维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0943-03

糖皮质激素受体 GR 真核表达载体的构建与鉴定

李秀英[1],徐晓玉[1],孙锦帆[2],陈 林[3],杨国汉[3]

(1. 重庆医科大学药学院药理教研室,重庆 400016;2. 云南克雷斯天然药物制药有限公司,云南昆明 6500511;
3. 第三军医大学大坪医院,重庆 400036)

【摘 要】目的:构建糖皮质激素 GR 的真核表达载体,为探讨 GR 与中医肾阳虚的关系奠定基础。方法:以 GR 基因为靶基因,以 pBS / U6-Neo 质粒为载体,设计构建重组体,根据 GR mRNA 基因序列,设计有小发夹结构的 2 对寡核苷酸序列,克隆到空载体 pBS / U6-Neo,转化 DH5a 菌株,提取质粒,进行 PCR 鉴定和测序分析。结果:经 PCR 鉴定筛出的重组体测序结果与目的序列相同,重组载体构建成功。结论:利用 RNA 干扰技术可成功构建小干扰 RNA 重组体,为后续稳定转染及培育转基因小鼠奠定基础。

【关键词】糖皮质受体 GR;RNA 干扰;pBS / U6-Neo 载体
【中国图书分类法分类号】R318 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-28

Establishment and identification of siRNA eukaryotic expression vectors of recombinant targeting gene glucocorticoid receptor

LI Xiuying, et al

(*Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Establish eukaryotic expression vector of glucocorticoid receptor GR, to explore the relation of GR and tradition Chinese medicine. *Methods*: Recombinant were designed and established Supported by the National Natural Science Foundation of China (3047119) by targeting gene GR and plasmid pBS / U6-Neo based on GR mRNA sequence. Two pairs of oligonucleotides were synthesized and inserted into plasmid pBS / U6-Neo to generate siRNA eukaryotic expression vectors. DH5a strains were transformed. plasmids were extracted, and the recombinant sequences were identified by PCR and sequencing. *Results*: The result of recombinant sequence was the same as aim sequence. The recombinant vectors were established successfully. *Conclusion*: siRNA recombinant can be established successfully by RNAi technique, to use in further gene stability transfer and cultivate transgenic mouse.

【Key words】Glucocorticoid receptor (GR); RNA interference; pBS / U6-Neo vector

糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)具有调节多种生理功能的作用,如代谢、分化和生长、抗炎和免疫抑制剂等,而其很多效应需要糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)的介导。即激素通过扩散进人细胞,与受体形成复合物,活化的激素-受体复合物结合到染色质上的高亲和力位点,进而调节特异性基因的转录[1]。现代研究表明肾阳虚患者其体内 GR 表达降低[2-4];本文基于 GR 功能下调是中医(肾)虚症的共同病理基础之一的事实,构建 RNA 干扰的 GR 表达载体,为进一步研究 GR 与肾阳虚症的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大肠杆菌 DH5a(本室保存);pBS / U6-Neo 载体(本室保存);限制性内切酶 Apa I、*Hind* Ⅲ、EcoR I、T_4 多核苷酸激酶、T_4 DNA 连接酶、T_4 DNA 聚合酶、DL2000 marker 和胶回收试剂盒(TAKARA),质粒抽提试剂盒(OMIGA),PCR 引物由上海生工公司合成。

1.2 siRNA 设计和重组体的构建

根据 Genbank 中报道的 GR 的 mRNA 序列(No.

作者介绍:李秀英(1975-),女,硕士研究生,
主要研究方向:药理学。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(3047119)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

X04435),参考 siRNA 的设计原则及参考文献[5-7],利用 pubmed 的 siRNA 在线设计软件分别在 GR 基因的 2 号外显子及 3、4 号外显子处设计以 3 个 G 开头的 GR 靶定 oligos 序列:

E1:5'-GGTCAGACCTGTTGATAGATA-3';

E2:5'-AGCTTATCTATCAACAGGTCTGACCCTTTTTG-3';

E3:5'-AGCTTATCTATCAACAGGTCTGACC-3';

E4:5'-AATTCAAAAAGGGTCAGACCTGTTGATAGATA-3';

F1:5'-GGACAGCACAATTACCTTTGA-3'

F2:5'-AGCTTCAAAGGTAATTGTGCTGTCCCTTTTTG-3';

F3:5'-AGCTTCAAAGGTAATTGTGCTGTCC-3'

F4:5'-AATTCAAAAAGGGACAGCACAATTACCTTTGA-3'。

分别在寡核苷酸片段的 5' 和 3' 端及 loop 结构处引入 Apa I、EcoR I 和 *Hind* Ⅲ酶切位点,便于与 pBS / U6-Neo 载体连接。

1.3 单链 DNA 片段的退火和磷酸化

分别取等量的合成的 oligos 单链片段样品 E1 和 E3、E2 和 E4、F1 和 F3、F2 和 F4 各 1μl,溶解在 48μl 退火缓冲液中,95℃水浴 5 min,自然缓慢冷却至室温,得到双链目标 DNA 片段;将退火的 oligos 进行磷酸化,反应条件:10×T_4 polynucleotide kinase buffer 1μl、T4 polynucleotide kinase 1μl、退火 oligos 2μl、双蒸水 6μl,混匀,37℃水浴 30min,70℃卵育 10min。

