

靶向人类心脏发育候选基因 *hole* 的 siRNA 真核表达载体的构建和鉴定

周军媚^{1,2}, 姚峰³, 谢华平², 叶湘漓², 王跃群²

(南华大学 1. 药学与生命科学学院, 3. 实验动物学部, 湖南省衡阳市 421001;

2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南省长沙市 410006)

[关键词] 心脏发育; *hole*; pSUPER; siRNA; H9c2 细胞

[摘要] **目的** 利用 siRNA 表达载体构建靶向人类心脏发育候选基因 *hole* 的 pSUPER RNAi 载体体系 (pSUPER-*hole*) 及筛选稳定产毒的细胞克隆。**方法** 化学合成一对编码短发夹 RNA 序列的、靶向人类心脏发育候选基因 *hole* 的寡核苷酸链 60 个碱基, 退火, 克隆到经 Bgl II、Xho I 双酶切的 pSUPER 质粒上, 构建重组 RNAi 质粒 (pSUPER-*hole*)。通过双酶切鉴定及测序分析验证构建效果。将正确构建的质粒转染大鼠心肌细胞 H9c2, 经过 puromycin 抗生素的筛选, 建立稳定产生逆转录病毒的细胞模型, 采用 RT-PCR 检测其抑制效果。**结果** pSUPER-*hole* 载体经双酶切鉴定及测序分析, 结果表明 60 个碱基成功插入到预计位点, 并且序列完全一致。重组载体转染包装细胞, 筛选的细胞克隆均可表达绿色荧光蛋白, 表明包装成功。RT-PCR 检测表明 pSUPER-*hole* 能成功抑制 *hole* 基因的表达。**结论** 靶向人类心脏发育候选基因 *hole* 的 siRNA 真核表达载体构建成功。

[中图分类号] Q34

[文献标识码] A

Construction and Identification of Eukaryotic siRNA Expression Vector Targeting Human Heart Developmental Candidate Gene *hole* Gene

ZHOU Jun-Mei^{1,2}, YAO Feng³, XIE Hua-Ping², YE Xiang-Li², and WANG Yue-Qun²

(1. College of Pharmacy and Life Science, 3. Department of Laboratory Animal Science, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410006, China)

[KEY WORDS] Heart Development; *hole*; pSUPER; siRNA; H9c2

[ABSTRACT] **Aim** To construct a pSUPER RNAi system that targets human heart developmental candidate gene *hole* and a stable virus-producing cell line. **Methods** A pair of 60nt oligonucleotides coding for short hairpin RNA and targeting human heart developmental candidate gene *hole* were chemically synthesized and annealed and inserted into pSUPER plasmids digested with Bgl II and Xho I to construct the recombinant pSUPER RNAi plasmid (pSUPER-*hole*).

Recombinant pSUPER-*hole* plasmid was identified by enzyme digestion and sequencing analysis. The packaging cell H9c2 was transfected with the recombinant plasmid. The mRNA expression level of *hole* was detected by RT-PCR. **Results**

The result of enzyme digestion and sequencing analysis demonstrated that 60 nt had been inserted successfully into the vector. Green fluorescent was detected in virus-producing cells, RT-PCR showed pSUPER-*hole* can inhibit the *hole* gene expression of H9c2. **Conclusion** The pSUPER RNAi vector targeting human heart developmental candidate gene *hole* are successfully constructed.

hole 基因是我们在寻找与心脏发育相关的基因时克隆的人类新基因。虽然 *hole* 基因没有功能性的结构域, 对 *hole* 蛋白的序列分析发现该蛋白不仅

具有 ERK 的结合位点 (D-domain), 而且还具有结合 SH3 结构域的多聚脯氨酸序列。结合 SH3 结构域的多聚脯氨酸序列能通过含有 SH3 结构域的蛋

[收稿日期] 2011-10-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81000035, 31071999 和 30871340)

[作者简介] 周军媚, 博士研究生, 讲师, 主要从事心脏发育基因调控机制研究, E-mail 为 zhoujunmei@yahoo.cn。姚峰, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事基因克隆和功能研究, E-mail 为 yaofeng0609@126.com。通讯作者王跃群, 博士研究生导师, 教授, 主要从事心脏发育基因调控和疾病分子机制研究, E-mail 为 yuequnwang@yahoo.com。

