文章编号:1000-5404(2006)11-1135-03

论著

RNAi 抑制 IEC-6 细胞中 ERp29 表达

杨 媛,章 波,王 蒙,王军平,粟永萍 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 构建抑制大鼠 ERp29 基因表达的重组质粒,并在 IEC-6 细胞中发挥作用。**方法** 根据大鼠 ERp29 的基因序列,设计合成含有发夹结构的寡核苷酸片段,经退火形成双链后克隆至 pAVU6 +27 载体质粒中,对阳性重组子进行酶切和测序鉴定后转染正常 IEC-6 细胞,通过 PCR 方法对 siERp29 干扰片段进行鉴定,并采用 Western blot 检测 ERp29 蛋白水平的表达变化。**结果** 重组质粒经双酶切后,有目的条带出现,提示 ERp29 干扰片段已克隆至 pAVU6 +27 载体质粒中,DNA 测序结果显示插入序列与预先设计完全一致。重组质粒转染 IEC-6 细胞后经 G418 筛选,成功获得阳性克隆,Western blot 结果显示 ERp29 的蛋白水平表达显著下降。**结论** 成功构建 ERp29 基因 RNA 干扰表达质粒,并在 IEC-6 细胞中发挥抑制作用,这为深入研究该基因在电离辐射中的作用奠定了基础。

关键词: ERp29; RNAi; IEC-6; 转染; 表达
中图法分类号: Q503; Q782; Q786 **文献标识码**: A

Inhibited expression of ERp29 in IEC-6 cell by RNA interference

YANG Yuan, ZHANG Bo, WANG Meng, WANG Jun-ping, SU Yong-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct pAVU6-siERp29 expression plasmid and observe its function in IEC-6 cells. Methods Rat siERp29 was subcloned into pAVU6 +27, DH10B *E. coli.* was transformed with the recombinant plasmid, and the ampicillin-resistant clones were identified by double digestion with *Hind*Ⅲ and *Bam*HⅠ and DNA sequencing. IEC-6 cells were transfected with the identified pAVU6-siERp29 and pAVU6 +27 by Lipofectamine2000. Results The DNA fragment obtained by double digestion and DNA sequencing showed that siERp29 was inserted into the pAVU6 +27 in correct orientation and reading frame. G418-resistant colonies of IEC-6 cells were obtained and confirmed as positive by PCR. The expression of ERp29 protein decreased by Western blotting. Conclusion pAVU6-siERp29 expression plasmid was constructed and took effect in IEC-6 cells, which help to further study the biochemical and physiological role in radiation response of this protein.

Key words: ERp29; RNAi; IEC-6 cells; transfection; expression

Demmer 等[1,2]在研究大鼠牙釉质细胞的内质网应激反应时发现并克隆了 ERp29 基因,其编码的蛋白质是一种内质网特异性蛋白,内质网应激时表达显著升高。电离辐射可引起内质网应激反应,而 ERp29 作为内质网应激相关蛋白,是一个电离辐射所致的效应分子,我们在以往的研究中发现:电离辐射可以诱导肠上皮细胞中 ERp29 表达升高,且该基因 mRNA 在照射后随时间增加而增加[3]。因此,为了深入研究该基因表达升高的原因及其在电离辐射中的作用机制,我们构建了 ERp29 基因 RNA 干扰表达载体,并实现了对正常大鼠空肠上皮细胞 IEC-6 中 ERp29 基因表达的特异性抑制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli.* DH10B 为本室保存。质粒 pAVU6 +27 为美国密西根大学 Engelke 教授赠送[4]。pAVU6 +27 表达载体全长 6 154 bp,其多克隆位点含 *Sal* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 两酶切位点,该载体含氨苄青霉素抗性基因和新霉素筛选基因。

1.1.2 干扰序列设计 从基因数据库中搜索出大鼠 ERp29 的 mRNA 序列,用于抑制 ERp29 表达的寡核苷酸为 5′-GGAGACAGACAAGAAGTGG -3′。采用 Invitrogen 公司网上软件设计干扰序列,由上海生工生物技术有限公司合成 2 条 DNA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30230360, 30400121)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30230360, 30400121)
作者简介:杨 媛(1978 -),女,山西省临汾市人,硕士研究生,主要从事基因表达与功能方面的研究。电话:(023) 68771720
通讯作者:粟永萍,电话:(023) 68752009, E-mail: suyping@yahoo.com
收稿日期:2006-01-08;修回日期:2006-03-21

