

[文章编号] 1007-3949(2007)15-07-0547-02

•研究论文摘要•

修饰的单链 DNA 寡核苷酸靶向修复低密度脂蛋白受体基因点突变

徐亚林¹, 苏鑫铭², 张芳林¹, 朱含章¹, 许伟伟¹, 范乐明¹

(南京医科大学 1. 动脉粥样硬化研究中心; 2. 附属第一医院儿科, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 低密度脂蛋白受体; 基因点突变; 单链 DNA 寡核苷酸靶向修复

目的 低密度脂蛋白(LDL)是血浆中胆固醇的主要载体,低密度脂蛋白受体(低密度脂蛋白受体)的生理功能是介导细胞对 LDL 的内吞,以满足细胞对胆固醇的需求并调节血浆胆固醇水平。LDL 受体基因突变可因血浆中 LDL 清除障碍而导致高胆固

醇血症,是最常见的单基因遗传病之一,称为家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)。修饰的单链 DNA 寡核苷酸(modified single-stranded DNA oligonucleotide, MSO)被证实可以较低频率地修复报告基因中的点突变。本研究的目的是利用 MSO 靶向基因原位修复 LDL 受体基因点突变的细胞模型,为探索 FH 的基因治疗打基础。方法 构建具有点突变 C660X 的 LDL 受体-GFP 真核表达载体,转染 Vero 细胞,筛选包含低密度脂蛋白受体-GFP 基因的稳定细胞系。以突变点为中心,分别合成 15 bp、25 bp、31 bp、35 bp 和 45 bp 的末端 6 个碱基硫代修饰的 MSO,每个长度的链合成 4 条,分别为修复链,与有义链一致(+链),与反义链一致(-链),对照链(分别与有义链和反义链一致,但未纠正突变位点)。利用脂质体转染细胞系,流式细胞仪检测细胞 GFP 的表达,初步确定修复效率。通过流式细胞仪分选表达 GFP 的细胞,利用 DiI-LDL 内移实验验证低密度脂蛋白受体的功能,培养一定时间后提取核酸和蛋白质分别进行焦磷酸测序分析和 Western blot 检测,确定最终的修复效率。结果

构建成功的细胞系命名为 Vero-H660,实验证实包含单拷贝的突变低密度脂蛋白受体-GFP 基因。由于该突变点为终止突变,所以 Vero-H660 不表达 GFP,但可以检测到 mRNA 的转录。通过转染不同长度的 MSO,流式细胞仪分析结果表明,最佳转染剂量为 50 nmol/L,+链均表现出一定程度的修复效果,-链的修复效果最差;其中 25 bp 与 31 bp 链(+链)的平均修复效率为 3%,而对照+链也表现出一定的修复效果。利用流式细胞仪分选 31 bp 链修复后表达 GFP 的细胞,DiI-LDL 内移实验表明被纠正的受体具有功能。PCR 扩增包含突变点的 DNA 序列,焦磷酸测序分析表明:31bp+链处理后平均 11%的细胞突变位点在基因组水平得到纠正。Western blot 检测到低密度脂蛋白受体-GFP 融合蛋白的表达。讨论 MSO 的原位修复能力,在实验动物体内或体外,在细胞的染色体上或染色体外,均已得到证实。但不同实验的修复效率悬殊,与 MSO 的组成相关。综合文献报告的不同结果发现,MSO 序列与突变部位的正义还是反义链互补、MSO 的链长、MSO 的修饰程度等均可明显影响其修复效率。为此,本项目设计了一个能较简便判别修复效率的测试模型:先将一个带有 EGFP 标记基因、自身又有无义点突变的低密度脂蛋白受体基因转入 Vero 细胞,然后针对该点突变制备不同组成的 MSO 进行修复试验。不能修复者,突变位点下游部分均不能表达。凡能纠正该点突变者即可获得包括 EGFP 的完整表达产物,修复效率越高,EGFP 的表达越多。因此,根据荧光强度可以筛选出最佳组成的 MSO。

(此文编辑 胡必利)