

慢病毒 GV115 - caspase - 3 siRNA 重组表达系统的构建及鉴定

赛佳明 马学晓 邱晨生 陈伯华 胡有谷

摘要 目的 构建高效的慢病毒 GV115 - caspase - 3 siRNA 重组表达系统。方法 根据 RNA 干扰序列设计原则,设计 4 个可能的 caspase - 3 siRNA 序列。应用全基因合成技术和亚克隆技术构建 GV115 - caspase - 3 siRNA 并采用 PCR 和测序对其进行鉴定。病毒包装后转染人胚肾 293T 细胞,通过应用 RT - PCR 技术检测转染后 caspase - 3 基因敲减效率,筛选高效的 GV115 - caspase - 3 siRNA。结果 GV115 - caspase - 3 siRNA 质粒 PCR 鉴定显示位于 341bp 附近的条带,测序结果与设计的基因序列完全吻合,4 个可能的 caspase - 3 siRNA 序列中基因敲减效率最高的可达到 84.2%。结论 成功构建高效的慢病毒 GV115 - caspase - 3 siRNA 重组表达系统。

关键词 慢病毒 caspase - 3 RNA 干扰 基因治疗

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.011

Construction and Detection of GV115 - caspase - 3 siRNA. *Sai Jiaming, Ma Xuexiao, Qiu Chensheng, et al. Department of Spine Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Shandong 266003, China*

Abstract Objective To construct and detect the GV115 - caspase - 3 siRNA. **Methods** On the basis of RNAi design principle, four caspase - 3 siRNA sequence were designed. GV115 - caspase - 3 siRNA was constructed by gene synthesis and subclone technique. The GV115 - caspase - 3 siRNA was detected by PCR and DNA sequencing. After the lentivirus had been packaged, the 293T cells were transfected by GV115 - caspase - 3 siRNA. The translation of caspase - 3 gene transfected by GV115 - caspase3 siRNA was detected using RT - PCR and the most effective GV115 - caspase - 3 siRNA was screened. **Results** The GV115 - caspase - 3 siRNA was proved to be right using PCR and DNA sequencing. The gene knocking rate of the most efficient GV115 - caspase - 3 siRNA was 84.2%. **Conclusion** The GV115 - caspase - 3 siRNA was constructed successfully.

Key words Lentivirus; Caspase - 3; RNA interference (RNAi); Gene therapy

细胞凋亡是细胞在生理或病理条件下,受到刺激信号的作用以及后续基因调控的一种自主的程序性死亡过程。在哺乳动物中,细胞凋亡通路主要有以下几种通路:死亡受体介导、线粒体介导和内质网介导的细胞凋亡信号转导通路^[1]。尽管以上细胞凋亡信号转导通路中细胞凋亡信号以及随后的反应多种多样,但 caspase - 3 则被称为凋亡的执行者,负责对依赖 caspase 细胞凋亡途径最后执行阶段的全部或部分关键性蛋白的酶切,起到核心作用,成为将细胞凋亡的启动者 caspase - 8、9 等信号转导至细胞凋亡的效应者 caspase - 6、7 的枢纽^[2~4]。

本研究构建并筛选高效的慢病毒 GV115 - caspase - 3 siRNA 重组表达系统,为进一步研究

caspase - 3 siRNA 的基因治疗作用奠定了基础。

材料与方法

1. 试剂:PCR 引物由上海吉凯基因技术有限公司合成;Taq polymerase 购自 TaKaRa 公司;QIAGEN Plasmid 大抽试剂盒购自 QIAGEN 公司;质粒构建所需各种酶为 NEB 公司产品;marker 购自上海吉凯基因技术有限公司;细菌摇床(HI-9211K)购自华利达实验设备公司;细菌培养箱(GHP9080)购自上海一恒科学仪器有限公司;PCR 仪(2720 thermal cycler)购自 Applied Biosystems 公司;高速离心机(TGL - 16G - A)购自日立公司;人胚肾 293T 细胞购自上海吉凯基因技术有限公司;RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司。

2. caspase - 3 siRNA 靶点设计及合成:根据目的基因 caspase - 3 以及 RNA 干扰序列设计原则,利用设计软件设计 4 个可能的 caspase - 3 siRNA 靶点序列(分别命名为 CS - 1、2、3、4)。据此合成 4 对 caspase - 3 siRNA 片段,并在序列两端连接 Age I 和 EcoR I 酶切位点。把合成的成对的引物干粉分别溶解于退火缓冲液中,90℃ 水浴 15min,然后自然冷却至室温。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171758)

