基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0010-04

靶向大鼠 gnas 基因 shRNA 真核表达载体的构建与鉴定

田运娇[1],易岂建[1],米 青[1],李娅莎[2]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院心脏中心;2. 重庆医科大学儿科研究所中心实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建并鉴定靶向大鼠 gnas 基因的小干扰 RNA(short hairpin RNA,shRNA)真核表达载体。方法:根据大鼠 gnas 基因 mRNA 序列设计并合成 3 条 shRNA 特异性寡核苷酸片段,退火形成双链后克隆进入线性化 pGenesil-1.1 载体,并进行酶切鉴定和测序,同时构建针对大鼠 GAPDH 基因的阳性对照质粒和不具有基因同源性的非特异性基因的质粒做阴性对照。结果:经酶切和测序鉴定分析,构建的 shRNA 已成功插入载体,并且与设计序列完全相符。结论:成功构建了靶向大鼠 gnas 基因的 shRNA 真核表达载体,为后续研究 Gsα 蛋白在心力衰竭中作用的体内外实验奠定了基础。

【关键词】gnas 基因;RNA 干扰;质粒;心力衰竭

【中国图书分类法分类号】R318.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-07

Construction and identification of eukaryotic expression plasmids containing short hairpin RNA targeting to gnas gene

TIAN Yun-jiao, et al

(Heart Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To construct eukaryotic expression plasmids containing short hairpin RNA (shRNA) that target at rat gnas gene, which encodes the a-subunit of the Gs protein (Gsα). *Methods*: Three pairs of shRNAs that target at gnas gene were designed. After annealed, the inserts were ligated into the linearized pGenesil-1.1 plasmids. The eukaryotic expression plasmids were constructed and identified using restriction enzyme analysis and sequencing analysis. The GAPDH plasmid was constructed as a positive control and targeting no-isogeny gene was served as a negative control. *Results*: pGenesil-1.1 plasmids were confirmed by restriction enzyme analysis and sequencing analysis in accordance with design requiring. *Conclusion*: We successfully constructed 3 recombinant plasmids pGenesil-1.1-shRNA targeted to gnas gene, and it's helpful for further research the role of Gsα gene in heart failure by RNA interference technique.

【Key words】Gnas; RNA interference; Plasmid; Heart failure

gnas 基因编码的 Gsα 蛋白,是刺激性鸟苷酸结合蛋白(Gs 蛋白)的活性亚单位,在心脏 β 受体(β-adrenergic receptor, β-AR)信号转导途径中发挥关键作用[1],因此其量和活性在维持正常心功能状态中具有重要意义。研究发现慢性心力衰竭(Heart failure, HF)时,Gsα 蛋白活性和(或)含量下降,β-AR 信号通路下调[2,3],这一改变究竟是引起心功能恶化的始动因素,还是一种适应性的保护机制,目前仍是争论的焦点。通过 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术抑制或减少 Gsα 的表达,是探索这一改变在 HF 发生发展中作用的有效途径。本研究拟构建 gnas 基因靶向特异性的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)真核表达载体,为利用基因沉默技术阐明这一分子异常在 HF 中的意义奠定实验基础。

作者介绍:田运娇(1984-),女,硕士,研究方向:小儿心力衰竭。

通讯作者:易岂建,男,教授,E-mail: qjyi2003@yahoo.com.cn。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号:CSTC.2007BB5301)。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达载体 pGenesil-1.1 和大肠杆菌 DH5-α(武汉市晶赛生物工程技术有限公司);DL15000 Marker、DL2000 Marker、T4 DNA 连接酶、*Sac* Ⅰ(TaKaRa 公司);*Eco*31 Ⅰ(Fermentas);凝胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒(宁波中鼎生物技术有限公司);LB 培养基、琼脂粉(重庆惠而利生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 gnas 基因靶向 siRNA 序列的设计与合成 针对大鼠 gnas 基因 3 个 mRNA 亚型(GenBank 序列号 NM_019132.1、NM_001024823.2 和 NM_021845.3)的共有序列,根据 Reynolds 等[4-6]先后建立和补充的一系列小干扰 RNA(small interference RNA,siRNA)设计原理,设计 3 条 siRNA 寡核苷酸序列,

