维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0264-03

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

谭 燕[1],姚云清[1],王莉妮[1],唐滢浍[1],李文桂[1],马 良[2],陈雅棠[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016; 2.美国路易斯安那州新奥尔良大学医学院,路易斯安那州 70112)

【摘 要】目的:构建并鉴定艾滋病主要机会性感染病原体 - 卡氏肺孢子(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-UCS 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,采用双酶切与测序法进行鉴定。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:成功构建和鉴定 PC MSG-UCS 基因的 siRNA 表达载体。

【关键词】PC MSG-UCS;siRNA;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】2008-01-09

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

TAN Yan, et al

(*Department of Infectious 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's upstream conserved sequence(UCS). *Methods*: Short hairpin RNA(shRNA) oligonucleotide targeting PC MSG UCS gene which was chemically synthesized and inserted into RNAi-Ready plasmid vector pTZU6+1 after annealing. The recombinant plasmid, PC-UCS, transformed into E. coil. TOP10 and amplified, was digested by restriction endonucleases HindIII and EcoRI and identified by gel electrophoresis 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-UCS, was constructed successfully.

【Key word】Pneumocystis carinii MSG-UCS;siRNA;Expression vector

卡氏肺孢子肺炎泛指肺孢子肺炎,其中耶氏肺孢子(Pneumocystis jiroveci,PJ)感染人体后引起的威胁人类健康的机会性感染性疾病,它好发于艾滋病(Acquired immune deficiency syndrome,AIDS)、器官移植、胶原性疾病长期使用皮质类固醇激素等各种先天或后天免疫机能缺陷者。由于 PJ 获取与体外持续培养困难,目前国内外多采用大鼠卡氏肺孢子肺炎(Pneumocystis carinii pneumonia,PCP)模型进行研究。MSG 是 PC 细胞壁的主要组成成分,积极参与了 PC 与宿主细胞间的免疫反应,对 PCP 的发病起着关键的作用;研究发现 MSG DNA UCS 调控 MSG 基因 mRNA 转录、翻译后初始 MSG 向内质网转运的重要环节[1]。本实验拟构建针对 MSG UCS 靶基因序列的 siRNA 载体,特异性地抑制甚至阻断 PC MSG 基因的表达,导致 PC 胞壁缺损并杀灭 PC,最终治愈 PCP 患者。

作者介绍:谭 燕(1981-),女,住院医师,硕士,研究方向:感染性疾病的发病机制和治疗。

通讯作者:姚云清,男,主任医师,E-mail:cqyaoyunqing@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471512),重庆市医学科技计划项目(04-2-100)。

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、

维普资讯 http://www.cqvip.com

T4 DNA 连接酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、高效感受态细胞试剂盒、DNAmarker 等购自上海生工生物工程有限公司与 TakaRa 公司。shRNA 由上海生工美国 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生物学重点实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 表达载体 pPC-UCS 的构建

1.2.1.1 shRNA-PC-UCS 的设计 在 genebank 查找 PC MSG UCS 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'-TCGAGAAGGGAGAATTGAGTTAAATCTTCGGATTTAACTCAATTCTCCCTTTTTTT-3'，反义链 5'-CTAGAAAAAAAGGGAGAATTGAGTTAAATCCGAAGATTTAACTCAATTCTCCCTTC-3'，正义链 5'末端与反义链 3'末端分别添加限制性核酸内切酶 *Sal* Ⅰ与 *Xba*l Ⅰ酶切位点。

1.2.1.2 单链 shRNA-PC-UCS 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 1 OD (33μl)，取溶解液各 10μl 混合，退火条件：94℃孵育 4min，80℃孵育 4min，37℃ 4min，25℃ 2min，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×T4 DNA 连接酶缓冲液 1.5μl，线性 pTZU6+1 质粒 2μl，T4 DNA 连接酶 1μl，加双蒸水至 15μl，于 16℃孵育过夜，置 -20℃保存。

