文章编号:1000-5404(2009)07-0641-03

技术方法

新基因 HA117 最佳 siRNA 的筛选及重组腺病毒构建

郑改焕,金先庆,罗 庆,郭玉霞,宿玉玺,徐酉华 (重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400014)

摘 要:目的 验证 pSOS-HUS 筛选目的基因最佳 siRNA 的效果,应用 pSOS-HUS 筛选新基因 HA117 最佳 siRNA,构建携带 HA117 基因最佳 siRNA 转录模板 DNA 的重组腺病毒。**方法** 构建携带 HA117 基因及其 siRNA 模板 DNA 链的双克隆质粒。把双克隆质粒分别转染 293 细胞,通过镜下观察、流式细胞仪检测比较绿色荧光表达强度,RT-PCR 检测 HA117 基因 mRNA 表达,筛选鉴定基因 HA117 最佳 siRNA。构建 HA117 基因 RNA 干扰重组腺病毒。**结果** 从 5 对模板 DNA 链中筛选出最有效片段 HAi5,构建携带 HAi5 的重组腺病毒。**结论** 载体 pSOS-HUS 可快捷有效地筛选目的基因的最佳 siRNA;在 5 对模板 DNA 中,HAi5 转录的 siRNA 对新基因 HA117 干扰效果最强;成功构建携带 HAi5 的重组腺病毒。

肿瘤细胞多药耐药的产生是多基因参与调控的复杂过程。为寻找参与肿瘤细胞多药耐药调节的相关基因,我们在前期的研究中建立了多药耐药细胞株 HL-60/MDR,以抑制消减杂交结合基因芯片的方法,筛选并克隆出了在耐药的 HL60/MDR 细胞中表达明显增高,在野生型 HL60 细胞中不表达的一个新基因 HA117(基因库登陆号 AY230154)[1,2]。本研究采用质粒 pSOS-HUS 对新基因 HA117 最佳 siRNA 转录模板 DNA 链进行筛选,并以筛选出的最佳转录模板 DNA 链,构建靶向 RNA 干扰新基因 HA117 的重组腺病毒,为进一步以 RNA 干扰(RNAi)技术研究新 HA117 基因功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和实验相关细胞株 筛选质粒 pSOS-HUS 及携带红色荧光蛋白 RFP 的腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS 由课题组与美国芝加哥大学分子肿瘤实验室合作开发,BJ5183 菌株及其衍生物 Adeasy-1 细胞、腺病毒基因组质粒 pAdeasy-1、包装细胞 293 细胞由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室 TONG-CHUAN HE 教授惠赠,携带 HA117 基因的质粒 pAdtrack-HA117 及大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。

1.1.2 实验相关试剂 限制性内切酶,T_4 连接酶,质粒 DNA 提取、回收、纯化试剂盒及 RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,脂质体 Lipofectamine 及 RNA 提取试剂盒购于 Invitrogen 公司,HA117 基因 siRNA 模板 DNA 链及 PCR 引物由 TaKaRa 公司合成。DNA 测序委托重庆医科大学感染病实验室进行。优质胎牛血清、1640 培养基为 Gibco 公司产品。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30471985)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30471985)

作者简介:郑改焕,女,河南省濮阳市人,博士研究生,主要从事血液肿瘤基础和临床方面的研究。E-mail: gaihuan168@163.com
通信作者:徐酉华,电话:(023)63631890,E-mail:xuyouhua0504@163.com

收稿日期:2008-07-02;**修回日期**:2008-07-31

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒 pSOS-HUS-HA117 的制备 限制性内切酶 *Hind*Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ双酶切 pAdTrack-HA117 及 pSOS-HUS 质粒,DNA 酶切后胶回收目的基因 HA117 及 pSOS-HUS 载体并纯化,以 T_4 连接酶连接后转导感受态细菌 DH5α,挑选扩增转化后克隆,提取质粒 DNA 酶切鉴定,酶切鉴定正确后送测序鉴定。

