维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)01-0001-04

靶向呼吸道合胞病毒 M2 基因 pshRNA 载体质粒的构建及意义

崔玉霞[1]，王萍玲[2]，周　娟[1]，杨锡强[1]

（1. 重庆医科大学附属儿童医院免疫室，重庆　400014；2. 贵阳市妇幼保健医院妇产科，贵阳　550004）

【摘　要】目的：构建针对呼吸道合胞病毒（RSV）M2 基因 mRNA 的短发卡结构状 RNA（shRNA）重组载体质粒，为利用 RNA 干扰技术抗 RSV 感染的深入研究奠定基础；方法：按 shRNA 设计原则，选择 RSV－M2 基因作为靶基因，设计 19bp 长的能产生短发卡结构的两段 DNA 反向重复序列，中间以 9bp 序列间隔，经退火形成互补双链，克隆至转录载体 pgenesil-1 上，重组质粒经酶切和测序鉴定，然后将构建成功的重组质粒转染 HEP2 细胞，荧光显微镜下观察绿色荧光细胞发生率以评估转染效率。结果：将设计合成的 DNA 片段成功克隆至载体上，经酶切及序列鉴定为目的序列，并且荧光显微镜下观察细胞有较多的绿色荧光蛋白表达。结论：成功构建了针对 RSV M2 基因 mRNA 的 shRNA 重组载体质粒，可利用重组质粒进一步研究其对 RSV 感染的抑制，从而为抑制 RSV 感染寻找新的基因治疗手段。

【关键词】呼吸道合胞病毒；M2 基因；短发卡结构状 RNA；重组质粒

【中国图书分类法分类号】Q784　　**【文献标识号】**A　　**【收稿日期】**2005-07-27

Construction and significance of the short hairpin RNA recombinant plasmid targeting M2 gene of respiratory syncystial virus

CUI Yuxia, et al

(*Immunology Lab,Children's Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To construct the recombinant plasmid targeting M2 gene of respiratory syncystial virus (RSV) for further study of RNA interference (RNAi) technology in inhibiting RSV infection. *Methods*: According to the designing principles of shRNA, The M2 gene of RSV was selected as the target gene. A 19bp reverse repeated sequences with 9bp spacer were designed and synthesized. The complement strain were obtained by annealing and inserted into the vector pgenesil-1 containing green fluorescenet protein (GFP) sequence and U6 promotor. Finally the recombinant plasmid were identified by enzyme digesion and DNA sequencing, then transfected into HEP2 cells and observed by fluorescence microscope. *Results*: The recombinante plasmid targeting the mRNA of RSV M2 gene was successfully constructed and the good efficents of transfection were found by fluorescence microscope. *Conclusion*: The successful construction of the pshRNA recombinant plasmid targeting the M2 gene of RSV will help futher study on application of the RNAi technology to anti-RSV infection.

【Key words】 Respiratory syncystial virus; M2 gene; Short hairpin RNA; Recombinant plasmid

呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus, RSV）是世界范围内婴幼儿下呼吸道感染的首要病毒病原，迄今为止尚无安全有效的抗 RSV 疫苗及治疗药物问世[1]，RNA 干扰[2]（RNA interference，RNAi）技术是一种能阻断目的基因表达的有效方法，为了从基因水平抑制 RSV 复制，我们选择对 RSV 复制起关键作用的 M2 基因[3-5]作为靶基因，利用含有 U6 启动子，以 pEGFP-C1 为骨架的转录载体 Pgenesil-1 构建能产生短发卡结构状 RNA（short hairpin RNA, shRNA）的载体质粒，为今后利用 RNAi 技术抗 RSV 感染的深入研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　质粒、菌株和细胞　含有绿色荧光蛋白（GFP）表达序

作者介绍：崔玉霞（1969－　），女，副主任医师，博士研究生，主要研究方向：儿童感染与免疫。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30340045）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

列和 U6 启动子的质粒 Pgenesil-1 由重庆医科大学肝炎研究所刘杞教授和唐琳博士惠赠；大肠杆菌 DH5α、人喉癌上皮细胞 Hep-2 由本实验室提供。

1.1.2 主要试剂 T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶 BamH Ⅰ、Hind Ⅲ购于 TakaRa 有限公司、小量质粒提取试剂盒购于 promega 公司，DNA 清洁试剂盒购于杭州 Vitagene 公司，大量质粒提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司，转染试剂 Lipofectamine™2000 购于 Invitrogen 公司。

