论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1418-05

靶向 CGI-100 基因 shRNA 干扰载体的构建与鉴定

汪永强,张 彦,雷 燕

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

【摘 要】目的:构建靶向 CGI-100 基因的 RNAi 表达载体并鉴定其抑制效率。方法:设计及化学合成 3 对靶向 CGI-100 基因的短发夹结构寡核苷酸,经退火成双链 DNA 片段,将其与经限制性内切酶 *BamH* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切的 PGenesil-1 质粒连接,构建表达 shRNA 的重组质粒,用脂质体 2000 转染到 K562 细胞中进行表达,经 RT-PCR 和斑点杂交检测转染前后 CGI-100 基因表达的变化。结果:经 DNA 测序证实 3 对靶向 CGI-100 基因的 RNA 干扰表达载体 PGenesil-1-CGI-100 构建成功,其中第 1 对 PGenesil-1-CGI-100 在 mRNA 水平抑制白血病 K562 细胞中 CGI-100 基因表达的效率最高,达 54%。结论:成功构建针对 CGI-100 基因的 RNA 干扰的表达载体,并筛选出 1 对抑制效率较高的重组干扰载体,为进一步研究 K562 细胞中 CGI-100 基因的功能奠定基础。

【关键词】CGI-100 基因;RNA 干扰;shRNA;K562 细胞

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-02-25

Construction and identification of the RNA interference system targeting CGI-100 gene

WANG Yong-qiang, 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 expression vector of RNA interference(RNAi)system for CGI-100 gene and identify its inhibition efficiency. *Methods*: Three oligonucleotides targeting CGI-100 gene were devised and chemically synthesized, annealed to form double-strand DNA and inserted into plasmid PGenesil-1 whose segments were digested by *BamH* Ⅰ and *Hind* Ⅲ. The recombinant vector were then transfected into K562 cells with lipofectamineTM 2000.CGI-100 expresstion in the transfected cells was assayed by RT-PCR and dot blot. *Results*: The recombinant plasmids of PGenesil-1-CGI-100 were successfully constructed by DNA sequencing analysis. The first of PGenesil-1-CGI-100 had the highest inhibition efficiency in mRNA levels, up to 54%. *Conclusion*: The RNA interference system targeting CGI-100 gene were successfully constructed and a interference vector with a higher inhibition efficiency was screened, which provides the foundation for further investigation.

【Key words】CGI-100 gene; RNA interference; shRNA; K562 cell

CGI-100 基因位于人类跨膜蛋白 emp24 第五转运区域(Homo sapiens transmembrane emp24 protein transport domain containing, TMED5)。目前的研究表明:emp24 家族为 24kD 内膜蛋白的前体,可能的功能有:(1)emp24 蛋白是包被囊泡 COP Ⅰ 与 COP Ⅱ 的重要组成部分[1];(2)参与分泌性蛋白质从内质网到高尔基体之间的转运[2,3];(3)emp24 与 Gas1p(糖基磷脂酰肌醇固定蛋白)相互作用,参与 P53 介导的肿瘤细胞生长抑制或凋亡[4]。这些研究表明 emp24 蛋白家族起着转运蛋白质及细胞生长方面的作用。CGI-100 是 emp24 蛋白家族的重要成员之一,其功能尚不清楚,推测 CGI-100 很可能影响肿瘤细胞的增殖、分化与凋亡,但其分子机制仍没有阐明,有必要进一步研究。

我们前期研究结果显示:采用 0.1 mg/ml 的苦参碱诱导 K562 细胞分化的过程中,3 h 后 CGI-100 mRNA 表达迅速降低,与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$),随着苦参碱作用时间延长,CGI-100mRNA 一直处于低表达水平,K562 细胞有向成熟分化的趋势,并且 CGI-100 基因的过表达可促使 K562 细胞增殖加快、恶性程度增高、S 期细胞增多[5,6]。这些结

作者介绍:汪永强(1978-),男,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。

果提示 CGI-100 基因的表达与肿瘤细胞恶性增殖、以及苦参碱诱导 K562 细胞分化与凋亡相关，CGI-100 可以作为治疗白血病的 1 个潜在靶基因。为了进一步研究 CGI-100 基因在 K562 细胞中的作用，本研究针对 CGI-100 基因设计 3 个不同位置的特异干扰序列，构建重组质粒载体，并转染 K562 细胞后进行筛选、鉴定其抑制 CGI-100 基因表达效率，为研究 CGI-100 基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细菌 PGenesil-1 质粒（含氨卞青霉素抗性基因和绿色荧光蛋白筛选标记）购自武汉晶赛生物工程技术有限公司，DH5α 菌株为本室保存。

