维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0597-04

Hsp90α 基因 RNAi 的载体构建研究

聂 滨,曾照芳

(重庆医科大学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室、重庆市重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建 Hsp90α(Heat shock protein 90 alpha)siRNA(Small interfencing RNA)表达载体,为后续的功能研究提供平台。方法:根据 Hsp90α 基因 cDNA 序列,设计有小发夹结构的 3 条寡核苷酸序列到空载体 Psuper EGFP1 中,转化 TOP10 菌株,提取质粒,进行酶切鉴定和测序分析。将三条序列和对照序列的质粒分别转染 HUK293 细胞,提取总 RNA,用 RT-PCR 检测 Hsp90α mRNA 的量。结果:经酶切鉴定、电泳证明,含作用序列的重组质粒 pSuper-Hsp90α1,pSuper-Hsp90α2,及 pSuper-Hsp90α3 构建是成功的,重组质粒 pSuper-Hsp90α1,pSuper-Hsp90α2 测序分析完全正确。用 RT-PCR 初步证明三条均有干扰效果,pSuper-Hsp90α1 最明显。结论:用于 Hsp90α RNAi 的重组质粒可于体外成功构建,初步确定 pSuper-Hsp90α1 为最佳作用靶点。

【关键词】RNA 干扰;热休克蛋白 90α 亚型

【中国图书分类法分类号】R363 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-04

Construction of RNA interference expression vectors of human Hsp90 alpha

NIE Bin, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the expression vector pSuper. Hsp90α/pSuper for further research of the Hsp90α. *Methods*: In accordance with the Hsp90α sequence in gene bank, three sequences respectively targeting Hsp90α were cloned into the RNA expression vector pSuper. *Results*: It was confirmed by enzyme digestion, and electrophoresis that the construction of the recombinant expression vector pSuper-Hsp90α1, pSuper-Hsp90α2 and pSuper-Hsp90α3 was successful. pSuper-Hsp90α1 and pSuper-Hsp90α2 were successful by sequencing. The expression of Hsp90α mRNA in HEK293 cells with pSuper-Hsp90α1, pSuper-Hsp90α2 and pSuper-Hsp90α3 decreased, and pSuper-Hsp90α1 notably decreased. *Conclusion*: The recombinant plasmid against Hsp90α RNAi can be successfully constructed in vitro, and pSuper-Hsp90α1 is the possible optimal target.

【Key words】RNA interference; Hsp90α

Hsp90α 是热休克蛋白家族中重要成员之一,参与众多的细胞生理过程,包括稳定蛋白结构、参与信号转导、细胞周期调节等多方面,同时,热休克蛋白 90 还在应激损伤、感染、肿瘤、自身免疫性疾病等各种疾病的病因学、发展和治疗等病理过程中发挥重要作用[1-3]。本项研究拟利用基因克隆技术构建重组表达载体 siRNA,为 Hsp90α 功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 质粒、酶、细菌 pSUPER 质粒由重庆医科大学药理学季业伟博士惠赠,大肠杆菌 TOP10 由重庆医科大学微生物学李俊明博士惠赠;对照质粒由有大坪外研七室李平老师惠赠,*Hind*Ⅲ、BglⅡ、ECOR Ⅰ T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司,DNA 胶回收纯化试剂,质粒小量提取试剂盒购自上海华舜生物公司。

1.1.2 仪器 PCR 仪(杭州,TC-25/H),电泳仪(CBS 公司,MGU—102T)、凝胶成象系统(上海,KH—UVI)。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 设计,合成,退火形成双链 根据 Genbank 中报道的 Hsp90α 的 cDNA 序列(No.BC023006),参考 siRNA 的设计原则,利用 Ambion 公司 siRNA 在线设计软件设计 3 条长为 19 个碱基的靶序列(见下表 1)。送上海生工生物工程技术服务有限公司合成,将合成的寡核苷酸溶解在 11μl H_2O 中,终浓度为 3μg/μl。依次按以下步骤操作:Oligos 各

作者介绍:聂 滨(1975-),男,硕士,
主要研究方向:临床检验诊断学(分子生物学)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 合成的三条靶序列

