论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0900-03

iASPP特异性RNAi表达载体的构建及其干扰效果鉴定

辛海明,刘泽军,陈 杰,王 刚 (第三军医大学西南医院国际合作实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建iASPP基因的RNAi真核表达载体PGCsilencer™H1/Neo/GFP/RNAi,并观察其转染白血病细胞株Jurkat前后iASPP的表达变化以及其对细胞凋亡的影响。**方法** 根据GenBank中iASPP的序列,设计特异性siRNA序列,将模板序列克隆至PGCsilencer™ H1/Neo/GFP质粒中,测序鉴定后,用脂质体将重组子转染至Jurkat细胞中,用RT-PCR方法检测iASPP的表达,用流式细胞仪检测细胞凋亡的变化。**结果** 经测序,模板序列与设计序列完全正确,RT-PCR检测Jurkat细胞中iASPP表达在转染干扰质粒后有明显的下降,转染后Jurkat细胞凋亡由11.81%增加到33.15%。**结论** 成功构建了iASPP基因的RNAi真核表达载体,且其对白血病细胞有一定的干扰效果,为下一步探讨iASPP对肿瘤细胞中p53的抑癌作用机制奠定了基础。

关键词:ASPP;质粒;RNAi

中图法分类号:R394-33;R394.3;R73-36 **文献标识码**:A

Construction and effect identification of RNAi eukaryotic expression vectors of iASPP

XIN Hai-ming, LIU Ze-jun, CHEN Jie, WANG Gang (Laboratory of International Cooperation, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the RNAi eukaryotic vector of inhibitory member of the ASPP family (iASPP) gene and observe the interfering effect in Jurkat cell line after the vector transfection. **Methods** The specific siRNA sequence was designed according to the iASPP sequence in GenBank. The sequence was cloned into PGCsilencer™ H1/Neo/GFP and then sequence analysis was performed. The recombinant plasmid was transfected into Jurkat cell by liposome. The iASPP expression was analyzed by RT-PCR and cell apoptosis was detected by FCM. **Results** The sequence of templet and specific siRNA was correct by sequence analysis. The iASPP expression in Jurkat cells decreased and the apoptosis rate increased from 11.81% to 33.15% after RNAi transfection. **Conclusion** The RNAi eukaryotic vector PGCsilencer™H1/Neo/GFP/RNAi was constructed successfully. The RNAi inhibitory effect on the Jurkat cells is confirmed. The successful construction of iASPP RNAi makes it possible to further study the interaction between iASPP and p53.

Key words: ASPP; plasmid; RNAi

p53是重要的抑癌基因之一。新发现的ASPP(apoptosis stimulating protein of p53)家族是能特异性地调节p53抑癌功能的蛋白质[1]。其中iASPP(inhibitory member of the ASPP family)与p53结合能干扰p53的细胞凋亡能力,因此是p53的重要抑制蛋白[2,3]。近期的研究表明iASPP在多种肿瘤细胞中表达显著升高[4,5],提示通过抑制肿瘤细胞中iASPP基因的过表达,解除其对p53的干扰作用,从而恢复p53的抑癌功能,可能是一个新的有效的肿瘤治疗策略和方向。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是目前最有效的基因沉默技术,能特异性抑制靶基因的转录,进而下调相应蛋白水平及功能[6]。本研究通过构建全长iASPP基因的siRNA(small interfere RNA)真核表达载体,观测其对iASPP基因的沉默作用,探讨应用RNA干扰调控p53的可能性,探索促进肿瘤治疗的新策略,为进一步实验提供技术手段。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30428013,30470675)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30428013, 30470675)

作者简介:辛海明(1978-),男,江西省鹰潭市人,硕士研究生,医师,主要从事基因表达及DNA甲基化方面的研究。电话(023)68754691

通讯作者:刘泽军,电话:(023)68754691, E-mail: zejunliu@hotmail.com

收稿日期:2005-10-17;**修回日期**:2006-01-18

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株和质粒　　含 H1 启动子的带 GFP 的转录载体 PGCsilencer™H1/Neo/GFP 质粒购于 Genescript 公司。其中包括 RNAi 阴性对照 PGCsilencer™ H1/Neo/GFP/NON RNAi 质粒。Jurkat 细胞株由第三军医大学预防医学院卫生毒理教研室惠赠。

