基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0169-03

卡氏肺孢子菌主要表面糖蛋白上游保守序列基因 microRNA 表达载体的构建和鉴定

梅 林,姚云清,朱艳玲,骆晓练,李文桂,陈雅棠
(重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建和鉴定卡氏肺孢子菌(Pneumocystis carinii,PC)主要表面糖蛋白(Major surface glycoprotein,MSG)表达调控基因上游保守序列(Upstream conserved sequence,UCS)的 microRNA 表达载体,并在体外转染到 PC 中观察其对 PC 的抑制作用。方法:设计并人工合成针对 PC MSG-UCS 基因的 1 对 microRNA 序列并定向克隆到表达载体 pcDNA ™6.2-GW/EmGFPmiR 上,序列正确的载体用脂质体转染 PC 细胞,RT-PCR 检测其对 PC MSG-UCS 基因的抑制作用,扫描电镜观察 PC 的超微结构变化。结果:凝胶电泳和测序鉴定得到的产物与预期的目的基因一致,其在 mRNA 水平能明显抑制 PC 的表达并能破坏 PC 的超微结构。结论:PC MSG-UCS 基因的 microRNA 表达载体 pPC-UCSm 构建成功,并能在体外抑制 PC 的表达。

【关键词】卡氏肺孢子菌;主要表面糖蛋白上游保守序列;microRNA;表达载体
【中国图书分类法分类号】R730.23 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-19

Construction and identification of plasmid vector of microRNA on pneumocystis carinii major surface glycoprotein gene's upstream conserved sequence

MEI Lin, et al
(*Department of Infection Disease, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To constructive and identify plasmid vector of microRNA on pneumocystis carinii (PC) major surface glycoprotein (MSG) gen's upstream conserved sequence (UCS), then we researched its effect after the recombinant plasmid was transfected into PC. *Methods*: microRNA oligonucleotides targeting PC MSG-UCS gene were chemically synthesized and inserted into plasmid vector pcDNA? 6.2-GW/EmGFPmiR after annealing. then the recombinant plasmid was transfected into PC by liposome in vitro. The PC MSG-UCS mRNA expression was detected by RT-PCR and the fine structure of PC was observed by electronmicroscope. *Results*: Gel electrophoresis and DNA sequencing showed that the recombinant plasmid containing the correct and full microRNA oligonucleotide, and it could knock down the expression of mRNA in PC in vitro, it could also destroy PC. *Conclusion*: The microRNA plasmid, pPC-UCSm, was constructed successfully, and it could knock down the expression of PC in vitro.

【Key words】Pneumocystis carinii; MSG-UCS; MicroRNA; Expression plasmid

作为《Science》评出的 2002 年十大科学成就之首—RNA 干扰(RNA Interference,RNAi)已成为分子生物学和遗传学研究的一大热点,其中 siRNA 与 microRNA 均能下调目的基因的表达,但二者又有区别。microRNA 是一组长约 20 ~ 24 个核苷酸的内源性非编码 RNA 分子,它的作用机制是成熟的 microRNA 通过形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC),与靶 mRNA 完全或不完全匹配结合,诱导靶 mRNA 降解或阻遏转录后翻译,从而调节细胞增值、分化与凋亡。因为 microRNA 在基因表达调控中发挥了重要作用,而且它调节基因表达的功能与来源无关,所以它已成为重要的实验工具[1]。

作者介绍:梅 林(1982-),男,硕士,
研究方向:卡氏肺孢子菌肺炎的基因治疗。
通讯作者:姚云清,男,教授,E-mail:cqyaoyunqing@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30471512);重庆市自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2009BB5407)。

卡氏肺孢子菌(Pneumocystis carinii,PC)是一种机会性感染病原体,主要见于艾滋病(Acquired immune deficiency syndrome,AIDS)、胶原性疾病长期使用皮质类固醇激素、肿瘤病人大量使用细胞毒性药物等各种先天或后天免疫机制缺陷者,可引起免疫缺陷个体发生卡氏肺孢子菌肺炎(Pneumocystis carinii pneumonia,PCP),PCP 患者若不经治疗,病死率高达 100%[2]。近年来 PCP 的发病率呈明显的上升趋势,严重危害了人民群众的身体健康。目前 PCP 的治疗药物存在严重的毒副反应,因此迫切需要研究更有效的治疗措施。PC 细胞壁的主要组成成分是 MSG,它对 PCP 的发病起着十分重要关键的作用:研究发现 MSG-UCS 调控 MSG 基因的 mRNA 的转录以及与翻译后初始 MSG 向内质网转运的重要环节[3]。本实验研究构建针对 PC MSG-UCS 基因的 microRNA 表达载体,用以转染 PC 来阻断 MSG 基因的表达,从而杀灭 PC,最终治愈 PCP 患者。