靶序列 1(672)	5-GATCCCCTGACTGGGAAGATCACTTGTTCAAGAGACAAGTGATCTTCCCAGTCATTTTTGGAAA-3
	3-GGGACTGACCCTTCTAGTGAACAAGTTCTCTGTTCACTAGAAGGGTCAGTAAAAACCTTTTCGA-5
靶序列 2(909)	5-GATCCCCCATATCCCGTGAGATGTTGTTCAAGAGACAACATCTCACGGGATATGTTTTTGGAAA-3
	3-GGGGTATAGGGCACTCTACAACAAGTTCTCTGTTGTAGAGTGCCCTATACAAAAACCTTTTCGA-5
靶序列 3(1089)	5-GATCCCCGAAGCTTTCAGAGCTGTTATTCAAGAGATAACAGCTCTGAAAGCTTCTTTTTGGAAA-3
	3-GGGCTTCGAAAGTCTCGACAATAAGTTCTCTATTGTCGAGACTTTCGAAGAAAAACCTTTTCGA-5

取 2μl，加入 46μl 的退火缓冲液中，在95℃ 4min，80℃ 5min，75℃ 5min 70℃ 10min，60℃ 5min，缓慢冷却至 37℃。退火的双链用 2% 的凝胶电泳，并以单正链为对照，检测退火是否成功。

1.2.2 pSUPER EGFP1 的处理 用 BglⅡ和 *Hind* Ⅲ双酶切 pSUPER EGFP1，反应体积 100μl，缓冲液为 10×K buffer，先用 BglⅡ37℃水浴 2h，然后加入 *Hind* Ⅲ37℃水浴 3h。用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。在紫外灯照射下切下目的片段，进行回收。

1.2.3 载体片段与插入序列连接转化 将载体的酶切片段与相应的插入序列以 1:2 比例用 T4 连接酶连接，16℃水浴过夜，$CaCl_2$ 法转化 TOP10 感受态细胞，用含浓度为 30μg/ml Kana 琼脂铺板。同时设置未线性化载体为空白对照。

1.2.4 重组质粒鉴定 从阳性平板上挑取单克隆菌落，分别接种于 Kana 30μg/ml LB 培养液中，200r/min、37℃振荡过夜。次日小量抽提质粒，用 BglⅡ酶切鉴定。能被 BglⅡ酶切开的是假阳性菌。如果不能切开，再用 *Hind*Ⅲ、ECOR Ⅰ酶切进行下一步鉴定。酶切后电泳，若出现 300 bp 左右条带，可认为重组成功，使用引物（TCTCGGTCTATTCTTTTG）测序。

1.2.5 细胞转染 在转染前 2 天，用胰酶消化培养瓶中的 HEK293 细胞，然后用无血清的培养基 DMEM 稀释，使细胞浓度约为 7×10^4/ml，转入 35mm 直径的 6 孔板（每孔加入 2ml 细胞悬液），转染前 1 天，培养基换成无双抗含 10% 小牛血清的 DMEM，培养 24h 左右细胞丰度约为 70%。转染时先去掉原培养液，再用无抗无血清的 DMEM 清洗 1 次，最后加入无抗无血清的 DMEM1500ml。余按 Lipofectamine 2000（Invitrogen 公司）转染试剂说明书操作（先分别用脂质体，质粒与无抗无血清的 DMEM 混匀，体积均为 250ml，室温 5 min。然后把两者混在一起室温 30min，最后把混合物加入相应孔内）。采用脂质体 10μl，4μg 重组质粒在无血清和无双抗 DMEM 中转染 HUK293 细胞，同时设对照组，转染 4μg 对照质粒（大坪医院外科研究所李平惠赠）和空白组（不加质粒和转染试剂）。在转染后 6h 换无抗无血清的 DMEM 继续培养。

