维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0008-04

人热休克蛋白 90β 基因沉默质粒的构建及转染效率的观察

季业伟[1,2],聂 滨[1,3],李 平[1],徐晓玉[2],周元国[1]

(1.第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心,重庆 400042;2.重庆医科大学药学院,重庆 400016;3.重庆医科大学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建能表达小发夹 RNA,从而特异、有效抑制人 Hsp90βmRNA 水平的质粒,比较该质粒对不同细胞株的转染效率。方法:合成 3 条对应于靶基因 3 个区域的 64nt 寡聚核苷酸,插入 pSUPER EGFP1 质粒,用 DH5α 细菌扩增,用酶切和测序法鉴定。以绿色荧光蛋白表达为标记,比较不同比例脂质体和质粒条件下,HepG2、HUVEC、HeK293 3 种细胞株的转染效率。结果:构建的 pSuper-Hsp90β1、pSuper-Hsp90β2、pSuper-Hsp90β3 3 个重组沉默质粒,插入片段碱基完全正确。在相同条件下,所构建的质粒对 HeK293 细胞转染效率最高,HepG2 细胞最低。结论:利用 pSUPER 质粒可成功构建人 Hsp90β 基因沉默质粒,该质粒对细胞株的转染效率可因细胞的不同而有显著差异。

【关键词】热休克蛋白 90;RNAi;基因转染;应激

【中国图书分类法分类号】Q782 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-17

Construction of si-RNA synthesis plasmids targeting human Hsp90 β gene and observation of their transfection efficiencies

JI Yewei, et al

(*Molecular Biology Center, Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the plasmid that can direct the synthesis of si-RNA like transcripts to specifically and effectively in hibit the mRNA level of human Hsp90βgene, and to compare the transfection efficiencies of the plasmids in different cell strains. *Methods*: Three 64 nt oligos corresponding to different regions in the target gene are chemically synthesized and annealed, then inserted into pSUPER EGFP1, proliferated by DH5a, and determined by endodigestion and sequencing. Three strains, HepG2、HUVEC and HeK293, were cultured. We then transfected the plasmids into the cells under different ratio of plasmid and Lipofectamine, and compared the transfection efficiencies of them by detection of EGFP Fluoresence. *Results*: The presence of positive recombinant clones was verified by double-digestion and sequencing. The bases inserted into the pasmids were correct. And the positive colonies were named as pSuper-Hsp90β1、pSuper-Hsp90β2 and pSuper-Hsp90β3, and the same condition, the constructed plasmid had the highest transfection efficiency in HeK293, and the lowest in HepG2 cells. *Conclusions*: The si-RNA synthesis plasmids targeting Hsp90β could be successfully constructed by using psuper plasmids, and the difference of their transfection efficiencies in different cells was significant.

【Key words】Hsp90; RNAi; Gene transfection; Stress

热休克蛋白 90(Heat shock protein90, Hsp90)是热休克蛋白家族成员,在哺乳动物各种细胞中高度表达,能够纠正细胞内蛋白质在热应激条件下发生的错误折叠,在细胞应激中具有重要的保护作用[1,2]。Hsp 90 作为分子伴侣,能够使一些细胞信号传导分子维持正确构象从而发挥信号传导功能。此外,Hsp90 也参与细胞骨架的维持、微管网的保护、细胞周期和细胞凋亡调控等过程[3,4]。

抑制 Hsp90 基因表达是研究其功能的一个良好手段,然而对此国内外目前尚无良好办法。我们前期发现小鼠 Hsp84 基因多态性可能是创伤应激耐受表型产生差异的原因[5],因此,我们拟利用 RNAi 技术,构建热休克蛋白 90β 基因沉默质粒,以为进一步证实我们前期的研究奠定基础。

作者介绍:季业伟(1980-),男,博士生,
主要研究方向:糖皮质激素抗炎效应的分子机制。

基金项目:高等学校全国优秀博士论文作者专项基金(编号 200156),国家自然科学基金项目(编号 30470988)。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

维普资讯 http://www.cqvip.com

E.coli DH5α 为本室保存，pSUPER EGFP1 质粒由本室李平硕士提供，限制性内切酶 *Bgl*II、*Hind*III 及 T4 连接酶等购自 Takara 公司，脂质体转染试剂 Lipofectectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司，质粒提取试剂盒为美国 Omega 公司产品。人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、HEK293 细胞由重庆医科大学刘金波博士生惠赠，HepG2 细胞由第三军医大学金世龙博士生惠赠。