1.1.2 主要试剂和工具酶 限制性内切酶（*BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ）、T4DNA 连接酶及缓冲液购自宝生物（大连）有限公司，质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术公司，氨卞青霉素（AMP）购自北方同正公司，DNA 分子量标准、电泳上样缓冲液等购自宝生物（大连）有限公司，琼脂糖（Agarose，电泳极）购自北方同正公司，斑点杂交试剂盒购自 Roch 公司。

1.1.3 PCR 引物设计 CGI-100、Vimention 及内参 β-actin PCR 引物交由 TaKaRa（大连）公司合成。

（1）CGI-100 引物（预期扩增目的基因 CDS 片断，大小为 689bp）上游引物：5'-AACTG CAGAT GGGCG ACAAG ATCTG GCTGC CC-3'，下游引物：5'-CGGGA TCCTT AAGTT CTACT TTTCC TCTTA TC-3'。

（2）β-actin 引物（扩增产物 416bp）上游引物：5'-CCTAG AAGCA TTTGC GGTGG-3'，下游引物：5'-GAGCT ACGAG CTGCC TGACG-3'。

（3）Vimention 引物（扩增产物 690bp）上游引物：5' -TGAC CGCT TCGC CAAC TACA T-3' 下游引物：5' -TAAG GGCA TCCA CTTC ACAG- 3'

1.2 方法

1.2.1 实验路线 见图 1。

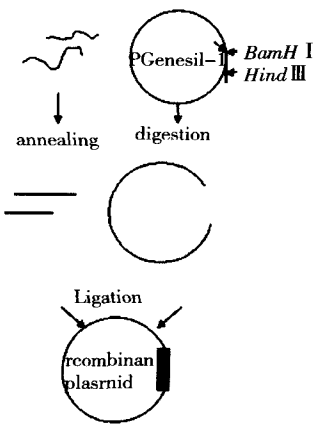


图 1 构建重组表达质粒实验路线图

1.2.2 基因特异性干扰序列的设计 依据干扰序列设计，利用在线生物软件设计 3 对针对 CGI-100 基因 3 个不同位置的小发夹 RNA（Short hairpin RNA，shRNA），结构均为正义链（19nt）—环（9nt）—反义链（19nt）—6 个连续 T，序列上游加 BamHI 酶切位点，下游加 HindIII 酶切位点。设计完成的干扰序列经与 GenBank 基因库比对后，排除了非 CGI-100 基因被干扰的可能性，然后送上海英俊公司合成。用与实验序列碱基组成相同但不同源的序列作为阴性对照。

第 1 对正义链：

5'-GATCCCAGGCACAAGAACAAGAAGTTCAAGAGCT TCTTGTTTTGTGCCTTTTTTTA-3'；

第 1 对反义链：

5'-AGCTTAAAAAACAGGCACAAGAACAAGAAGTCTC TTGAACTTCTTGTTCTTGTGCCTGG-3'。

第 2 对正义链：

5'-GATCCGCTCGTGATCGAAACATACTTCAAGAGAGT ATGTTTCGATCACGACTTTTTTA-3'；

第 2 对反义链：

5'-AGCTTAAAAAAGCTCGTGATCGAAACATACTCTCT TGAAGTATGTTTCGATCACGAGCG-3'。

第 3 对正义链：

5'GATCCGTGGGCACATACAAATTCTTTCAAGAGAAGA ATTTGTATGTGCCCACTTTTTTA-3'；

第 3 对反义链：

5'-AGCTTAAAAAAGTGGGCACATACAAATTCTTCTCT TGAAAGAATTTGTATGTGCCCACG-3'。

阴性对照正义链：

5'-GATCCGCTTCATAAGGCGCATAGCTTCAAGAGAGC TATGCGCCTTATGAAGCTTTTTTA-3'；

阴性对照反义链：

5'-AGCTTAAAAAAGCTTCATAAGGCGCATAGCTCTCT TGAAGCTATGCGCCTATGAAGCG-3'。

1.2.3 干扰序列退火成双链 退火体系为 50 μl，其中各正义链取 8 μl，各反义链取 8 μl，退火缓冲液 34 μl，轻轻混匀后，置于 95℃水浴箱 5 min，然后缓慢降至室温。

