

pSIREN-HIF-1 α /shRNA 表达载体的构建与鉴定

赵留芳, 张书萍, 李晓江, 任艳鑫, 张康, 喻博, 马静, 隋军
(昆明医科大学第三附属医院 / 云南省肿瘤医院 头颈外科, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 构建 pSIREN-HIF-1 α /shRNA 重组质粒并测序鉴定, 为下一步探索鼻咽癌基因治疗的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 途径奠定基础. **方法** 根据基因库 HIF-1 α cDNA 序列 (NM_001530/NM_181054) 以及 Reynolds 设计原则, 设计并合成两端有酶切位点的 60 个碱基的寡核苷酸链, 退火成互补双链后将退火产物与 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen 载体链接后, 热转化至大肠杆菌 JM109 菌株中, 提取质粒进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 测序分析. **结果** PCR 扩增片段出现约 470 bp 大小的目的基因条带, 与预期结果相符; 凝胶电泳证实重组载体构建成功, 插入片段测序结果与合成的寡核苷酸序列一致. **结论** 成功构建重组质粒 pSIREN-HIF-1 α /shRNA, 为下一步用脂质体包装并转染鼻咽癌细胞的研究奠定基础.

[关键词] RNA 干扰; 鼻咽癌; 质粒; HIF-1 α ; 短发卡 RNA

[中图分类号] R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 10-0058-05

Construction and Identification of pSIREN-HIF-1 α /shRNA Expression Vector

ZHAO Liu-fang, ZHANG Shu-ping, LI Xiao-jiang, REN Yan-xin, ZHANG Kang, YU Bo, MA Jing, SUI Jun

(Dept. of Head and Neck Surgery, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University/ Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To construct and identify pSIREN-HIF-1 α /shRNA expression vector in order to make foundation of gene therapy for further exploration of RNA interference to nasopharyngeal carcinoma. **Methods** According to HIF-1 α cDNA gene sequence in the gene bank (NM_001530/NM_181054), a pair of 60 nt oligonucleotides each containing the sites of restriction endonuclease at both ends, were designed and synthesized by Reynolds design principles. Oligonucleotides were annealed and ligated with linearized RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen. Transfected into JM109, the recombinants were finally sequenced and identified by 1% agarose gel electrophoresis. **Results** The size of the target gene fragment amplified by PCR was 470 bp and in accordance with the expected result. pSIREN-HIF-1 α was successfully constructed and identified by 1% agarose gel electrophoresis. Sequence analysis of inserted fragment revealed the same sequence as synthesized shRNA Oligonucleotides. **Conclusion** pSIREN-HIF-1 α /shRNA expression vector has been successfully constructed, and can make the foundation of research using liposome packaging transfecting nasopharyngeal carcinoma cell for the next step.

[Key words] RNA interference; Nasopharyngeal carcinoma; Plasmids; HIF-1 α ; shRNA

RNAi (RNA interference) 是在进化过程中高度保守的、双链小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 可以高效、特异地阻断体内同源

基因表达, 促使同源 mRNA 降解, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型, 又称 RNA 干预或干涉, 是一种转录后基因沉默技术^[1]. 短发卡 RNA (short

[基金项目] 云南省卫生科技计划项目 (2010NS085; 2011WS0068)

[作者简介] 赵留芳 (1986~), 男, 云南宣威市人, 医学硕士, 住院医师, 主从事头颈肿瘤的基础与临床研究工作.

[通讯作者] 李晓江. Email: wingman11@163.com

hairpin RNA, shRNA) 是由 1 条 RNA 单链自身折叠形成双链的茎, 再加上 1 条单链的环构成, 在细胞内会被自动加工成 siRNA, 使靶基因沉默, 干扰其翻译/转录形成蛋白质的功能, 使细胞向成熟方向分化或诱导细胞凋亡, 从而达到抑制细胞增殖的目的^[2]. RNAi 技术可特异性敲除或关闭特定基因的表达, 该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾疾病及恶性肿瘤的基因治疗等领域^[3,4]. 本实验构建了针对 HIF-1 α 基因的特异性 shRNA 表达载体, 同时设立阴性对照, 并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和基因测序加以验证. 为进一步进行质粒的转染治疗鼻咽癌或者其他肿瘤提供分子基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen 质粒购于宝生物工程(大连)有限公司; JM109 菌株由中国科学院昆明动物所惠赠.