1.2 方法

1.2.1 Hsp90β 特异 64nt 寡核苷酸的设计与合成 依据 Genebank 上人 Hsp90β 的 mRNA 序列，利用美国 Ambion 公司在线设计软件，选择位于 mRNA 编码区被 SiRNA 互补结合的 19 个碱基序列，共选择了 3 条靶序列，各设计 1 条 19nt 的随机寡核苷酸序列，经 NCBI Blast 排除了其非特异同源性。然后，将 3 条核苷酸序列套入共 64nt 寡核苷酸的 pSUPER EGFP1 质粒插入序列，插入片断包括：两端用于形成酶切位点(BglII，HindIII)的序列，作为终止信号的 5 个胸嘧啶核苷(T)，两个反向互补排列的 19 nt Hsp90β 特异性序列以及 1 个 9nt 的间隔区，后三者能使转录生成的 mRNA 形成茎环结构。64nt 寡核苷酸序列见表 1，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 合成的 64nt 寡核苷酸

		Sequence	Location
Oligo	1	5'GATCCCCGATCAGACAGAGTACCTAGTTCAAGAGACTAGGTACTCTGTCTGATCTTTTTGGAAA3'	646–664
		5'AGCTTTTCCAAAAAGATCAGACAGAGTACCTAGTCTCTTGAACTAGGTACTCTGTCTGATCGGG 3'	
Oligo	2	5'GATCCCCGCTTGGAATCCACGAAGACTTCAAGAGAGTCTTCGTGGATTCCAAGCTTTTTGGAAA3'	1398–1417
		5'AGCTTTTCCAAAAAGCTTGGAATCCACGAAGACTCTCTTGAAGTCTTCGTGGATTCCAAGCGGG 3	
Oligo	3	5' GATCCCC GAAATCTTAGATAAGAAGGTTCAAGAGACCTTCTTATCTAAGATTTCTTTTTGGAAA 3'	1789–1807
		5' AGCTTTTCCAAAAAGAAATCTTAGATAAGAAGG TCTCTTGAACCTTCTTATCTAAGATTTCGGG3'	

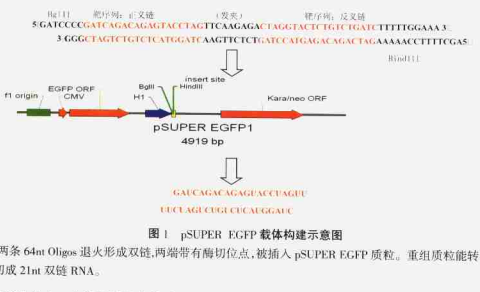


图 1 pSUPER EGFP 载体构建示意图

注：合成的两条 64nt Oligos 退火形成双链，两端带有酶切位点，被插入 pSUPER EGFP 质粒。重组质粒能转录出 m RNA，后者将折叠、被剪切成 21nt 双链 RNA。

1.2.2 寡聚核苷酸的退火 自行配制退火缓冲液：100mmol/L氯化钠，50mmol/L Hepes，pH 7.4。将寡聚核苷酸用无菌双蒸水溶解，溶液浓度为 1.5mg/ml。每条寡聚核苷酸各取 2μl，配对的寡核苷酸加入 46μl 退火缓冲液，在 PCR 仪上退火，退火程序为：90℃ 4min→85℃ 4min→80℃ 4min→75℃ 4min→70℃ 10min→65℃ 10min→60℃ 5min，然后缓慢降至室温，-20℃ 保存。经 3%琼脂糖电泳检查退火后寡聚核苷酸的双链大小。

1.2.3 pSUPER EGFP1 质粒的线性化及连接 先后用 *Hind*III、*Bgl*II 对质粒进行酶切，使用推荐的通用 buffer K，用 1%的琼脂糖回收线性化的 DNA 片段。将寡聚核苷酸与线性化的载体用 T4 连接酶过夜连接，连接产物加入 *Bgl*II 降低转化背景后转入感受态的大肠杆菌 DH 5α。使细菌在含有卡那霉素的琼脂糖平板上过夜生长，挑取单菌落，在含卡那霉素的 LB 培养液中扩增，提取质粒。用 *Bgl*II 酶切鉴定寡聚核苷酸是否已连入 pSUPER EGFP1 载体，对已酶切鉴定的载体用通用引物测序。整个载体构建技术路线见图 1。

