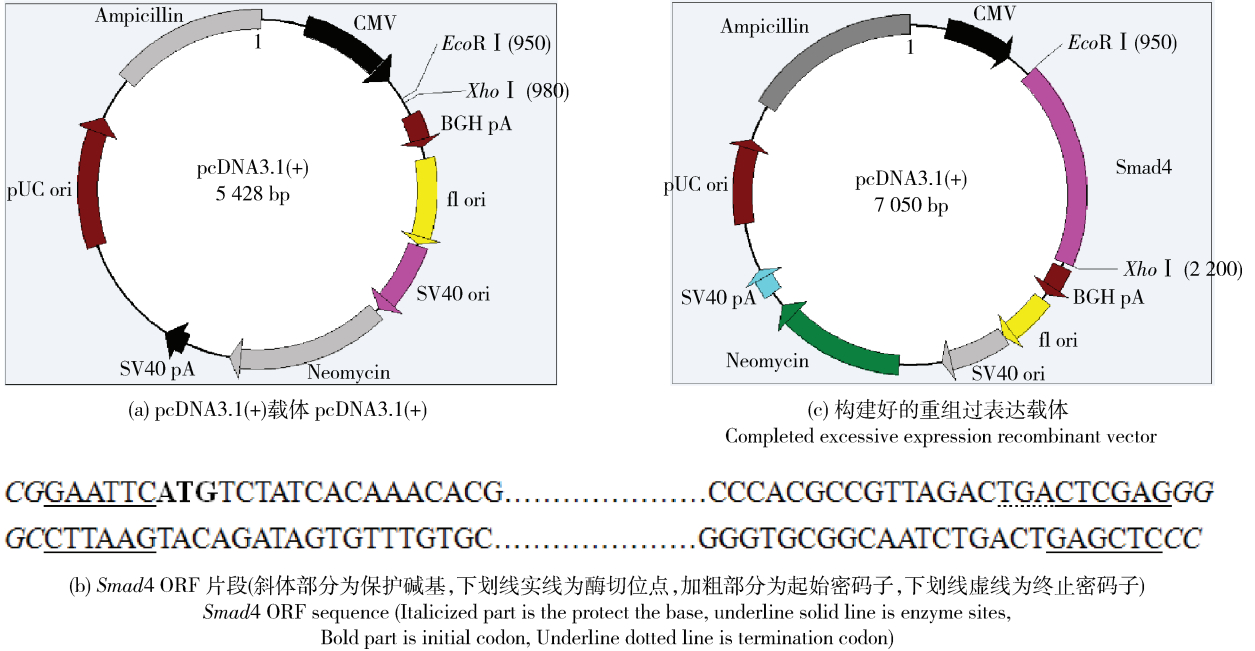


图 2 *Smad4* 基因的过表达载体构建

Fig. 2 Construction of overexpression vector of *Smad4* gene

### 1.4 *TGF-β1*、*Smad4* 基因 RNA 干扰表达载体的构建

#### 1.4.1 shRNA 的合成

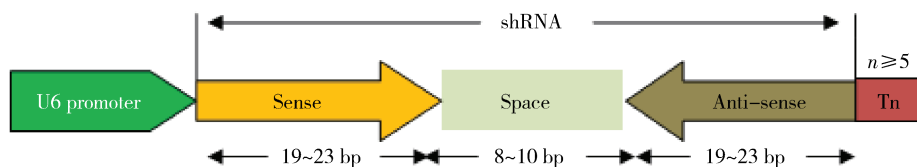
1)shRNA 靶序列的设计。图 3(a)所示,为设

计好的目的序列结构模式图;①从 *TGF-β1*、*Smad4* 基因 ORF 序列起始密码子 AUG 开始搜寻下游 19 个碱基长度且 GC 含量约在 50%左右的正反义互补序列 3 对;②将每一对正反义序列展开,在中间插