1.2.6 RT-PCR 分析 Hsp90α mRNA 的表达 在转染 24h 后采用 Trizol 一步法（Invitrogen 公司）提取细胞总 RNA，取 2μg RNA 进行逆转录（Superscriptase Ⅱ，Invitrogen 公司）得到 cDNA。特异性 Hsp90α 扩增的正向引物序列为：5'AGGATCTGGTCATCTTGCTTATG 3'，反向引物为 5'TCATCAATACCCATACCAAGTTTG 3'，扩增片段 120bp。特异性内参 GAPDH 扩增正向引物序列为 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'，反向引物为 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'，扩增片段 400bp。20μl PCR 反应体系，94℃ 2min，94℃ 30s、53℃ 30s、72℃ 60s 进行 32 个循环后。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳后凝胶成像，抑制率计算参照文献[4]。

2 结 果

2.1 质粒构建模式图

将合成的寡核苷酸与 pSUPER 载体连接，构建模式见图 1。

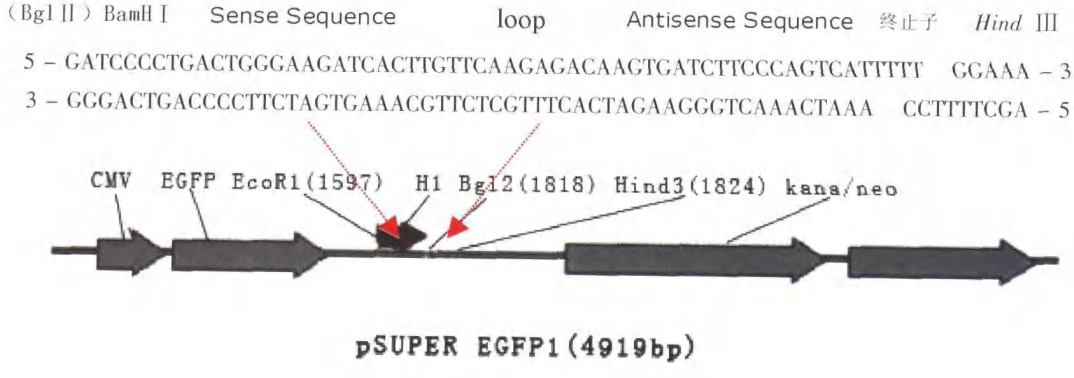


图 1 质粒构建模式图

维普资讯 http://www.cqvip.com

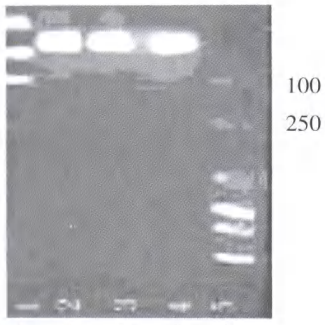


图 2 退火电泳图

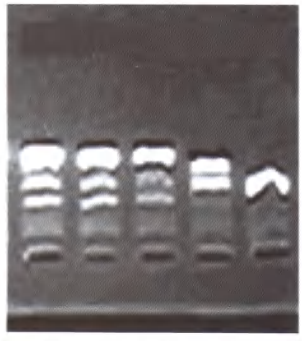


图 3 BglⅡ酶切鉴定图

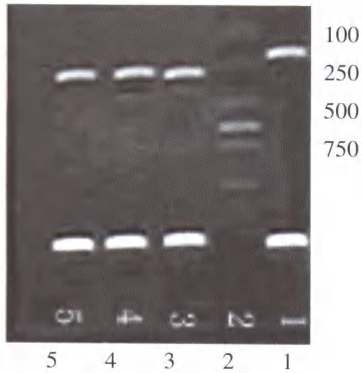


图 4 *Hind*Ⅲ、ECOR Ⅰ酶切图

2.2 退火寡核苷酸与单链寡核苷酸电泳结果

电泳图(见图 2),Lane1 为靶序列 1 的单正链;Lane2,Lane3,Lane4 分别为退火的靶序列 1,2 和 3;Lane5 为 Marker 2000。可见退火前后的寡核苷酸电泳图谱明显不同,Lane1 出现 3 条带,位置在 120 bp,60 bp,及 30 bp 左右,分别是单链,双链以及自身折叠形成的发夹结构。Lane2,3,4 电泳图谱出现 1 条带,约 60 bp 左右。

