文章编号:1000-5404(2006)10-1007-03

论著

人CCL20基因特异性shRNA重组慢病毒表达载体的构建及测序

董征学[1],彭代智[1],刘 敬[1],周 新[1],田 易[1],李 芳[1],严 泉[1],林 恒[1],王 勇[1],周光前[2] ([1]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]贝尔法斯特女王大学癌症研究和细胞生物学中心,贝尔法斯特,英国 BT126BJ)

提 要:目的 利用RNA干扰技术,以人CCL20基因为靶基因,设计CCL20基因特异性的小干扰RNA(siRNA),构建其短发夹RNA(shRNA)重组慢病毒表达载体,并进行测序鉴定。**方法** 设计并合成人CCL20基因特异性的DNA寡核苷酸,连接到经*Spe* Ⅰ和*Sal* Ⅰ双酶切线性化的pHSER-dsRNA-GFP-SIN质粒上,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,筛选阳性菌落、扩增后提取质粒,进行DNA测序鉴定。**结果** 将合成的两对人CCL20基因特异性DNA寡核苷酸序列退火后,分别克隆到线性化的pHSER-dsRNA-GFP-SIN载体质粒上。在氨苄青霉素培养基条件下,筛选出相应的阳性菌落,经DNA测序鉴定确实为所需序列。**结论** 构建成功了2对人CCL20基因特异性shRNA重组慢病毒表达载体,可进一步用于干扰CCL20基因的mRNA转录,从而为制备CCL20基因表达抑制型的人角朊干细胞奠定基础。

关键词:RNA干扰;慢病毒表达载体;CCL20基因
中图法分类号:Q75;Q781;Q782 **文献标识码**:A

Construction and sequencing of recombinant lentiviral plasmid affecting human CCL20 gene by RNA interfering

DONG Zheng-xue[1], PENG Dai-zhi[1], LIU Jing[1], ZHOU Xin[1], TIAN Yi[1], LI Fang[1], YAN Quan[1], LIN Heng[1], WANG Yong[1], ZHOU Guang-qian[2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University Belfast, Belfast UK)

Abstract: Objective To design the small interference RNA (siRNA) specific to human CCL20 gene by RNA interfering technique, construct its recombinant lentiviral expression vectors, and identify these vectors by DNA sequencing. **Methods** According to Tuschl's principle, the siRNA was designed and converted into cDNA of shRNA (small hairpin RNA) of siRNA for CCL20 gene. The cDNA was synthesized and inserted into plasmid pHSER-dsRNA-GFP-SIN which was linearized by restriction endonucleases *Spe* Ⅰ and *Sal* Ⅰ. The recombinant plasmid was transformed into competent *E. coli*. DH5α cells. The positive recombinant colony was selected by ampicillin medium agar and identified by DNA sequencing. **Results** Two recombinant lentiviral plasmids of siRNA specific to CCL20 gene were constructed successfully. Their DNA sequence analysis completely coincided with their designed sequences. **Conclusion** Lentiviral vector-based siRNA expression plasmids against CCL20 gene have been successfully constructed and identified. They will be further used for interfering CCL20 mRNA transcription and lay the foundation for CCL20 gene modified human keratinocyte stem cells.

Key words: RNA interference; lentiviral vector; CCL20

人CCL20是近年来发现的一种CC亚族的趋化因子,经与配体CCR6的作用直接参与了树突状细胞、T细胞的定向迁移[1]。在皮肤组织中,CCL20主要由活化的角朊细胞产生,可强有力地诱导$CD34^+$细胞造血祖细胞来源的Langerhans细胞祖细胞向表皮内迁移[1,2]。因为作为供体的组织工程皮肤本身无Langerhans细胞,受体Langerhans细胞所介导的间接抗原提呈途径在启动组织工程皮肤移植物的排斥反应中发挥

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471679);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金资助项目(200306)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471679) and the Open Fund of the State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (200306)

作者简介:董征学(1969-),男,山东省沂水县人,硕士研究生,主治医师,主要从事皮肤创面覆盖物与免疫的实验方面的研究。电话:13594054690
通讯作者:彭代智,电话:(023)68754225,E-mail:dzpeng@yahoo.com