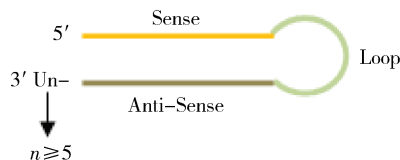
入 10 个碱基的 Loop 片段;③为确保转录能够终止,在每一条序列的 3'端加上 6 个连续的 T 碱基外加 2 个胸腺嘧啶,补加胸腺嘧啶是使人工合成的干扰片段尽量接近于自然形成的 siRNA,更有利于启动双链 RNA 的沉默效应;④在每对序列两端加上相应的酶切位点,根据干扰载体图谱,本试验选取的酶切位点为 *Bam*H I 和 *Hind* III,这样转录形成的整条 RNA 即为 shRNA;最后,将设计好的 3 对序列送广州市锐博生物科技有限公司采用化学方法进行碱基合成。

2) 双链 shRNA 的制备。将合成好的基因片段稀释为  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,取相应的正义和反义链各  $5 \mu\text{L}$ ,退

火形成双链,反应体系: $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  正义寡核苷酸链  $5 \mu\text{L}$ ,  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  反义寡核苷酸链  $5 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $15 \mu\text{L}$ ,总量为  $25 \mu\text{L}$ ,反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ min}$ ;  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $30 \text{ s}$  后降到  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 。如图 3(b)所示,为 shRNA 茎环样双链结构;shRNA 发挥效应时会在细胞内 Dicer 酶作用下经剪接形成只包含 19 个碱基长度的双链小 RNA 即 dsRNA,dsRNA 在解旋酶作用下解开双链同时与胞内核酶复合物相结合,进而形成 RNA 沉默诱导复合物 RISC<sup>[21]</sup>,激活的 RISC 可根据碱基互补配对原则结合到同源的 mRNA 转录本上,最后在核酸酶作用下将 mRNA 彻底降解,从而实现目的基因的精确沉默<sup>[22]</sup>。



(a) 由正反互补序列构成的 shRNA 片段 shRNA fragments which is composed of sense and antisense sequence



(b) 由 shRNA 片段形成的发夹结构 Hairpin structure formed by shRNA fragments

图 3 shRNA 结构模式图

Fig. 3 Structure diagram of shRNA

#### 1.4.2 *TGF- $\beta$ 1* 基因 shRNA 片段插入干扰表达载体

如图 4 所示,将 pRNA-U6.1/Neo 干扰载体进行双酶切,双酶切体系:*Hind* III ( $10 \text{ U}/\mu\text{L}$ )  $1 \mu\text{L}$ , *Bam*H I ( $10 \text{ U}/\mu\text{L}$ )  $1 \mu\text{L}$ ,  $10 \times$  buffer  $4 \mu\text{L}$ ,质粒(约  $2 \mu\text{g}$ )  $20 \mu\text{L}$ ,加无菌水补至  $40 \mu\text{L}$ 。反应条件: $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $4 \text{ h}$ 。将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,利用 OMEGA 胶回收试剂盒纯化回收酶切产物。将合成好的 shRNA 连接到 pRNA-U6.1/Neo 干扰表达载体中,反应体系:pRNA-U6.1/Neo  $1 \mu\text{L}$ ,寡核苷酸双链  $4 \mu\text{L}$ ,Solution I 连接液  $5 \mu\text{L}$ ,总量  $10 \mu\text{L}$ ,反应条件: $16 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1 \text{ h}$ 。

#### 1.4.3 *Smad4* 基因 shRNA 片段插入干扰表达载体

如图 5 所示,以同样条件将 pRNA-U6.1/Neo 干扰载体进行双酶切,双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,利用 OMEGA 胶回收试剂盒纯化回收酶

