

具有不同酶活性并可抵抗特异shRNA降解的nm23-H1真核表达载体的构建和表达

Zhansheng LU, Lili GUO, Lin LI, Zhihao WU, Qinghua ZHOU

摘要

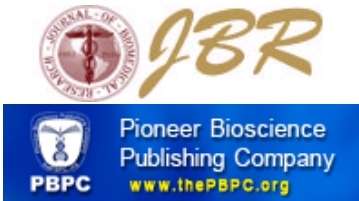
背景与目的 已有的研究证明nm23-H1基因是一个重要的肿瘤转移抑制基因,但其抑制肿瘤转移的生化机理尚不完全清楚。Nm23-H1基因结构和功能异常与肿瘤的侵袭转移有密切关系。我们前期已构建了nm23-H1的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)载体以及可抵抗此shRNA降解的nm23-H1的cDNA的表达载体,在此基础上我们欲应用基因定点突变技术构建具有不同酶活性并能抵抗此shRNA降解的nm23-H1cDNA真核表达载体,并通过恢复实验验证其表达,为进一步研究肿瘤抑制基因nm23-H1的分子机制提供理论基础和实验依据。方法 以pcDNA3.1(+)-shRNA-resistant-nm23-H1质粒为突变模板,应用重叠延伸PCR方法引入nm23-H1基因四个单点突变和一个联合位点突变,并将突变基因片段克隆到真核表达载体pcDNA3.1Hygro(+).将突变质粒转染人肺腺癌细胞株A549/nm23-H1-shRNA(稳定沉默nm23-H1基因),利用Western blot技术验证不同突变体nm23-H1蛋白的表达。结果 成功构建了shRNA抵抗的nm23-H1S44A、nm23-H1P96S、nm23-H1H118F、nm23-H1S120G、nm23-H1P96S-S120G五个突变型真核表达载体,经DNA序列分析突变的碱基序列与实验设计完全一致,经Western blot验证nm23-H1蛋白表达正常。结论 成功构建了五个具有不同突变位点的shRNA抵抗的nm23-H1基因真核表达载体,并且突变蛋白质nm23-H1表达正常,同时也表明重叠延伸PCR技术是一种高效、便捷、经济的DNA定点突变方法。

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2014.03.01

关键词

Nm23-H1; 重叠延伸PCR; 定点突变; Western blot

全文: [PDF](#) [HTML](#)



ARTICLE TOOLS

- 索引源数据
- 如何引证项目
- 查找参考文献
- 审查政策
- Email this article (Login required)

RELATED ITEMS

- Related studies Databases Web search
- Show all

ABOUT THE AUTHORS

Zhansheng LU
300052 天津, 天津市肺转移与肿瘤微环境重点实验室
天津市肺癌研究所, 天津医科大学总医院 (通讯作者: 周华, E-mail: zhouqh135@163.com; 吴志浩, E-mail: zwu2ster@gmail.com)

Lili GUO
300052 天津, 天津市肺转移与肿瘤微环境重点实验室
天津市肺癌研究所, 天津医科大学总医院 (通讯作者: 周华, E-mail: zhouqh135@163.com; 吴志浩, E-mail: zwu2ster@gmail.com)

Lin LI
300052 天津, 天津市肺转移与肿瘤微环境重点实验室
天津市肺癌研究所, 天津医科大学总医院 (通讯作者: 周华, E-mail: zhouqh135@163.com; 吴志浩, E-mail: zwu2ster@gmail.com)

Zhihao WU
300052 天津, 天津市肺转移与肿瘤微环境重点实验室

天津市肺癌研究所，天津医
大学总医院（通讯作者：周
华，E-

mail: zhouqh135@163.

吴志浩，E-mail:

zwu2ster@gmail.com)

Qinghua ZHOU

300052 天津，天津市肺

移与肿瘤微环境重点实验室

天津市肺癌研究所，天津医

大学总医院（通讯作者：周

华，E-

mail: zhouqh135@163.

吴志浩，E-mail:

zwu2ster@gmail.com)