1.2.4 线性 PGenesil-1 质粒的制备 限制性内切酶 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切 PGenesil-1 质粒，1%的琼脂糖凝胶电泳后回收大片段。

1.2.5 重组质粒 PGenesil-1-CGI-100 的转化及转化产物的筛选 取上述各退火产物 2 μl 与线性载体 PGenesil-1 4 μl，在 3 μl T4DNA 连接酶的作用下 16℃连接过夜，构建成重组表达载体 PGenesil-1-CGI-100，将连接产物全部加入预先制备好的感受态细胞中，并涂布于 Kan^+LB 平板中，置 37℃温育 12~16 h。阳性重组干扰质粒命名为 PGenesil-1-CGI-100，阴性对照重组质粒命名 PGenesil-1negativecontrol。

1.2.6 重组质粒 PGenesil-1-CGI-100 的提取与鉴定 挑取上述 Kan^+LB 平板上的单菌落，碱裂解法提取质粒，取 5 μl 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。将有质粒条带的重组质粒直接送往重庆医科大学感染性疾病重点实验室测序。

1.2.7 细胞培养 K562 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、5% CO_2 条件下培养。

1.2.8 转染 K562 细胞及筛选 生长良好的 K562 细胞转染前 1 d 传代,以含 10%小牛血清、不含抗生素的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 3×10^5 个/ml, 接种于 12 孔细胞培养板中,每孔 500 μl。K562 细胞的转染按 Lipofectamin TM 2000 试剂说明书进行:取 4.8 μl 脂质体溶于 100 μl 无血清、无抗生素 RPMI1640 液中配为 A 液;PGenesil 空质粒、阴性对照质粒 PGenesil-CGI-100-Negative 和 PGenesil-CGI-100 重组质粒 DNA 各 1.6 μg 溶于 100 μl 无血清、无抗生素 RPMI1640 液中配为 B 液;将 A、B 两液轻轻混匀,室温放置 20 min 后,加至细胞培养板中,37℃,5%CO_2 饱和湿度培养 24 ~ 48 h,观察荧光的发生,72 h 后更换培养液并加 G418 进行抗性筛选(850 μg/ml),8 d 后用 G418(200 μg/ml)维持传代培养。阳性重组细胞命名为 K562-CGI-100,空载体转染细胞命名为 K562-PGenesil,阴性对照质粒转染细胞命名为 K562-Negative。

1.2.9 半定量 RT-PCR 法鉴定 CGI-100 基因沉默情况 分别取对数生长期的各转染细胞与未转染 K562 细胞 5×10^5 个,采用 Trizol 试剂分别提取各组细胞的总 RNA 后,用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,选取 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 上的样本经 AMV 逆转录酶 RT 成 cDNA,再进行 PCR 扩增,反应条件为 94℃ 2 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 50 s,30 个循环,最后 72℃延伸 5 min 检测 CGI-100 基因的 mRNA 表达情况,同时做 β-actin 内对照。取 5.0 μl PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳(180 V,20 min),用 BIO-RAD 图象分析仪上观察并扫描制片,记录结果。

1.2.10 斑点杂交鉴定 CGI-100 基因沉默情况

1.2.10.1 DIG 随机引物法标记 CGI-100 基因探针、Vimention 基因探针 取未转染 K562 细胞 5×10^5 个,采用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA 后,用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,选取 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 上的样本作为逆转录的模板。用 CGI-100 引物扩增该基因,取 20 μl PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳后,按照胶回收试剂盒回收纯化,用分光光度计测定 CGI-100 基因的浓度和纯度,取 CGI-100 基因 DNA 0.8 μg,无菌水补充至 16 μl,在沸水中变性 10 min,加入 DIG 随机引物法标记试剂(Roche 公司),在 37℃标记 12 h,Vimention 基因探针标记方法同上。

1.2.10.2 标记探针效率的检测 严格按照 Roche 公司提供的说明书进行,将对照 DNA 与待检测的 DNA 点在尼龙膜上,免疫显色后对比分析探针标记效率。