1.2.4 细胞培养及转染 HUVEC 用 RPMI 1640 培养基，HEK 293、HepG2 用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清，100μg/ml 青霉素及 100μg/ml 链霉素)于 37 ℃，5%CO_2 孵箱内培养，当细胞生长至 80%融合时传代。在转染前 1 天将对数生长期细胞以 1×10^5 接种于 24 孔板，使细胞在转染时有 80%~90%汇合度。转染期间使用无抗生素的培养基。分别按照质粒 0.8μg，脂质体为 0.8，2，4μl 的条件转染 3 种细胞。转染步骤遵循 Lipofectectamine 2000 的使用说明进行。于转染后 36h 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2　结　果

2.1　pSuper 沉默质粒的构建

合成的寡聚核苷酸退火后电泳位置为 60bp 大小，而单链由于折叠形成发夹，电泳条带为 30bp 位置。核苷酸片断分别带有 *BamH*Ⅰ、*Hind*Ⅲ 酶切位点，*BamH*Ⅰ 的突出末端与 *Bg*Ⅱ 的突出末端可以互补连接，寡聚核苷酸与经 *Hind*Ⅲ、*Bg*Ⅱ 双酶切的 pSUPER EGFP1 质粒连接后，*Bg*Ⅱ 酶切位点破坏。经过 *Bg*Ⅱ 酶切鉴定，我们得到了被分别插入寡聚核苷酸的 3 种 pSuper 阳性重组质粒，并经测序鉴定证明插入寡聚核苷酸完全正确，没有碱基突变，分别命名为 pSuper-Hsp90β1、pSuper-Hsp90β2、pSuper-Hsp90β3。3 个质粒测序结果见图 2。

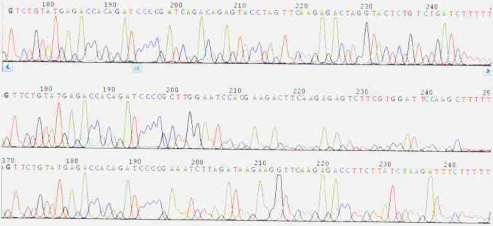
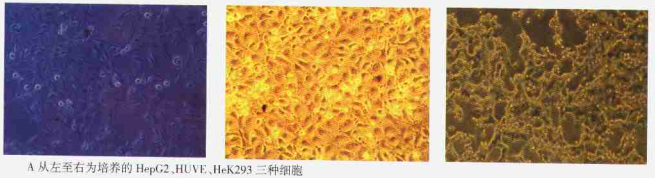


图 2　测序证实 3 个 pSuper 沉默质粒构建成功

2.2　沉默质粒转染真核细胞的效率

我们先后对 HepG2、HUVEC、HeK293 细胞进行了转染试验。对于三种细胞，质粒(μg)/脂质体(μl)比例为 1∶1、1∶2.5、1∶5 时，36h 细胞都有绿色荧光蛋白表达。三种细胞均为 1∶5 比例转染效率最高，1∶2.5 比例转染次之，1∶1 比例转染效率最低。相同转染条件下，不同细胞类型转染效率有明显的差别，HepG2 转染效率最低，HeK293 转染效率最高，HUVEC 转染效率居于两者之间，见图 3。



A 从左至右为培养的 HepG2、HUVE、HeK293 三种细胞



B 从左至右为转染后 36h，根据绿色荧光蛋白判断，HepG2、HUVE、HeK293 转染效率为 30%、50%和 80%

图 3　细胞培养和转染效率观察

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

RNA 干扰广泛存在于原生生物、真菌、无脊椎动物和脊椎动物等生物体内，是利用双链 RNA使序列特异性靶基因 mRNA降解从而阻断相应基因的表达的现象[6]。RNAi 作用具有突出的特点：①能特异性地抑制目的基因。②靶序列的选择性。③抑制基因表达具有很高的效率。④抑制基因表达的效应可以在不同的细胞间长距离传递和维持[7,8]。

