维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0517-03

卡氏肺孢子表面糖蛋白 siRNA 表达载体的构建和鉴定

王莉妮,姚云清,谭 燕,唐滢浌,李文桂,马 良,陈雅堂

(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(Pneumocystis carinii,PC)主要表面糖蛋白(Major surface glycoprotein,MSG)基因短干扰性 RNA(Short interfering RNA,siRNA)表达载体。方法:设计并人工合成针对 PC MSG 基因的短发夹状(Short hairpin RNA,shRNA)序列并定向克隆到 siRNA 表达载体 pTZU6+1 上,采用双酶切后凝胶电泳与 DNA 测序法进行鉴定。结果:酶切和测序鉴定得到的产物与预期目的基因一致。结论:成功构建卡氏肺孢子主要表面糖蛋白基因 siRNA 表达载体。

【关键词】卡氏肺孢子;主要表面球蛋白;siRNA;表达载体

【中国图书分类法分类号】R531.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-22

Construction and identification of plasmid vector of short interfering RNA on pneumocystis carinii major surface gene

WANG Li-ni, et al

(*Department of Infection Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct and identify a plasmid vector of short interfering RNA(siRNA) on pneumocystis carinii(PC) major surface glycoprotein(MSG) gene. *Methods*: Short hairpin RNA(shRNA) oligonucleotide targeting PC MSG gene which was chemically synthesized and inserted into RNAi-Ready plasmid vector pTZU6+1 after annealing, the recombinant plasmid, pPC-MSG, transgormed into E.coil.TOP10 and amplified, was digested by restriction endonucleases *Hind* Ⅲ and *EcoR* Ⅰ and identified by gelelectrophoresis and DNA sequencing. *Results*: Gel electrophoresis and DNA sequencing showed that the recombinant plasmid containing the correct and full shRNA oligonucleotide. *Conclusion*: The siRNA plasmid, pPC-MSG was constructed successfully.

【Key words】Pneumocystis carinii; Major surface glycoprotein; siRNA; Expression plasmid

PC 是一种机会性感染病原体,主要见于艾滋病病人、器官移植、胶原性疾病及长期服用免疫抑制剂、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,导致卡氏肺孢子肺炎(Pneumocystis carinii pneumonia,PCP)。如不经治疗,病死率高达 100%。目前 PCP 的化疗疗效有限且药物存在严重毒副作用,所以迫切需要研究更加有效的治疗措施。作者在自然科学基金资助下,采用 RNA 干扰技术(RNA interference,RNAi)治疗 PCP,选择 PC 的 MSG 基因的保守序列作为靶基因构建 shRNA 表达载体,拟转染 PC 诱导 MSG 基因转录后 mRNA 的降解,或抑制其翻译蛋白质,从而特异性的阻断 MSG 基因的表达,达到杀灭 PC 的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性核酸内切酶 *Xba*Ⅰ、*Sal*Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*EcoR*Ⅰ,T4DNA 连接酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、高效感受态细胞制备试剂盒、DNAmarker 等购自上海深工与 TakaRa 公司。shRNA 由上海生工生物工程有限公司美国 PE 公司 DNA 自动合成仪合成。大肠杆菌 TOP10 菌株和 siRNA 表达载体 pTZU6+1 质粒由重庆医科大学感染性疾病分子学重点实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 表达载体 pPC-MSG 的构建

1.2.1.1 shRNA-PC-MSG 的设计 在基因库中查找 PC MSG 基因保守序列,针对其基因组结构编码区在线设计 shRNA 序列,组成为 4 个碱基茎环连接的正向与反向各 21 个碱

作者介绍:王莉妮(1979-),女,硕士,
研究方向:感染性疾病发病机制与预防。

通讯作者:姚云清,男,副教授,E-mail:cqyaoyunqing@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471512)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

