基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0578-04

针对 IER3IP1 基因的 shRNA 真核表达载体的构建和鉴定

雷 燕,张 彦,汪永强

(重庆医科大学检验系临床生化教研室 临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建特异性针对 IER3IP1 基因的 shRNA (Short Hairpin RNA)的真核表达载体,观察对 IER3IP1 基因表达的沉默作用,筛选出抑制效果较好的干扰片段。方法:针对 IER3IP1 基因,设计合成 2 对特异性 DNA 片段以及 1 对无关序列的阴性对照 DNA 片断,将它们插入真核表达载体 pGenesil-1 中构建重组质粒,质粒转染 L02 正常肝脏细胞株后,以半定量 RT-PCR 法检测转染后 24、48、72 h IER3IP1 基因的抑制效果。结果:成功构建 2 个特异性针对 IER3IP1 的 shRNA 真核表达载体;所构建的载体中有 1 对能够特异性的降低 L02 细胞中 IER3IP1 的 mRNA 表达水平,且干扰效果显著,抑制率较高,与空载对照组比在转染后 24、48、72 h 抑制率分别为 64%、79%、69%。结论:设计构建的真核表达载体可以特异性干扰 IER3IP1 基因的表达,为进一步研究 IER3IP1 基因的功能奠定了基础。

【关键词】RNA 干扰;基因,IER3IP1

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-26

Construction and identification of eukaryotic expression vector of short hairpin RNA for IER3IP1 gene

LEI Yan, et al

(*The Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education and Department of Clinical Biochemistry, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the shRNA (Short Hairpin RNA) eukaryotic expression vector targeting at IER3IP1 gene and observe its silencing effect on IER3IP1 gene. *Methods*: Two pairs of DNA fragments targeting at IER3IP1 gene and one pair of DNA fragment of negative control were synthesized and cloned into the Eukaryotic Expression Vector pGenesil-1.These vectors were separately transfected into the L02 cells. Inhibitory effect at the time of 24, 48, 72 h after transfection were detected by semiquantitative RT-PCR. ***Results***:These shRNA eukaryotic expression vectors were successfully constructed. One of them could significantly and specially inhibite the expression of IER3IP1 gene and the inhibition ratios were separately 64%, 79% and 69% at the time of 24, 48 and 72 h, compared with empty vector group. *Conclusion*: The combinated eukaryotic expression vector could inhibit the expression of IER3IP1 gene, which forms the basis for investigating IER3IP1 gene's function .

【Key words】RNA interference; Gene, IER3IP1

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是近几年来发展迅速的基因研究手段,借助 RNAi 机制,研究人员得以迅速简便地降低细胞中某个特定基因的表达,实现类似"基因敲除"的效果,从而分析目标基因表达改变对细胞产生的影响,研究目标基因的功能。

IER3IP1 (Immediate early response 3 interacting protein 1,IER3IP1) 基因全长 1 304 bp, 定位于 18q12,该基因在心脏、骨骼肌、肾脏高表达,在肝脏、脑中度表达,在胎盘、肺、外周血白细胞低表达。它编码的蛋白质含有 82 个氨基酸残基,是定位于内质网的跨膜蛋白[1]。目前对于该基因的功能研究很少,是功能未明的基因之一。有报道称神经酰胺诱导神经元样 PC12 细胞凋亡过程中该基因的表达升高 3.12 倍[2];该基因参与苦参碱对 K562 细胞的诱导分化作用[3,4]。我们选择 IER3IP1 基因表达相对较高的肝脏细胞 L02 株为研究对象,设计、构建表

作者介绍:雷 燕(1981-),女,硕士,
研究方向:肿瘤的发生、发展与逆转机制。

通讯作者:张 彦,女,副教授,E-mail:zy2753@hotmail.com。

达 IER3IP1 shRNA 的真核表达载体，并转染 L02 细胞，观测对 IER3IP1 基因的沉默效果，筛选出有效的干扰片段，为后期研究 IER3IP1 基因的功能打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和细胞

shRNA 真核表达载体 pGenesil-1 购自武汉晶赛生物工程技术有限公司，大肠杆菌菌株 DH5a 和正常肝脏细胞 L02 均由本实验室保存。

1.2 工具酶与主要试剂

质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒均购自上海华舜生物工程公司，RNA 抽提试剂、LipofectamineTM2 000 均购自 Invitrogen 公司，限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*BamH* Ⅰ酶、T4DNA 连接酶等购自大连宝生公司，胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司，DMEM 培养基购自 GIBCO 公司。