序列(5′端是 *Sal* Ⅰ 酶切位点,3′端是 *Xba* Ⅰ 酶切位点):5′-TCGACGGAGACAGACAAGAAGTGGTTCGCCACTTCTTGTCTGTCT-CCTTTTTGGT-3′; 5′-GCCTCTGTCTGTTCTTCACCAAGCGGTGA-AGAACAGACAGAGGAAAAACCAGATC-3′。

1.1.3 主要试剂 细胞总 DNA 提取试剂盒购自 Promega (USA),脂质体购自 Roche(USA),PCR 试剂盒购自大连宝生物公司,细胞培养基 DMEM 购自 Hyclone 公司(USA),ERp29 抗体(单克隆、兔来源)购自 ABR 公司(USA),辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,各种限制性内切酶购自 New England Biolabs,电泳试剂均购自 Sigma,其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 寡核苷酸的退火及连接 将合成的寡核苷酸溶于双蒸水,浓度为 1 μg/μl。各取 1 μl 加入 5 μl 10×T_4DNA 连接酶缓冲液中,用双蒸水补至 50 μl。按照下列条件进行退火:95 ℃变性 5 min;95 ~ 70 ℃降温(-0.1 ℃/s);70 ℃保温 10 min;70 ~ 30 ℃降温(-0.2 ℃/30 s)。取出退火后的 DNA,与载体(pAVU6 +27,*Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切)连接、转化感受态大肠杆菌 DH10B。

1.2.2 重组质粒的鉴定 挑选转化子,按照试剂盒操作说明进行 DNA 提取。由于插入片段仅有 55 bp,因此选择载体上另外 2 个酶切位点 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ进行酶切(包括插入片段),0.8% 琼脂糖电泳鉴定。对初步鉴定的重组子进行序列测定,确定插入片段与预期相同,大量扩增重组质粒用于转染 IEC-6 细胞。

1.2.3 细胞培养及基因转染 大鼠空肠上皮细胞株(IEC-6)由本室保存。培养液组成:DMEM、10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素,于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。细胞培养至对数生长期时,收获细胞转接于 6 孔培养板中孵育 24 h 后进行转染。采用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 作为转染试剂,将重组质粒和空载体分别转染 IEC-6 细胞,400 μg/ml G418 筛选 4 周,最终获得转染后的阳性细胞用于下一步实验。

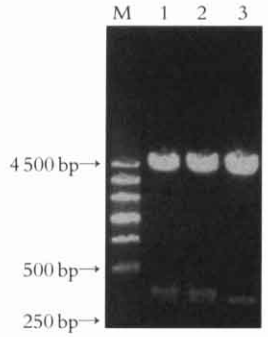
1.2.4 转染细胞的 PCR 鉴定 收集转染后培养的 2 组细胞,加入 Tripure 1.5 ml,吹打细胞使之重悬,加入 200 μl 氯仿,剧烈振荡,12 000 r/min 离心 10 min,取上清 400 μl 加入 10 μl RNA 酶,37 ℃消化 30 min,加入异丙醇 500 μl,13 000 r/min 离心10 min,加入 70% 乙醇 700 μl,13 000 r/min 离心 5 min,加双蒸水 15 μl。插入片段仅为 55 bp,因此选择载体上另外 2 个位点进行扩增。引物序列分别:P1:5′-CCCAAGCTTGGATCCAAG-GTCGGGC-3′, P2: 5′-ACCATTATAAGCTGCAATAAACAAG-3′, PCR 反应体系为:1 μl 模板,2 对引物各 0.5 μl, 2 μl 10×缓冲液, 1 μl 10 mmol/L dNTP mix , 0. 5 μl *Taq* 酶,去离子水补至 20 μl。反应条件为:预变性 94 ℃ 2 min;94 ℃ 20 s,55 ℃ 50 s, 72 ℃ 1 min 共 30 个循环。取 5 μl 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 免疫印迹检测 收集转染后阳性细胞,抽提细胞总蛋白,紫外分光仪测蛋白浓度。调整蛋白上样量进行 SDS-PAGE,聚丙烯酰胺分离胶浓度为 12%(30% 丙烯酰胺 6.00 ml, 4×Tris · Cl/SDS 3. 75 ml, H_2O 5. 25 ml, 10% 过硫酸铵 0.05 ml, TEMED 0.01 ml)。蛋白转移时采用半干转印仪(Bio-Rad 公司),15 V,30 min。一抗(ERp29 抗体)稀释浓度为 1∶2 500,二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG)稀释浓度为 1∶5 000。