白结合从而影响 MAPK 信号途径^[1], 而 ERK 本身就是一个 MAPK 信号途径中的重要激酶。我们前期工作已表明该基因在心脏组织中的表达非常强烈^[2], 同时, *hole* 蛋白过表达强烈抑制 MAPK 信号途径中的下游因子 AP-1 和 SRE 的活性^[3], 而 MAPK 与心血管的发育、心肌肥大等心脏疾病的发生有着密切的关系, 因此我们认为 *hole* 基因可能是通过 MAPK 信号途径来参与心脏发育的调节, 但是其具体的作用机制仍不清楚, 因此本研究拟构建抑制 *hole* 基因表达的 siRNA 真核表达载体, 并选择大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞为包装载体, 为进一步研究 *hole* 基因在心脏发育过程中的功能奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pSUPER. retro. puro + GFP 质粒、大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA Marker、蛋白 Marker、限制性核酸内切酶购自 MBI 公司; DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; 梭华-SofastTM 基因转染试剂购自厦门太阳马公司; H9c2 细胞为中南大学馈赠。靶向 *hole* 的 60nt oligos 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; E. Z. N. A. plasmid mini kit 购自美国 OMEGA 公司; Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; revertAidTM first strand cDNA synthesis kit 购自 Fermentas 公司。

1.2 靶向 *hole* 基因 siRNA 序列设计

应用 BLOCK-iTTM RNAi Designer 软件 (Invitrogen 公司), 将 *hole* 基因序列号输入后, 得到一系列 siRNA 序列, 选取得分最高的一条序列作为欲沉默的靶序列。按照 pSUPER 载体说明书中构建发夹状短链 RNA 的原则, 设计序列: 正义链 5'-ATCCCCGCTTCT-TCATCTCAGGAATTTCTAGAGAATTCCTGAGATGAA-GAAGCTTTTTTC-3', 反义链 5'-TCGAGAAAAAGCTTC-TTCATCTCAGGAATTTCTAGAAAATTCCTGAGATGAGAAGCGGG-3'。从 5' 端到 3' 端依次为 BglII 酶切黏性末端、由 19 个碱基组成的靶序列 (下划线标示)、中间 9nt 的间隔区、能与靶序列结合的互补序列 (下划线标示)、XhoI 酶切黏性末端。

1.3 重组载体的构建

本研究选用 pSUPER. retro. puro + GFP 质粒作为载体, 该质粒含有 RNA 聚合酶 III H1 启动子, 可高效转录产生针对靶序列的 siRNA; 该质粒含有氨苄青霉

素抗性基因和编码绿色荧光蛋白的基因更利于阳性克隆的筛选。pSUPER 载体有 Bgl II 和 Xho I 酶切位点, 将该载体用 Bgl II 和 Xho I 双酶切。将合成的分别带有 Bgl II 和 Xho I 酶切黏性末端的正义和反义寡核苷酸进行退火, 然后与经 Bgl II 和 Xho I 顺序酶切的 pSUPER 载体进行连接, 使双链核苷酸片段定向克隆于 pSUPER 载体上, 构成重组质粒。

1.4 阳性克隆的鉴定

挑取重组克隆进行酶切鉴定。因为在设计寡核苷酸时, 在其间隔区引入一个 Xba I 酶切位点, 在 pSUPER 载体上也存在一个 Xba I 酶切位点, 两个位点相距 1230 bp 左右, 故可选用 Xba I 酶切位点进行鉴定。如果正确连入, 用 Xba I 酶切会产生 1230 bp 左右的酶切产物。如果没有连入目的片段, 酶切则只有载体带。为进一步验证插入序列的准确性, 将经过酶切鉴定的阳性克隆菌液送上海生物工程有限公司测序。阳性克隆命名为 pSUPER-*hole*。