经 Blast 软件进行分析后，确定目标基因序列如下：gnas-1：CTACACCACTCCTGAGGAT；gnas-2：CAAGTACTTCATCCGGGAT；gnas-3：GTCACTACTGCTACCCTCA。另设计随机阴性对照序列 HK，该序列经过 Blast 比较，与人、鼠基因库无明显同源；大鼠 GAPDH 阳性对照序列由武汉市晶赛公司提供，是已知的具有高水平基因沉默作用的 siRNA。根据干扰序列设计并合成编码 shRNA 序列的 DNA 单链，如表 1、2 所示。

如表所示引物结构为：CACC+Sense+Loop+Antisense+ 终止信号 + *Sac* Ⅰ。因 pGenesil-1.1 载体线性化处理时用 *Eco*31 Ⅰ酶切，酶切后载体上的残基是 GGAG，CACC 是正好与残基互补的序列，因此 shRNA 序列前加 CACC 便于干扰片段连接到载体上。以上寡核苷 DNA 单链均由武汉市晶赛生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 单链目的基因片段的退火连接 各用 30 μl annealing buffer 溶解上述合成的 10D 单链目的基因片段，各取 2 μl(即 2 μl gnas1-A+2 μl gnas1-B)再加 16 μl annealing buffer 混匀，94℃退火 5 min，自然冷却至室温。各取 1 μl 退火产物加 99 μl H_2O 做 100 倍稀释，以便与线性化载体进行连接反应。

1.2.3 质粒 pGenesil-1.1 的线性化处理 在 10 μl 反应体系中，加质粒 pGenesil-1.1 8.5 μl、*Eco*31 Ⅰ 0.5 μl、10 × Q Buffer 1 μl，37℃水浴反应 5 h，1%琼脂糖凝胶回收大片段，即为线性化表达质粒。

1.2.4 稀释退火片段分别与线性化 pGenesil-1.1 质粒表达载体的连接 *gnas* 1、*gnas* 2 和 *gnas* 3 稀释退火片段分别与线性化载体 pGenesil-1.1 的连接，连接反应条件：稀释退火片段、线性化质粒载体、10 × Ligase Buffer 、T4 DNA Ligase 各 1 μl，加 H_2O 6 μl，22℃水浴反应过夜。

1.2.5 质粒转化、阳性克隆的筛选和纯化 各取 5 μl 过夜连接产物转化感受态细胞 DH5a，分别涂布于含 Kanar 抗性(终浓度为 30 mg/L)的 LB 平板上，37℃恒温箱培养过夜。从每个培养皿上各挑取 3 个单克隆菌落接种于 3 ml 含 Kanar 抗性的 LB 培养液中，37℃恒温摇床(250 r/min)培养过夜。

1.2.6 酶切鉴定和测序 小量提取质粒后，用 *Sac* Ⅰ做酶切鉴定，反应条件如下：取质粒 DNA 8.5 μl 、*Sac* Ⅰ 0.5 μl、10 × H Buffer 1 μl，37℃水浴反应 3 h；取 5 μl 样品在 1% 琼脂糖凝胶电泳 20 min 观察结果。为进一步验证克隆进入质粒载体序列的准确性，挑取克隆正确的重组质粒转化菌液送武汉市晶赛公司进行测序。

2 结 果

2.1 重组质粒构建模式

经酶切鉴定多克隆位点(MCS)如下：-*Mlu* Ⅰ-hU6 promoter-Insert DNA- *Sac* Ⅰ-。与既往的 pGenesil-1 载体相比，本载体 pGenesil-1.1 线性化后已无 *Eco*31 Ⅰ位点，因原始的 pGenesil-1.1 有 2 个 *Eco*31 Ⅰ酶切位点，线性化后，两个 *Eco*31 Ⅰ酶切位点的识别位点碱基已被切除。且该载体还加了腺病毒重组臂，需要时可以直接用于腺病毒重组实验。