切产物。将合成好的 shRNA 片段连接到 pRNA-U6.1/Neo 中。

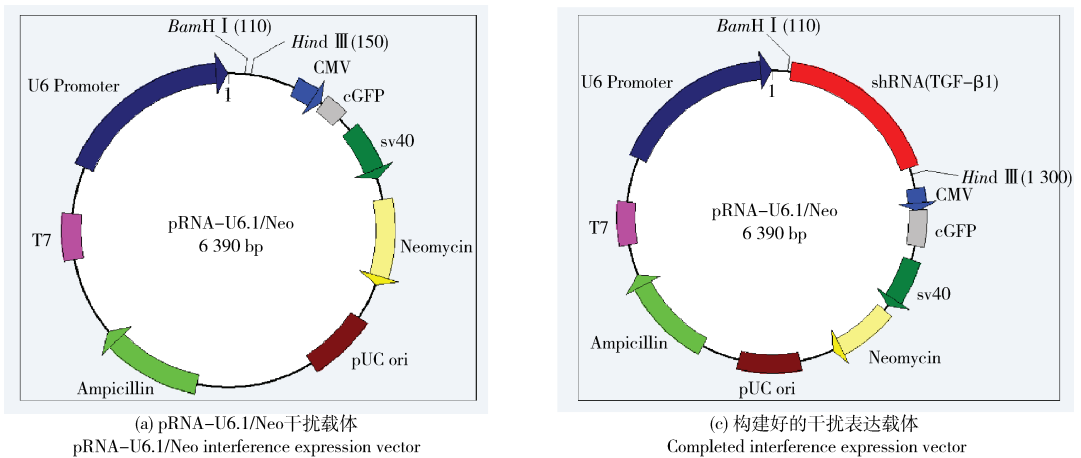
#### 1.5 重组载体的鉴定与保存

将构建好重组载体转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,取  $80 \mu\text{L}$  进行平板涂布,16 h 后挑单菌落;经菌落 PCR 阳性筛选后,送至上海生工生物工程股份有限公司测序。将测序符合要求的菌液取少量于冻存管内,按 1:1 的比例加入甘油与水的混合物(高温灭菌),放入  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱封存。

## 2 结果与分析

### 2.1 *TGF- $\beta$ 1*、*Smad4* 基因 ORF 扩增结果

以反转录的 cDNA 为模板,PCR 扩增 *TGF- $\beta$ 1*、*Smad4* 基因 ORF 片段,目的片段的长度分别为  $1\ 134$ 、 $1\ 644 \text{ bp}$ ,如图 6 所示,在  $1.1$  和  $1.6 \text{ kb}$  处可见目的条带。

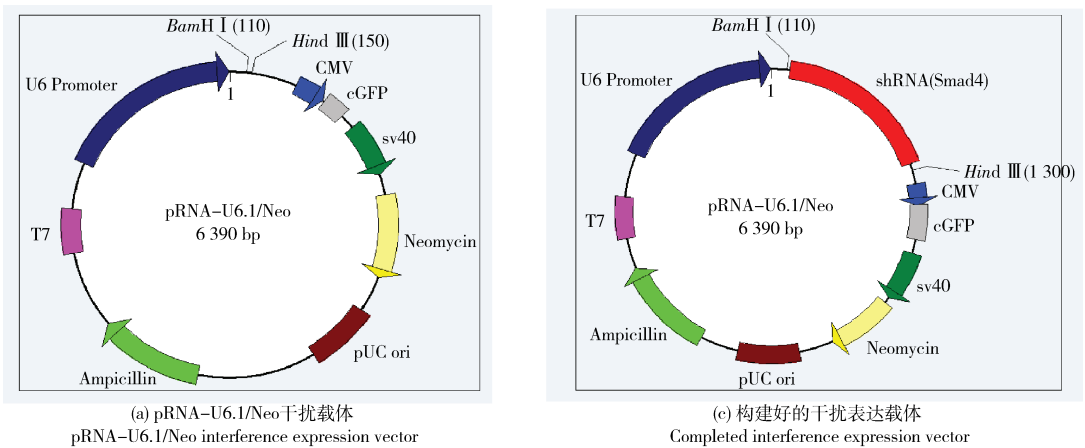


**F1: GATCCCGCAAGCTACGACTGCCTAATIGATATCCGTTAGGCAGTCGTAGCTTGCTTTTTTCCAAA**  
**R1: AGCTTTTGGAAAAAAGCAAGCTACGACTGCCTAACGGATATCAAATTAGGCAGTCGTAGCTTGCGG**  
**F2: GATCCCGCATGCACATATGGTTCAATIGATATCCGTTGAACCATATGTGCATGCTTTTTTCCAAA**  
**R2: AGCTTTTGGAAAAAAGCATGCACATATGGTTCAACGGATATCAAATTGAACCATATGTGCATGCGG**  
**F3: GATCCCGCAGGTTTAGCTGTATCATTTGATATCCGATGATACAGCTAAAACCTGCTTTTTTCCAAA**  
**R3: AGCTTTTGGAAAAAAGCAGGTTTAGCTGTATCATCCGGATATCAAATGATACAGCTAAAACCTGCGG**