1.1.2 主要试剂 TaKaRa DNA Ligation Kit (Code No.D6022)、DNA maker (分子量标记物), Taq 酶 (Promega), 及 Oligo DT 引物 (宝生物大连有限公司), 脂质体 (LipofectamineTM 2000) (Invitrogen 公司), 菌株培养用 LB 培养基 (上海生工生物工程公司) 及质粒抽提试剂盒 (Omega 公司), 其他试剂均为分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 HIF-1 α shRNA 序列的设计与合成 在 NCBI 数据库中查找 HIF-1 α 的基因序列号, 得知该基因具有 2 个亚型: NM_001530、NM_181054. 分别查找二者的全长 mRNA 序列, 选取具有重叠部分的序列, 根据 Reynolds 等提出的 siRNA 设计原则选取其中的一个位点 CTGGACACAGTGTGTT-TGA (381-399) 作为靶序列, 并通过 BLAST 软件确定所选序列与其他基因没有同源性. 按照下列结构序列合成: BamHI + Sense + Loop + Antisense + TTTTTT + EcoRI. 各序列均有 60 个核苷酸, 正义链和反义链之间加入 9 个寡核苷酸 (TTCAAGAGA) 形成发卡结构, 以 TTTTTT 作为终止信号, 5' 端为 BamHI 酶切位点末端, 3' 端为 EcoRI 酶切位点末端, 用于将寡核苷酸序列克隆到载体上. 前向序列 5'-GATCCGCTGGACACAGTGTGTTTATTCAAGA-GATCAAACACACTGTGTCCAGTTTTTTT-3'; 反向序列 5'-AATTCAAAAAAAGTGGACACAGTGTGTT-TGATCTCTGAATCAAACACACTGTGTCCAGCG -

3'. 另以随机打乱顺序的序列 ACTCCGACGAAGCA-GCATA 作为阴性对照, 并经过 Blast 软件比较, 与人、鼠基因库无明显同源性. 前向序列 5'-GATCCGACTCCGACGAAGCAGCATATTTCAAGAGATATG-CTGCTTCGTCGGAGTTTTTTT-3', 反向序 5'-AA-TTCAAAAAAAGTCCGACGAAGCAGCATATCTCT-TGAATATGCTGCTTCGTCGGAGTTCG-3', 以上寡核苷酸 DNA 单链均委托宝生物工程(大连)有限公司合成.

1.2.2 表达载体的构建 (1) 将已合成的 shRNA 寡核苷酸单链模板分别稀释至大约 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; (2) 50 μL 退火体系配制: Oligo-sense 2 μL 、Oligo-antisense 2 μL , 加入浓度为 0.05 mol/L 的 HEPES 缓冲液 46 μL , 混匀; 离心后置于 94 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中 5 min; 然后让其缓慢冷却至室温, 冷却速度约 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; (3) 表达载体的链接: 取退火产物各 1 μL 与 pSIREN-RetroQ-ZsGreen 1 μL , 以 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的 Solution I 连接后, 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜; (4) 取过夜连接产物热转化至大肠杆菌 JM109 菌株, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养过夜、氨苄青霉素筛选后, 各随机挑选 8 个转化后的单菌落以引物 AGGCGGGCCATTTACCGTAAG 及 TAATTTCTTGG-GTAGTTTGC 进行多聚酶链反应 (PCR) 扩增; (5) 提取纯化质粒 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳; (6) 初步鉴定后送宝生物工程(大连)有限公司测序.

2 结果

2.1 阳性菌落的鉴定

以 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性菌落 PCR. 1~8 为 PCR 产物, 左侧为阳性干扰质粒组, 右侧为阴性对照质粒组, 2 组均出现 473 bp 大小的目的基因条带, 表明质粒初步构建成功. 阳性组中 3 未见条带, 考虑未转化成功. PCR 产物 (图 1).

2.2 重组质粒凝胶电泳

将阳性质粒 1、阴性质粒 2 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, 所示片段分子大小约为 6.6 kb, 与所设计的重组质粒分子大小一致 (图 2).

2.3 重组载体的 DNA 序列测定

重组质粒 pSIREN-HIF-1 α /shRNA 委托宝生物工程(大连)有限公司测序分析. 结果显示, 重组质粒 shRNA 编码序列与本实验设计的靶向 HIF-1 α 的核苷酸序列完全一致, 表明成功构建了重组质粒载体 (见图 3, 4).