2.2 载体质粒线性化处理

pGenesil-1.1 质粒线性化后 2 个片段分别为 5 149 bp、698 bp，如图所示，酶切后的片段均符合要求，可作下一步连接。

表 1 靶向 gnas 基因的 shRNA 序列

编号	序列
	A 5'-CACCGCTACACCACTCCTGAGGATTTCAAGACGATCCTCAGGAGTGGTGTAGTTTTTTG-3'
shRNA-gnas1	B 5'-AGCTCAAAAAACTACACCACTCCTGAGGATCGTCTTGAAATCCTCAGGAGTGGTGTAGC-3'
	序列位于 NM_019132.1 的 1133-1151、NM_021845.3 和 NM_001024823.2 的 2352-2370 之间
	A 5'-CACCGCAAGTACTTCATCCGGGATTTCAAGACGATCCCGGATGAAGTACTTGTTTTTTG-3'
shRNA-gnas2	B 5'-AGCTCAAAAAACAAGTACTTCATCCGGGATCGTCTTGAAATCCCGGATGAAGTACTTGC-3'
	序列位于 NM_019132.1 的 1193-1211、NM_021845.3 和 NM_001024823.2 的 2412-2430 之间
	A 5'-CACCGTCACTACTGCTACCCTCATTCAAGACGTGAGCGGTAGCAGTAGTGACTTTTTTG-3'
shRNA-gnas3	B 5'-AGCTCAAAAAAGTCACTACTGCTACCCTCACGTCTTGAATGAGGGTAGCAGTAGTGAC-3'
	序列位于 NM_019132.1 的 1249-1267、NM_021845.3 和 NM_001024823.2 的 2468-2486 之间

表 2 随机设计阴性对照序列

序列号	序列
HK	GACTTCATAAGGCGCATGC
shRNA-HK	A 5'-CACCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTG-3'
shRNA-HK	B 5'-AGCTCAAAAAAGACTTCATAAGGCGCATGCCGTCTTGAAGCATGCGCCTTATGAAGTC-3'
GAPDH	GTGGATATTGTTGCCATCA
shRNA-GAPDH	A 5'-CACCGTGGATATTGTTGCCATCATTCAAGACGTGATGGCAACAATATCCACTTTTTTG-3'
shRNA-GAPDH	B 5'-AGCTCAAAAAAGTGGATATTGTTGCCATCACGTCTTGAATGATGGCAACAATATCCAC-3'

2.3 重组质粒酶切鉴定

在插入的目的基因片段里，我们设计了一个 *Sac* Ⅰ的酶切位点，而质粒 pGenesil-1.1 本来就有一个 *Sac* Ⅰ的酶切位点，如若插入正确，质粒就能被 *Sac* Ⅰ酶切出 1 条约 916 bp 的 DNA 小带（图 3）。经酶切鉴定分析：质粒 HK、GAPDH、gnas1、gnas2、gnas3 均符合设计要求。

2.4 重组质粒 DNA 测序分析

送转化菌液 *gnas*1、*gnas*2 和 *gnas*3 去测序（测序过程由武汉市晶赛生物工程技术有限公司完成）。经测序证实重组质粒中插入的 shRNA 片段的碱基序列与设计序列完全一致（图 4～6）。

3 讨　论

HF 是各种心血管疾病发展的终末阶段。在 HF 初期，交感神经系统、肾素－血管紧张素系统等活性增高，具有重要代偿意义，而这些神经体液因子长期激活对心肌具有毒性作用，引起心肌 β 受体密度下调、心肌重构等病理生理改变，导致 HF 患者心脏功能进一步恶化，形成恶性循环。目前 HF 发生发展中的分子病理机制还未完全阐明。多项研究表明[2,3]，在 HF 患者及动物模型中可见 Gsα 活性和（或）含量下降，β-AR-cAMP 系统活性下调。这一变化是否就是 HF 时

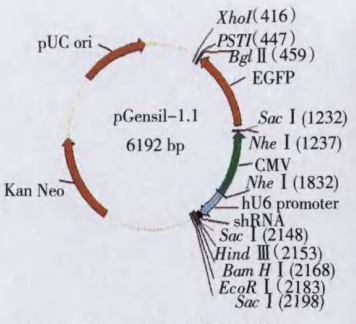
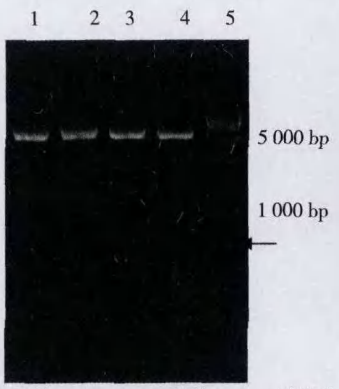