(b) *TGF-β1* 基因设计合成的干扰目的片段 (加粗部分为正反义互补序列, 下划线实线为loop序列, 绿色部分为 *BamH I* 酶切位点, 红色部分为 *Hind III* 酶切位点)  
 Interference fragments which is designed by *TGF-β1* gene (Bold part is sense and antisense complementary sequence, underline solid line is Loop sequence, the green part is *BamH I* enzyme site, the red part is *Hind III* enzyme site)

图 4 *TGF-β1* 基因 RNAi 表达载体的构建

Fig. 4 Construction of *TGF-β1* RNAi expression vector

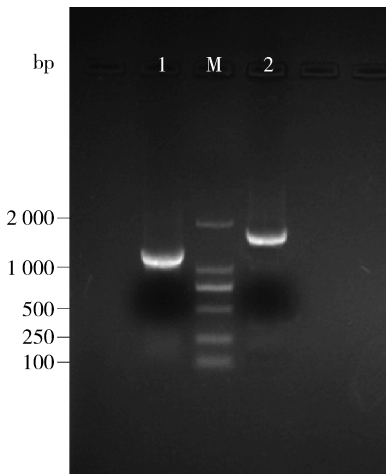


**F1' : GATCCCGCCAGCAAATGTGTGACCATTIGATATCCGATGGTCACACATTTGCTGGTTTTTCCAAA**  
**R1' : AGCTTTTGGAAAAAACCAGCAAATGTGTGACCATCCGGATATCAAATGGTCACACATTTGCTGGCGG**  
**F2' : GATCCCGCCATCAGAACGGCCATCTTTIGATATCCGAAGATGGCCGTTCTGATGGTTTTTCCAAA**  
**R2' : AGCTTTTGGAAAAAACCATCAGAACGGCCATCTTCCGGATATCAAAGATGGCCGTTCTGATGGCGG**  
**F3' : GATCCCGCATTTACGCCACCGATATTTGATATCCGATATCCGTTGGCTGAAAATGCTTTTTTCCAAA**  
**R3' : AGCTTTTGGAAAAAAGCATTTCAGCCACCGATATCCGGATATCAAATATCCGTTGGCTGAAAATGCGG**

(b) *Smad4* 基因设计合成的干扰目的片段 (加粗部分为正反义互补序列, 下划线实线为loop序列, 绿色部分为 *BamH I* 酶切位点, 红色部分为 *Hind III* 酶切位点)  
 Interference fragments which is designed by *Smad4* gene (Bold part is sense and antisense complementary sequence, underline solid line is Loop sequence, the green part is *BamH I* enzyme site, the red part is *Hind III* enzyme site)

图 5 *Smad4* 基因干扰表达载体

Fig. 5 RNAi expression vector of *Smad4* gene



1. 以 cDNA 为模板扩增的 *TGF-β1* 基因 ORF 片段; M. DNA marker DL2000; 2. 以 cDNA 为模板扩增的 *Smad4* 基因 ORF 片段。

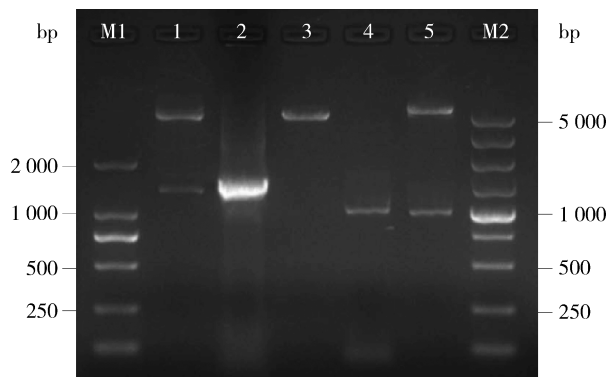
1. *TGF-β1* gene ORF sequence which was cloned from cDNA sequence; M. DNA marker DL2000; 2. *Smad4* gene ORF sequence which was cloned from cDNA sequence.