收稿日期:2006-03-17;修回日期:2006-04-10

着关键作用，因此，采用 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术下调人角朊细胞的 CCL20 基因表达，将有可能减少或消除受者的 Langerhans 细胞向组织工程皮肤移植物内迁移，削弱或阻断间接抗原提呈途径，从而减轻受体的排斥反应，延长组织工程皮肤移植物的存活时间。

本实验以人 CCL20 基因为靶基因，设计 CCL20 基因特异性的小干扰 RNA，合成其相应的短发夹结构 RNA（small hairpin RNA，shRNA），构建重组慢病毒表达载体，并进行 DNA 测序鉴定。该载体的成功构建将为进一步制备 CCL20 基因表达受抑制的角朊干细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和来源

慢病毒载体（lentiviral vector，LV）转移质粒 pHSER-dsRNA-GFP-SIN、装质粒 Lentipack 和包膜蛋白质粒 Lentienv 由英国贝尔法斯特女王大学周光前博士惠赠。限制性内切酶 *Spe* Ⅰ、*Sal* Ⅰ及 T_4 DNA 连接酶、核酸分子量标准 λ-*Hind* Ⅲ digest 和 DL-2000，胶回收试剂盒 Agarose Gel DNA Purification Kit V2.0 均为 TaKaRa 公司产品。E.Z.N.A®质粒小量抽提试剂盒为美国 Omega 公司产品。

1.2 人 CCL20 基因 shRNA 模板序列的设计

参考 GenBank 数据库人 CCL20 mRNA（NM_004591）序列，利用美国 Ambion 公司网站提供的 siRNA Target Finder（http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html），根据 RNAi 设计原则[3]设计 CCL20-siRNA。在 CCL20 基因起始密码子下游约 100 bp 起，分别选取外显子上 2 个 RNAi 靶点，命名为 CCL20-siRNA 1（靶序列：GCAACTTTGACTGCTGTCT，起始位置：81）和 CCL20-siRNA 2（靶序列：ATATATTGTGCGTCTCCTC，起始位置：247）。

以每个靶点为模板，根据碱基互补配对原则，设计寡核苷酸链；在互补的两条序列中间加入 Loop，序列为 TTCAAGAGA；序列的两端加上酶切位点，5′端加 *Spe* Ⅰ，3′端加上 *Sal* Ⅰ。每条寡核苷酸链长度均为 59 bp。CCL20-siRNA 1 靶点模板序列正义链：5′-CTAGTGCAACTTTGACTGCTGTCTTTCAAGAGAAGACAGCAGTCAAAGTTGCTTTTTTG-3′，反义链：5′-TCGACAAAAAAGCAACTTTGACTGCTGTCTTCTCTTGAAAGACAGCAGTCAAAGTTGCA-3′。CCL20-siRNA 2 靶点模板序列正义链：5′-CTAGTATATATTGTGCGTCTCCTCTTCAAGAGAGAGGAGACGCACAATATATTTTTTTG-3′，反义链：5′-TCGACAAAAAAATATATTGTGCGTCTCCTCTCTCTTGAAGAGGAGACGCACAATATATA-3′。以上寡核苷酸序列模板由北京赛百盛生物试剂公司化学合成。

寡核苷酸模板分别加无菌去离子水 33 μl 稀释，终浓度为 1 μg/μl；正义和反义模板序列各取 5 μl，去离子水定容至 100 μl，100 ℃加热 2 min，然后自然冷却至室温。退火 CCL20-siRNA 寡核苷酸进一步稀释，使终浓度达到 10 ng/μl。

1.3 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞的制备

氯化钙法制备，冻存于 -70 ℃备用。

1.4 扩增慢病毒载体质粒

无菌条件下，分别将滤纸片法保存的慢病毒载体质粒 pHSER-dsRNA-GFP-SIN、Lentipack 和 Lentienv 滴加质粒的滤纸部分剪碎，加入无菌去离子水 40 μl，充分振荡后，3 000 r/m 离心 5 min，取 5 μl 进行常规转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。挑取单克隆菌落接种于含氨苄青霉素 60 μg/ml 的 LB 液体培养基中扩增后，提取质粒。质粒抽提方法参照 Omega 公司质粒抽提试剂盒操作手册。