1.1.3 shRNA 的设计 根据 Genebank 中 RSV 标准株 A2 株 M2 基因的核苷酸序列（基因编号 M74568）和 shRNA 的设计原则[6]，针对编码 RSV-M_2 蛋白的 mRNA，从起始密码子下游寻找符合设计特征的靶序列，选择 19～21nt 的 M2 基因编码区核苷酸，共设计出三对正、反义核苷酸链，并用 BLAST 软件进行同源分析证实为 RSV 高度保守后，采用化学合成方法合成单链寡核苷酸，经退火得到双链 DNA。寡核苷酸形成双链后 5′ 端带有改变一个碱基的 BamH Ⅰ酶切位点以做酶切鉴定，3′ 端带有 Hind Ⅲ酶切位点，5′ 端开始为 19 个核苷酸的正义链，中间以 9 个核苷酸间隔 TTCAAGACG 形成发夹襻状结构，其后为 19 个核苷酸的反义链，3′ 端加有转录终止信号 TTTTT。所设计的 shRNA 序列在上海博亚公司合成，三对序列分别为：

序列 1:

sense:5-GATCGGAGTATGCTCTTGGTGTAGTTCAAGACGCTACACCAAGAGCATACTCTTTTTA-3′

antisense:5-AGCTTAAAAAGAGTATGCTCTTGGTGTAGCGTCTTGAACTACACCAAGAGCATACTCC-3′

序列 2

sense:5-GATCGGAACACACTATATTTCAATTTCAAGACGATTGAAATATAGTGTGTTCTTTTTA-3′

antisense:5-AGCTTAAAAAGAACACACTATATTTCAATCGTCTTGAAATTGAAATATAGTGTGTTCC-3′

序列 3

sense:5-GATCGATCCATTGGACCTCTCAAGTTCAAGACGCTTGAGAGGTCCAATGGATTTTTTA-3′

antisense:5-AGCTTAAAAAATCCATTGGACCTCTCAAGCGTCTTGAACTTGAGAGGTCCAATGGATC-3′

1.2 *实验方法*

1.2.1 重组质粒构建和鉴定的技术路线见图 1，具体方法如下。

1.2.2 方法

1.2.2.1 退火 取等摩尔数的 DNA 合成片段在退火缓冲液中加热到 95℃ 2min，然后缓慢降至室温，乙醇脱盐纯化。

1.2.2.2 载体酶切 用 BamH Ⅰ和 Hind Ⅲ双酶切 Pgenesil-1 转录载体，DNA 清洁型试剂合回收酶切片段。

1.2.2.3 连接 将退火产物与酶切载体按 10:1 的摩尔比在 T_4 DNA 连接酶作用下 4℃过夜连接。

1.2.2.4 转化 将连接产物空质粒分别转入大肠杆菌

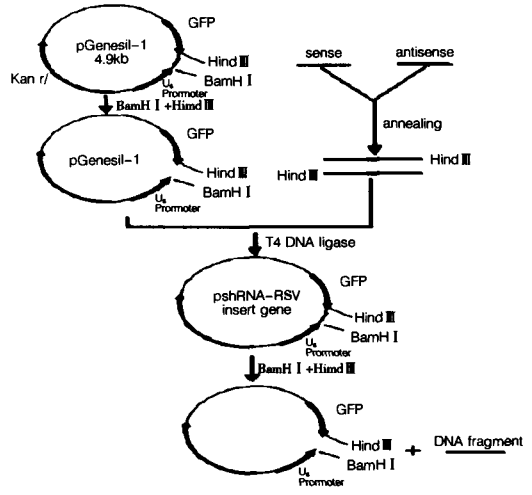


图 1 重组质粒构建和鉴定的技术路线

DH5α 感受态细菌中，180r/min 振摇 60min，取菌液涂布于 LK 平板上，卡拉霉素抗性筛选阳性克隆，37℃孵箱过夜培养。

1.2.2.5 重组质粒的筛选鉴定 挑取单菌落在 LK 培养基中振摇培养 12～14h，取菌液 1.5ml 提取质粒并酶切，取酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2.6 测序鉴定 取酶切鉴定为正确的重组质粒菌液送上海华大生物技术公司测序。构建的重组质粒根据其所针对 RSV 基因组核苷酸的起始位置分别命名为 pshRNA7816、pshRNA8260 和 pshRNA8330。