图 6 *TGF-β1*、*Smad4* 基因 ORF 片段 PCR 结果检测

Fig. 6 PCR detection of *TGF-β1* and *Smad4* gene ORF segment

## 2.2 重组载体双酶切

pMD19-T 空载的总长度为 2 692 bp, pcDNA3.1 (+) 空载的总长度为 5 428 bp, *TGF-β1* ORF 片段和 *Smad4* ORF 片段的长度分别为 1 134 和 1 644 bp。如图 7 所示,对含有 *TGF-β1*、*Smad4* 基因 ORF 片



M1. DNA marker DL2000; 1. pcDNA3.1(+)-*Smad4* 重组载体双酶切; 2. *Smad4* 基因 ORF 片段; 3. pcDNA3.1(+) 双酶切; 4. *TGF-β1* 基因 ORF 片段; 5. pcDNA3.1(+)-*TGF-β1* 重组载体双酶切; M2. DNA marker DL5000。

M1. DNA marker DL2000; 1. Recombination vector pcDNA3.1(+)-*Smad4* was double digested by restriction enzyme; 2. *Smad4* gene ORF sequence; 3. pcDNA3.1(+) vector double digestion; 4. *TGF-β1* gene ORF sequence; 5. Recombination vector pcDNA3.1(+)-*TGF-β1* was double digested by restriction enzyme; M2. DNA marker DL5000.

图 7 *TGF-β1*、*Smad4* 重组载体双酶切鉴定

Fig. 7 Double enzyme identification of *TGF-β1* and *Smad4* recombination vector

段的重组载体 pMD19-T 进行双酶切,分别在 1 和 2 kb 的位置可见目的条带,另对 pcDNA3.1(+)-空载进行双酶切,由双螺旋结构变为线性结构,电泳速度变慢。

## 3 讨论

草鱼是目前我国养殖产量最大的淡水鱼品种,不仅为国内淡水渔业发展做出巨大贡献,而且其蛋白含量高、价格低,深受国内外消费者欢迎,也给养殖户带来了巨大的经济效益<sup>[23]</sup>;所以研究草鱼肌肉发育调控机制对我国水产养殖业的发展有重要的参考和借鉴意义。事实上,在哺乳动物中已有许多研究证实 *TGF-β*/*Smads* 信号通路与肌肉生长发育和组织分化密切相关<sup>[24]</sup>,且 *TGF-β1* 信号因子发挥作用主要依赖信号途径下游的 *Smad* 蛋白家族<sup>[25]</sup>,其中 *Smad4* 蛋白是信号途径的中心转导分子,可与其他因子结合形成寡聚体,进入细胞核调控靶基因的转录<sup>[26]</sup>。目前,*Smad4* 蛋白在鱼类中的研究工作已开展,本团队成员前期已克隆分离了草鱼 *Smad4* 基因并对其结构做了生物信息学分析<sup>[27]</sup>。另外,在鲤鱼体内也发现了 *Smad4* 基因有不同的组织表达模型,暗示着可通过改变 *Smad4* 基因组织表达水平来对 *TGF-β1*/*Smad4* 信号途径进行调控<sup>[28]</sup>。而在本团队前期的研究工作中,采用反义寡核苷酸技术也已经发现 *TGF-β1*/*smad4* 信号途径极可能是与草鱼肌肉发育相关的一个重要通路,但其具体作用机制还不清楚<sup>[29]</sup>。为此,本研究在前期工作的基础上,克隆分离了草鱼肌肉中关键的信号因子 *TGF-β1* 和 *Smad4* 基因,期望为下一步研究 *TGF-β1*/*Smad4* 信号通路在草鱼肌肉发育中的作用机制奠定基础。