基呈发夹状结构，加 5'端起始密码子和 3'端终止密码子共计 56bp；正义链 5'-TCGAGAGAAAGGGATTTGATGTCATTTTCGAATGACATGAAATCCCTTTCTTTTT-3'，反义链 5'-CTAGAAAAAAGAAAGGGATTTCATGTCATTCGAAAATG ACATGAAATCCCTTTCT-3'，正义链 5'末端与反义链 3'末端分别添加限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Xba*l Ⅰ酶切位点。

1.2.1.2 单链 shRNA-PC-MSG 退火形成双链并纯化 分别用 33μl 退火缓冲液充分溶解正义链与反义链各 1OD (33μl)，取溶解液各 10μl 混合，退火条件：94℃孵育 4min，80℃孵育 4min，37℃4min，25℃4min，然后置于冰上；加 2 倍退火反应体积无水乙醇、3mmol/L 乙酸钠 2μl 溶解退火片断，置 -20℃过夜，14 500r/min 离心10min，弃上清，沉淀用 75%乙醇清洗，离心弃上清，自然挥发后加入 20μl 双蒸水溶解，于 -20℃保存备用。

1.2.1.3 定向克隆 反应体系如下：退火寡核苷酸链 6μl，1.5×T4DNA 连接酶缓冲液 1.5μl，线性 pTZU6+1 质粒 2μl，T4DNA 连接酶 1μl，加双蒸水至 15μl，于 16℃孵育过夜，置 -20℃保存。

1.2.1.4 重组质粒 pPC-MSG 转化感受态 TOP10 和转化克隆挑选 转化分 2 组，取已分装好的感受态细菌 2 管，分别加入上述连接液和 pTZU6+1 质粒各 10μl，轻轻混匀后于冰上放置 30min，42℃孵育 90s，然后再在冰上放置 20min，加入 1ml LB 培养基后 37℃振荡培养 1h，最后将其涂于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂糖培养平板上，37℃培养 12h，空载体 pTZU6+1 质粒转化菌未见克隆生长，重组质粒 pPC-MSG 转化菌有克隆生长，挑取较大的分散的克隆置于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃振荡培养 12h，质粒提取采用 TakaRa 公司质粒抽提试剂盒，按说明书操作。

1.2.1.5 siRNA 表达重组质粒 pPC-MSG 酶切后凝胶电泳鉴定 用 *Hind* Ⅲ、*EcoR* Ⅰ双酶切重组质粒 pPC-MSG，以 pTZU6+1 空载体作对照。反应体系为：*Hind* Ⅲ 0.5μl、*EcoR* Ⅰ 0.5μl，pPC-MSG 或 pTZU6+1 12μl，10×Mbuffer1.5μl，补足双蒸水至 15μl，37℃酶切 3h；取 5μl，反应产物与 2μl 6×loading buffer 混匀后进行 1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪成像。

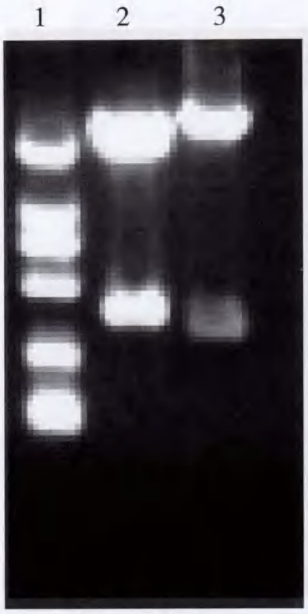
1.2.1.6 测序鉴定 重组质粒由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室测序鉴定。

1.2.1.7 pPC-MSG 体外干扰 PC 初步探讨 将成功建立 PCP 模型小鼠无菌取肺分离及纯化 PC，按脂质体转染试剂 Lipofectamine™2000 说明书转染载体质粒，转染液为无抗生素无血清 DMEM，转染 6h 后换含血清的培养液，并计数，按照 5×10^5 个 PC 每孔加于长满 80% $HepG_2$ 细胞的 24 孔板中[1]，同时设置未转染对照组。48h 后六亚基四胺银染色观察包囊数量，染色方法按照快速鉴定卡氏肺孢子虫法进行[2]。