1.2.10.3 CGI-100 基因沉默情况的斑点杂交 分别取对数生长期的各转染细胞与未转染 K562 细胞 5×10^5 个,采用 Trizol 试剂分别提取各组细胞的总 RNA 后,用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,依次点在尼龙膜上,共点 6 个点,每个样本点 4 μl,量为 1.8 μg,同时每个样本设内参对照,共点 6 个点,每个样本点 5 μl,量为 2.3 μg,固定、杂交、免疫显色均按说明书进行。Vimention 基因沉默情况的斑点杂交方法同上。

2 结 果

2.1 载体酶切鉴定

将载体用 *BamH* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ双酶切,回收产物行琼脂糖电泳检查,发现环状质粒已切开,大片段清晰,而小片段因太小未检测出来(图 2)。

2.2 重组质粒的质量

重组质粒电泳结果表明,质粒条带清晰,含量大,可用于进一步鉴定(图 3)。

2.3 重组质粒的 DNA 测序结果

结果表明,干扰序列克隆正确,不存在碱基的缺失、插入等突变现象(图 4),说明靶向 CGI-100 基因的 shRNA 重组干扰载体构建成功。

2.4 阳性克隆细胞的稳定筛选

经过筛选得到的阳性克隆细胞于荧光倒置显微镜下观察,始终有绿色荧光蛋白的稳定表达(图 5)。

2.5 RT-PCR 鉴定 CGI-100 基因表达的沉默结果

以琼脂糖电泳条带的亮度来判断 CGI-100 基因与的 mRNA 表达高低(见图 6)。

其中第 1 对 PGenesil-1-CGI-100 质粒转染 K562 细胞后对 CGI-100 基因的 mRNA 表达抑制率最高,抑制率达 54%。

2.6 CGI-100 基因探针、Vimention 基因探针标记效率的检测结果

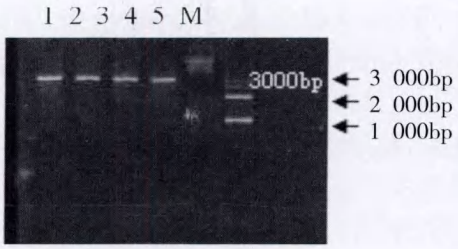
与对照 DNA 相比,CGI-100 基因探针可以检测到 0.1 pg 的 mRNA,Vimention 基因探针可以检测到 0.1 pg 的 mRNA, 用上述二种探针用于斑点杂交,灵敏度都较高(图 7)。

2.7 斑点杂交鉴定 CGI-100 基因的沉默结果

以斑点的蓝色亮度来判断 CGI-100 基因与 Vimention 基因的 mRNA 表达高低(见图 8),第 1 对 PGen esil-1-CGI-100 质粒转染 K562 细胞后,CGI-100 基因的 mRNA 表达降低程度最高,与 RT-PCR 鉴定结果相一致,所以选该对质粒转染 K562 后的重组细胞为后续的研究对象。

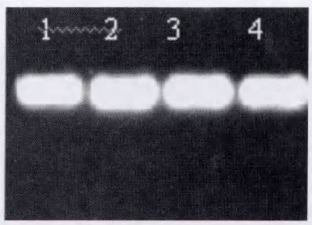
3 讨 论

RNA 干扰(RNAi interference,RNAi)技术是指通过双链 RNA 特异性地抑制靶基因转录后表达的现象,它通过人为地引入与靶基因具有同源序列的双链 RNA(正义 RNA 和反义 RNA),从而诱导靶基因的 mRNA 降解,达到阻止基因表达的目的。该技术不仅应用于植物、动物、线虫等有机体中,而且广