1.2.2 HA117 基因 siRNA 转录模板 DNA 链的设计、合成 根据 siRNA 设计原则以及 HA117 基因全长 cDNA 序列,设计 HA117 基因的特异性插入片段序列,经 blast 比对,择优选择其中 5 对,并加上 pSOS-HUS 质粒 *Sfi* Ⅰ酶切后粘性末端互补序列,提交公司合成,分别命名为:HAi1 正义链 5′-aGCACCTGAGTACAGACAATtttt-3′,反义链 5′-aATTGTCTGTACTCAGGTGCtttt-3′。各对 HAi DNA 小写部分为 pSOS-HUS 质粒 *Sfi* Ⅰ酶切后粘性末端互补序列;HAi2 正义链 5′-aATACGGAGATACGACAGTAtttt-3′,反义链 5′-aTACTG TCGTATCTCCGTATtttt-3′;HAi3 正义链 5′-aCGACAGTATCAACATATCAtttt-3′,反义链 5′-aTGATATGTTGATACTGTCGtttt-3′;HAi4 正义链 5′-aTTATGGACCTGAGGCAGATtttt-3′,反义链 5′-aATCTGCCTCAGGTCCATAAttt-3′;HAi5 正义链 5′-aCGACAGTATCAACATATCAtttt-3′,反义链 5′-aTTCTCAGCTGGACCATCTGtttt-3′。

1.2.3 双克隆质粒的制备 *Sfi* Ⅰ酶切重组质粒 pSOS-HUS-HA117,T_4 连接酶分别连接 5 对模板 DNA 与酶切质粒后,转导感受态细菌 DH5α,挑选扩增转化后克隆,提取质粒 DNA 酶切鉴定,酶切鉴定正确后送测序鉴定。

1.2.4 脂质体介导双克隆质粒转染 293 细胞 分别提取重组质粒 pSOS-HUS-HA117 以及 5 个双克隆质粒 DNA 各 30 μl。分光光度仪测 $D(260)$ 值分别为 7.78、7.32、9.45、8.33、7.96 和 8.57。由转染所需质粒 DNA 均为 4 μg 计算,转染所需双克隆质粒 DNA 量分别为:10.5、11.0、8.5、9.7、10.0、9.6 μl。293 包装细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,置于 37 ℃、5% CO_2 的孵箱中培养。取对数生长期细胞传代至 6 组 50 ml 细胞培养瓶,使细胞密度达 50% ~60%,培养 14 h 后,以脂质体介导分别把重组质粒 pSOS-HUS-HA117 以及 5 个双克隆质粒 DNA 转染入 293 细胞。转染 24 h 后荧光显微镜观察及流式细胞仪检测比较 GFP 表达强度。

1.2.5 RT-PCR 检测转染 293 细胞 HA117 基因 mRNA 表达 脂质体介导把重组质粒 pSOS-HUS-HA117 及 5 个双克隆质

粒分别转染6组293细胞，转染后24 h收集细胞，提取总RNA，进行RT-PCR扩增。内参β-actin上游引物：5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′，下游引物：5′-AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT-3′；目的基因上游引物：5′-CAGAGTCAGGGACTTCAGCCTTAT-3′，下游引物：5′-CTGTTTCCTTCTCACTCCCAACCA-3′；扩增条件：94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，68 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共35个循环 72 ℃ 7 min。扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳，紫外投射仪观察。

1.2.6 携带HA117基因最佳siRNA模板DNA链的重组腺病毒制备 *Sfi* Ⅰ酶切腺病毒穿梭质粒pSES-HUS后，以T_4连接酶与HAi连接，转导感受态细菌DH5α，挑选转化后阳性克隆pSES-HUS-HAi，酶切鉴定正确后送测序分析。*Pme* Ⅰ酶切pSES-HUS-HAi，转导入腺病毒同源骨架质粒BJ-Adeasy，经*Pac* Ⅰ酶切鉴定正确后，转导感受态细胞DH5α，进一步用*Pac* Ⅰ酶切鉴定。重组腺病毒质粒线性化后以脂质体介导转染293细胞包装，转染25～30 d，大部分细胞飘浮后收集细胞，干冰重复冻溶3次，收集含病毒的上清并感染293细胞，使重组腺病毒大量扩增。交互感染3轮后收获高滴度Ad-HAi5腺病毒，保存于－80 ℃待用[3]。