1.3 IER3IP1siRNA 的设计

设计并合成靶向 IER3IP1 基因的 DNA 序列：根据 NCBI Genbank 中的 IER3IP1 的核苷酸序列(GenBank accession No. NM-016 097)，利用 Ambion 公司网站和武汉晶赛公司的在线设计软件，参考文献报道中的设计原则选择符合特征的靶序列，将选出的靶序列在 NCBI 中 BLAST 进行同源性比对，排除和其它编码序列同源。对于该目的基因选择了 2 个靶位点来设计干扰片断，然后选择最有效的进行后续研究。除此之外还设计了 1 对无关序列的阴性对照序列，利用 BLAST 进行同源性比对，以保证与其它的序列无同源性。一共设计 3 对DNA 寡核苷酸单链交由上海英骏生物技术有限公司合成。全长发夹结构 DNA 序列的设计为：*BamH* Ⅰ+Sense+Loop+Antisense+终止信号+*Hind*Ⅲ。DNA 片段 1 正义链：5'-GATCCGAGCCGGGAATTAAATCACTTCAAGAGAGTGATTTAATTCCCG-GCTCTTTTTTA-3'，反义链：5'-CA-CTCTCTTGAAGTGATTTAATTCCCGGCTCG-3'；DNA 片段 2 正义链：5'-GATC-CGAACATTGGCTGGGGAACATTCAAGACCAATGTTCTTTTTA-3'，反义链 5'-AGCTTAAAAAAGAACATTGGCTGGGGAACATCTCTT-GAATGTTCCCCAGCCAATGTTCG-3'；阴性对照：正义链 5'-GATCCGTTCATAAGGCGCATAGCTTCAAGAGAGCTATGCGCCTTATGAAGCTTTTTTA-3'，反义链 5'-AGCTTAAAAAAGCTTCATAAGGCGCATAGCTCTCTTGAAGCTATGCGCCTTATGAAGCG-3'。

1.4 pGenesil-1-shRNA 重组载体的构建与鉴定

将公司合成好的 DNA oligos 溶解在灭菌、无核酸酶的水中，各取片段 1、2 与阴性对照的正义链，反义链 DNA oligos 与退火缓冲液混合。将混合物在 95℃温育 5 min，然后自然冷却至室温。采用 DNA 重组技术，将 DNA 双链与经 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切后的 pGenesil-1 载体连接，转化大肠杆菌 DH5a，37℃培养过夜，长出的单个菌落为转化菌菌落。

挑取单个菌落，37℃摇菌过夜。收集细菌，按说明书操作小量快速抽提质粒 DNA，1%的琼脂糖凝胶电泳检测结果，并将重组质粒送去测序鉴定，阳性克隆分别命名为 pGenesil-1-shRNA1，pGenesil-1-shRNA2，pGenesil-1-shRNA 阴性对照。重组质粒的 DNA 测序工作交由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室完成。

1.5 引物设计与合成

1.5.1 β-actin 基因内参照引物的设计与合成 根据 GenBank 上报告的看家基因 β-actin 的序列，利用 PrimerPremier 软件设计了 β-actin 的 PCR 扩增引物：上游引物 5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGG-3'，下游引物 5'-GAGCTACGAGCTGCCTG-ACG-3'。

1.5.2 IER3IP1 基因 PCR 扩增引物设计与合成 根据 GenBank 上报告的 IER3IP1 基因全长 mRNA 的序列，利用 Primer Premier 软件设计了 IER3IP1 的 PCR 扩增引物：上游引物 5'-GAAGATCTATGGCCTTTACCCTGTACTCACTG-3'，下游引物 5'-CGGGATCCTCATCCAAATAATAAAAGTAACAC-3'。