1.5 重组 pHSER-CCL20-siRNA-1 和 pHSER-CCL20-siRNA-2 构建

Spe Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切 pHSER-dsRNA-GFP-SIN 载体，使之线性化。双酶切产物用 0.8% 琼脂糖凝胶、120 V 电压电泳 35 min，长度为 9 kb 的片段用凝胶回收试剂盒（Agarose Gel DNA Purification Kit V2.0，TaKaRa 公司）回收，方法参照操作手册。将退火的 CCL20-siRNA 片段与回收的线性载体按摩尔比 3∶1 的比例用 T_4 DNA 连接酶进行连接，反应体系为 20 μl，16 ℃过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞后，接种于含氨苄青霉素 60 μg/ml 的 LB 平板，37 ℃，压力筛选 14～16 h。

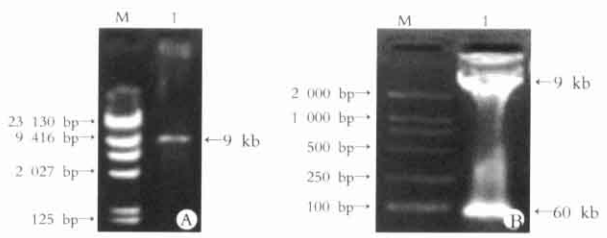
1.6 重组 pHSER-CCL20-siRNA1 和 pHSER-CCL20-siRNA2 载体质粒测序鉴定

将扩增的重组载体质粒菌液加入 15% 无菌甘油，-70 ℃冰箱冻存。将可能含有重组载体质粒的菌液各取 1 ml 送上海生工公司测序。测序引物为 5′-CAGTGTCACTAGGCGGGAAC-3′。

2 结果

2.1 pHSER-dsRNA-GFP-SIN 载体质粒线性化、鉴定及纯化回收

载体质粒 pHSER-dsRNA-GFP-SIN 经 *Spe* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后，用 0.8% 琼脂糖凝胶，加入 0.2 μg 的酶切产物，120 V 电压电泳 35 min 后照相，仅见到 9 kb 条带，表明环状质粒已被切开（图 1A）。使用 1% 琼脂糖凝胶，加入 98.8 μg 的酶切产物，120 V 电压电泳 35 min，还可见到 60 bp 的小片段（图 1B）。



A：0.2 μg 酶切产物；M：DNA 标准 *Hind* Ⅲ消化的 λDNA；1：酶切产物。B：98.8 μg 酶切产物；M：DNA 标准 DL2000；1：酶切产物

图 1 双酶切载体质粒 pHSER-dsRNA-GFP-SIN 的电泳图

2.2　氨苄青霉素抗性筛选重组载体质粒

pHSER-CCL20-siRNA1、pHSER-CCL20-siRNA2 培养板上分别长出形态和大小基本一致细菌菌落(图 2)。



图 2　重组 pHSER-CCL20-siRNA 转化大肠杆菌 DH5α 后的阳性菌落

2.3　重组载体质粒测序鉴定

重组载体质粒由上海生工生物工程技术服务有限公司测序，测序结果均包含目的序列。

pHSER-CCL20-siRNA1 测序结果(下划线部分就是插入片断)：AAGTTCTGTATGAGACCACACTAGTGCAACTTTGACTGCTGTCTTTCAAGAGAAGACAGCAGTCAAAGTTGCTTTTTTGTCGACTGATCAATCG。

pHSER-CCL20-siRNA2 测序结果(下划线部分就是插入片断)：TATAAGTTCTGTATGAGACCACACTAGTATATATTGTGCGTCTCCTCTTCAAG AGAGAGGAGACGCACAATATATTTTTTTGTCGACTGATCAA。