2 结 果

2.1 重组质粒 pPC-MSG 酶切后凝胶电泳鉴定

用 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切重组质粒 pPC-MSG 后产生 2 800bp 与 408bp 片断，而空载体 pTZU6+1 双酶切后产生 2 800bp 与 325bp 片断，凝胶电泳结果与预期相符，初步证明 shRNA-PC-MSG 已被插入到pTZU6+1 载体中，见图 1。



1.DNA marker；2.重组质粒 pPC-MSG；3.空载体 pTZU6+1

图 1 重组质粒 pPC-MSG 双酶切后凝胶电泳成像

2.2 重组质粒 pPC-MSG 的测序与鉴定

重组质粒 pPC-MSG 测序结果显示与设计 DNA 片断序列完全一致，见序列中下划线处，进一步证实 pPC-MSG 重组质粒构建成功。测序结果如下：

pPC-MSG

GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCTAGTTTTTTTTTTGCGGACCGAAGTCCGCTCTAGAAAAAAGAAAGGGATTTCATGTCATTCGAAAATGACATGAAATCCCTTTCTCTCGACGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAACTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCA

2.3 重组质粒 pPC-MSG 体外干扰 PC 初步探讨

染色并计数未转染 pPC-MSG 组与转染 pPC-MSG 组包囊数(见表 1)，2 组相比有统计学差异，说明 pPC-MSG 对 MSG 靶基因有干扰作用。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 空白对照组与转染 pPC-MSG 组 PC 包囊数比较

转染时间	空白对照组	转染 pPC-MSG 组	*P* 值
48h	14.00 ± 0.97	9.20 ± 1.58	>0.05

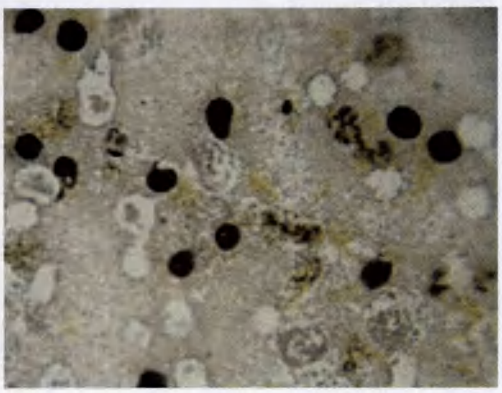


图 2 空白对照组 PC 包囊染色



图 3 pPC-MSG 转染组 PC 包囊染色

随着分子生物学技术在生物医学领域的广泛应用,人们对 PC 的研究由早期形态学观察发展到分子克隆和基因组核苷酸序列分析,发现 PC 不仅具有原虫的特征,而且与真菌中的一类酿酒酵母具有 90%的基因同源性。虽然 PC 归类问题尚无定论,但深入研究发现不同哺乳动物源的 PC 具有宿主特异性与基因型别差异[3]。分析不同来源的 PC 线粒体大亚基 rRNA(MtLSU rRNA)和细胞核 rRNA 内转录区(Internal transcribed spacer,ITS)基因序列发现,人源性 PC 与鼠源性 PC 基因序列差异约为 5%,故学者 Frenkel 等提出将人源性 PC 命名为"耶氏肺孢子虫"(Pneumocystis jiroveci,PJ)[4],但是为了避免医学文献混乱的问题,目前大多学者仍然将 PJ 所致的肺炎称为 PCP,或者直接称呼"肺孢子肺炎"[5,6]。由于 PJ 获得与体外持续培养困难,目前国内外多采用大鼠 PCP 模型进行研究,已得到许多有关 PC 基因组的特征性信息。脉冲电泳分离分析 PC 基因组有 16 条线形染色体,全基因组大小为 7.7Mbp,分布于 300kb 至 700kb 之间。大鼠源 PC 的基因组富含 A/T,其典型的基因序列含有 60%~65%A/T。编码区含有 1 个或多个内含子,内含子长度接近 50bp,其中的 A/T 含量高于编码区。PC 的滋养体型和包囊型的染色体末端因为包含编码病原体表面抗原基因而最令人感兴趣,迄今为止,已经在 PC 染色体亚端粒区确认了 3 个编码表面抗原的多基因家族中功能相似的同源基因,分别编码 MSG、表面糖蛋白相关抗原(MSR)和 PRT1 蛋白激酶[7]。