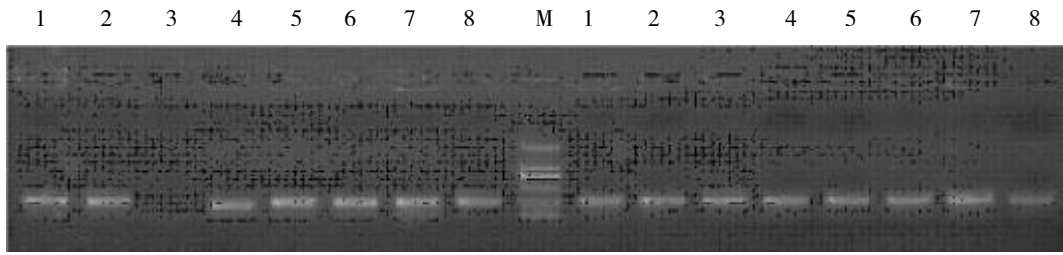


图 1 PCR 产物

Fig. 1 The product of PCR

M: 分子质量标记物 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp.

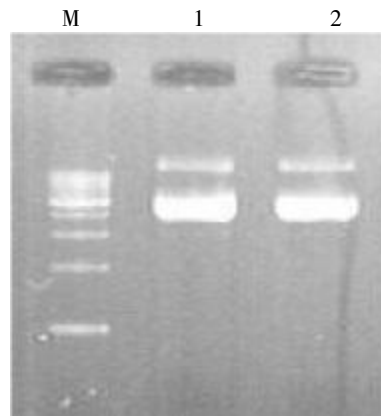


图 2 重组质粒凝胶电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of recombinant plasmid from gel

M: 超螺旋 DNA 梯度标记物分子量 11 849 bp, 10085bp, 8 023 bp, 6 133 bp, 5 026 bp, 3 997 bp, 3 049 bp, 2 087 bp.

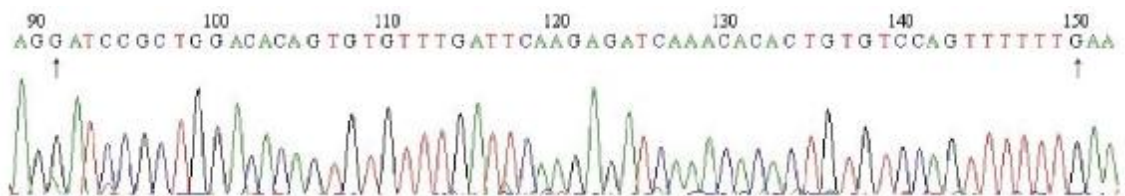


图 3 阳性干扰链的测序结果

Fig. 3 The sequence of positive interference chain

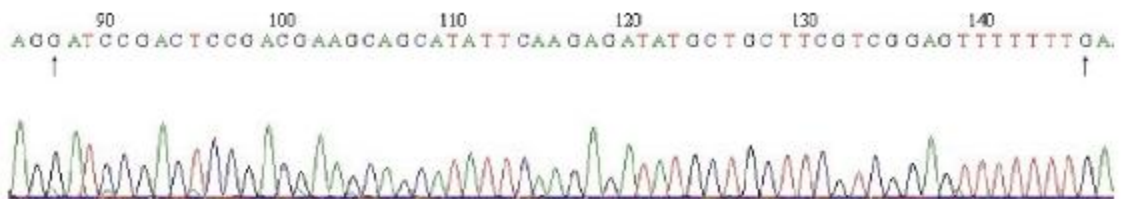


图 4 阴性对照链的测序结果

Fig. 4 The sequence of negative control chain

3 讨论

RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen Retroviral Vector 是一种利用 U6 启动子的自我钝化的反转录表达载体. 该载体可用以表达短发卡 RNA. 能被 BamHI 和 EcoRI 双酶切为线性化载体. 当编码适当短发卡 RNA 的双链 DNA 寡核苷酸链 (即目的基因) 被连接进入载体后, 就可用来沉默目的基因. 因载体可以表达绿色荧光蛋白, 可以此方便检测质粒的转染效率.

基因治疗作为目前一个全新研究的治疗手段之一, 日益成为肿瘤基因靶向治疗的焦点, 包括反义核酸法、核酶法、基音敲除和 RNAi 等. RNAi 是指内源性或外源性双链 RNA (dsRNA) 介导的细胞内某特定基因的 mRNA 发生特异性降解, 诱导细胞表现出特定基因缺失的表型, 是一种转录后基因沉默技术, 具有不编码蛋白与转录后干扰的特性^[5], 目前已经广泛运用于研究基因功能以及进行初步基因治疗的研究^[6].