随着基因功能研究的不断深入,反向遗传学研究手段尤其是基因沉默越来越受到研究者的重视。RNA 干扰技术相比于反义核苷酸技术因具有稳定性强、沉默效率高等优点而受到更广泛的关注<sup>[30]</sup>。此外,RNA 干扰技术在水产动物中的研究工作也已经开展:Wu 等<sup>[18]</sup>研究澳洲肺鱼抗神经坏死病毒诺达病毒(NNV)的免疫机制时,利用 RNA 干扰技术将与抗诺达病毒有关的 *Mx* 基因沉默,发现与诺达病毒复制有关的 RNA 聚合酶表达量显著降低,说明了 RNA 干扰技术在鱼体免疫机制研究方面起到了很好的抑制效果;另外,中科院朱作言团队<sup>[19]</sup>也采用 RNA 干扰技术研究斑马鱼尾部发育有关的



NTL 基因的作用机理, 试验主要采用巨型细胞病毒 CMV 启动子驱动模板 DNA 的方法构建质粒, 然后将设计好的用于转录 shRNA 的基因序列通过该质粒注射进入斑马鱼早期胚胎观察 NTL 基因沉默效果, 而在本试验中采用的是 U6 启动子, U6 启动子不仅能够增强干扰载体的表达能力而且对细胞的毒性和伤害较小。另一方面, 从目前的研究现状来看, 该技术在水产动物中的研究多集中在免疫和病理方面, 关于鱼类尤其是有经济价值的淡水鱼发育和调控方面的研究较少, 且研究方法多是直接针对细胞内有表达作用的功能基因进行沉默<sup>[31]</sup>, 而对于细胞内表达量很高的基因并不能完全阻断, 抑制效果不是很好; 在本试验设计中, 是从机体调控的角度出发想通过沉默细胞内关键的信号因子代替沉默下游的功能基因, 观察是否能够将目的基因完全沉默或是增强抑制效果。

目前利用 RNA 干扰技术研究信号通路的方法一是将干扰片段通过慢病毒包装转染进入细胞<sup>[32]</sup>, 二是针对信号途径中关键的信号因子构建 RNA 干扰表达载体<sup>[33]</sup>, 后将构建好的表达载体转染至细胞或进行鱼体注射, 分别在细胞和载体水平做相应检测; 而相对于病毒转染, 构建表达载体的方法要更安全、转染效率更高<sup>[34]</sup>。Zenke 等<sup>[35]</sup> 构建了红鳍东方鲀相关基因的 RNA 干扰表达载体, 随后将干扰载体转染至已构建好的细胞系中, 利用 Northern blot 等技术方法分析发现携带 U6 启动子的 RNA 干扰表达载体能有效的干扰目的基因的转录, 相比于基因敲除的方法其沉默效果更为明显。也有学者采用正向研究手段即通过构建真核过表达载体对相关基因的功能进行推测与验证, Coleman 等<sup>[36]</sup> 以编码骨骼肌肌动蛋白基因为先导序列插入人胰岛素样生长因子 (IGF1) 基因, 构建 *IGF1* 基因真核过表达载体, 转染至小鼠骨骼肌细胞中, 检测到骨骼肌细胞相关基因 mRNA 和肌动蛋白含量均有所增加, 证明了人类胰岛素样生长因子可以促进骨骼肌的生长发育。在本试验中同时构建了草鱼 *TGF-β1* 和 *Smad4* 基因的 RNA 干扰和真核过表达载体, 更确保了后续试验结果的可靠性; 在接下来的工作中, 会进行草鱼肌肉组织细胞培养, 并将构建好的表达载体转染至肌肉组织细胞中, 同时采用 RT-PCR 和 Westernblot 技术方法在转录和蛋白水平作进一步检测; 目前该方法的缺点和不足主要体现在转染效率低、易受细胞种类和环境因素影响等, 这也是日后