MSG 具有重要的生物学意义而备受重视。MSG 蛋白特征分析已经证实,MSG 定位于 PC 细胞壁,是一种富含甘露糖的糖蛋白,在非还原状态下呈现粘附和聚集特征,构成 PC 细胞壁的重要成分。MSG 不仅是 PC 细胞壁的主要组成成分,而且积极参与了 PC 与宿主细胞间的免疫反应:(1)PC 经呼吸道感染后主要沉积在肺泡内繁殖,其致病需要附着在Ⅰ型肺泡上皮细胞上,MSG 与宿主细胞的纤维连接素、表面活性蛋白 A、D 等结合介导 PC 粘附宿主细胞;(2)MSG 刺激宿主非特异性免疫细胞如中性粒细胞、单核细胞等聚集于肺泡间质、释放 TNF-α 与多种白细胞介素等细胞因子,加重肺泡等肺组织损伤;(3)MSG 等 PC 细胞抗原成分虽然可以刺激宿主抗体产生特异性免疫应答,CD_4^+T 细胞与 CD_8^+T 活化并释放细胞因子,对 PC 有一定的攻击作用,但是在 AIDS 等疾病患者 CD_4^+T 细胞显著减少的状态下该免疫反应对宿主几无保护作用;(4)宿主肺泡巨噬细胞对 PC 的吞噬作用为最主要的防御机制,而 PC 可以通过转化 MSG 的表达来逃避宿主的免疫攻击或通过产生过量的富含甘露糖的表面蛋白来干扰肺泡巨噬细胞甘露糖受体的表达及活性,提示抗原多态性和(或)变异可能是 PC 逃避宿主防御的机制之一。

至今,国内外尚无 RNAi 技术干扰 PC 基因表达、治疗 PCP 的报道。基于 RNAi 技术对目的基因特异、高效的抑制作用,并正逐渐由基础研究向临

(下转第 525 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

[3] Westberg JA,Serlachius M,Lankila P,et al. Hypoxic preconditioning induces neuroprotective stanniocalcin-1 in brain via IL-6 signaling[J]. Stroke,2007;38(3):1025-1030.

[4] Bernaudin M,Tang Y,Reilly M,et al. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance[J]. J Biol Chem,2002;277(42):39728-39738.

[5] 周 烜,邬力祥,刘发益,等. 低氧预适应对离体星形胶质细胞缺氧复氧耐受性的影响[J]. 第三军医大学学报,2007;29(8):681-684.

[6] 吕国蔚,史美棠,李 凌,等. 急性重复缺氧对小鼠缺氧耐受性的影响及其机制的初步探讨[J]. 中国病理生理杂志,1992;8(4):425-428.

[7] 董苍转、吕国蔚. 缺氧预适应小鼠脑匀浆提取液对 PC12 细胞的影响[J]. 首都医科大学学报,2001;22(2):97-99.

[8] Lu GW,Yu S,Li RH,et al. Hypoxic preconditioning:a novel intrinsic cytoprotective strategy[J]. Mol Neurobiol,2005;31(1-3):255-271.

[9] 李 宏,高文祥,卢国守,等. 缺氧预适应小鼠脑匀浆提取液对 HepG2 细胞缺氧耐受性的影响[J]. 河南师范大学学报,2007;(4):127-130.