1.5 稳定产毒细胞模型的建立

H9c2 细胞用含 10% 胎牛血清、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DEME 培养基传代培养, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。当细胞汇合度达 50% ~ 90% 时, 按说明书利用梭华-SofastTM 基因转染试剂将重组质粒 pSUPER-*hole* 导入 H9c2 细胞, 48 h 后, 以 500 mg/L puro 抗生素筛选转染细胞, 同时设立没有转染质粒的空白对照细胞。隔天换液, 待没有转染质粒的空白对照细胞全部死亡, 再换用 250 mg/L puro 继续培养、筛选。8 ~ 10 天左右出现抗性克隆, 20 天后挑单克隆扩大培养, 用 150 mg/L puro 维持选择压力, 24 孔板 \rightarrow 6 孔板 \rightarrow 25 mL 培养瓶 \rightarrow 50 mL 培养瓶 \rightarrow 100 mL 培养瓶中建成稳定转染细胞系。同时筛选并建立 pSUPER 空载体的稳定转染细胞系作为对照组。

1.6 RT-PCR 检测 *hole* 基因的表达

利用 Trizo1 一步法提取已经筛选的阳性克隆细胞和对照组细胞的总 RNA, 紫外分光光度法测定 RNA 的纯度和浓度, 取 5 μ g 总 RNA 进行 RT-PCR。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳, 以 GAPDH 作为参照。用 Prime 5.0 引物设计软件设计 *hole* 和 GAPDH 引物, 并由大连宝生物公司合成。*Hole* 基因引物上游为 5'-GCA AGG CGT TGA CAC TGC TAC T-3', 下游为 5'-GAA CCT GGC GAC GGT ACT CG-3', 扩增产物长度为 486 bp; GAPDH 引物上游为 5'-AGT GGC AAA GTG GAG ATT GTT-3', 下游引物为 5'-GTC TTC TGG GTG GCA GTG AT-3', 扩增产物长度为 488 bp。

2 结果

2.1 pSUPER-hole RNAi 系统构建模式

图 1 所示为构建 pSUPER-hole RNAi 系统的模式图。图中 A 代表将 pSUPER. retro. puro + GFP 载体用 Bgl II、Xho I 双酶切处理后纯化得到线性化片段。将合成的 60nt 寡核苷酸退火后与线性 pSUPER. retro. Puro + GFP 载体连接, 得到 pSUPER-hole 重组质粒。B 代表构建好重组质粒 pSUPER-hole 转染入包装细胞内转录生成茎环转录本。C 代

表茎环转录本经进一步加工成为双链 RNA, 就是有功能的 siRNA。

pSUPER. retro. Puro + GFP 载体是通过其 RNA 聚合酶 III H1 启动子启动 siRNA 的产生, 其终止信号是 5 个胸苷, 转录终止位点位于第二尿苷(U)之后, 因此其 3'末端会含有 2 个 U。所以这种载体产生的双链 siRNA 既含有 19nt 的靶序列其 3'末端还含有 2 个 U。研究表明这种双链 siRNA 对内源性的靶基因会产生明显的抑制表达效应^[4]。