2.3 重组质粒酶切结果

将菌落扩增后提取质粒,酶切鉴定结果如图 3 所示。图中,Lane1 为同时被酶切的空 Psuper;Lane2 为未被酶切的 Psuper;Lane3,Lane4,Lane5 分别为酶切含靶序列 1,2 和 3 的 Psuper;靶序列 1,2 和 3 的 Psuper 不能被 BglⅡ切开,而空质粒对照可被切开。对不能切开的质粒行 *Hind*Ⅲ、ECOR Ⅰ酶切电泳如图 4 所示。图中,Lane1 为被酶切的空 Psuper;Lane2 为 Marker 2000;Lane3,Lane4,Lane5 分别为连接的靶序列 1,2 和 3;靶序列 1,2 和对照有一电泳条带位置在 300bp 左右,应该是重组的阳性载体;而对照空质粒酶切的小片段在 230bp 左右。

2.4 测序结果

把含靶序列 1,2 和 3 的质粒命名为 pSuper-Hsp90α1,pSuper-Hsp90α2,及 pSuper-Hsp90α3。pSuper-Hsp90α1,pSuper-Hsp90α2 测序结果如图 5 和图 6 所示,与设计目标应合成的链完全一致,说明已把靶序列 1 和靶序列 2 合成的寡核苷酸插入到了 RNAi 载体 pSUPER EGFP1 中,成功构建了能靶向 Hsp90α 基因的 siRNA 载体。由于 pSuper-Hsp90α3 测序始终在发夹处信号有中断,应继续考虑改变其测序方向,以得出更全面的结果。

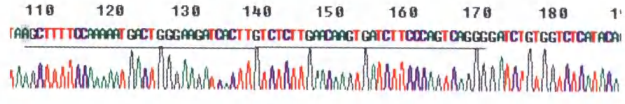


图 5 含靶序列 1 的 pSuper-Hsp90α1 测序结果

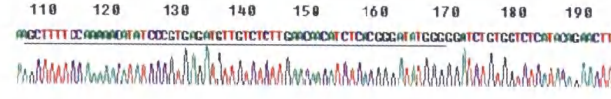


图 6 含靶序列 2 的 pSuper-Hsp90α2 测序结果

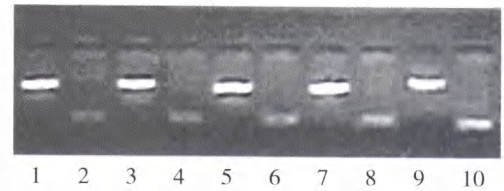


图 7 siRNA 抑制 Hsp90α mRNA 表达

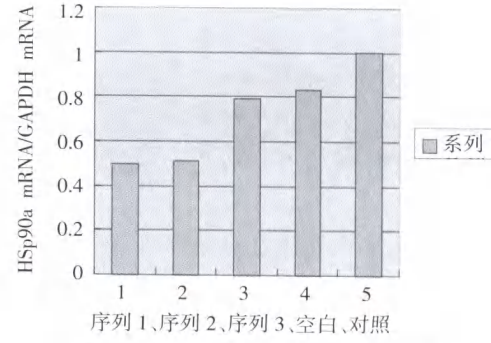


图 8 siRNA 抑制 Hsp90α mRNA 表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.5 siRNA 对 Hsp90αmRNA 表达水平的抑制作用

采用半定量 RT-PCR 测定靶基因 Hsp90α mRNA 与对照基因 GAPDH mRNA 的表达水平。结果显示,与对照转染组比,对靶基因 Hsp90α mRNA 表达具有明显的抑制作用(图 7)泳道 1、3、5、7、9 分别是靶序列 1、靶序列 2、靶序列 3、空白、对照的 GAPDH;泳道 2、4、6、8、10 分别是靶序列 1、靶序列 2、靶序列 3、空白、对照的 Hsp90α。采用光密度扫描法计汁算各条带光密度值(反应其 RNA 含量)。将对照的 Hsp90a mRNA/GAPDH mRNA 比值定为 1。则空白 Hsp90a mRNA/GAPDH mRNA0.83,靶序列 1Hsp90a mRNA/GAPDH mRNA,靶序列 2Hsp90α mRNA/GAPDH mRNA,靶序列 3Hsp90α mRNA/GAPDH mRNA 比值为分别为 0.497、0.51、0.79(见图表 1)。