工作的重点和难点。

## 参考文献 References

- [1] Travis M A, Sheppard D. TGF-β activation and function in immunity[J]. *Annual Review of Immunology*, 2014, 32:51
- [2] Gu A D, Zhang S, Wang Y, Xiong H, Curtis T A, Wan Y Y. A critical role for transcription factor Smad4 in T cell function that is independent of transforming growth factor beta receptor signaling[J]. *Immunity*, 2015, 42(1):68-79
- [3] Yu F X, Zhang Y, Park H W, Jewell J L, Chen Q, Deng Y T, Pan D J, Taylor S S, Zhi C L, Kun L G. Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation[J]. *Genes & Development*, 2013, 27(11):1223-1232
- [4] Liu D S, Gao W, Liang E S, Wang S L, Lin W W, Zhang W D, Jia Q, Guo R C, Zhang J D. Effects of allicin on hyperhomocysteinemia-induced experimental vascular endothelial dysfunction[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 714(1):163-169
- [5] Craft C S, Pietka T A, Schappe T, Coleman T, Combs M D, Klein S, Abumrad N A, Mecham R P. The extracellular matrix protein MAGP1 supports thermogenesis and protects against obesity and diabetes through regulation of TGF-β [J]. *Diabetes*, 2014, 63(6):1920-1932
- [6] Kumawat K, Menzen M H, Bos I S T, Baarsma H A, Borger P, Roth M, Tamm M, Halayko A J, Simoons M, Prins A, Postma D S, Schmidt M, Gosens R. Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF-β-induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells[J]. *The FASEB Journal*, 2013, 27(4):1631-1643
- [7] Samarakoon R, Overstreet J M, Higgins P J. TGF-β signaling in tissue fibrosis; Redox controls, target genes and therapeutic opportunities[J]. *Cellular Signalling*, 2013, 25(1):264-268
- [8] Chung A C, Dong Y, Yang W, Zhong X, Li R, Lan H Y. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF-β/Smad3-regulated microRNAs[J]. *Molecular Therapy*, 2013, 21(2):388-398
- [9] Mcpherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β Superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387(6628):83-90
- [10] Acharjee S, Chung T K, Gopinadhan S, Shankar S R, Wang Y J, Li L, Vercherat C, Gulbagci N T, Rossner M, Taneja R, Acharjee S. Sharp-1 regulates TGF-beta signaling and skeletal muscle regeneration[J]. *Cell Science*, 2014, 127(3):599-608
- [11] Funkenstein B, Olekh E, Jakowlew S B. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta6) gene in fish: Regulation in skeletal muscle by nutritional state [J]. *BMC Molecular Biology*, 2010, 11:37
- [12] Bergsma A J, Groen S, Ploeg A T, Pijnappel P. A diagnostic approach for the unbiased identification of splice switching variants enables tailored antisense oligonucleotide-based