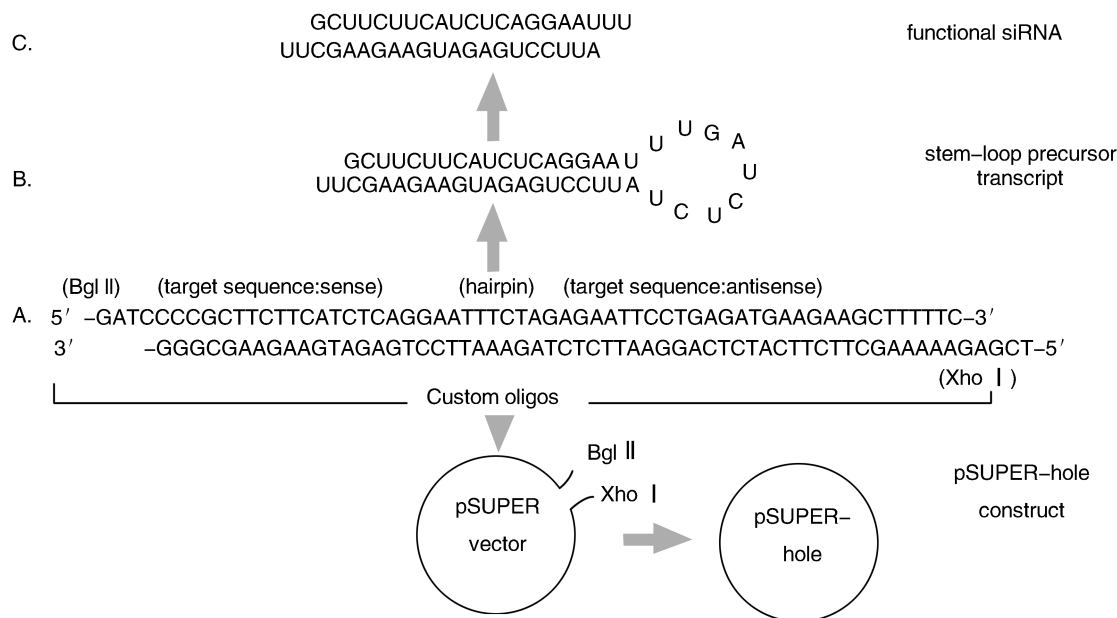


图 1. pSUPER-hole RNAi 系统构建模式图

Figure 1. Construction graph of pSUPER-hole RNAi system

2.2 重组质粒的鉴定

选取 ALB 琼脂板上的可疑菌落摇菌后采用碱裂解法提取质粒, 用 Xba I 进行酶切, 取 10 μL 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并选取空质粒作为对照。电泳结果显示, 泳道 4 是空载体质粒, 观察到一条约 8 kb 的条带; 1-3 泳道为重组质粒, 可以观察到两条带, 其中一条大约 6.5 kb 和一条约 1.23 kb 的 DNA 条带 (图 2), 这表明 1-3 号克隆都是阳性克隆。

选取酶切正确的一个克隆菌液 (2 号克隆) 送上海生工生物公司进行测序, 利用 MSCV-R 引物测定重组质粒 pSUPER-hole, 测序结果显示, 下划线标示的序列与本研究设计合成的 60nt 寡核苷酸的有义链完全一致, 说明已经把合成的 60nt 寡核苷酸插入到 pSUPER 载体中, 靶向 hole 基因的 pSUPER-hole 重组载体构建成功 (图 3)。