作者单位:266003 青岛大学附属医院脊柱外科

通讯作者:陈伯华,主任医师,博士生导师,电子信箱: bhchen@hotmail.com

3. GV115 – caspase – 3 siRNA 重组质粒的制备与鉴定:通过 Age I 和 EcoR I 酶双酶切 GV115 载体和 4 组双链 caspase – 3 siRNA 片段,采用 T4 DNA 连接酶在适当的 buffer 中分别进行连接反应,产物分别命名为 GCS – 1、2、3、4。连接反应采用通用体系,于 16℃ 连接过夜,连接后的产物进行转化实验。然后采用 GV115 通用引物(上游引物:5' – CCATGATTCTTCATATTG – 3'; 下游引物:5' – GTAATACGGTTATC-CACCGC – 3')对阳性克隆行 PCR 鉴定及测序鉴定。

4. 慢病毒 GV115 包装:慢病毒 GV115 载体包装系统由 GV115 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体 3 质粒组成。利用大肠杆菌菌株 DH5 α 分别进行 GV115 – caspase – 3 siRNA 重组病毒质粒及其两种辅助包装原件载体质粒的抽提;人胚肾 293T 细胞复苏及传代;采用 Lipofectamine 2000 试剂盒将重组质粒及辅助包装质粒转染人胚肾 293T 细胞;转染后 48h 后,病毒的收获及效价测定。

5. GV115 表达系统对人胚肾 293T 感染条件和感染参数的确定:实验前保证细胞的良好生长状态,实验前 1 天接种 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个目的细胞于 96 孔培养板中,所加培养基体积为 $90\mu\text{l}$,一次实验需要 20 个孔。实验共分为 3 个不同梯度的感染复数(multiplicity of infection, MOI),分别为 100、10、1。当细胞的融合率约为 30% ~ 50% 时,将 $10\mu\text{l}$ 3 个不同梯度的病毒加到各组的相应孔中。在水平方向轻轻拍打培养板,使培养基和病毒等试剂充分混匀,然后把细胞板放回培养箱孵

育。12h 以后观察细胞状态,弃去细胞上清,更换为新鲜培养基。感染后的细胞可以连续培养 1 周,通过观察 GFP 的表达时间和表达强度来确定慢病毒载体对目的细胞的感染情况。

6. GV115 – caspase – 3 siRNA 表达系统的筛选:实验分组:GV115 组(G 组),GV115 – caspase – 3 siRNA 组(分为 GCS – 1、2、3、4 组)。将各组病毒颗粒按照上步实验确定的 MOI 值加入各组人胚肾 293T 细胞培养容器中继续培养。根据 Invitrogen 公司的 TRIZOL 操作说明书进行总 RNA 抽提。RNA 反转录获 cDNA 后采用两步法进行 Real – time PCR 检测各组 caspase – 3 基因的敲减效率。采用 GAPDH 作为内参基因,上游引物序列:5' – TGACTTCAACAGCGACACCCA – 3',下游引物序列:5' – CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA – 3'; 目的基因 caspase – 3: 上游引物序列:5' – GGAAGCGAATCAATGGAGCTC – 3', 下游引物序列:5' – CTCAGAACACAAACAAAC – 3'。

7. 统计学方法:采用 Thermal Cycler DICE Real – time System analysis software 对 RT – PCR 检测所得 Ct 值进行分析并采用 t 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. siRNA 序列:设计的 4 对 caspase – 3 siRNA 序列,见表 1。

表 1 caspase – 3 siRNA 序列

分组	caspase – 3 siRNA 序列(5'→3')
CS – 1a	ccggccGAAAGGTGGCAACAGAATTctcgagAATTCTGTTGCCACCTTCgggttttg
CS – 1b	aattcaaaaaccGAAAGGTGGCAACAGAATTctcgagAATTCTGTTGCCACCTTCgg
CS – 2a	ccgggtGGAATTGATGCGTGATGTTctcgagAACATCACGCATCAATTCCacttttg
CS – 2b	aattcaaaaagtGGAATTGATGCGTGATGTTctcgagAACATCACGCATCAATTCCac
CS – 3a	ccgggcGAATCAATGGACTCTGGAActcgagTTCCAGAGTCCATTGATTGcgttttg
CS – 3b	aattcaaaaageGAATCAATGGACTCTGGAActcgagTTCCAGAGTCCATTGATTGc
CS – 4a	ccggccTGAGATGGGTTATGTATActcgagTATACATAAACCCATCTCAggtttttg
CS – 4b	aattcaaaaaccTGAGATGGGTTATGTATActcgagTATACATAAACCCATCTCAgg