2 结果

2.1 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)载体的构建

将退火后的 DNA 与载体连接,转化 *E. coli.* DH10B 后可见转化子产生。从中随机挑选 5 个转化子,提取其 DNA 进行酶切。电泳结果显示:有 3 个阳性克隆产生。将其送至上海生物工程技术服务有限公司进行 DNA 序列测定,ERp29 干扰片段序列和插入的方向与预先设计完全一致。说明克隆成功,重组质粒命名为 pAVU6-siERp29 (图 1)。

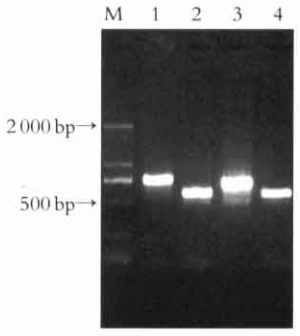


M: 标准; 1,2: *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 pAVU6-siERp29; 3: *Hind*Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 pAVU6 +27

图 1 重组质粒 pAVU6-siERp29 酶切鉴定电泳图

2.2 细胞转染及 PCR 鉴定

将重组质粒 pAVU6-siERp29 和 pAVU6 +27 转染 IEC-6 细胞,加入 G418 筛选 7 d 可见阳性细胞克隆出现,转染细胞被命名为 IEC-siERp29 和 IEC-pAVU6。为了确定重组质粒在转染细胞中的存在,采用 PCR 方法进行检测。结果显示:以转染细胞为模板所扩增的产物与以质粒 DNA 为模板所扩增的产物完全相同(图 2),说明细胞的转染是成功的。

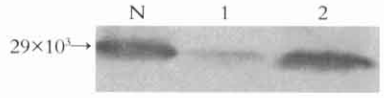


M: 标准; 1: pAVU6-siERp29; 2: pAVU6 +27; 3: IEC-siERp29; 4: IEC-pAVU6

图 2 转染细胞的 PCR 鉴定

2.3 ERp29 蛋白在 IEC-6 细胞中的抑制

免疫印迹方法检测转染细胞中 ERp29 蛋白的表达,结果显示:重组质粒 pAVU6-siERp29 转染 IEC-6 细胞后,ERp29 蛋白表达明显比其他细胞低,受到抑制,为正常的 28% ($P<0.01$, 图 3)。说明 ERp29 基因 RNA 干扰质粒在 IEC-6 细胞中发挥了作用。



N：正常 IEC-6；1：IEC-siERp29；2：IEC-pAVU6

图 3　免疫印迹检测 IEC-6 细胞中 ERp29 蛋白的表达

3　讨论

ERp29 是位于真核细胞内质网的可溶性蛋白，广泛表达于各种组织，在各种哺乳动物呈现高度保守，有高度同源性[5]。研究表明：ERp29 基因位于人 12 号染色体，其蛋白分子量为 29×10^3，含有定位于内质网的信号序列 KEEL，具有 2 个结构域[6]：N-端结构域与蛋白二硫键异构酶（PDI）的硫氧化蛋白结构域类似，C-端结构域为全螺旋结构，目前功能不明。许多研究证实在内质网应激条件下，ERp29 可与重要的内质网应激相关分子伴侣 Bip/GRP78 形成复合物相互作用[7]，参与内质网蛋白质折叠与运输，但少见有关 ERp29 在电离辐射中作用的研究报道。我们以往研究证实：肠上皮细胞受到电离辐射后，ERp29 表达显著升高[8-10]。因此，深入探讨 ERp29 分子在电离辐射中的作用，以及阐述其作用机制将对研究肠上皮损伤修复具有重要意义。

