

靶向遗传印记基因 PEG10 的 siRNA 真核表达载体的构建及鉴定

黄 锦, 林菊生, 常 莹, 周秀敏

The Construction and Identification of siRNA Eukaryotic Expression Vector Targeting Genetic Imprinted Gene PEG10

HUANG Jin, LIN Ju-sheng, CHANG Ying, ZHOU Xiumin

Institute of Liver Diseases, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: LIN Ju-sheng

Abstract :Objective To construct and identify the siRNA eukaryotic expression vector targeting PEG10.

Methods Four siRNAs were designed according to the coding sequence of PEG10 gene, and cloned into the downstream of H1 promoter of psiRNA-hH1neo. The constructed recombinant was analyzed and identified by Ase I endonuclease digestion and DNA sequencing. **Results** The constructed psiRNA plasmid digested with Ase I was linearized. The sequencing result confirmed that the sequence of inserted fragment was correct. **Conclusion** Eukaryotic expression vector of siRNA targeting PEG10 gene was successfully constructed, and should be a novel effective expression vector for HCC gene therapy.

Key words :Genetic imprinted gene; PEG10; siRNA; Eukaryotic expression vector; Identification

摘要 目的 构建并鉴定针对遗传印记基因 PEG10 的 siRNA 真核表达载体。方法 根据 PEG10 基因 cDNA 序列,设计针对目的基因的 4 个 siRNA 靶序列,将其插入 H1 启动子下游,克隆到真核表达载体 psiRNA-hH1neo 中,通过酶切鉴定和 DNA 测序鉴定。结果 酶切鉴定及 DNA 测序结果显示插入片段正确。结论 本研究成功构建针对 PEG10 的真核表达载体,可能成为肝癌基因治疗中的一种新型、高效的治疗载体。

关键词 遗传印记基因; PEG10; siRNA; 真核表达载体; 鉴定

中图分类号:R735.7; R73-35⁴ 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)01-0086-03

0 引言

原发性肝细胞癌基因治疗面临的一大难题,是寻找参与绝大多数肝癌发病关键性的特异分子靶。PEG10 (Paternally expressed gene 10) 是 2001 年 Ryuichi Ono 等用 cDNA 微阵列在肝细胞癌组织中发现的一个新的遗传印记基因,它在肝癌中表达的特异性提示可能参与肿瘤细胞生长失控^[1]。本研究采用分子克隆技术,构建了针对 PEG10 的 siRNA 真核表达载体,通过酶切鉴定和测序鉴定其结构。

1 材料与方法

1.1 材料 质粒 psiRNA-hH1neo 购自美国 Invivo Gen 公司,受体菌 E. coli DH-5[®] 由本实验室保

存。限制性内切酶 Bbs I 和 Ase I 及 T4DNA 连接酶购自美国 NEB 公司,M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂 Rnasin 和 Taq 聚合酶为美国 Promega 公司产品。高纯质粒提取试剂盒购自杭州 V-gene 公司,DNA 凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司,DNA 由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 靶序列的设计和筛选 利用 NCBI Genbank 检索 PEG10 mRNA 的全长序列,参照 siRNA 设计原则,并运用 RNA structure 软件模拟靶 mRNA 的二级结构,尽量避免自身结合的茎区,选择配对区域较少的序列,如线区和环区。筛选出 4 个 21 个核苷酸的序列,分别命名为 psiRNA1 (GCA GAA GCTCACAGAGGA GAA)、psiRNA2 (GCACAACTACCCA GCTTTCA T)、psiRNA3 (GGCA GT GCA TTCACA TTGA GA) 和 psiRNA4 (GTTCGA TGGCA ACCCA GACA T)。两端均引入 Bbs I 酶切位点。

1.2.2 靶向 PEG10 的 siRNA 真核表达载体的构建

收稿日期:2006-01-24;修回日期:2006-05-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471983)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所

通讯作者:林菊生

作者简介:黄锦(1980-),女,博士在读,主治医师,主要从事肝癌分子生物学研究

1.2.2.1 shRNA 表达模板的制备 将化学合成的正义链和反义链退火,形成 shRNA 表达模板,表达模板由正义链 + loop (CCACC) + 反义链组成,两端为酶切位点。

1.2.2.2 p siRNA-h H1neo 载体酶切 Invivogen 公司 p siRNA-h H1neo 质粒,H1 启动子下游有两个 Bbs 酶切位点,酶切反应后,用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,凝胶回收 2 640 bp 片断,实验步骤按照华舜 DNA 凝胶回收试剂盒说明书操作。回收后通过紫外分光光度计定量。