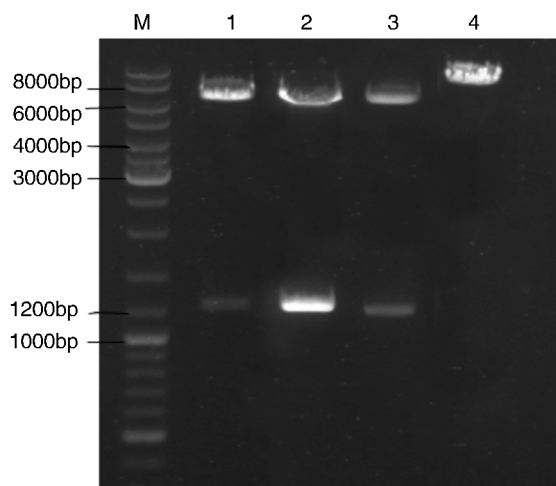


图 2. 重组质粒用 Xba I 酶切鉴定

Figure 2. Electrophoresis pattern of recombinant vector digested with Xba I

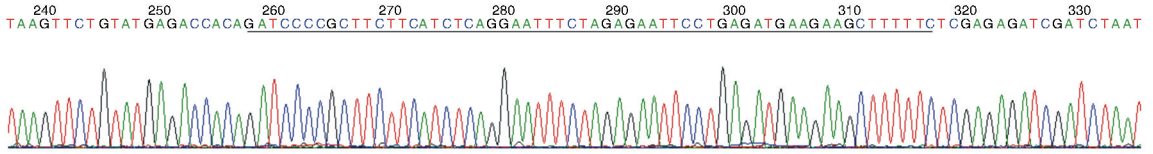


图3. 重组质粒的测序图谱

Figure 3. Sequencing map of recombinant vector

2.3 逆转录病毒载体的包装

选取筛选好的稳定表达 pSUPER-hole 的细胞在倒置荧光显微镜下观察,发现所有的细胞均带有绿

色荧光(图4),说明包装出的重组逆转录病毒具有感染性,且稳定表达 pSUPER-hole 的细胞筛选成功。

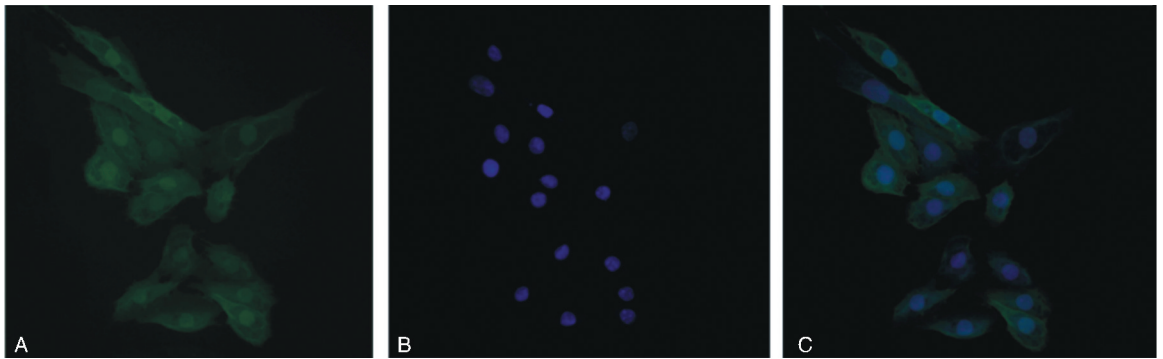


图4. 重组质粒 pSUPER-hole 包装细胞 A为筛选后的 pSUPER-hole 的 H9c2 细胞, B为 DAPI 染细胞核, C为 A 和 B 重叠图。

Figure 4. Packaging cell with recombinant plasmid pSUPER-hole

2.4 pSUPER-hole 能抑制 hole 基因的表达

与仅转染 pSUPER 空载体的细胞系相比,转染 pSUPER-hole 质粒的细胞系中 hole 基因表达显著下降,说明转染 pSUPER-hole 质粒后,明显沉默了 hole 基因在 H9c2 细胞中的表达(图5)。

用于高效特异性地下调靶基因的表达,从而使靶基因的功能失活^[5]。由于 pSUPER 质粒可以在细胞内复制扩增,这种 siRNA 表达载体可以在细胞中持续抑制靶基因的表达,持续几个星期甚至更久,这使之成为适用于较长周期研究的方法^[6]。在 RNAi 研究中,序列的设计是非常重要的步骤。设计的原则主要依据以下几点:①从靶基因起始密码子 AUG 下游 50 nt ~ 100 nt 开始搜寻理想的 siRNA 序列,越靠近靶基因的 3' 端,其基因沉默效果可能越好^[7];② siRNA 序列中 GC 比最好在 35% ~ 60% 之间,尽量避免高 G 含量或连续的 G 区段,因为这样的序列容易形成 G 四聚体结构;③理想的 siRNA 序列不能含有连续的 4 个 T 或 A,否则可能终止有 RNA Polymerase III 介导的转录^[8];④将选取的 siRNA 序列进行 BLAST 分析,以保证该 siRNA 序列的特异性^[9]。本研究设计的靶序列靠近靶基因的 3' 端,其 GC 比是 42%,同时进行了 BLAST 分析,确保其特异性,理论上分析其沉默效果是最好的。

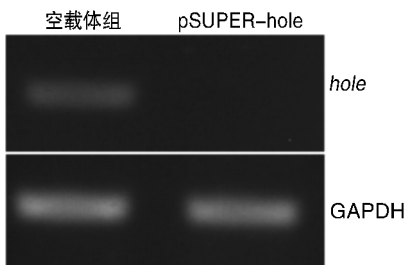


图5. RT-PCR 检测转染 pSUPER-hole 和空载体的细胞中 hole 的表达

Figure 5. Expression of hole mRNA in different cell lines was detected by RT-PCR

3 讨论

pSUPER RNAi 系统是利用逆转录病毒载体 pSUPER 进行干扰基因表达的系统,近年来被广泛

我们选用的包装细胞系来源于大鼠胚胎的心肌细胞系 H9c2, H9c2 细胞系是一株同时具有骨骼肌与心肌功能的特异心肌细胞株系, H9c2 细胞在形态学、电流生理学、生物化学特性上与正常心肌细