RNAi 是由双链 RNA 引发的转录后基因沉默机制[11]。它是一门新兴的基因阻断技术，可以简单、有效、特异地下调细胞中基因的表达，具有投入少，周期短，操作简单等优势[12]。本实验采用 RNAi 技术[13]，构建了 ERp29 基因 RNAi 表达质粒，稳定转染 IEC-6 细胞后，能够特异性抑制该基因表达，为功能研究提供了低表达 ERp29 的细胞平台。在 RNA 干扰实验中靶的选择是技术的关键之一，实验中我们根据靶序列选取的一般原则，结合生物信息学，选取了 1 条对 ERp29 基因有效且特异的 siRNA 序列，符合实验需要。电离辐射损伤修复的复杂性决定了研究 ERp29 在电离辐射中的作用应该有较长的观察时间，以排除慢修复的干扰。因此，在表达基因时我们采用真核表达载体 pAVU6 +27，该载体含有氨苄和 G418 筛选标记，带有的启动子 U6 具有明确的转录起点和终点，可用于基因的稳定表达。将 RNAi 表达质粒转染到 IEC-6 细胞，细胞培养过程中始终维持 G418 的筛选压力，获得的细胞是质粒整合进基因组 DNA 的单克隆细胞，可以持续、长期表达 siRNA，发挥 RNAi 效应。对筛选获得的细胞进行 PCR 检测，证实 RNAi 表达质粒存在于实验细胞中。为研究 RNAi 表达质粒对 IEC-6 细胞中 ERp29 的抑制效果，利用 ERp29 特异的单克隆抗体进行 Western blot 检测，结果显示 ERp29 表达明显降低，为正常细胞的 28%，说明 ERp29 基因 RNAi 表达质粒在 IEC-6 细胞中发挥了作用。

总之，本实验成功制备了抑制 ERp29 表达的 RNAi 质粒，并将其转染 IEC-6 细胞，G418 筛选得到阳性克隆，Western blot 检测蛋白表达，其沉默效率为 72%，为深入研究该基因在电离辐射所致肠上皮损伤修复中的作用提供了新的实验基础。

参考文献：

[1] DEMMER J, ZHOU C, HUBBARD M J. Molecular cloning of ERp29, a novel and widely expressed resident of the endoplasmic reticulum [J]. FEBS Lett, 1997, 402(2-3): 145-150.

[2] HUBBARD M J, MCHUGH N J, CARNE D L. Isolation of ERp29, a novel endoplasmic reticulum protein, from rat enamel cells evidence for a unique role in secretory-protein synthesis[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(7): 1945-1957.

[3] ZHANG B, SU Y P, AI G P, *et al*. Differentially expressed proteins of gamma-ray irradiated mouse intestinal epithelial cells by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(12): 2726-2731.

[4] GOOD P D, KRIKOS A J, LI S X, *et al*. Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei[J]. Gene Ther, 1997, 4(1): 45-54.

[5] SARGSYAN E, BARYSHEV M, BACKLUND M, *et al*. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding a putative endoplasmic reticulum chaperone, ERp29[J]. Gene, 2002, 285(1-2): 127-139.

[6] LIEPINSH E, BARYSHEV M, SHARIPO A, *et al*. Thioredoxin fold as homodimerization module in the putative chaperone ERp29: NMR structures of the domains and experimental model of the 51 kDa dimer [J]. Structure (Camb), 2001, 9(6): 457-471.

[7] SARGSYAN E, BARYSHEV M, SZEKELY L, *et al*. Identification of ERp29, an endoplasmic reticulum lumenal protein, as a new member of the thyroglobulin folding complex[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 17009-17015.

[8] 章　波，粟永萍，艾国平. ERp29 基因的克隆及其在 IEC-6 细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(18)：1830-1832.

[9] BO Z, YONGPING S, FENGCHAO W, *et al*. Identification of differentially expressed proteins of gamma-ray irradiated rat intestinal epithelial IEC-6 cells by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry[J]. Proteomics, 2005,5(2): 426-432.

[10] 章　波，粟永萍，艾国平，等. γ 射线照射前后 IEC-6 细胞蛋白质组的差异分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25(24)：2157-2160.

[11] HUTVAGNER G. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation[J]. FEBS Lett, 2005, 579(26): 5850-5857.

[12] MEISTER G, TUSCHL T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA[J]. Nature, 2004, 431(7006): 343-349.

[13] MELLO C C, CONTE D, Jr. Revealing the world of RNA interference[J]. Nature, 2004, 431(7006): 338-342.

（编辑　周　芳）