3 讨 论

RNAi 技术,是指利用 21 到 23bp 长双链 RNA(即 Small interfering RNA,siRNA)诱导与其有同源序列的 mRNA 降解的过程[4-6]。RNAi 与核酶法、反义核酸法、基因敲除(Knock Out)法相比有很明显的优势。RNA 干扰能在低于反义核酸几个数量级的浓度下,使目标基因表达降到极低水平甚至完全剔除,从而产生缺失突变体表型表现出其高效率。与核酶技术不能区别正常的 RNA 序列和突变的癌基因序列相比,它能够特异地只降解与之序列相对应的单个内源基因的 mRNA,治疗针对性强,不良反应小,表现其高特异性。另外双链 RNA(Double strand,dsRNA)尤为稳定,无需像反义核酸那样进行广泛的化学修饰以提高半衰期。它还能同时抑制多个基因:利用 RNAi 方法可以产生多个基因同时剔除的表型,RNA 干扰效应甚至可通过生殖系统传递到后代中去[4]。制备 siRNA 有 5 种方法:化学合成、体外转录、长片断 dsRNAs 经 RNaseⅢ类降解、siRNA 表达载体或者病毒载体在细胞中表达 siRNA、PCR 制备的 siRNA 表达框在细胞中表达。其中,通过质粒的复制扩增的方法可显著降低制备 siRNA 的成本。pSUPER RNAi 系统已经成功用在基因表达的下游调节,这种作用是有效并且特异的[7]。

成功构建 RNAi 真核表达载体,是用 RNAi 技术研究基因功能的第一步。在我们构建的过程中,有几点是非常重要。①退火一定要慢,在靶序列 Tm 附近设置的温度梯度应该密些,才能保证退火效果好。②BglⅡ在 K buffer 中反应时存在星火活性,加大缓冲体系可减少乱切可能。③在连接时靶序列和线性化的空质粒比例要适中,比例失调连接上的可能性明显下降。④因靶序列容易形成发夹结构,测序引物离目的片段近一些,有助于测通序列。

当细胞受到应激时 Hsp90α 会反应性升高,这可能是对照高于空白的原因,由于转染效率只有 70%左右,这可能是相对于空白组干扰效果欠佳的原因,在培养基中加入 G418 可以筛选出转染成功的 HUK293 细胞。但 Hsp90α 是细胞必须的蛋白,干扰掉了 Hsp90α 细胞能否成活要在后续的试验中探索。

本实验成功构建了靶向 Hsp90α 的 siRNA 真核表达载体,为下一步观察其在稳定蛋白结构、信号转导、细胞周期调节等生理功能;观察其在应激损伤、感染、肿瘤、自身免疫性疾病等病理情况下的功能,打下了稳固的基础。

(致谢:大坪外研七室的老师提供的帮助)

参 考 文 献

[1] Laurence H Pearl.Chrisostomos Prodromou Structure and in vivo function of Hsp90 [J].Current Opinion in Structural Biology, 2000;10:46-51.

[2] L.Neckers,K.Neckers.Heat shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutics-an update[J].Drugs,2005;(1):137-142.

[3] L.Whitesell,S.L.Lindquist. HSP90 and the chaperoning of cancer[J].Cancer,2005;(10):761-765.

[4] Holen T,Wiiger M.T,Prydz H. Positional effects of short interfering RNA targeting the human coagulation trigger Tissue FactorJ].Nucleic Acids Research,2002;30:1757-1766.

[5] Elbashir SM,Lendeckel W,Tuschl T,et al.Duplexes of 21-nucleotide RNA mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J].Nature,2001;411(6836):428-429.

[6] Billy E,Zhang HD,Filipowicz W.Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines[J].Proc.Natl. Acad. Sci USA,2001;98 (25):14428-14433.

[7] Brummelkamp.T.R,Bernads. R,Agami.R.A system for stable expression of short interfering RNA in Mammalian cells [J].Science, 2002;296:550-553.