3　讨论

及时有效地覆盖创面是治疗严重创(烧)伤皮肤缺损的重要措施之一。创(烧)伤后的大面积皮肤缺损造成自体皮源严重不足，异基因组织工程皮肤虽能及时覆盖创面，却因机体的免疫排斥反应而不能长期存活。Langerhans 细胞是引起皮肤移植排斥反应的启动细胞，而 CCL20 在招募 Langerhans 祖细胞向表皮迁移过程中起着至关重要的作用。由受体 Langerhans 细胞所介导的间接抗原提呈在启动组织工程皮肤移植物的排斥反应中发挥着关键作用[4]。因此，制备 CCL20 基因表达受抑制的组织工程皮肤将可能减轻受体的排斥反应，延长移植物的存活时间。

RNAi 是一种序列特异性的转录后基因沉默现象。RNAi 技术具有稳定性好、阻断效率高、特异性强的特点[5]，现已成为操纵微生物和培养哺乳动物细胞基因表达的强有力工具[6]。siRNA 表达载体通过转染到细胞的 DNA 模板在胞内的转录得到相应的 siRNAs 发挥作用。与腺病毒载体相比，慢病毒载体(LV)不但能够感染分裂细胞，而且可感染非分裂细胞[7]；逆转录病毒虽然能够感染非分裂细胞，但因生物安全性问题而使用受到限制，而本实验所用的 LV 转移质粒却具有良好的生物安全性[8]。

制备异基因组织工程皮肤的一个关键因素是植入足够数量的、低免疫原性的、具有再生活力的种子细胞。人角朊干细胞是皮肤组织的特异性干细胞，具有极大的增殖潜力和无限的自我更新能力。可见，人角朊干细胞是组织工程皮肤种子细胞的良好来源[9]。采用 RNAi 技术修饰人角朊干细胞的 CCL20 基因以降低其免疫原性是一个值得探索的方向。siRNA 慢病毒载体适宜于转染属于非分裂细胞的人角朊干细胞，并且能达到长期表达的目的。本实验按照 GenBank 中报告的人 CCL20 基因核苷酸序列，根据 siRNA 设计原则设计出了 2 对 CCL20 基因的 shRNA，并成功克隆至慢病毒载体质粒，成功地构建了两个与设计序列完全一致的人 CCL20 基因特异性 shRNA 重组慢病毒表达载体，从而为制备基因修饰的人角朊干细胞奠定了基础。

参考文献：

[1] 岳海岭，彭代智. CCL20 的结构与功能[J]. 免疫学杂志，2004，20(增刊 1)：S100 - S102.

[2] VANBERVLIET B，HOMEY B，DURAND I，*et al*. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment：possible role at inflamed epithelial surfaces [J]. Eur J Immunol，2002，32(1)：231 - 242.

[3] TUSCHL T，ZAMORE P D，LEHMANN R，*et al*. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro [J]. Genes Dev，1999，13(24)：3191 - 3197.

[4] MHASHILKAR A M，DOEBIS C，SEIFERT M，*et al*. Intrabody-mediated phenotypic knockout of major histocompatibility complex class I expression in human and monkey cell lines and in primary human keratinocytes [J]. Gene Ther，2002，9(5)：307 - 319.

[5] ELBASHIR S M，HARBORTH J，LENDECKEL W，*et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. Nature，2001，411(6836)：494 - 498.

[6] HEMANN M T，FRIDMAN J S，ZILFOU J T，*et al*. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*[J]. Nat Genet，2003，33(3)：396 - 400.

[7] RUBINSON D A，DILLON C P，KWIATKOWSKI A V，*et al*. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells，stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. Nat Genet，2003，33(3)：401 - 406.

[8] TOTSUGAWA T，KOBAYASHI N，MARUYAMA M，*et al*. Lentiviral Vector：a useful tool for transduction of human liver endothelial cells [J]. ASAIO J，2003，49(6)：635 - 640.

[9] LI A，POULIOT N，REDVERS R，*et al*. Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny [J]. J Clin Invest，2004，113(3)：390 - 400.

(编辑　汪勤俭)