1.1.2　主要试剂　　Tripure RNA 分离试剂(Roche 公司)、RT-PCR 试剂盒(Takara 公司)、*Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ、T_4 DNA 连接酶(Takara 公司)、胶回收试剂盒(Omega 公司)、质粒抽提试剂盒(Omega 公司)、DMRIE(Invitrogen 公司)、PMA(Sigma 公司)、PHA(Sigma 公司)、RPMI1640(Gibco 公司)、Annexin V FITC Kit(晶美公司)

1.2　方法

1.2.1　靶位的选择及小干扰 RNA(SiRNA)的设计　　根据 GenBank 中 iASPP 基因序列,利用 SiRNA 设计工具"SiRNA sequenceselector"设计针对 iASPP(AJ888472)特异性 SiRNA 序列。靶位序列为:GCAGACAGCGAGCTATGAA,继而利用 BLAST 分析,未发现有同源序列。SiRNA 插入序列,上游限制位点为 *Bam*H Ⅰ,下游限制位点为 *Hind* Ⅲ,Loop 序列为 TTCAAGAGA。合成模板结构为:接头 1 + 正义序列 + 环状序列 + 反义序列 + 终止信号 + 接头 2。其正向为5′-TCCCGCAGACAGCGAGCTATGAATTCAAGAGATTCATAGCTCGCTGTCTGCTTTTTGGAT-3′反向为3′-GTCTGTCGCTCGATACTTAAGTTCTCTAAGTATCGAGCGACAGACGAAAAACCTATCGA-5′。

1.2.2　PGCsilencer™H1/Neo/GFP/RNAi 载体的构建与鉴定

①寡核苷酸片段退火形成双链:两条寡核苷酸的片段各 2 μl,1 × 退火 buffer46 μl。95 ℃ 5 min,70 ℃ 10 min,缓慢降至 30 ℃(> 1 h),维持 30 min,降至 4℃。②PGCsilencer™ H1/Neo/GFP 质粒酶切,回收线性化空载体。③目的片段与线性化空载体的连接。④将连接好的质粒转化大肠杆菌 DH5α,用含氨卞霉素的平板筛选,挑取阳性菌落送测序。

1.2.3　转染　　将 0.5 ml 低血清培养基加入 6 孔板中的 1 孔,每孔加 8 μl DMRIE-C 试剂,轻轻转动培养板混匀,室温孵育 15 min. 然后加入含 4 μg DNA 的 0.5 ml 低血清培养基,晃动混匀。室温孵育 15 ~ 45 min 以形成复合物。5% CO_2、37 ℃孵育 4 h 后,每孔加入 2 ml 含 15% FBS 的生长培养基。对 Jurkat 细胞,加入 PHA 和 PMA,使其终浓度分别为 1 μg/ml 和 50 ng/ml,以促进启动子活性和基因表达。转染 24 ~ 48 h 后分析基因的活性。

1.2.4　RT-PCR 检测 iASPP 的表达　　①设计 iASPP 特异性检测引物:根据 GenBank 中 iASPP 基因序列,利用 Primer Premier 5.0 设计,然后进行 BLAST 比对。上游引物 5′-TGAAGGAGATGAACGACCCG-3′,下引物 5′-GGCGCAGTCAGCATAACCC-3′。内参 β-actin:上游引物 5′-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3′,下游引物:5′-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3′。②按 Tipure 说明书进行提取总 RNA,然后按 RT-PCR 操作说明进行。iASPP 基因 PCR 扩增参数如下:94 ℃,5 min→94 ℃,30 s→54 ℃,30 s→72 ℃,40 s。30 个循环,72 ℃,8 min。β-actin 扩增参数如下:94 ℃,5 min→94 ℃,30 s→55 ℃,40 s→72 ℃,45 s。26 个循环,72 ℃,8 min。

1.2.5　流式细胞仪检测细胞凋亡　　①调整待测细胞浓度至 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml,取 1 ml 细胞,1 000 r/min, 4 ℃离心 10 min,弃上清。②加入 1 ml 预冷的 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,1 000 r/min, 4 ℃离心10 min,弃上清,重复两次。③将细胞重悬于 200 μl 结合缓冲液,加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI,轻轻混匀。避光室温反应 15 min 或 4 ℃反应 30 min。④加入300 μl结合缓冲液,在 1 h 内上机检测。