1.4 酶切和第一条链的连接反应

pBS/U6-Neo 载体用 Apa I 酶切,为了防止酶切后的产物自身连接,对酶切产物进行了钝化,其反应为:载体质粒 8.5μl、10×T_4 DNA polymerase buffer1.5μl、0.1% BSA 1.5μl、dNTP mixture 2μl,70℃保温 5min、37℃水浴 5min 后加入 T4 DNA polymerase 1.5μl、37℃反应 5min,钝化后的产物用乙醇、醋酸钠进行沉淀和纯化,纯化后的样品用 Hind Ⅲ酶切,酶切线性化产物用 1.0%琼脂糖凝胶回收。将 0.3 pmol 磷酸化退火片段 E1+E3、F1+F3 和 0.03pmol 线性化 pBS / U6-Neo 载体溶解在 1μl 连接酶缓冲液中,加入 1μl T4 DNA 连接酶,补足水至终体积 10μl,16℃ 水浴连接反应过夜。分别将重组质粒命名为 pBS / U6-Neo-E1 和 pBS / U6-Neo-F1,将重组质粒分别转化感受态细菌 DH5a,涂布于含 Amp 抗性的 LB 平板上,37℃ 恒温培养过夜。然后各挑取 10 个单克隆菌落进行 PCR 分析。其引物分别为:E3、F3 和 TW13;选择一个 PCR 鉴定正确的菌液进行扩增、提质粒;提取的质粒进行 Apa Ⅰ 酶切,酶切后产物转化感受态细菌 DH5a,涂布于含 Amp 抗性的 LB 平板上,37℃ 恒温培养过夜。然后挑取 1 单克隆菌落进行扩增目的质粒 DNA,对提取的目的质粒 DNA 进行测序分析。

1.5 酶切和第二条链的连接反应

将测序正确的重组质粒 pBS / U6-Neo-E1 和 pBS / U6-Neo-F1 分别用 *Hind* Ⅲ和 EcoR Ⅰ酶切,酶切产物进行胶回收,连接第二条链:E2+E4,F2+F4;分别将连接了第二条链的重组质粒命名为 pBS / U6-Neo-E2 和 pBS / U6-Neo-F2,连接产物进行转化、涂板、挑单菌落扩增、提质粒,主要步骤同上,将提取的质粒用 *Hind* Ⅲ酶切,酶切产物用引物 T3 进行测序分析。

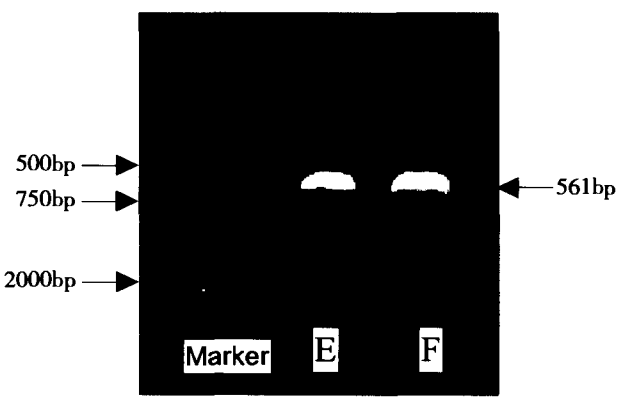
2 结 果

2.1 空载体酶切鉴定

将空载体酶切产物行电泳检查,发现环状质粒已被切开,大片段约为 5300bp。

2.2 PCR 鉴定

将第一段连接好的质粒 pBS/U6-Neo-E1 和 pBS/U6-Neo-F1 分别用引物 E3 和 TW12、F3 和 TW12 进行 PCR 分析鉴定,获得的目的条带为 561bp,与试验预期目的相符,见图 1。

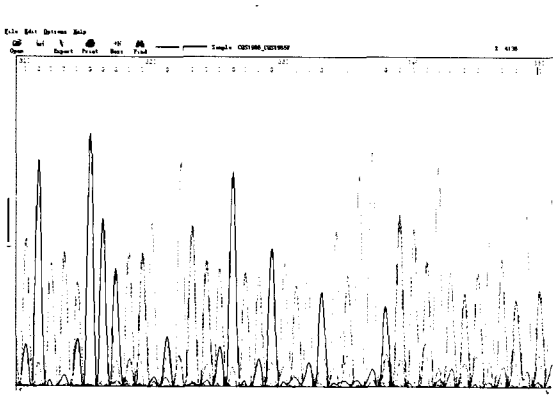


Marker:DL2000;E: pBS / U6-Neo-E1;F: pBS / U6-Neo-F1

图 1 重组质粒 E 和 F 第一次连接的 PCR 分析

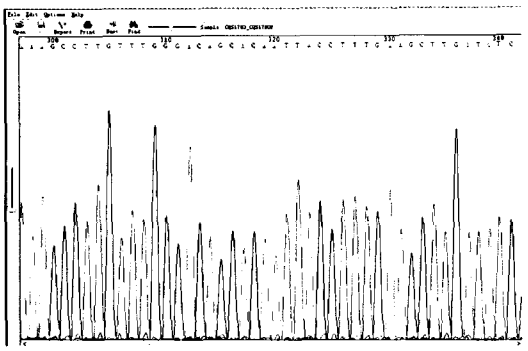
2.3 测序结果

将重组质粒 pBS/U6-Neo-E1、pBS/U6-Neo-F1 和 pBS/U6-Neo-E2、pBS/U6-Neo-F2 *Hind* Ⅲ酶切产物送大连宝生物公司测序。测序结果均与目的序列相同。