1 材料和方法

1.1 主要材料

microRNA 表达载体 pcDNA ™6.2-GW/EmGFPmiR、载体构建试剂盒 BLOCK-iTTMPol Ⅱ miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP 及脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;大肠杆菌 TOP10 菌株由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室保存; 限制性内切酶 *Xba* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*EcoR* Ⅰ、T4DNA 连接酶、DNAmarker 购自 TakaRa 公司,柱离心式质粒抽提试剂盒、柱离心式胶回收试剂盒均购自上海华舜公司,高效感受态细胞制备试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;RT-PCR 试剂盒为 Promega 公司产品。microRNA oligo 及 PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 microRNA 表达载体的构建

1.2.1.1 microRNA 表达载体的设计 根据 PC MSG-UCS 基因序列(AF321555),针对其基因组结构编码区应用软件设计 microRNA oligo 序列,经 BLAST 查询,与其它 PC 基因和人类基因无同源性。microRNA oligo 序列为(共 64 bp):正义 5'-TGCTGAAATCTGGCCTATATGCGTCGGTTTTGGCCACTGACTGACCGACGCATAGGCCAGATTT-3',反义链 5'-CCTGAAATCTGGCCTATGCGTCGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCGACGCATATAGGCCAGATTTC-3',正义链 5'末端与反义链 3'末端分别含有限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ酶切位点。

1.2.1.2 单链 oligo 退火形成双链 将合成好的 oligo 用双蒸水溶解成 100 μmol/L,溶解液各取 5 μl 混匀,退火体系:100 μmol/L top strand oligo 5 μl、100 μmol/L bottom strand oligo 5 μl、10 × oligo annealing buffer 2 μl、双蒸水 8 μl,95℃加热 5 min,放置室温自然冷却 20 min,形成双链 oligo,于 -20℃保存备用。

1.2.1.3 定向克隆 反应体系如下:双链 oligo(10 nmol/L)4 μl、5 × ligation buffer 4 μl、表达载体 pcDNA ™6.2-GW/EmGFPmiR 2 μl 和 T4 DNA ligase(1 U/μl) 1 μl,双蒸水 9 μl;反应条件为室温下连接 30 min,置 -20℃保存。

1.2.1.4 重组质粒 pPC-UCSm 转化感受态 TOP10 和转化克隆挑选 转化分 2 组,取已经分装好的感受态细菌 2 管,先分别加入上述连接液和空载体 pcDNA ™6.2-GW/EmGFPmiR 各 10 μl;混匀后先在冰上放置 30 min,然后 42℃孵育 90 s,再次在冰上放置 20 min;每管加入 1 ml LB 培养液后于摇床上 37℃振荡培养 1 h;最后将其涂于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养平板上,37℃培养 16 h 后发现空载体质粒平板未见克隆生长,重组质粒 pPC-UCSm 平板有克隆生长,每管挑取较大的分散的单个克隆置于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃振荡培养约 14 h,质粒的提取采用上海华舜公司试剂盒,按说明书操作。

1.2.2 microRNA 表达重组质粒 pPC-UCSm 的鉴定

1.2.2.1 双酶切鉴定转化菌 用 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切重组质粒 pPC-UCSm 和空载体 pcDNA ™6.2-GW/EmGFPmiR,用空载体作对照。

1.2.2.2 测序鉴定转化菌 重组质粒由 Invitrogen 公司测序鉴定。

1.2.3 重组质粒 pPC-UCSm 抑制 PC 表达的体外实验

1.2.3.1 PC 的转染 将建模成功的 PCP 小鼠的肺组织用无菌术取出后分离及纯化 PC,转染试剂用脂质体 Lipofectamine 2000,按重组质粒 pPC-UCSm 4 μg,转染试剂 6 μl 的比例配置,空载体组加入 pcDNA ™6.2-GW/EmGFPmiR,空白对照组不转染。

1.2.3.2 RT-PCR 法检测转染后 PC mRNA 的表达 转染 48 h 后提取各孔的总 RNA 各 1 μl,使用上海华舜公司的小量植物(叶)总 RNA 快速抽提纯化试剂盒,按说明书操作。按照 ImProm-Ⅱ ™Reverse Transcription System 进行 cDNA 第一链的合成,PC MSG-UCS 基因的 PCR 引物 P1:5'-ATGAGGATTGCATTTTTTG-3',P2:5'-CAATCTCATCTTGTGCTCCT-3'。用于扩增内参照基因的引物 P3:5'-CTAGGATCCGAATCCTGCAAAAAAGTG-3',P4:5'-CGCGAATTCTTAAAGAATTATCCATACTCC-3'。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃30 s,循环 28 次,最后 72℃延伸 5 min。反应产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3.3 PC 的扫描电镜观察 转染 48 h 后取样做扫描电镜标本。