2　结果

2.1　PGCsilencer™ H1/Neo/GFP/RNAi 表达载体的构建

2.1.1　构建 PGCsilencer™H1/Neo/GFP/RNAi 质粒　　本研究根据 GenBank 提供的 iaspp 基因序列,设计合成发卡样 iaspp siRNA 序列,采用 DNA 重组技术,将互补的双链 iaspp siRNA 定向亚克隆入 PGCsilencer™H1/Neo/GFP 真核表达载体,连接转化,获得 PGCsilencer™H 1/Neo/GFP/RNAi 真核表达质粒。

2.1.2　PGCsilencer™H1/Neo/GFP/RNAi 质粒的鉴定　　取 PGCsilencer™H 1/Neo/GFP/RNAi 克隆质粒菌种送上海鼎安测序鉴定,结果与插入的发卡样序列完全正确。

2.2　PGCsilencer™ H1/Neo/GFP/RNAi 质粒的转染

本研究选择了针对白血病细胞株转染效率较高的脂质体 DMRIE-C。在 PHA 和 PMA 的作用下,将干扰质粒和脂质体混匀形成复合体,然后转染到细胞中。24 h 后荧光显微镜下观察转染效率(图 1)。

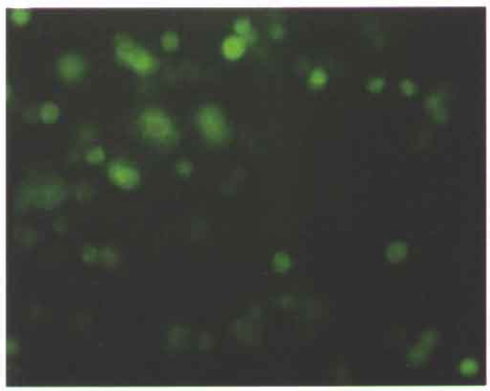
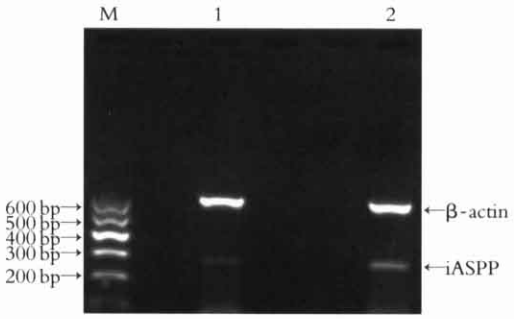


图 1　观察质粒转染图　(荧光显微镜 ×100)

2.3　RT-PCR 检测转染前后变化

用 RT-PCR 方法检测 iASPP 在 Jurkat 细胞株干扰前后的表达,1.5% 的琼脂糖凝胶电泳显示结果见图 2。干扰后的 iASPP 电泳条带亮度明显低于干扰前的电泳条带的亮度。说明干扰质粒达到一定的干扰 iASPP 表达的效果。

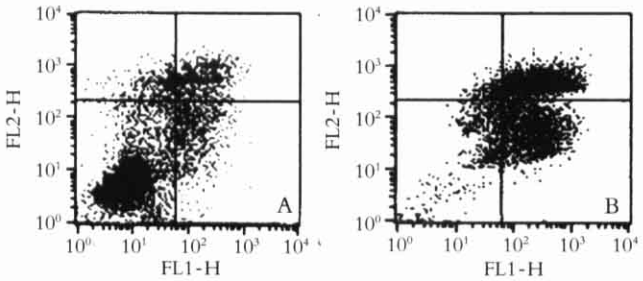


M：标准；1：转染后；2：转染前

图2 转染前后 Jurkat 细胞 iASPP 表达水平

2.4 流式细胞仪检测转染前后细胞凋亡的变化

用流式细胞仪检测转染前后 Jurkat 细胞的凋亡变化(图3)，由图中可以看出细胞凋亡率由转染前的 11.81% 增加到转染后的 33.15%，说明干扰质粒降低了 iASPP 的表达，从而减少了 iASPP 对 p53 的抑制作用，促进了细胞凋亡的增加。