[10] 李如亮,王延枝,张楚富.生物化学实验[M]. 第 1 版.武汉:武汉大学出版社,1998.57-58.

[11] Todoroki S,Morooka H,Yamaguchi M,et al. Ropivacaine inhibits neurite outgrowth in PC-12 cells [J]. Anesth Analg,2004;99(3):828-832.

[12] 曹 亚,李官成,邓锡云,等. 实用分子生物学操作指南[M]. 第 1 版.北京:人民卫生出版社,2003.22-23.

[13] 胡 野,凌志强,单小云. 细胞凋亡的分子医学[M]. 第 1 版.北京:军事医学科学出版社,2002.474.

[14] Tischler AS,Greene LA.Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor [J]. Lab Invest,1978;39(2):77-89.

[15] Levi A,Biocca S,Cattaneo A,et al. The mode of action of nerve growth factor in PC12 cells[J]. Mol Neurobiol,1988;2(3):201-226.

[16] Divinski I,Holtser-Cochav M,Vulih-Schultzman I,et al. Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin[J]. J Neurochem,2006;98(3):973-984.

[17] Carmeliet P,Dor Y,Herbert JM,et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis,cell proliferation and tumour angiogenesis [J]. Nature,1998;394(6692):485-490.

[18] Shoshani T,Faerman A,Mett I,et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene,RTP801,involved in apoptosis[J]. Mol Cell Biol,2002;22(7):2283-2293.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 519 页)

床应用发展的趋势,结合目前对 PC MSG 基因序列及其功能分析结果[8~10],我们针对 PC MSG 靶基因设计同源序列,用含有 RNA 聚合酶启动子Ⅲ(RNA polⅢ)的转录载体 pTZU6+1 成功构建能产生 siRNA 的重组载体质粒 pPC-MSG,为 RNAi 治疗 PCP 的实验研究与临床研究奠定了基础,已经证明重组载体质粒 pPC-MSG 在体外对 PC 有一定干扰作用。

(致谢:重庆医科大学病毒性肝炎研究所的唐霓博士、郭晖老师;重庆医科大学附属第一医院的向廷秀博士、张秉强博士、余登高老师、唐小葵博士;深圳市红十字会医院倪小毅博士等。)

参 考 文 献

[1] 倪小毅,陈雅堂.卡氏肺孢子虫在八种细胞系上的增殖情况[J]. 中华传染病杂志,2002;20(4):233-236.

[2] 倪小毅,陈雅堂.快速鉴定卡氏肺孢子虫[J]. 重庆医科大学学报,1999;24(3):283-284.

[3] Keely SP,Fischer JM,Stringer JR.Evolution and speciation of Pneumocystis[J]. Eukaryot Microbiol,2003;50(S):624-626.

[4] Frenkel JK.Pneumocystis pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease(IDD):a critical historical overview[J]. Eukaryot Microbiol,1999;46(5):89-92.

[5] Cushion MT,Stringer JR.Has the name really been changed?It has for most researcher[J]. Chin Infect Dis,2005;41(12):1756-1758.

[6] Stringer JR,Beard CB,Miller RF,et al.a new name (Pneumocystis jiroveci)for Pneumocystis from humans[J]. Emerg Infect Dis,2002;8(9):891-896.

[7] Ambrose HE,Keely SP,Aliouat EM,et al.Expression and complexity of the PRT1 multigene family of Pneumocystis carinii [J]. Microbiology,2004;150(Pt 2):293-300.

[8] Stringer JR, Keely SP.Genetics of Surface Antigen Expression in Pneumocystis carinii[J]. Infection and Immunity,2001;69(2):627-639.

[9] Hauser PM,Lo Presti L,Cockell M,et al.Analysis of Pneumocystis carinii gene function by complementation in yeast mutants[J]. Eukaryot Microbiol,2006;53(Suppl 1):S149-150.

[10] Keely SP,Linke MJ,Cushion MT,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.

(责任编辑:冉明会)