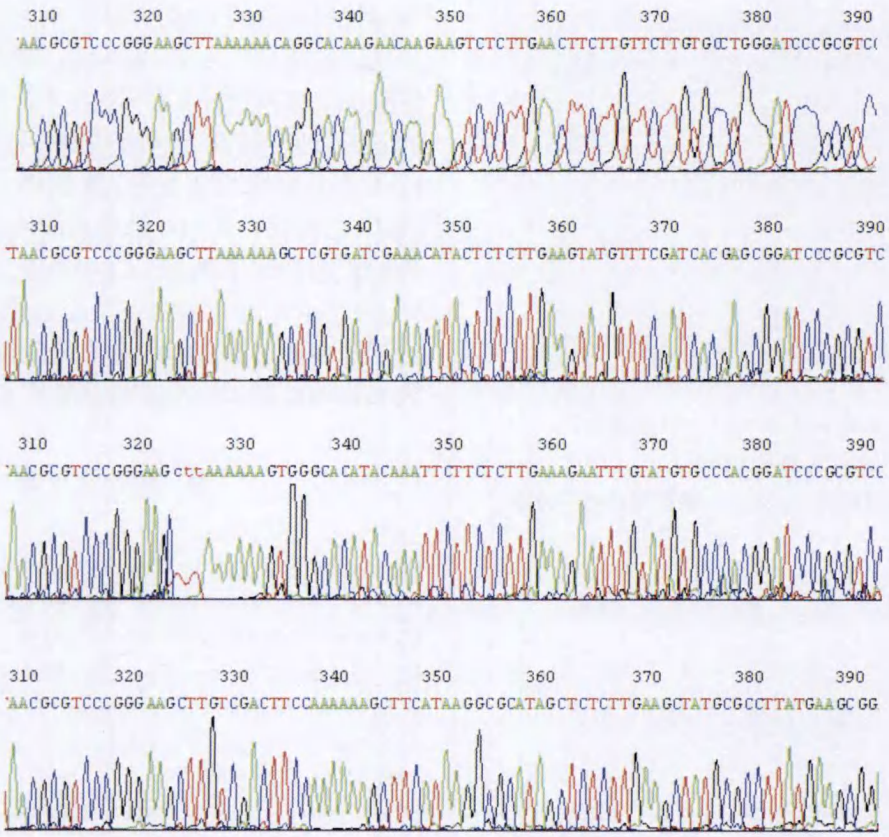
1～4. PGenesil-1 质粒双酶切大片段；5. PGenesil-1 质粒；M.1kb DNA Marker

图 2 PGenesil-1 质粒由 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切结果



1. 第 1 对 PGenesil-1-CGI-100 质粒；2. 第 2 对 PGenesil-1-CGI-100 质粒；3. 第 3 对 PGenesil-1-CGI-100 质粒；4. PGenesil-1-CGI-100-negative control 质粒

图 3 重组质粒电泳结果



A. 第 1 对 PGenesil-1-CGI-100；B. 第 2 对 PGenesil-1-CGI-100；C. 第 3 对 PGenesil-1-CGI-100；D. PGenesil-1 negative control

图 4 重组质粒测序峰图

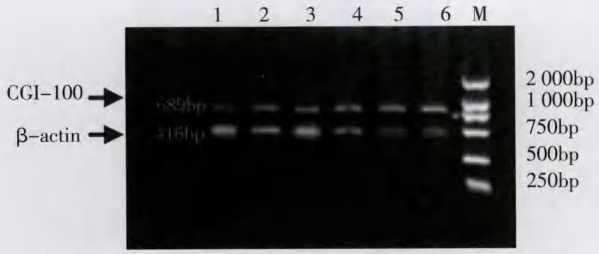


A. PGenesil-1-CGI-100 质粒转染 K562 细胞 EGFP 蛋白的表达图

B. PGenesil-1 negative control 质粒转染 K562 细胞 EGFP 蛋白的表达图

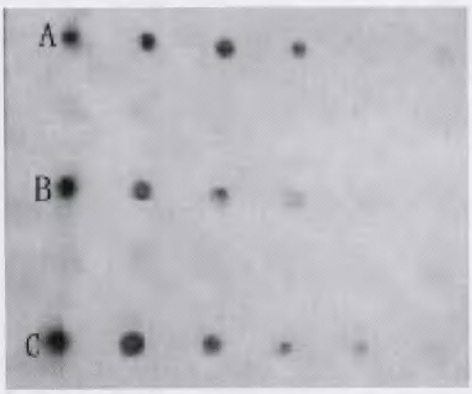
C. PGenesil-1 质粒转染 K562 细胞 EGFP 蛋白的表达图

图 5 K562-CGI-100、K562- Negative、K562-PGenesil 阳性细胞克隆荧光图



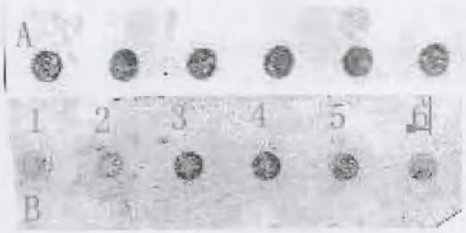
M. DL,2000 DNA marker;1～3. 分别为 3 对干扰载体转染 K562 细胞;4. K562-PGenesil;5. K562- Negative;6. K562 细胞