A：转染前；B：转染后

图3 流式细胞仪检测转染前后 Jurkat 细胞凋亡状况

3 讨论

ASPP 家族成员的抑癌基因或癌基因的作用主要是通过特异性的影响 p53 的细胞凋亡功能来实现的。细胞在受到基因损伤的时候，p53 基因的表达会大量增加，产生 P53 蛋白质，该蛋白质可以停滞细胞复制来争取修复 DNA 的时间，或者直接让损伤细胞死亡(凋亡)，因此可以抑制不正常细胞增生，即可以抑制癌细胞的增生。ASPP 家族的发现圆满的解释了 p53 是如何决定细胞是要停止复制或者是进入凋亡程序的。在缺乏 ASPP 时，p53 倾向于与停滞基因的启动子结合，而在 ASPP 存在时，ASPP 就会首先与 p53 结合，引起 p53 与启动子的亲和性发生改变，这个 ASPP-p53 复合物倾向于与凋亡基因的启动子结合，从而使基因受损细胞发生程序性死亡[7]。iASPP 可与 ASPP1 和 ASPP2 竞争与 p53 的结合位点，从而影响 ASPP 与 p53 的正常结合，起到抑制 p53 的诱导细胞凋亡能力的作用[2]。

本实验选择了 PGCsilencer™H 1/Neo/GFP 质粒，其带有抗性筛选基因 Neo 和绿色荧光蛋白 GFP 指示基因。这样可以更好的对转染效率进行监测以及以后进一步筛选出稳定表达的细胞株。在转染时选择了对白血病细胞具有较高转染效率的脂质体 DMRIE-C，同时加入 PHA 和 PMA 对细胞进行刺激，从而增强启动子活性和基因表达。

以前曾有多个不同长度序列的 iASPP 克隆序列被不同的研究者使用，本实验是针对全长 iASPP 序列进行研究[8]，实验成功构建了全长 iASPP 的干扰质粒 PGCsilencer™H 1/Neo/ GFP/RNAi。然后转染到白血病细胞中，运用 RT-PCR 法观察到细胞株 Jurkat 中 iASPP 的表达含量有明显的下降，流式细胞仪检测到 Jurkat 细胞凋亡率由转染前的 11.81 % 增加到转染后的 33.15 %，表明具有一定的干扰效果。本实验显示瞬时转染对悬浮生长的白血病细胞转染效率较低。为解决转染效率问题，在下一步实验中拟通过构建病毒载体，筛选出稳定表达的细胞株，观察其对 iASPP 基因表达调控的时间效应和剂量效应关系。同时多选几个序列进行筛选，以获得抑制作用更强的序列，并进一步从体内外实验评价 SiRNA 表达载体对 iASPP 基因的抑制效应，为以后通过对 iASPP 的调节从而恢复肿瘤细胞中 p53 的抑癌功能提供可行的手段，从而为开发基于 RNAi 的抗肿瘤药物提供新策略。

参考文献：

[1] LIU Z J, LU X, ZHONG S. ASPP-Apoptotic specific regulator of p53 [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1756(1): 77 - 80.

[2] BERGAMASCHI D, SAMUELS Y, O'NEIL N J, *et al*. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human [J]. Nat Genet, 2003, 33(2): 162 - 167.

[3] 辛海明，刘泽军. iASPP—抑癌基因家族中的癌基因[J]. 生命的化学, 2005, 25(4): 300 - 301.

[4] LIU Z J, ZHANG Y, ZHANG X B, *et al*. Abnormal mRNA expression of ASPP members in leukemia cell lines[J]. Leukemia, 2004, 18(4): 880.

[5] ZHANG X, WANG M, ZHOU C, *et al*. The expression of iASPP in acute leukemias[J]. Leuk Res, 2005, 29(2): 179 - 183.

[6] HANNON G J. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418 (6894): 244 - 251.

[7] SAMUELS LEV Y, O'CONNOR D J, BERGAMASCHI D, *et al*. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53 [J]. Mol Cell, 2001, 8(4): 781 - 794.

[8] SLEE E A, GILLOTIN S, BERGAMASCHI D, *et al*. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization[J]. Oncogene, 2004, 23(56): 9007 - 9016.

(编辑 王 红)