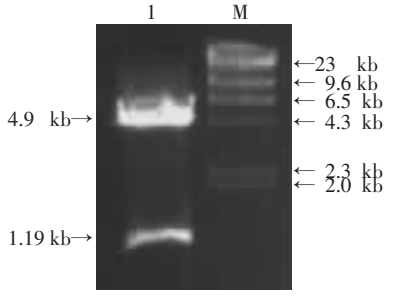
1.3 统计学处理

采用SPSS 12.0统计软件行χ^2分析。

2 结果

2.1 成功构建重组质粒pSOS-HUS-HA117

重组质粒pSOS-HUS-HA117构建成功后，*Hind* Ⅲ和*Kpn* Ⅰ双酶切鉴定可见4.9 kb大小pSOS-HUS质粒条带和1.19 kb大小HA117基因条带（图1）。

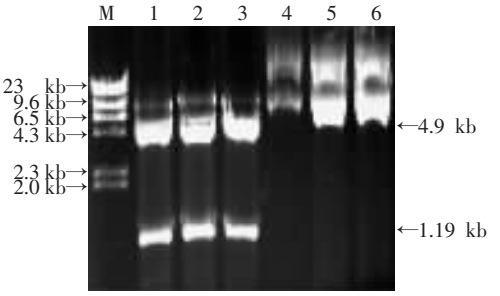


1：重组质粒pSOS-HUS-HA117；M：λ*Hind* 标准

图1 重组质粒双酶切电泳结果

2.2 成功构建5个双克隆质粒pSOS-HUS-HA117-HAi

质粒pSOS-HUS上U6与H1启动子间含有*Sfi* Ⅰ酶切位点，被*Sfi* Ⅰ酶切后此酶切位点随之被切下，克隆至此位点的各HAi片段不含*Sfi* Ⅰ酶切位点，即克隆成功后质粒不能被*Sfi* Ⅰ酶切开。*Sfi* Ⅰ酶切双克隆质粒pSOS-HUS-HA117-HAi1，可见未被切开螺旋DNA质粒电泳条带；以*Hind* Ⅲ和*Kpn* Ⅰ双酶切双克隆质粒pSOS-HUS-HA117-HAi1可见1.19 kb大小HA117基因条带及4.9 kb大小质粒DNA条带，表明双克隆质粒pSOS-HUS-HA117-HAi重组成功（图2）。其余4个双克隆质粒酶切鉴定同pSOS-HUS-HA117-HAi1。酶切鉴定后送测序鉴定，结果正确。以*Hind* Ⅲ和*Kpn* Ⅰ双酶切双克隆质粒pSOS-HUS-HA117-HAi1可见1.19 kb大小HA117基因条带及4.9 kb大小质粒DNA条带。



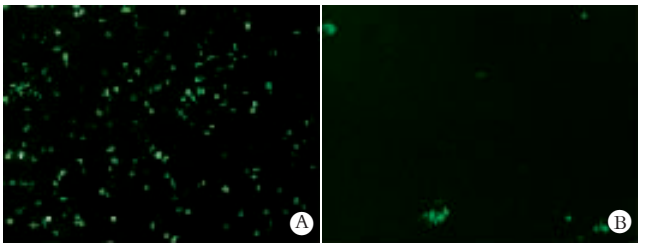
M：λ*Hind* Ⅲ标准；1－3：双克隆质粒*Hind* Ⅲ、*Kpn* Ⅰ双酶切；4：双克隆质粒*Sfi* Ⅰ单酶切；5、6：双克隆质粒未经酶切

图2 双克隆质粒酶切鉴定电泳结果

2.3 5对HA117基因siRNA干扰效果比较

2.3.1 转染293细胞绿色荧光蛋白（GFP）表达比较分析结果

转染293细胞24 h后经观察比较转染24 h后经观察比较，转染携带HAi5的293细胞绿色荧光表达最弱。回收各组细胞送流式细胞仪检测转染细胞表达GFP比例，数据经χ^2检验，转染携带有HAi5的双克隆质粒的293细胞表达GFP比例最低，与荧光显微镜下观察结果一致提示HAi5转录的siRNA对目的基因HA117的干扰效果最强（图3，表1）。