胞所应具有生理特质有一定的相似性^[10]。H9c2 细胞优良的分裂能力可以提供大量的细胞,克服了原代心肌细胞不能大量获得并且缺乏分裂能力的局限,同时它还避免了原代细胞的心肌细胞转染效率低下的缺点,因此利用 H9c2 细胞来进行心肌细胞的相关研究是目前较理想的细胞模型。

本研究通过阳离子聚合物的方法转染包装大鼠心肌细胞系 H9c2,同时进行筛选得到稳定表达系,筛选后的阳性细胞在倒置荧光显微镜下均可观察到绿色荧光,说明筛选成功,可以获得感染靶细胞的逆转录病毒,同时利用 RT-PCR 检测其干扰效果,结果显示 pSUPER-hole 能明显抑制 *hole* 基因在 H9c2 中的表达,这为进一步研究 *hole* 基因在心脏发育过程中的功能奠定实验基础。

[参考文献]

[1] Muslin AJ. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 115 (7): 203-218.
 [2] Zhou J, Li Y, Liang P, et al. A novel six-transmembrane protein hole functions as a suppressor in MAPK signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333 (2): 344-352.

[3] 周军媚, 吴秀山. 人心脏发育候选基因 *hole* 在 MAPK 信号传导途径中的作用[J]. *科技导报*, 2005, 23 (9): 23-25.
 [4] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R, et al. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296: 550.
 [5] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22 (3): 326-330.
 [6] Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications[J]. *Biotechniques*, 2008, 44 (5): 613-616.
 [7] Rinne A, Littwitz C, Pott L, et al. Adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNA (shRNA) mediates efficient gene silencing in terminally differentiated cardiac myocytes [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 515: 107-123.
 [8] Mello CC, Conte DJr. Revealing the world of RNA interference[J]. *Nature*, 2004, 431 (7006): 338-342.
 [9] 杜广胜, 文渊, 马业新. RNA 干扰下调小鼠心肌细胞可溶性环氧化物水解酶的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (3): 206-210.
 [10] Wang W, Hino N, Ochi R, et al. Kv 2. 1 K⁺ channels underlie major voltage-gated K⁺ outward current in H9c2 myoblasts[J]. *Jpn J Physiol*, 2002, 52 (6): 507-514.

(此文编辑 文玉珊)

(上接第 396 页)

[9] Yuan KH, Li Q, Yu WL, et al. Comparison of photodynamic therapy and pulsed dye laser in patients with port wine stain birthmarks: a retrospective analysis[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2008, 5 (1): 50-57.
 [10] Li CZ, Cheng LF, Wang ZQ, et al. Attempt of photodynamic therapy on esophageal varices [J]. *Lasers Med Sci*, 2009, 24(2): 167-171.
 [11] Hamblin MR, Miller JL, Ortel B. Scavenger-receptor targeted photodynamic therapy [J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 72 (4): 533-540.
 [12] 章义利, 戴凌燕, 周秀云, 等. 阿托伐他汀对鼠动脉粥样硬化基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(1): 29-32.
 [13] Brasseur N, Langlois R, La Madeleine C, et al. Receptor-mediated targeting of phthalocyanines to macrophages via covalent coupling to

native or maleylated bovine serum albumin[J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 69(3): 345-352.

[14] Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(1): 36-46.
 [15] Tawakol A, Castano AP, Gad F, et al. Intravascular detection of inflamed atherosclerotic plaques using a fluorescent photosensitizer targeted to the scavenger receptor[J]. *Photochemical Photobiological*, 2008, 7(1): 33-39.
 [16] Zhan Q, Yue W, Hu S. Effect of photodynamic therapy and endostatin on human glioma xenografts in nude mice[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2011, 8(4): 314-320.
 [17] Yin H, Li Y, Zheng Y, et al. Photoinactivation of cell-free human immunodeficiency virus by hematoporphyrin monomethyl ether [J]. *Lasers Med Sci*, 2011, [Epub ahead of print].

(此文编辑 许雪梅)