1.6 重组质粒的转染与筛选

L02 细胞常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液(含双抗)，于转染前 1 d 接种 6 孔板(接种时换用无双抗的培养液)。按照转染试剂 LipofectamineTM2 000 说明书转染细胞。同时设立空白对照组(转染时只加转染试剂)、空载(pGene sil-1 质粒)对照、pGenesil-1-shRNA 阴性对照、pGenesil-1-shRNA1、pGenesil-1-shRNA 2。

1.7 半定量 RT-PCR 检测抑制效应

分别收集转染后 24、48、72 h 的各组细胞，分别提取总 RNA，紫外分光光度计定量，调整浓度。按照 RT-PCR 试剂说明书操作，做半定量测定。

1.8 统计学分析

所有实验数据均以均数 ± 标准差表示，利用 SPSS13.0 软件进行方差分析。

2 结 果

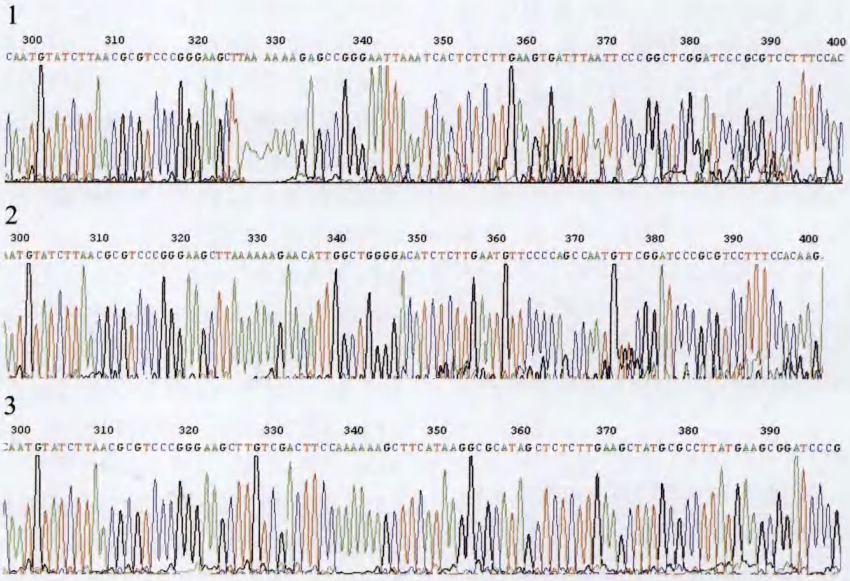
2.1 重组质粒的测序鉴定

DNA 测序工作由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室完成，测序结果显示插入序列正确(见图 1)。

2.2 L02 细胞系中 IER3IP1 基因的表达抑制

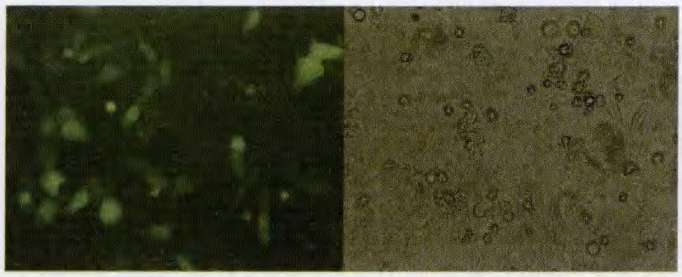
2.2.1 瞬时转染效率 转染 24 h 后表达绿色荧光蛋白的细胞达到 75%左右 (见图 2)，48 h 表达绿色荧光蛋白的细胞可以达 85%以上。

2.2.2 瞬时转染的基因抑制效果 半定量 RT-PCR 检测：以 β-actin 为内参，分析 IER3IP1 的表达水平。各组细胞在转染后 24、48(见图 3)、72 h 目的基因的



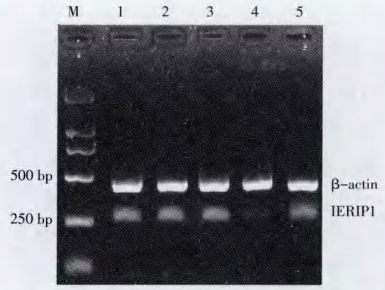
1. pGenesil-1-shRNA1；2. pGenesil-1-shRNA2；3. pGenesil-1-shRNA 阴性