图 6 RT-PCR 分析 CGI-100 基因在 K562 细胞的表达



A. Vimention 基因探针;B. CGI-100 基因探针;C.阳性对照基因探针

图 7 CGI-100 基因探针、Vimention 基因探针标记效率



A. Vimention 基因探针杂交 Vimention mRNA;
B. CGI-100 基因探针杂交 CGI-100mRNA;
1～3. 分别为 3 对干扰载体转染 K562 细胞;
4. K562-PGenesil;5. K562-Negative;6. K562 细胞

图 8 斑点杂交鉴定 CGI-100 基因表达

泛应用于人体基因功能的研究上。由于该技术具有基因抑制效果确切、高特异性、高效性的特点，它为研究基因的功能提供了新的方法[7,8]。

目前，产生 siRNA 的方法很多，大致可分为两类：一类为体外转录或化学合成 siRNA 转染细胞后介导 RNAi，此类方法主要用于筛选有效的 siRNA，另一类为发夹式 siRNA 表达载体转染细胞后表达发夹式 siRNAs 而介导 RNAi，由于化学合成的 siRNA 抑制时间短，成本相对较贵，因此限制了应用，体外转录得到的 siRNA 也存在产量低、纯度低、抑制基因时间短等问题，而发夹式 siRNA 表达载体转染细胞后表达的发夹式 siRNAs 成本相对较低，并且它可以稳定，持续地表达发夹式 siRNA，使基因沉默时间更长，更加稳定，便于基因的长期研究。本研究所用的真核干扰表达载体 PGenesil-1 中的 neo 真核细胞抗性基因为靶基因在哺乳动物细胞中的长期基因沉默研究奠定了基础，而且该载体带有 EGFP绿色荧光蛋白报告基因，可直观地在荧光显微镜下观察转染效率。

国内外已有大量文献报道了利用 siRNA 成功抑制特定基因的表达，尤其是靶向恶性肿瘤中高表达基因的研究[9]，由于 CGI-100 基因在白血病 K562 细胞中呈高表达，RNA 干扰技术的优点是将高表达的基因沉默，使高表达的基因表达降低，所以采用 RNA 干扰技术抑制 K562 细胞中 CGI-100 基因的表达，是研究 CGI-100 基因功能的途径之一，为此，我们成功构建了靶向 CGI-100 基因的干扰表达载体，并用 RT-PCR 与斑点杂交双重方法筛选、鉴定出了抑制效率最高的一对干扰表达载体，为深入研究 CGI-100 基因的功能奠定基础。

参 考 文 献

[1] Ginger E,Nathan J. P24 proteins,intracellular trafficking,and behavior:Drosophila melanogaster provides insights and opportunities [J]. Biology of the Cell,2004,96(4):271-278.

[2] Schimmoller F,Singer-Kruger B,Schroder S,et al. The absence of Emp24p,a component of ER-derived COPII-coated vesicles,causes a defect in transport of selected proteins tothe Golgi[J]. EMBO J,1995,14(7):1329-1339.

[3] Renwang P,Anna D A,Dieter G.Evidence for overlapping and Distinct Functions in Protein Transport of Coat Protein Sec24p Family Members[J]. J Biol Chen,2000,275(15):11521-11528.

[4] Muniz M,Nuoffer C,Hauri H,et al. The EMP24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles[J]. J. Cell Biol,2000,148(5):925-930.

[5] 黄风霞，张 彦，王伟佳.苦参碱对 K562 细胞 CGI-100 基因表达和细胞增殖的影响[J].中国实验血液学杂志，2008，16(3)：525-530.

[6] 黄风霞，张 彦，王伟佳.未知基因 CG1-100 的克隆及其真核表达载体的构建[J]. 重庆医科大学学报，2007，32(8)：785-788.

[7] Zamoer P D.RNA interference:listern to the sound of silence[J]. Nature Structureal Biology,2001,8(9):46-51.

[8] Fire A,Xu S,Montgomery M K,et a1. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenomab-ditiselegans [J]. Nature,1998,391(6669):806-811.

[9] Sven Kappel. Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes[J]. Nucleic Acids Research,2006,34(16):4527-4536.

（责任编辑：冉明会）