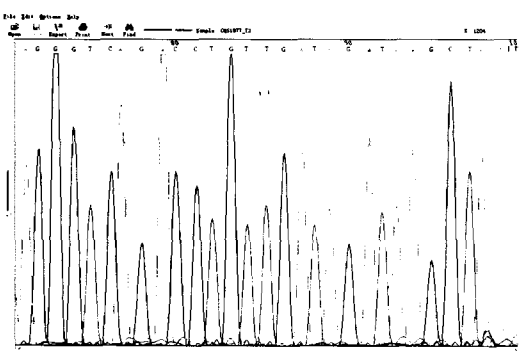
a:重组质粒 pBS / U6-Neo-E1 中 E1 部分

维普资讯 http://www.cqvip.com

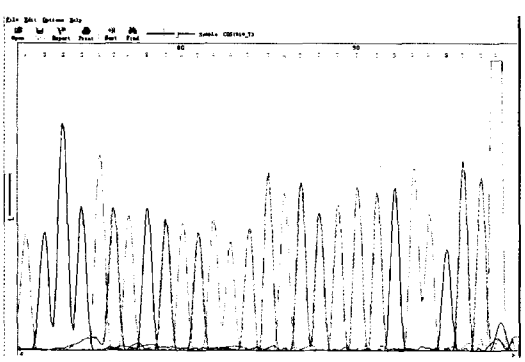


b:重组质粒 pBS / U6-Neo-F1 中 F1 部分

图 2 重组质粒用引物 TW13 的测序结果



a:重组质粒 pBS / U6-Neo-E2 中 E4 部分



b:重组质粒 pBS / U6-Neo-F2 中 F4 部分

图 3 重组质粒用引物 T3 的测序结果

3 讨 论

抑制蛋白活性的研究策略是研究许多生理和病理过程的重要方法。近来研究表明,一些小的双链 RNA 可高效、特异地阻断体内特定基因表达,促使 mRNA 降解,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型,即 RNA 干扰。

本课题运用pBS/U6-Neo 载体质粒, 将针对靶序列的寡核苷酸序列设计成具有回文结构的模板链, 在细胞内转录出具有互补序列的单链 RNA,并自身折叠形成发夹样双链结构, 类似于小干扰 RNA,从而达到阻断目的基因表达的目的。经测序表明载体构建成功,为后续的实验奠定了基础。

(通讯作者:徐晓玉,023-68485216,xxy0618@sina.com)

参 考 文 献

[1] 杨世杰,主编.药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.123.

[2] 凌昌全,李 敏,朱德增,等.糖皮质激素受体与阴阳虚症关系的初步探讨[J]. 上海中医药杂志,2001;1(1):34-35.

[3] 凌昌全,李 敏.糖皮质激素受体—虚症相关蛋白之一[J]. 上海中医药杂志,2003;37(5):8-10.

[4] 凌昌全,李 敏,朱德增,等.阴阳虚症与糖皮质激素受体关系的临床与实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志,2001;11(9):532-533.

[5] Xavier Coumoul,Wenmei Li,Rui-Hong Wang, et al. Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system[J]. Nucleic Acids Research,2004;32(10):85-90.

[6] Rashmi G,Shah,Medini M,et al. DNA vector-based RNAi approach for stable depletion of poly (ADP-ribose) polymerase-1 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2005;331(1):167-174.

[7] Yang Shi.Mammalian RNAi for the masses[J]. TRENDS in Genetics,2003;19 (1):9-12.

(上接第 942 页)

法及影响脉搏波速度的因素[J]. 生物医学工程学杂志,2000;17(2):179-182.

[7] 全晓莉,何 为,张维维. 利用示波法原理测量血压的一种新方法[J]. 航天医学与医学工程,2006;19(1):71-73.

[8] 张维维,何 为,全晓莉. 应用示波法计算血压方法的改进与实现[J]. 医疗卫生装备,2005;26(11):5-6.

[9] 朱燕秋,杨 浩,何 为. 血管硬化指数的测量方法与临床应用研究[J]. 医疗设备信息,2005;20(9):13-15.

[10] 全晓莉, 何 为, 古良玲. 动脉硬化指数的测量与临床研究[J]. 医疗卫生装备,2006;27(2):1-2.

[11] 罗志昌,张 松,杨益民,等. 光电容积脉搏波描记法原理及其在临床上的应用[J]. 世界医疗器械,2000;16(9):41-47.