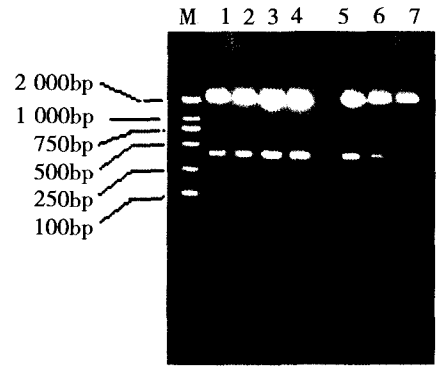
1.2.1.4 重组质粒 pPC-UCS 转化感受态 TOP10 和转化克隆挑选 转化分 2 组，取已分装好的感受态细菌 2 管，分别加入上述连接液和 pTZU6+1 质粒各 10μl，轻轻混匀后于冰上放置 30min，42℃孵育 90s，然后再在冰上放置 20min，加入 1ml LB 培养基后 37℃振荡培养 1h，最后将其涂于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂糖平板上，37℃培养 12h，空载体 pTZU6+1 质粒转化菌未见克隆生长，重组质粒 pPC-UCS 转化菌有克隆生长，挑取较大的分散的克隆置于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃振荡培养 12h，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

1.2.2 siRNA 表达重组质粒 pPC-UCS 的鉴定

1.2.2.1 酶切后凝胶电泳 用 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切重组质粒 pPC-UCS，以 pTZU6+1 空载体作对照。反应体系为：Hind Ⅲ0.5μl，EcoR Ⅰ0.5μl，pPC-UCS 或 pTZU6+1 12μl，10×M buffer1.5μl，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。

1.2.2.2 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。

2 结 果



M. DNA Marker；1~6. 重组质粒 pPC-UCS；7. 空载体 pTZU6+1

图 1 重组质粒 pPC-UCS 双酶切后凝胶电泳成像

2.1 重组质粒 pPC-UCS 酶切后凝胶电泳鉴定

用 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切重组质粒 pPC-UCS 后产生 2 800bp 与 408bp 片段，而空载体 pTZU6+1 双酶切后产生 2 800bp 与 352bp 片段，凝胶电泳结果与预期相符，初步证明 shRNA-PC-UCS 已被插入到 pTZU6+1 载体中，见图 1。

2.2 重组质粒 pPC-UCS 的测序鉴定

测序结果表明重组质粒 pPC-UCS 含有正确的目的寡核苷酸片段，见图 2。

3 讨 论

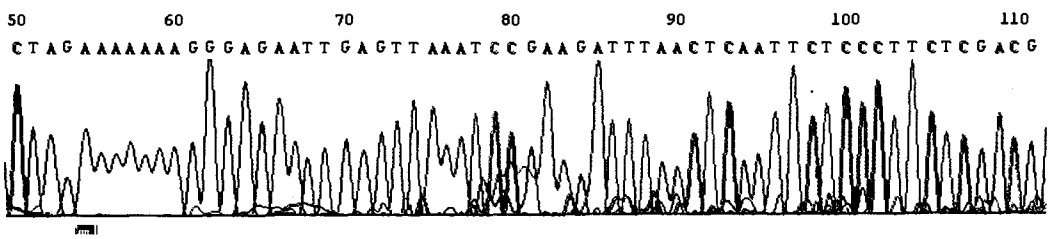


图 2 pPC-UCS 测序结果

维普资讯 http://www.cqvip.com

自 1981 年美国学者报告首例 AIDS 患者以来，联合国艾滋病规划署公布全世界超过 7 000 万 HIV 感染者，其中约 4 200 万已经死于艾滋病。因此艾滋病与结核病、疟疾构成全球 3 大严重传染病，并高居首位。艾滋病最主要的致死原因是机会性感染，其中 PC 引起的肺部感染—PCP 最为多见，80%以上的艾滋病患者可经历 1 次或多次 PCP。此外，器官移植、胶原性疾病长期使用皮质类固醇激素、白血病、肿瘤治疗中大量使用细胞毒性药物等各种先天与后天免疫机能缺陷者，PCP 的发病率可高达 54.5%并逐年增高。PCP 患者若不经治疗，病死率高达 100%。目前的防治对策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，临床发现这些药物存在严重的毒副作用，部分患者不能耐受；同时部分患者体内的 PC 发生基因变异可产生耐药性，这就迫切需要研究更加有效的防治措施。