图 1　重组质粒测序峰图



左图在荧光显微镜下拍摄；右图在光镜下拍摄(×400)

图 2　pGenesil-1-shRNA1 转染 24 h 后的细胞中绿色荧光蛋白表达状态



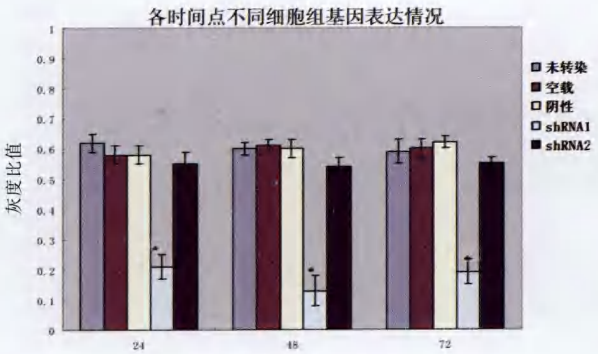
M. Marker；1. 未转染的细胞；2. 转染空载的细胞；3. 转染 pGenesil-1-shRNA 阴性重组质粒的细胞；4. 转染 pGenesil-1-shRNA1 的细胞；5. 转染 pGenesil-1-shRNA2 的细胞

图 3　48 h 各组细胞中目的基因表达情况

表达情况，琼脂糖凝胶电泳图经 Gel Pro Analyzer 软件分析确认，扫描各组细胞的 IER3IP1 和 β-actin 条带的灰度，计算比值。经统计学分析，空白对照组（转染时只加转染试剂）、空载（pGenesil-1 质粒）对照、pGenesil-1-shRNA 阴性对照、pGenesil-1-shRNA2 各组之间数值无统计学差异（$P>0.05$），pGenesil-1-shRNA 1 与其它各组数值有明显统计学差异（$P<0.01$），pGenesil-1-shRNA 1 转染的细胞 IER3IP1 的表达明显低于对照组细胞中的表达水平（见图 4）。按下列公式计算 IER3IP1 基因表达抑制率：IER3IP1 基因表达抑制率=（1-转染组 IER3IP1 表达强度/空载体转染组 IER3IP1 表达强度）×100%。pGenesil-1-shRNA1 组与空载对照组比较在 24、48、72 h 抑制率分别为 64%、79%、69%，其中以 48 h 的抑制率最高。

3　讨　论

利用 RNA 干扰技术进行基因功能的研究或治疗已被广泛应用于基因治疗和功能基因组学的研究中，并显示出良好的效果。目前常用的干扰方法是化学合成 siRNA 和构建 shRNA 的真核表达载体以及构建病毒载体。化学合成 siRNA 缺点是价格较贵，效率只有转录合成的 shRNA 的 1/10~1/40，基因抑制持续时间短，对细胞毒性大，转染效率低，合成工艺上也存在不可弥补的缺陷。病毒载体的主要缺点是价格较高以及耗费时间比较长，不适用于大量筛选 siRNA 序列，对实验条件要求较高，容量偏小，有可能伴随部分炎症反应。我们选择质粒载体，考虑质粒载体廉价易操作，质粒载体在体内表达



*P<0.01

图 4　转染 24、48、72 h 后不同细胞组基因表达情况

shRNA，是一种产生 RNA 干扰的良好方式，它与化学合成的双链 RNA 作用一致，且持续时间长、费用低，可以长期保存，是作为早期筛选有效基因干扰片断的适用方法。

本研究建立了 IER3IP1shRNA 的真核表达载体，转染 L02 细胞后有特异性干扰现象发生，抑制率较高。同时我们还对 RNA 干扰的时效性进行了研究，发现干扰现象在转染后 24 h 就出现，在 48 h 达到最高，72 h 略有降低，因此利用 RNA 干扰对基因功能的研究，可以不做费时费力的稳定筛选，采用瞬时转染 RNA 干扰重组载体就可以达到对基因功能研究的需要，使 RNA 干扰技术成为一个快速方便的研究基因功能的常用手段。