1.2.3 观察 pshRNA7816 及无关质粒转染效率 当培养在 12 孔板中的 HEP2 细胞长至 80%～90%汇合时，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的 DMEM，转染 6h 后换含血清的培养液，根据 GFP 表达后发绿色荧光的特点，细胞于转染后 24～48h，倒置荧光显微镜下直接观察转染情况并照相，随机选择 5 个视野计数细胞，按下面公式计算：绿色荧光细胞发生率 = 绿色荧光细胞数 / 总细胞数，通过绿色荧光细胞发生率评估转染效率。

2 结 果

2.1 *重组质粒的酶切鉴定*

因重组质粒 BamH Ⅰ酶切位点丢失，故不能被 BamH Ⅰ切开，仍保持环状，但是可以被 Hind Ⅲ酶切为 4848bp 的线性化 DNA 片段。空载体 pgenesil-1 的 BamH Ⅰ酶切位点存在，故 BamH Ⅰ和 Hind Ⅲ均可将 pgenesil-1 切成 4848 的线性化 DNA 片段，实验结果与预期一致，pshRNA8260 酶切鉴定见图 2，pshRNA7816 和 pshRNA8330 酶切鉴定图同 pshRNA8260。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 pshRNA 8260 酶切鉴定电泳图

注：M.DNA marker；1.未经酶切的 pgenesil-1；2.未经酶切的重组质粒；3.BamH Ⅰ单酶切；4.Hind Ⅲ单酶切；5.BamH Ⅰ+Hind Ⅲ双酶切

2.2 重组质粒序列测定

三个重组质粒 pshRNA7816、pshRNA8260 和 pshRNA8330 测序结果显示与设计 DNA 片段序列完全一致（见序列中下划线处），进一步证实 psh RNA7816、psh RNA8260 和 psh RNA8330 重组质粒构建成功。测序结果如下：

pshRNA7816

GTCAGTAGTAACTTGTTCATTGCAGCTTATAATGGTTACAA
ATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTT
TTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATG
TATCTTAACGCGTCCCGGGAAGCTTAAAAAGAGTATGCTCT
TGGTGTAGCGTCTTGAACTACACCAAGAGCATACTCCGATC
CCGCGTCCTTTCCAGAAGATATATAAACCCAAGAAATCGAA
ATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAA
AACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTAC
TTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAG
TCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTA
TATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCC
TGCCCGACCTTGGCGCGCGCTCGGCGCGCCGTCACGCTCCG
TCACGTGGTGCGTTTTGCCTGCGCGTCTTTCCACTGGGGGAA
TTCGTCGACTCTAGACACTACGTGAACCATCACCCTAATCA
AGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAA
CCCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAGC
CCGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAG
G

PshRNA8260

GTCGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAA
TAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTT
TTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGT
ATCTTAACGCGTCCCGGGAAGCTTAAAAAGAACACACTATA
TTTCAATCGTCTTGAAATTGAAATATAGTGTGTTCCGATCCC
GCCTCCTTTCCACAAGATATATAAACCCAAGAAATCGAAAT
ACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAA
CATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTT
TCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTC
AAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATA
TGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTG
CCCGACCTTGGCGCGCGCTCGGCGCGCCGTCACGCTCCGTC
ACGTGGTGCGTTTTGCCTGCGCGTCTTTCCACTGGGGGAATT
CGTCGACTCTAGACACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAG
TTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGACCC
TAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCG
GCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA
GCGGGCGC

PshRNA8330

TCATGTCGAGGTAACTTGTCCTATTGCAGCTTATAATGGTTA
CAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCA
TTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCA
ATGTATCTTAACGCGTCCCGGGAAGCTTAAAAAATCCATTG
GACCTCTCAAGCGTCTTGAACTTGAGAGGTCCAATGGATCG
ATCCCGCGTCCTTTCCACAAGATATATAAACCCAAGAAATC
GAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTT
TAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTAT
TACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTA
CAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATC
GTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCT
TCCTGCCCGACCTTGGCGCGCGCTCGGCGCGCCGTCACGCT
CCGTCACGTGGTGCGTTTTGCCTGCGCGTCTTTCCACGGGGG
GAAATCGGCGACTCTAGACACTACGTGAACCATCACCCTAA
TCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAG

2.3 pshRNA 重组质粒的转染效率

细胞于转染后 48h，倒置荧光显微镜下计数绿色荧光表达细胞，计算 pshRNA7816 和无关对照质粒的绿色荧光细胞发生率分别为 75.68% 和 73.48%，说明 Lipofectamine™ 2000 有较高的转染效率，荧光表达细胞见图 3、图 4。

3 讨 论

RSV 隶属于副粘病毒科、肺炎病毒属，为非节段性、单股负链 RNA 病毒，共编码 10 种蛋白[7,8]其基因顺序为 3′-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5′，RSVM2 基因的 mRNA 包含两个相互重叠的开放读码框架 ORF1 和 ORF2，分别编码 M2-1 和 M2-2 蛋白，M2-1 蛋白能够促进 RSV 的转录和增

维普资讯 http://www.cqvip.com

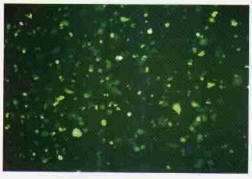


图 3　pshRNA7816 荧光细胞表达图

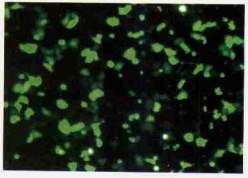


图 4　无关对照质粒荧光细胞表达图

强基因连接区的通读功能,是 RSV 复制所必需的转录延长因子[8,9],M2-2 被认为是在 RSV 感染后期 RSV 调控转录和复制的可逆开关,可调节病毒转录和复制间的平衡,对子代病毒的生成与繁殖起着至关重要的作用[9],由于 M2-1 和 M2-2 基因在病毒复制中的重要作用,故选择 M2 基因作为干扰的靶基因可有效的抑制 RSV 的复制。

RNA 干扰是由双链 RNA (double strand RNA, dsRNA)引发的使细胞内同源 mRNA 降解的转录后基因沉默现象,可以特异性抑制相应互补碱基序列的基因表达,以防御外来有害转座子或病毒的入侵。其作用机制主要是当 dsRNA 被导入细胞后,dsRNA 被细胞内核酸内切酶切割成 21～23bp 的小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA),进而启动细胞内的 RNAi 反应,而导致基因沉默,研究发现,19～23nt 的 siRNA 能特异地诱导 RNA 干扰[10,11],siRNA 可通过直接化学合成或体外转录产生,也可由启动子转录形成小发卡结构状 RNA 在体内产生siRNA[12-14],目前,已经证明在培养的哺乳细胞中 RNAi 可用于抗病毒和抗肿瘤的基因治疗[15-17]。

为了研究 RNAi 对 RSV 复制的抑制效应,在本实验中我们选择 RSVM2mRNA 作为基因干扰的靶目标,利用以 pEGFP-C1 为骨架的 Pgenesil-1 质粒作为转录载体,构建了三个能产生 shRNA 的载体质粒,并经酶切电泳和测序分析鉴定为正确的重组质粒,以脂质体 Lipofectamine™2000 作为转染试剂转染细胞,利用重组质粒在细胞内可以表达绿色荧光的特点直接观察转染效率,并证实有较高的转然效率,这些工作为我们下一步应用 shRNA 抑制 RSV 感染的研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Maggon K, Barik S. New drugs and treatment for respiratory syncytial virus [J]. Rev Med Virol, 2004;14(3):149-168.

[2] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans [J]. Nature, 1998;391(6669):806-811.

[3] Collins PL, Hill MG, Cristin J, et al. Transcription enlongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegment negtive-strand RNA virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93(1):81-85.

[4] Hardy RW, Harmon SB, Wertz GW. Diverse gene junction of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated termination [J]. J Virol, 1999;73(1):170-176.

[5] Hardy RW, Wertz GW. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junction during viral transcription [J]. J Virol, 1998;72(1):520-526.

[6] Tuschl T. Expanding small RNA interference. Nat Biotechnol [J], 2002;20(5):446-448.

[7] Collins PL, Wertz GW. cDNA cloning and transcriptional of nine poolyadenylated RNAs encoded by genome of human respiratory syncytial virus [J]. Proc Natl Sci USA, 1983;80(11):3208-3212.