图 1　pGenesil-1.1 质粒结构图



注：1.原始 pGenesil-1.1 载体；2、3、4.线性化 pGenesil-1.1 质粒；5.DL 15 000 Marker

图 2　质粒 pGenesil-1.1 的 *Eco*31 Ⅰ酶切电泳图



注：M.DL 2000 Marker；1～5.HK、GAPDH、*gnas*1、*gnas*2、*gnas*3 重组质粒，*Sac* Ⅰ 酶切结果；6.非酶切质粒。

图 3　重组质粒酶切鉴定图

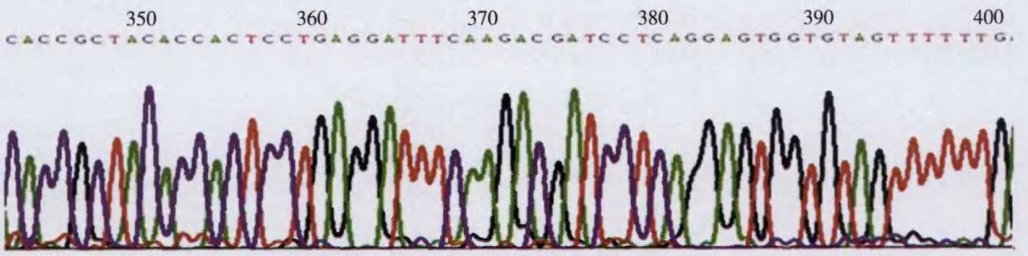


图 4　gnas1-shRNA 测序图谱

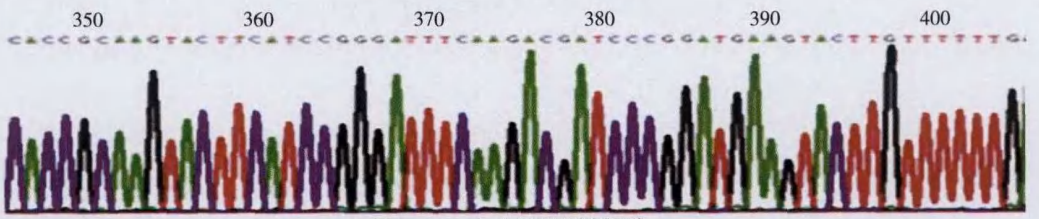


图 5　gnas2-shRNA 测序图谱

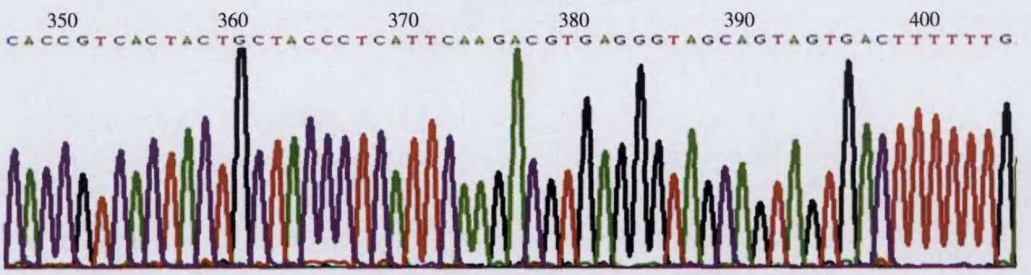


图 6　gnas3-shRNA 测序图谱

心功能恶化的原因呢？动物实验显示[7-9]，与野生型小鼠相比，过表达 Gsα 的小鼠，心率变异性增多，心肌细胞明显肥大，对去甲肾上腺素的敏感性增加，左室射血分数下降，心肌组织大量纤维化，予普萘洛尔治疗可阻断这些病理变化。因此推测，在交感神经系统持续过度激活的条件下，Gsα 的变化有可能是为减少 β 受体过度刺激引起多种损害而产生的一种适应性保护机制[10]。那么，将 RNA 干扰技术用于 Gsα 基因研究，对阐明其在 HF 发生发展中的作用提供更具说服力的证据，而构建靶向 gnas 基因的 shRNA 干扰质粒表达载体是该技术的关键。