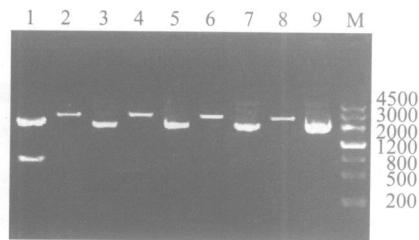
1.2.2.3 连接及转化 将 shRNA 表达模板和 p siRNA-h H1neo 酶切产物按 4:1 的比例混合,T4DNA 连接酶 27 连接过夜,转化感受态 DH-5 大肠杆菌中,取振摇后的转化菌,均匀涂抹在含 -gal 和 IPTG 的卡那琼脂平板上,倒置培养过夜。观察菌落生长情况,蓝白斑筛选,挑取白色单克隆。

1.2.2.4 质粒的扩增和提取 将挑取的菌落分别接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37°C、250r/min 振摇 12~14h。取 3ml 转化菌液,按照 V-gene 公司超纯质粒抽提试剂盒说明书步骤提取质粒,取 1 μl 在 1% 的琼脂糖电泳,通过灰度扫描定量。

1.2.2.5 质粒的鉴定 酶切鉴定:将提取的重组质粒和 p siRNA-h H1neo 空质粒,用限制性内切酶 Ase 进行酶切鉴定。测序鉴定:取 1ml 转化菌液,送上海英骏生物技术公司进行测序鉴定。测序引物:5'CCCTAACTGACACACA TTCC3',测序方法为反向测序。

2 结果

2.1 重组载体酶切鉴定结果 用 Ase 分别酶切重组载体和空载体,见图 1,重组质粒酶切后呈线性化,电泳出一条带;空质粒组得到 752bp 和 2 227bp 两条带;未经酶切的质粒分别为电泳出超螺旋环状 DNA、线状 DNA、切口环状 DNA 三条带。以上结果均与预期相符。



1. p siRNA-h H1neo Ase ; 2. p siRNA1 Ase ; 3. p siRNA1 Lane; 4. p siRNA2 Ase ; 5. p siRNA2; 6. p siRNA3 Ase ; 7. p siRNA3; 8. p siRNA4 Ase ; 9. p siRNA4; M. Marker

图 1 重组质粒酶切鉴定结果

2.2 测序结果 将 DNA 测序结果通过 DNAssist 2.2 软件进行比对,与预先设计结果完全相符。说明已将 4 个不同序列的 siRNA 分别成功克隆至载体 p siRNA 上,可以用于后续研究。

3 讨论

遗传印记基因 PEG10 来源于病毒反转录转座子,是属于父方表达的印记基因。父方表达的印记基因可促进细胞的生长,使个体发育更加强壮,而这类基因的过表达就有可能导致细胞的恶性转化^[2~4]。研究发现,PEG10 在小鼠再生肝和人类肝细胞癌组织中高表达,在相应的癌旁及正常人肝、胰、结肠、胃、淋巴和表皮中均不表达^[5~6]。我们的前期研究表明,PEG10 在肝癌组织中的表达具有特异性,人肝癌细胞系 Hep G2 中 PEG10 高表达^[7]。因此,PEG10 有可能是一个潜在的肝癌基因治疗的分子靶。

RNAi 技术作为一种新的基因沉默手段,以其严格的序列特异性、高效性及高度稳定性等特点迅速成为研究的热点,并逐渐发展成为研究基因功能和肿瘤基因治疗的重要工具。目前常用的制备 siRNA 的方法有化学合成法、体外转录法、“鸡尾酒”法(RNaseIII 酶切 dsRNA)、表达载体法和表达框法等 5 种,本实验采用的真核表达载体法克服了其他方法成本高,步骤繁琐的缺点,具有简单、快捷、经济的优点,利用真核表达载体可以进行瞬时转染或建立稳定的转基因细胞系,便于进行短期和长期的研究。本研究选择 p siRNA-h H1neo 载体,其 H1 启动子是 RNA 聚合酶 II 启动子,它能够精确高效的转录出 shRNA,进而在体内被切割成为 siRNA,提高了 RNAi 的特异性和效率。在 H1 启动子下游有 2 个 Bbs 酶切位点,通过 Bbs 酶切后可以产生非粘性末端,即提高了酶切的效率又简化了酶切步骤,防止载体的自身环化。

siRNA 的靶位点的选择是 RNAi 成功的关键,其设计原则通常包括 G/C 含量在 40%~55% 之间,避免 4 个 A、T、C 和 G 相连的序列,Blast 分析排除同源性。实验中一般针对每个目的序列设计 3~4 对 siRNAs,筛选出最有效的进行后续研究。siRNA 对目的基因靶位点的识别具有高度的序列特异,通过碱基配对完全互补的序列才能发挥作用。而且,RNA 二级结构对 siRNA 作用的影响非常显著^[8~9]。本研究选取的 4 个靶位点,均考虑到了 RNA 二级结构的影响,其中 p siRNA1 和 p siRNA2 为线状结构,p siRNA3 和 p siRNA4 为环状结构。结果显示,相同的 GC 含量,线状结构(p siRNA2)对

巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶来源的 NO 对共培养 HL60 细胞凋亡的影响

张 申¹, 尹利华¹, 卫涛涛²

Effects of Inducible Nitric Oxide Synthase Derived Nitric Oxide on Apoptosis of HL60 Cells

Co-cultured with RAW264.7 Macrophages

ZHANG Shen¹, YIN Li-hua¹, WEI Tao-tao²

1. Department of Laboratory Medicine, Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China; 2. Center for Structural and Molecular Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences

Abstract :Objective To study effects of inducible nitric oxide synthase (iNOS)-derived nitric oxide (NO) on apoptosis of HL60 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophages. **Methods** Upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS) and interferon (IFN- γ), inducible nitric oxide synthase gene was expressed in RAW 264.7 macrophages, which caused the consequent generation of nitric oxide. Effects of nitric oxide on HL60 cells viability, expression of bcl-2 and bax protein, activity of Caspase-3 and cell apoptosis were evaluated with MTT assay, Western blot analysis, fluorescence analysis, flow cytometry (FCM), transmission electron microscopy (TEM) and DNA agarose gel electrophoresis. **Results** The results showed that iNOS-derived nitric oxide caused oxidative damage of HL60 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophages, and decreased cell viability, and evidently reduced expression of bcl-2 and increased expression of bax, and induced activity of caspase-3 and DNA fragmentation. **Conclusion** The results suggested important effect of iNOS-derived nitric oxide on apoptosis of cells in RAW 264.7 macrophages.

收稿日期: 2006-02-21; 修回日期: 2006-04-14

基金项目: 怀化市科技计划资助项目(0502)

作者单位: 1. 418000 湖南怀化医学高等专科学校检验系; 2. 中国科学院生物物理研究所结构与分子生物学研究中心

作者简介: 张申(1955-), 男, 学士, 教授, 主要从事自由基生物学研究

Key words: Inducible nitric oxide synthase; Nitric oxide; Apoptosis; Macrophage

摘要: 目的 研究巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)来源的一氧化氮(NO)对共培养 HL60 细胞凋亡的影响。

方法 以脂多糖(LPS)和 γ -干扰素(IFN- γ)诱导 RAW 264.7 巨噬细胞 iNOS 基因的表达产生过量 NO 为实验模型, 通过

PEG10 mRNA 的抑制作用最强, 表明靶 mRNA 的二级结构对 siRNA 的功能有很大影响。

本研究中我们构建针对 PEG10 基因的 siRNA 真核表达载体, 并通过酶切鉴定和测序鉴定, 说明我们构建的针对 PEG10 的真核表达载体是正确有效的, 可以用于后续 PEG10 基因功能的研究, 以及沉默 PEG10 后抑制肝癌细胞生长, 诱导肝癌细胞凋亡, 从而为肝癌的基因治疗提供理论依据和实验工具。

参考文献:

- [1] Ryuichi Ono, Shin Kobayashi, Hirotaka Wagatsuma, et al. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21 [J]. Genomics, 2001, 73(2): 232-237.
- [2] Noble A, Towne C, Chopin L, et al. Insulin-like growth factor bound to vitronectin enhances MCF-7 breast cancer cell migration [J]. Endocrinology, 2003, 144(6): 2417-2424.
- [3] Moorehead RA, Sanchez OH, Baldwin RM, et al. Transgenic overexpression of IGF- γ induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2003,

22(6): 853-857.

- [4] Vella V, Sciacca L, Pandini G, et al. The IGF system in thyroid cancer: new concepts [J]. Mol Pathol, 2001, 54(3): 121-124.
- [5] Tsou AP, Chuang YC, Su JY, et al. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers [J]. J Biomed Sci, 2003, 10(6 Pt 1): 625-635.
- [6] Hiroshi Okabe, Seiji Satoh, Yoichi Furukawa, et al. Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1 [J]. Cancer Research, 2003, 63(12): 3043-3048.
- [7] 常莹, 陶璐薇, 陈孝平, 等. 肝癌组织中遗传印记基因 PEG10 表达的特异性及其意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(12): 1408-1411.
- [8] Naito Y, Yamada T, Ueda K, et al. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32: W124-129.
- [9] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(3): 326-330.

[编辑: 刘红武]