[8] Collins PL, Dickens LE, Buckler-White A, et al. Nucleotides sequence for the gene junction of human respiratory syncytial virus reveal the distinctive features of intergenic structure and gene order [J]. Proc Natl Sci USA, 1986;83(13):4594-4598.

[9] Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription [J]. Proc Natl Sci USA, 1999;96(20):11259-11264.

[10] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured

(下转第 54 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

切相关。

Cyclin D_1 是调节细胞进入细胞周期增生期的主要因子，其过度表达可导致细胞周期调控异常，从而发生癌变。已有研究表明，食管癌、结肠癌等多种恶性肿瘤中均存在 cyclin D_1 的过度表达。研究结果显示：卵巢恶性上皮肿瘤及交界性上皮肿瘤 Cyclin D_1 表达较卵巢良性上皮肿瘤强（$P<0.05$）。提示 cyclin D_1 的过度表达可能与卵巢上皮肿瘤的发生发展有关。这与 Worsly 等的报道一致[9]。表明 cyclin D_1 在卵巢肿瘤发生、发展过程中起着重要作用。

本研究结果显示：beta-catenin 可能是激活原癌基因 c-myc，cyclin D_1 的启动因素，而 APC 蛋白表达与 c-myc，cyclin D_1 的激活无明显关系。

总之：APC-beta-catenin-Tcf-4 信号传导通路对卵巢上皮性肿瘤的恶化起着重要作用，如何寻找合适的干预因素，调整其表达，使细胞恢复正常分裂，从而抑制肿瘤生长，使其成为有效的治疗方法，有待进一步探讨。

（通讯作者：重庆医科大学病理教研室 李昱 400016）

参 考 文 献

[1] 张明金，王 强，王元和，等. 大肠癌组织连环蛋白的表达及其临床意义[J]. 第二军医大学学报，2000;21(3):239-241.

[2] Shimizu M, Saiton Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, bwnign and malignant human pancreatic tissues [J]. Hum PATHOL, 1990;21:607-612.

[3] Gamallo C, Palacios J, Moreno G, et al. beta-catenin expression pattern in stage Ⅰ and Ⅱ ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin gene mutations, clinico-pathological features, and clinical outcome [J]. Am J Pathol, 1999;155(2):527- 536.

[4] Moreno-Bueno G, Gamallo C, Perez-Grallego L, et al. bete-Catenin expression pattern, bete-Catenin gene mutations, and microsatelliteinstability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas [J]. Diagn M OL Pathol, 2001;10(2):116-122.

[5] Wu R, Zhai Y, Fearon ER, et al. Diverse mechanisms of beta-catenin Deregulation in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas [J]. Cancer Res, 2001;61(22):8247-8255.

[6] Karbova E, Davidson, Metodiev K, et al. Adenomatous polyposis coli (APC) protein expression in primary and metastatic serous ovarian carcinoma[J]. Int J Surg Pathol, 2002;10(3):175-180.

[7] Jarrett CR, Blancoto J, Car T, et al. Humman APC2 Localization and Allelic Imbalame [J]. Cancer Res, 2001;61(21):7978-7984.

[8] Thliveris A, Samowitz W, Mastsunami N, et al. Demonstration of Promoter Activity and Alternative Splicing in the Region 5' to Exon 1 of the APC Gene [J]. Cancer Res, 1994;54(11):2991-2995.

[9] Worsly SD, Ponder BA, Davies BR. Overexpression of Cyclin D_1 in epithelial ovarian cancers[J]. Gynecol Oncol, 1997;64:189.

（上接第 4 页）

mammalian cells [J]. Nature, 2001;411(6836):494-498.

[11] Yu JY, Deruiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002;99(9):6047-6052.

[12] Sui GC, Soohoo C, Affar EB, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002;99(8):5515-5520.

[13] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing cells [J]. Science, 2002;296(5567):550-553.

[14] Yang D, Buchholz F, Huang Z, et al. Short RNA duplxes produced by hydrolysis with Escherichia coli RNase Ⅲ mediate effective RNA interference in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002;99(15):9942-9947.

[15] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post- transcriptional gene silencing in Drosophila cells [J]. Nature, 2000;404 (6775):293-296.

[16] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. Nature, 2001;409(6818):363-366.

[17] Yang D, Lu H, Erickson JW. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in Drosophila embryos [J]. Curr Biol, 2000;10(19):1191-1200.