在 RNAi 实验中，siRNA 序列的设计是关系实验成败的第一步。本实验的研究对象 gnas 基因，是一个有 3 个 mRNA 亚型的基因，如何设计对 3 个 mRNA 亚型均有较佳基因沉默效果的 siRNA 序列是首要问题。实验中先查找 mRNA 亚型间的共有序列，再对其进行自身特征分析和二级结构预测，最终确定了靶 siRNA 序列。主要遵循以下原则：①选择具有均衡碱基含量（即 G/C 含量在 50%左右）的序列作为候选序列[4]；②避免内部反向重复序列，以减小 siRNA 的有效作用浓度，提高 siRNA 干扰效率[5]；③尽量遵循 siRNA 正义链碱基偏爱性规律，即：正义链第 3、19 位碱基为 A、第 10 位碱基为 U、第 19 位碱基非 G 或 C；第 13 位碱基非 G[5]；④进行 Blast 同源性比对，确保 siRNA 序列的特异性，从而使其潜在脱靶效应减小到最低程度[5]。既往认为以 AA(N19)TT 为标准设计的 siRNA 有较高的沉默效率，但近来发现一些具有较小脱靶效应的 siRNA 序列不是以 AA 为起始的，所以不再以此作为主要选择标准[6]。

其次，在 shRNA 环序列的组成和载体的选择上，我们选用了在 shRNA 插入片段前有 hU6 启动子的载体 pgenesil-1.1，并在设计编码 shRNA 序列的 DNA 正义链和反义链中设计了 UUCAAGAGA 组成的 loop 结构，因研究认为含有 hU6 启动子的载体，对靶基因的沉默效果较好，沉默时间较久[11]，且当发夹环的组成为“UUCAAGAGA”和“UUGAUAUCCG”时具有较高的抑制效率[12]。

此外一个严谨的 RNAi 实验还应该设计定性检测的阳性对照和阴性对照，通过这些对照我们才可以确定 siRNA 介导的 RNAi 在使用的细胞系中是否有效，才能在 1 个新的细胞系中建立 RNAi 系统。本实验是国内 RNAi 实验中较早设立阳性对照体系的。

最后经酶切鉴定和 DNA 测序证实，3 个目的 shRNA 重组质粒及阴性对照和阳性对照均构建成功。本研究首次成功构建了 3 条 gnas 基因干扰重组质粒，为利用基因沉默技术研究 Gsα 基因在 HF 中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Wehrens X H T, Marks A R. Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease[J].Trends Biochem Sci,2003, 28(12): 671-678.

[2] Zolk O, Kouchi I, Schnabel P, et al. Heterotrimeric G proteins in heart disease[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2000,78:187-198.

[3] Lohse M J, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the Role of ?-Adrenergic Signaling in Heart Failure [J]?.Circ Res,2003,93: 896 - 906.

[4] Elbashir S .M, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic ma-mmalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods, 2002,26:199-213.

[5] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. Nat Biotechnol,2004,22(3):326-330.

[6] Naito Y, Yamada T, Kumiko U T, et al. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference[J]. Nucleic Acids Res,2004,32:124-129.

[7] Geng Y J, Ishikawa Y, Vatner D E, et al. Apoptosis of cardiac myocytes in Gsalpha transgenic mice[J]. Circ Res,1999,84:34-42.

[8] Vatner D E, Yang G P, Geng Y J, et al. Determinants of the cardiomyopathic phenotype in chimeric mice overexpressing cardiac gsalpha [J]. Circ Res,2000,86(7): 802-806.

[9] Hardt S E, Geng Y J, Montagne O, et al. Accelerated Cardiomyopathy in Mice With Overexpression of Cardiac Gsalpha and a Missense Mutation in the alpha-Myosin Heavy Chain[J]. Circulation,5,2002,105(5): 614-620.

[10] Vatner S F, Vatner D E, Homcy C J. β-adrenergic receptor signaling: An acute compensatory adjustment-inappropriate for the chronic stress of heart failure: Insights from Gs overexpression and other genetically engineered animal models [J]. Circ Res,2000,86:502- 506.

[11] Makinen P I, Koponen J K, Karkkainen A M, et al. Stable RNA interference:comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain [J]. Gene Med,2006,8:433-441.

[12] Wang L, Mu F Y. A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette[J]. Bioinformatics, 2004,20:1818-1820.

（责任编辑：冉明会）