A：转染重组质粒pSOS-HUS-HA117的293细胞；B：转染双克隆质粒pSOS-HUS-HA117-HAi5的293细胞

图3 HAi5干扰效果荧光显微镜观察 （×100）

表1 转染293细胞GFP表达情况

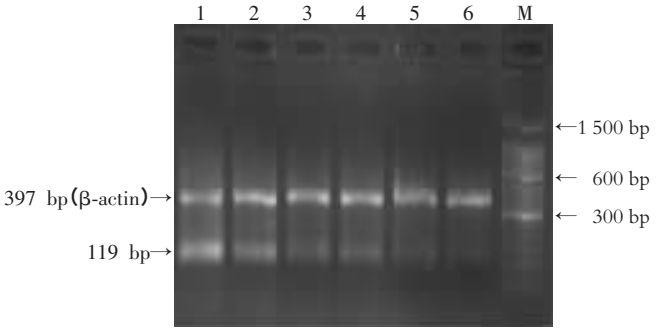
组别	表达荧光细胞数（$\times10^7$）	不表达荧光细胞数（$\times10^7$）	细胞总数（$\times10^7$）	表达荧光细胞百分比（%）
对照	1.72	0.88	2.60	66.23[a]
HAi1	1.65	1.69	3.34	49.57[a]
HAi2	0.79	1.26	2.05	38.73[a]
HAi3	0.23	2.52	2.75	8.49[a]
HAi4	0.60	3.30	3.90	15.42[a]
HAi5	0.03	2.35	2.38	1.36[a]

a：$P<0.05$，组间比较

2.3.2 转染293细胞HA117基因mRNA表达 RT-PCR检测比较6组转染细胞HA117基因mRNA表达，转染pSOS-HUS-HA117-HAi5组的293细胞HA117基因mRNA表达最低，提示HAi5转录的siRNA对HA117基因的干扰效果最强（图4）。

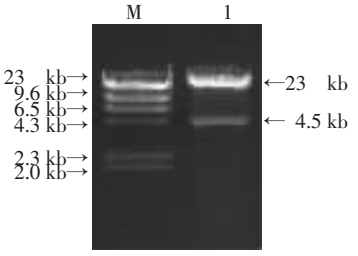
2.4 携带HAi5的重组腺病毒构建结果

重组腺病毒Ad-HAi5的酶切鉴定：HAi5与腺病毒穿梭质粒pSES-HUS重组后，与腺病毒同源骨架质粒Adeasy重组，重组成功后经*Pac* Ⅰ酶切后电泳，可见4.5 kb和23 kb大小2条DNA条带，表明同源重组成功（图5）。



1：转染 pSOS-HUS-HA117 的 293 细胞；2－6：依次为转染携带 HAi1、HAi2、HAi3、HAi4、HAi5 的双克隆质粒的 293 细胞；M：DNA 标准

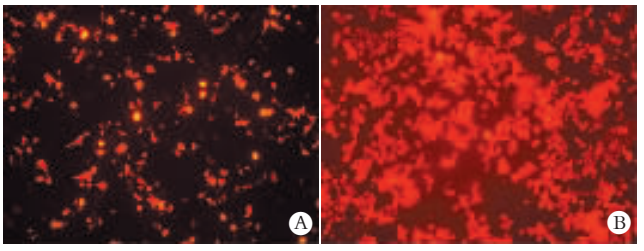
图 4　转染 293 细胞 HA117 基因 mRNA 表达



M：λ*Hind* Ⅲ 标准；1：Adeasy-HAi5

图 5　Adeasy-HAi5 经 *Pac* Ⅰ 酶切鉴定结果

重组腺病毒 Ad-HAi5 感染 293 包装细胞并收获高滴度病毒。pAdeasy-HAi5 转染 293 细胞，24 h 后可观察到红色荧光，并随时间荧光强度逐渐增强，同时细胞逐渐由贴壁状态转为悬浮（图 6）。