2 结 果

2.1 重组质粒酶切后凝胶电泳鉴定

用 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切重组质粒 pPC-UCSm 后产生 2 200 bp 与 425 bp 片断, 而空载体 pcDNA ™6.2-GW/EmGFPmiR 双酶切后产生 2 200 bp 与 361 bp 片断,凝胶电泳结果与预期相符,初步证明 microRNA olgio 已被插入到 pcDNA ™6.2-GW/EmGFPmiR 载体中,见图 1。

2.2 重组质粒的测序和鉴定

送检的重组质粒测序结果显示含有正确的目的寡核苷酸片段,与设计 DNA 片断序列完全一致,见图 2。

2.3 重组质粒对 PC MSG-UCS mRNA 的降解

用 RT-PCR 法检测 PC MSG-UCS mRNA 的表达发现,空白对照组与空载体组的 mRNA 水平比较无显著差异,转染 pPC-UCSm 组 PC MSG-UCS mRNA 的水平明显降低,与空白对照组及空载体组比较有显著差异,见表 1、图 3。由此表明重组质粒 pPC-UCSm 可以抑制 PC MSG-UCS mRNA 的表达。

2.4 重组质粒对 PC 超微结构破坏的扫描电镜观察

转染 48 h 后,电镜观察发现有的 PC 表膜出现凹陷性损害(见图 4)。有的 PC 出现大破损,内部结构暴露,见图 5。

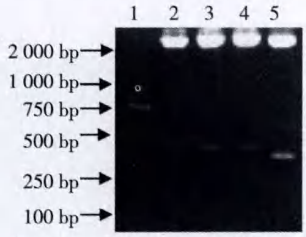
3 讨 论

microRNA 是一种广泛存在于真核生物中长约 20 ~ 24 个核苷酸的单链小分子 RNA,是一组不编码蛋白质的短序列 RNA,本身不具有开放阅读框(Open read frame,ORF),它与 siRNA 既有联系又有区别:microRNA 和 siRNA 都可以产生 RNAi 作用,但 microRNA 可以通过含有 RNA 聚合酶Ⅱ启动子的载体表达,因此可具有高度的细胞或组织特异性[4,5],而 siRNA 通常要在 RNA 聚合酶Ⅲ的启动下生成,该酶不具有细胞或组织特异性。细胞或组织特异性既是 microRNA 表达的主要特点,又是 microRNA 较之 siRNA 的优势。microRNA 表达的细胞或组织特异性提示人们 microRNA 可能决定细胞和组织的功能特异性,也可能参与了复杂的基因调控,从而对组织的发育起重要作用。

表 1 各组 PC MSG-UCS mRNA 抑制率

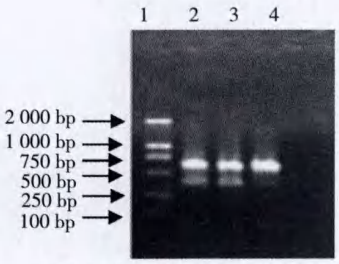
分组	n	PC MSG-UCS mRNA 光密度值与相应内参之比	抑制效率
空白对照组	3	0.351 6 ± 0.016 2	-
空载体组	3	0.340 5 ± 0.013 6	3.1%
pPC-UCSm 组	3	0.079 2 ± 0.012 9	77.47%*