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酸序列分析，在 PC 的滋养体型和包囊型的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，分别编码主要表面糖蛋白、表面糖蛋白相关抗原(Major surface glycoprotein-related antigen，MSR)和 PRT1 (Phosphoribosyltransferase1，PRT1)蛋白激酶。MSG 具有重要的生物学意义而倍受重视，其积极参与了 PC 与宿主细胞间的免疫反应。PC 经呼吸道感染后主要沉积在肺泡内繁殖，其致病须要附在Ⅰ型肺泡上皮细胞上，MSG 与宿主细胞的纤维连结素、表面活性蛋白 A、D 等结合介导 PC 粘附宿主细胞，MSG 抗原刺激宿主非特异性免疫细胞聚集于肺泡间质、释放 TNF-α 等细胞因子加重肺泡等肺组织的损伤；PC 可以通过转换 MSG 的表达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，以逃避宿主的免疫攻击。如何控制 MSG 基因的表达已经成为我们防治 PC 感染、致病的关键环节。而 MSG 基因大家族仅由 UCS 基因调控，启动其下游连接的 1 个待转录 MSG 基因 mRNA 的表达。UCS 基因高度保守，是 1 个极具吸引力的 PCP 基因治疗靶点[1,2]。

近年来发现并迅速发展的新型基因阻断技术-RNA 干扰(RNA interference，RNAi)，也称为基因沉寂疗法(Gene silencing)，为我们治疗 PCP 提供了新的思路与强劲的技术支持。RNAi 技术的基本原理是，利用 siRNA(或称小干扰性 RNA，micro-RNA，miRNA)诱导目的基因转录后 mRNA 的降解或抑制其翻译蛋白质，从而特异性地阻断目的基因的表达；研究还发现，RNAi 参与了染色体基因组的修饰作用，包括 DNA 的甲基化、异染色质的形成以及程序性 DNA 清除等过程。

许多研究表明在哺乳动物细胞中用 siRNA 能高效阻断某个特定基因的表达，它与正义、反义 RNA 基因干涉相比，具有效果最强；持续时间长，甚至可持续到下一代；具有基因序列特异性；不受注射部位的影响等优点。RNAi 作为 1 种新的基因表达调控方式，在防御病毒感染、维持基因组稳定性、参与胚胎发育调控等多方面发挥重要的生物作用[3]。

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 技术显示出对目的基因特异、高效的抑制作用，并正逐渐由基础研究向临床应用发展的趋势，结合目前对 PC MSG-UCS 基因序列分析结果，我们针对高度保守的、启动 PC MSG 基因转录的 PC UCS 区段设计同源序列，用含有 RNA 聚合酶启动子Ⅲ(RNA pol Ⅲ)的转录载体构建能产生 siRNA 的载体质粒，拟采用脂质体或新型多聚阳离子载体 PEI 介导转染进入 PC 细胞内表达 siRNA，特异性地抑制 PC UCS 基因以至阻断 PC MSG 基因的转录和蛋白质翻译，导致 PC 的胞壁缺损并杀灭 PC，最终治愈 PCP 患者。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] Schaffzin JK，Stringer JR.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(Pt 3)：677-686.

[3] Kim N，Gan HH，Schlick T. A computational proposal for designing structured RNA pools for in vitro selection of RNAs [J]. RNA，2007；13(4)：478-492.

(责任编辑：关蕴良)