RNA 干扰实验中设计有效地靶向目的基因的干扰片断以及选择较高转染效率的转染细胞是干扰试验中至关重要的因素。参考现有文献中关于设计有效靶序列的原则，综合分析，优化其序列结构，使所设计的 siRNA 具有较高的沉默效率：①从起始密码下游 50~100 nt 开始，避开 5'端或 3'端的非编码区，搜索 AA(N19)序列；②U6 启动子所转录的序列特征是被转录序列的第一个碱基往往是“G”，5~6 个 T 必须放置在 shRNA 插入片段尾部以确保 RNA 聚合酶Ⅲ终止转录；③对 mRNA 目标区域进行二级结构预测，排除那些作用于复杂二级结构的 siRNA 序列；④做 Blast 对照，并进一步用 mRNA 相似性软件或脱靶控制软件筛选，把脱靶控制到最小水平。在这个实验中我们设计了 2 个靶序列，试验证明只有一个靶序列有效，另外一个无显著的干扰效果，RNA 干扰现象是一个很复杂的过程，有很多机制目前还不清楚，不同 siRNA 抑制效果不同可能受到目标序列位置、GC 含量、二级结构等多种因素的影响。除了选择有效的靶序列外，选择高效转染率的目的细胞也很重要，转染效率低的细胞很难对抑制效果进行正确地评价。因此我们选择该基因表达较高且转染效率较高的肝脏细胞 L02 株作为研究IER3IP1 基因干扰效果检测的目的细胞，可以对抑制效果进行正确地评价，并且筛选出有效的干扰片断。

鉴于文献报道和我们的前期实验中探讨 IER3IP1 基因可能的功能，以及文献报道发现一些疾病与 IER3IP1 基因位于的染色体 18q12 的缺失有关，如 18q12-qter 丢失在大肠癌是一个独立的不良预后生物学指标[5]，还有诸如胃癌[6]乳腺癌[7]、直肠癌[8]、胰腺癌[9]、胆管癌[10]、恶性纤维组织细胞瘤[11]、食管癌[12]等与染色体 18q12 上的某些基因缺失有关。到目前为止位于 18q21.1 上的 3 个肿瘤抑制基因(SMAD4/DPC4，SMAD2，DCC)已经公认。而在染色体 18q12 上已经有证据证明有潜在的肿瘤抑制基因存在，可是还没有任何基因得到公认。所以通过研究 IER3IP1 基因的功能，对了解一些肿瘤细胞的发病分子机制能有所启发。

我们在反复筛选 IER3IP1 基因 RNAi 的有效靶序列基础上，设计、构建、表达 IER3IP1 shRNA 的真核表达载体，为后期研究 IER3IP1 基因的功能奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Yiu W H, Poon J W, Tsui S K. Cloning and characterization of a novel endoplasmic reticulum localized G-patch domain protein, IER3IP1 [J]. Gene, 2004, 337(8): 37-44.

[2] Decraene C, Brugg B, Ruberg M, et al. Identification of genes involved in ceramide-dependent neuronal apoptosis using cDNA arrays[J]. Genome Biol, 2002, 3(8): research0042.1-research0042.22.

[3] 张　彦. 苦参碱诱导 K562 白血病细胞分化早期的基因表达分析[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(6): 342-345.

[4] 王伟佳, 张　彦, 黄凤霞. 苦参碱处理的 K562 细胞中 IER3IP1 基因表达及其对细胞增殖的影响[J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(12): 823-828.

[5] 刘秀萍, 河内茂人, 小贺厚德. 大肠癌染色体组 DNA 拷贝数异常的临床病理学意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(5): 355-359.

[6] Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K. Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(14): 2397-2403.

[7] Halama N, Grauling-Halama S A, Beder A, et al. Comparative integromics on the breast cancer-associated gene KIAA1632: clues to a cancer antigen domain[J]. Int J Oncol, 2007, 31(1): 205-210.