Wang Z 等^[7]指出由于 RNAi 的高效性与潜力, 有助我们对肿瘤的认识, 提高对肿瘤治疗, 特别是进行个性化癌症治疗的可能. Nemunaitis J 等^[8]也提出了利用 RNA 干扰技术, 可以制定以靶基因为目的的个性化癌症治疗, 可能为癌症的临床基因治疗提供基础. 迄今, 在几乎所有的真核生物中都发现 RNAi 现象的存在, 表明了 RNAi 在进化上高度保守性, 因此在维持真核细胞的正常生理功能方面可能具有非常重要的作用^[9]. RNAi 的作用特点主要表现在: (1) 稳定持久; (2) 高特异性; (3) 作用强大; (4) 浓度依赖性; (5) 双干扰系统; (6) 可传播性^[10].

一般来说, RNAi 的研究一般需要经过以下步骤: (1) siRNA 的合理设计; (2) siRNA 真核表达载体的构建; (3) siRNA 抑制效果的验证; (4) RNAi 有效抑制靶基因后, 细胞生物学行为的观察和对比. 选择合适的基因靶点是 siRNA 肿瘤治疗可能成功的关键因素之一^[11]. 候选靶点包括细胞增殖相关基因、转移、血管生成、耐药基因等. 根据国外的研究结果, siRNA 的设计需尽量满足下列原则^[12,13]: (1) 在转录本 mRNA 的 AUG 起始密码下游 50~100nt 之间, 寻找“AA (N19) TT”或“AA (N21)”序列, 作为潜在的 siRNA 靶点; (2) GC 含量在 30%~70%; 有研究结果显示 GC 含量在 50%时最理想; (3) 将潜在的序列与相应的基因组数据库 (人、小鼠、大鼠等) 进行 BLAST

序列比对, 排除那些和其他编码序列或 EST 同源的序列; (4) 选出合适的目标序列进行合成, 以找到最有效的 siRNA. 同时, 一个完整的 RNAi 实验必须有阳性对照和阴性对照, 通过阳性对照观察转染效率, 通过阴性对照排除非特异性因素的影响. 虽然有一系列应该遵循的原则, 但是目前对哺乳动物细胞靶基因中 RNA 干扰作用位点的选择还只是一个经验性的过程, 完全符合这些原则的 siRNA 也并非都有效; 其原因还不明了, 可能是位置效应的结果. 通过质粒等表达载体在细胞内直接转录 siRNA 不仅容易操作, 最重要的是能够建立稳定的表达, 从而达到延长 RNA 干扰的目的^[14].

本实验在大连宝生物生物工程技术公司专家的指导下, 参考文献中提到的有效序列, 设计挑选了 1 对寡核苷酸序列, 构建了重组质粒 pSIREN-HIF-1 α /shRNA; 经凝胶电泳和基因测序鉴定证实构建成功. 该质粒在细胞内转录生成发夹状双链 RNA 分子后, 通过 Dicer 酶生成 siRNA 分子, 从而诱导基因沉默. 这种方法操作简便, 成本低, 能在细胞内稳定产生 shRNA, 避免转染时受 RNase 降解^[15]. 该表达载体将为后续研究鼻咽癌细胞 HIF-1 α 基因的功能提供基础: 可以瞬时沉默 HIF-1 α 基因, 同时联合沉默其他关键基因, 如 survivin 基因, 观察其对鼻咽癌细胞的细胞增殖活力影响; 观察对细胞周期分布的改变, 进一步可以筛选后得到稳定表达细胞株, 进而联合放射实验, 观察缺氧环境下鼻咽癌细胞的增殖、凋亡改变, 从而更深入认识 HIF-1 α 对肿瘤细胞的生物学改变.

[参考文献]

- [1] SIBLEY C R, SEOW Y, WOOD M J. Novel RNA-based strategies for therapeutic gene silencing [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(3):466-476.
- [2] SASHITAL D G, DOUDNA J A. Structural insights into RNA interference [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2010, 20(1): 90-97.
- [3] GU Y, HOU W, XU C, et al. The enhancement of RNAi against HIV in vitro and in vivo using H-2K (k) protein as a sorting method [J]. *J Virol Methods*, 2012, 182(1-2): 9-17.
- [4] DEVINCENZO J P. The promise, pitfalls and progress of RNA-interference-based antiviral therapy for respiratory viruses [J]. *Antivir Ther*, 2012, 17(1):213-225.

(下转第 72 页)