在哺乳动物中，大于 30bp 的 dsRNA 可以引起干扰素效应，使 RNA 转录广泛降解、宿主细胞蛋白合成普遍下降。化学合成 3' 对称性突出 2nt 的约 21~23nt 双链 RNA 复合物可以诱导哺乳动物细胞产生特异的沉默效应，而且可以避免宿主细胞发生干扰素效应。但是化学合成的 dsRNA 价格昂贵，并且只能取得瞬时的效果。目前运用质粒在细胞内表达 dsRNA 可以诱导有效的、特异的基因沉默，通过物理和化学方法可以将表达 dsRNA 的质粒有效导入哺乳动物细胞，并且利用质粒携带的抗生素抗性基因可以筛选到基因沉默表型稳定的永生株。

用于哺乳动物细胞的短双链 RNA 表达载体多用聚合酶Ⅲ H1-RNA 基因启动子或 U6 启动子作为启动子，我们运用的 pSUPER EGFP1 质粒采用聚合酶Ⅲ H1-RNA 基因启动子，转录产生的较小的 RNA 不带有多聚腺嘌呤尾巴，转录起始位点清楚，以连续的 5 个胸腺嘧啶为转录终止信号。最重要的是，转录的模板会在第 2 个尿嘧啶后被切割，切割产物与合成的小双链沉默 RNA 具有相似的有两个尿嘧啶的 3'端突出的末端。我们将含靶序列的寡聚核苷酸片断插入质粒，聚合酶Ⅲ将以插入序列为模板，合成短 RNA，后者序列由反向重复序列和中间 9nt 的间隔区组成，将自身折叠形成茎环结构，茎部含有与沉默靶部位一致的序列，环状结构会被 RNAi 通路的关键酶 Dicer 切割，形成 3'端 UU 突出的 21nt 双链 RNA。这种双链 RNA 将作为一种导向，引发 RNA 诱导沉默复合物(RISC)在目标 mRNA 的对应序列部位进行切割。

基因沉默质粒对宿主细胞的有效转染是其发挥作用的前提，只有高的转染效率才能产生有效的抑制作用，为此，我们对不同条件下 pSuper 沉默质粒转染哺乳动物细胞的转染效率进行观察。结果显示，构建的三种沉默质粒在相同的转染条件下转染效率没有明显差别，可能插入片段序列的不同并不使质粒的电荷及构象产生差异。而质粒与脂质体数量的比值的不同，却对转染效率有明显的影响，按 1:1 比例转染细胞，转染效率相对最低，1:5 比例转染效率稍高于 1:2.5 比例转染。同时，细胞类型对转染效率也有决定性的影响：人肝癌细胞株 HepG2、人脐静脉内皮细胞株 HUVEC、人胚肾上皮细胞 HeK293，在相同的转染条件下三种细胞株 pSuper 沉默质粒转染效率差别较大，HepG2 转染效率最低，HeK293 转染效率最高，HUVEC 转染效率居中。

综上，使用 pSUPER EGFP 质粒可以成功构建人 Hsp90β 沉默质粒，用该质粒转染哺乳动物细胞首先要注意细胞株的选择，另外质粒与脂质体的比例也非常重要，考虑到脂质体的毒性，研究认为 1：2.5 的比例是较为恰当的。

（本文通讯作者，周元国。感谢陈星云助理研究员提供的生物信息学方面的重要帮助，感谢刘苹实验师在细胞培养方面的支持。）

参 考 文 献

[1] Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing'heat shock'proteins[J]. J Cell Sci, 2002: 2809-2816.

[2] Yonehara M, Minami Y, Kawata Y, et al. Heat-induced chaperone activity of HSP90[J]. J Biol Chem, 1996; 271: 2641-2645.

[3] Martina W, Joachim C. Heat Shock Protein 90 Homeostasis Controls Stage Differentiation in Leishmania donovani [J]. Molecular Biology of the Cell, 2001; 12: 3307-3316.

[4] Beere HM. Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins[J]. Sci STKE, 2001; 93: RE1.

[5] Haiying Shen, Yuanguo Zhou, Wang Hua, et al. Identification of polymorphisms of heat shock protein 90 in BALB/c and C57BL/6 mice[R]. the 32th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2002. Orlando, Florida. USA.

[6] Kasschau KD, Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing [J]. Cell, 1998; 95(4): 461-470.

[7] Andriew fire, Siqun Xu, Mark K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998; 391(6669): 806-811.

[8] David Baulcombe. RNA silencing: Diced defence[J]. Nature, 2001; 409(6818): 295-299.