- correction[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2016, 117(2):S27
- [13] Fu K Y, Zhu T T, Guo W C, Ahmat T, Li G Q. Knockdown of a putative insulin-like peptide gene *LdILP2* in *Leptinotarsa decemlineata* by RNA interference impairs pupation and adult emergence[J]. *Gene*, 2016, 581(2):170-177
- [14] Maegawa Y, Mochizuki S, Miyamoto N, Sakurai K. Gene silencing using a conjugate comprising Tat peptide and antisense oligonucleotide with phosphorothioate backbones[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(4):1276-1278
- [15] Liang C, Wang Y, Murota Y, Liu X, Smith D, Siomi M C, Liu Q. TAF11 assembles the RISC loading Complex to enhance RNAi efficiency[J]. *Molecular Cell*, 2015, 59(5):807-818
- [16] Wilson R C, Doudna J A. Molecular mechanisms of RNA interference [J]. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 2013, 42:217-239
- [17] Zhuang J J, Hunter C P. RNA interference in *Caenorhabditis elegans*: Uptake, mechanism and regulation[J]. *Parasitology*, 2012, 139(5):560-573
- [18] Wu Y C, Lu Y F, Chi S C. Anti-viral mechanism of barramundi Mx against betanodavirus involves the inhibition of viral RNA synthesis through the interference of RdRp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(3):467-475
- [19] Su J G, Zhu Z Y, Wang Y P, Xiong F, Zou J. The cytomegalovirus promoter-driven short hairpin RNA constructs mediate effective RNA interference in zebrafish *in vivo*[J]. *Marine Biotechnology*, 2008, 10(3):262-269
- [20] Wang Y, Lu Y, Zhang Y, Ning Z, Li Y, Zhao Q, Liang X. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation [J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(6):625-631
- [21] Ito H, Urushihara M, Liang X, Asanuma H. Improvement of RNAi activity and strand selectivity of RISC formation by modified siRNA involving intercalators near 5' termini [J]. *Chembiochem*, 2012, 13(2):311-315
- [22] Hoh Y K. RNA interference: An instant update on the mechanism, functions, & therapeutic applications [J]. *American Biology Teacher*, 2014, 76(6):373-377
- [23] Krynak K L, Oldfield R G, Dennis P M, Durkalec M, Weldon C. A novel field technique to assess ploidy in introduced grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Cyprinidae) [J]. *Biological Invasions*, 2015, 17(7):1931-1939
- [24] Chen M, Huang L, Zhang W, Shi J, Lin X L, Lv Z Q, Zhang W, Liang R Y, Jiang S P. MiR-23b controls TGF-beta1 induced airway smooth muscle cell proliferation via TGFbetaR2/p-Smad3 signals [J]. *Molecular Immunology*, 2015, 70:84-93
- [25] Gaarenstroom T, Hill C S. TGF-beta signaling to chromatin: How smads regulate transcription during self-renewal and differentiation [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014, 32:107-118
- [26] Yang S M, Deng A C, Huang D L, Sun J H, Yang G, Yu Y P, Hou Z H, Guo W W, Zhai S Q, He D Z, Han D Y, Young W Y, Xiao Y. The role of Smad4 in vestibular development in mice [J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2011, 29(1):15-23
- [27] 吕池波, 郁二蒙, 谢骏, 王广军, 余德光, 李志斐, 王海英, 龚望宝. 草鱼 *Smad4* 基因的克隆、生物信息学分析及反义真核载体的构建 [J]. 华南农业大学学报, 2013(4):517-523
- Lv C B, Yu E M, Xie J, Wang G J, Yu D G, Li Z F, Wang H Y, Gong W B. Cloning of *Smad4* and construction of antisense *Smad4* gene expression vector from *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2013(4):517-523 (in Chinese)
- [28] Wang Z Y, Kunihiko F, Ayako N, Nobuaki O. Four types of *Smad4* found in the common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution*, 2005, 304(3):250-258
- [29] Yu E M, Xie J, Wang G J, Yu D G, Gong W B, Li Z F, Wang H Y, Xia Y, Wei N, Xie J. Gene expression profiling of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and crisp grass carp [J]. *International Journal of Genomics*, 2014, 2014:639-687
- [30] Ramachandran P V, Ignacimuthu S. RNA interference: A silent but an efficient therapeutic tool [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(6):1774-1789
- [31] Xiong Y, Zeng H, Zhang Y, Xu D, Qiu D. Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2013, 9(4):370-381
- [32] Zhu X M, Yao F H, Yao Y M, Dong N, Yu Y, Sheng Z Y. Endoplasmic reticulum stress and its regulator XBP-1 contributes to dendritic cell maturation and activation induced by high mobility group box-1 protein [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(7):1097-1105
- [33] Du J, Gao X, Deng L, Chang N, Xiong H, Zheng Y. Transfection of the glial cell line derived neurotrophic factor gene promotes neuronal differentiation [J]. *Neural Regeneration Research*, 2014, 9(1):33-40
- [34] Itaka K, Uchida S, Matsui A, Yanagihara K, Ikegami M, Endo T, Ishii T, Kataoka K. Gene transfection toward spheroid cells on micropatterned culture plates for genetically modified cell transplantation [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2015, 101:e52384
- [35] Zenke K, Kim K H. Novel fugu U6 promoter driven shRNA expression vector for efficient vector based RNAi in fish cell lines [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 371(3):480-483
- [36] Coleman M E, Demayo F, Yin K C, Lee, H M, Geske R, Montgomery C, Schwartz R J. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(20):12109-12116