[8] Lips E H, de Graaf E J, Tollenaar R A, et al. Single nucleotide poly-

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0582-04

雄激素受体、凝血酶敏感蛋白 -1 与前列腺良、恶性疾病血管生成的关系

谭 毅,王 明,王连渠
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨雄激素受体(Androgen receptor,AR)、凝血酶敏感蛋白 -1(Thrombosopndin-1,TSP-1)在良性前列腺增生(Benign prostatic hyperplasia,BPH)、前列腺癌(Prostate cancer,Pca)中的表达及与血管生成的关系。方法:良性前列腺增生 20 例;前列腺癌 60 例,前列腺癌组中根据 Gleason 分级,Gleason 评分<7 为低评分组前列腺癌(35 例),Gleason 评分≥7 为高评分组前列腺癌(25 例);无骨转移者 47 例,有骨转移者 13 例。运用免疫组化二步法检测各组中 AR、TSP-1 的表达水平及微血管密度(Microvesel density,MVD)。结果:BPH 组中 AR、TSP-1 的表达高于 Pca 组($P<0.01$),MVD 值低于 Pca 组($P<0.01$);在 Pca 中低评分组 AR、TSP-1 的表达高于高评分组($P<0.01$),MVD 值低于高评分组($P<0.01$);无骨转移组 AR、TSP-1 的表达高于骨转移组($P<0.01$),MVD 值低于有远处转移组($P<0.01$)。AR、TSP-1 阳性组的 MVD 值分别小于阴性组的 MVD 值($P<0.01$)。TSP-1 与 AR 呈正相关($r=0.722$,$P<0.05$)。结论:AR、TSP-1 在前列腺癌中均为低表达,且与肿瘤的 Gleason 评分及有无骨转移密切相关。前列腺癌中 AR 突变使 TSP-1 减少,从而促进血管生成。

【关键词】前列腺肿瘤;良性前列腺增生;雄激素受体;凝血酶敏感蛋白 -1;微血管密度
【中国图书分类法分类号】R737.25 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-26

The relationship between androgen receptor, thrombospondin-1 and angiogenesis in nonmalignant and malignant prostate tissue

TAN Yi, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of androgen receptor(AR) and thrombospondin-1(TSP-1) in human benign prostatic hyperplasia(BPH)and prostate cancer(Pca), and to explore the relationship between them and angiogenesis. *Methods*: Eighty specimens from BPH(20)and Pca(60)were included in the study.The Pca was divided into low Gleason score group(Gleason score<7) and high Gleason score group(Gleason score≥7), and into non-bone metastasis group and bone metastasis group. The expression of AR, TSP-1 and microvesel density(MVD) were detected by immunohisto- chemistry(two-step method). *Results*: The positive rates of AR and TSP-1 in BPH group were significantly higher than those in Pca group; the MVD mounts in BPH group was significantly lower than that in Pca group.The positive rates of AR and TSP-1 in lower Gleason score group were significantly higher than those in higher Gleason score group, and the MVD mounts in lower Gleason score group was significantly lower than that in higher Gleason score group.The positive rates of AR and TSP-1 in non-bone metastasis group were significantly higher than those in bone metastasis group, and the MVD mounts in non-bone metastasis group was significantly lower than that in bone metastasis group.MVD mounts in AR positive and TSP-1

作者介绍:谭 毅(1977-),男,住院医师,硕士,研究方向:前列腺癌。
通讯作者:王 明,男,副教授,E-mail:wangmxr@sohu.com。

morphism array analysis of chromosomal instability patterns discriminates rectal adenomas from carcinomas[J]. J Pathol, 2007, 212(3): 269-277.
[9] Harada T, Baril P, Gangeswaran R, et al. Identification of genetic alterations in pancreatic cancer by the combined use of tissue microdissection and array-based comparative genomic hybridisation[J]. Br J Cancer, 2007, 96(2): 373-382.
[10] Saito S, Ghosh M, Morita K, et al. The genetic differences between gallbladder and bile duct cancer cell lines[J]. Oncol Rep, 2006, 16(5): 949-956.
[11] Tarkkanen M, Larramendy M L, Böhling T, et al. Malignant fibrous histiocytoma of bone: analysis of genomic imbalances by comparative genomic hybridisation and C-MYC expression by immunohistochemistry[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(8): 1172-1180.
[12] Su M, Chin S F, Li X Y, et al. Comparative genomic hybridization of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cell lines[J]. Dis Esophagus, 2006, 19(1): 10-14.

(责任编辑:关蕴良)