A：原代 48 h；B：原代 20 d

图 6　Ad-HAi5 经 293 细胞包装荧光显微镜观察　（×100）

3　讨论

RNAi 是 siRNA 介导的转录后水平的基因沉默，具有高特异性，高效性及可传递性等特点，是研究基因功能的有效方法[4]。目前 siRNA 的设计多采用软件设计或从既有文献中获得。软件设计出的多对目的基因 siRNA 干扰效果可能并不相同。因此，若能方便快捷地从多对 siRNA 链中筛选出对目的基因干扰效果最强的 siRNA，将对后续用 RNAi 成功沉默目的基因表达十分重要，对新基因的功能研究而言尤其如此。在本研究中采用的一种方便有效的 siRNA 筛选质粒 pSOS-HUS，是本课题组与美国芝加哥大学肿瘤研究所合作开发出一种表达小片段 RNA 从而达到 RNAi 的载体系统[5]。该载体包括 2 部分：一是需要被干扰的目的基因和 GFP 形成融合蛋白，另一部分在 U6 启动子及 H1 双启动子启动下，可转录出19～21 nt 的双链小片段 RNA（siRNA），此段 19～21 nt 序列如与目的基因一段完全互补，即可遵循 RNA 干涉的原理使该基因表达沉默。沉默的效果可以通过 GFP 表达的减弱或缺失从荧光显微镜下直接观测。

RNAi 中 siRNA 的获取可通过体外制备，如化学合成 siRNA、体外转录合成 siRNA 以及用 RNase Ⅲ 消化长片段 dsRNA 得到 siRNA，或体内合成如利用质粒或病毒载体表达 siRNA 及 PCR 方法制备 siRNA 的表达框架[6]。其中，腺病毒载体具有宿主范围广，对人致病性低及能有效进行增殖等优点，是目前应用最广泛的生物载体之一。以腺病毒载体在细胞内表达转录 siRNA 操作方便、成本低。本研究中采用的腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS 设计有双启动子 *Sfi* Ⅰ 酶切位点，把目的基因的 siRNA 转录模板 DNA 克隆入此酶切位点后即可转录为 siRNA。以此穿梭质粒与腺病毒骨架质粒构建为针对目的基因的 RNA 干扰重组腺病毒，经感染实验细胞后，可在较长时间内稳定表达目的基因靶向 siRNA，执行 RNAi 功能。

我们应用筛选质粒 pSOS-HUS，从 5 对 HA117 基因 siRNA 转录模板 DNA 片段中成功筛选出了干扰效果最强 HAi5，并以改造的腺病毒穿梭质粒 PSES-HUS 构建了携带 HAi5 的靶向干扰 HA117 基因的重组腺病毒。本研究为进一步以 RNA 干扰技术研究新基因 HA117 的功能奠定了基础，同时本研究结果表明，质粒 pSOS-HUS 是方便快捷的目的基因最佳 siRNA 转录模板 DNA 筛选系统。

关键词：HA117 基因；pSOS-HUS；RNA 干扰；多药耐药
中图法分类号：R394-33　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 付劲蓉，刘文励，周剑锋，等. 多药耐药相关基因 HV126 的电子克隆及在化疗前后白血病细胞中的表达[J]. 中华医学遗传学杂志，2005，22(2)：158－163.
[2] 付劲蓉，刘文励，周剑锋，等. 急性髓系白血病细胞多药耐药相关基因的筛选[J]. 华中科技大学学报：医学版，2005，34(6)：659－661，665.
[3] He T C，Zhou S，da-Costa L T，*et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1998，95(5)：2509－2514.
[4] Aagaard L，Rossi J J. RNAi therapeutics：principles，prospects and challenges[J]. Adv Drug Deliv Rev，2007，59(2－3)：75－86.
[5] Luo Q，Kang Q，Song W X，*et al*. Selection and validation of optimal siRNA target sites for RNAi-mediated gene silencing[J]. Gene，2007，395(1－2)：160－169.
[6] Grimm D，Kay M A. Therapeutic application of RNAi：is mRNA targeting finally ready for prime time? [J]. J Clin Invest，2007，117(12)：3633－3641.

（编辑　龙　亮）