注：与空白对照组相比 *P<0.05



1.marker(DL2000)；2～4.重组质粒 pPC-UCSm；5.空载体 pcDNA™6.2-GW/EmGFP- -miR

图 1 重组质粒 pPC-UCSm 双酶切后凝胶电泳成像



1. marker (DL2000)；2. 空载体组；3. 空白对照组；4. pPC-UCSm 组

图 3 microRNA 对 PC MSG -UCS mRNA 表达的抑制

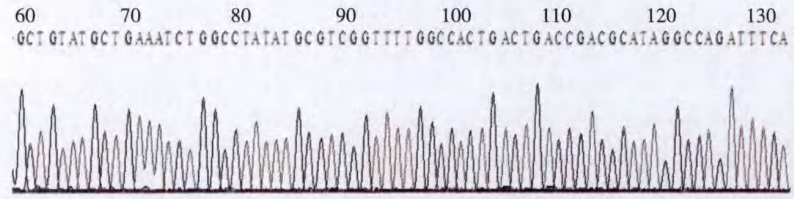


图 2 pPC-UCSm 测序结果



图 4 pPC-UCSm 组扫描电镜示 PC 表膜出现凹陷性损害（↑）×4 500

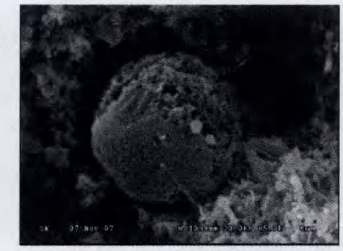


图 5 pPC-UCSm 组扫描电镜示 PC 出现大破损，内部结构暴露（↑）×5 000

中国自 1985 年首次报告艾滋病病例以来，艾滋病的流行呈快速上升趋势，近年来艾滋病病例报告数均以 30%以上的速度快速增长，已经日益成为一个严峻的公共安全问题。艾滋病病人最主要的死亡原因是机会性感染，其中 PC 感染肺部引起的 PCP 最为多见。目前 PCP 防治措施是采用甲氧苄胺嘧啶－磺胺甲基异恶唑或喷他咪等药物进行化疗，现首选磺胺类药物，但毒副反应较多，喷他脒疗效较肯定，但有严重的肝、肾毒性，并已有耐药病例报道。因此迫切需要研究高效低毒的防治措施。随着对 PC 的深入的研究，研究者发现在 PC 染色体亚端粒区的 MSG，MSG 定位于 PC 细胞壁，是一种富含甘露糖的糖蛋白，它既是 PC 细胞壁的主要组成成分，又积极参与了 PC 与宿主细胞间的免疫反应：MSG 不仅介导 PC 粘附宿主细胞—Ⅰ型肺泡上皮细胞，而且刺激宿主释放细胞因子加重肺组织的损伤，PC 还可以通过转换 MSG 的表达从而逃避宿主的免疫攻击。从上述研究结果我们可以明确地知道，如何控制 MSG 基因的表达已成为我们防治 PC 的关键环节。进一步研究发现，DNA 元件 UCS 调控 MSG 基因 mRNA 的转录以及翻译后初始 MSG 向内质网的转运等重要环节。UCS 高度保守，MSG 基因大家族仅由一个 UCS 调控，因此 UCS 是一个十分重要的 PC 基因治疗的靶点[6]。

谭燕等[7]成功构建了 PC MSG-UCS 的 siRNA 表达载体，并将其转染到 PC 中，证实沉默 MSG-UCS 基因表达、抑制 MSG 蛋白合成并杀灭 PC。骆晓梅等[8]成功构建了 Survivin 靶向的 microRNA 表达载体，并证实能抑制靶基因的表达。但国内尚无 microRNA 抑制 PC 基因表达、治疗 PCP 的报道。本实验设计并构建 PC MSG-UCS 基因的 microRNA 表达载体，通过双酶切和测序鉴定表明表达载体构建成功，并将其通过脂质体转染到 PC 中经 RT-PCR 检测和扫描电镜观察表明其能特异性的抑制 PC MSG-UCS 基因的表达并能破坏 PC 的超微结构，为 microRNA 抑制 PC 基因表达、治疗 PCP 的实验研究和临床研究打下了基础。

参 考 文 献

[1] Rajewsky N. MicroRNA target predictions in animals[J].Nat Genet,2006,38(s):s8-s13.

[2] 唐滢淦，姚云清，谭 燕，等.卡氏肺孢子胸腺嘧啶核苷酸合酶基因 siRNA 表达载体的构建和鉴定[J].重庆医科大学学报，2009,34(7):877-879.

[3] Keely S P,Linke M J,Cushion M T,et al. Pneumocystis murina MSG gene family and the structure of the locus associated with its transcription[J].Fungal Genet Biol,2007,44(9):905-919.

[4] Berezikov E,Cuppen E,Plasterk R H.Approaches to microRNA discovery[J]. Nat Genet,2006,38(s):s2-s7.

[5] Lee Y,Kim M,Han J,et al.MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase Ⅱ[J].EMBO J,2004,23(20):4051-4060.

[6] Schaffzin J K,Stringer J R.Expression of the Pneumocystis carinii major surface glycoprotein epitope is correlated with linkage of the cognate gene to the upstream conserved sequence locus[J].Microbiology,2004,150(Pt3):677-686.

[7] 谭 燕，姚云清，王莉妮，等.卡氏肺孢子主要表面糖蛋白 UCS 基因 siRNA 表达载体的构建和鉴定[J].重庆医科大学学报，2008,33(3):264-266.

[8] 骆晓梅，刘家云，苏明权，等.Survivin 靶向的 microRNA 表达载体的构建和鉴定[J].中国肿瘤生物治疗杂志，2007,14(2):187-189.

（责任编辑：冉明会）