2. GV115 – caspase – 3 siRNA 重组质粒的鉴定:连接入 caspase – 3 siRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段为 341bp,没有连接入 caspase – 3 siRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段为 307bp(图 1)。测序结果证实分组连接的 caspase – 3 siRNA 片段与设计的基因序列吻合。

3. GV115 – caspase – 3 siRNA 病毒转染效率:通过观察荧光表达情况可以看出,加入的病毒量 MOI = 100 组和 MOI = 10 组病毒转染效率相当,加入的病毒量 MOI = 1 组病毒转染效率明显降低(图 2)。因此采用 MOI = 10 进行 GV115 – caspase – 3 siRNA 表达系统的筛选实验。

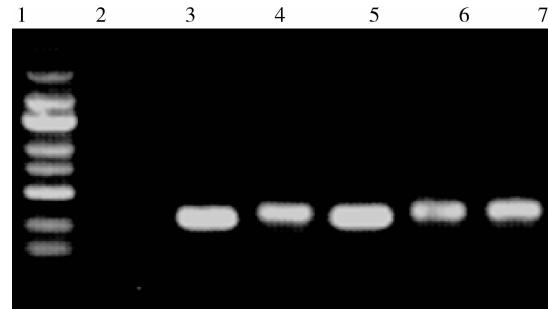


图 1 PCR 鉴定电泳图

1. marker(自上而下依次为 5kb、3kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp);2. 阴性对照(ddH_2O);3. 阴性对照(空载体组);4 ~ 7. GCS – 1、2、3、4 各组

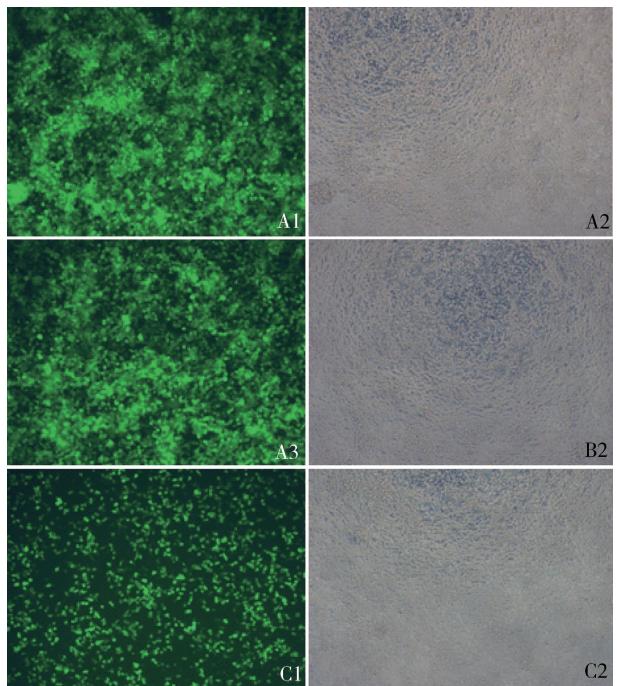


图 2 GV115 - caspase - 3 siRNA 病毒转染效率

A1、B1、C1 分别为 MOI = 100、10、1 时荧光显微镜下 ($\times 100$) 转染细胞荧光密度照片; A2、B2、C2 分别为 MOI = 100、10、1 时的光镜下 ($\times 100$) 细胞密度照片

4. GV115 - caspase - 3 siRNA 筛选实验: 从定量 PCR 结果可以看出, 与空载体对照组相比较, GCS - 1 组 caspase - 3 基因敲减效率达到 81.8% ($P = 0.011$); GCS - 2 组 caspase - 3 基因敲减效率达到 54.6% ($P = 0.022$); GCS - 3 组 caspase - 3 基因敲减效率达到 46.8% ($P = 0.027$); GCS - 4 组 caspase - 3 基因敲减效率达到 84.2% ($P = 0.010$), 认为 GCS - 4 是最有效靶点(图 3)。

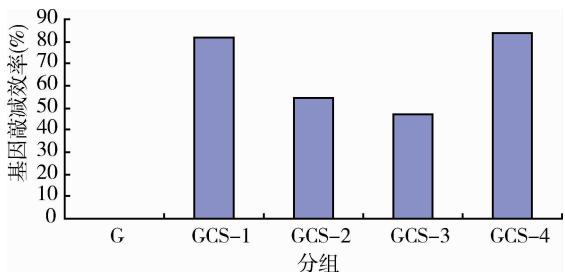


图 3 GV115 - caspase - 3 siRNA 筛选实验
各组 caspase - 3 基因敲减效率

讨 论

RNAi 基因沉默有以下显著优点^[5,6]: ①高特异性: 只引起与双链 RNA (dsRNA) 同源的信使核糖核酸 (mRNA) 降解, 而其他 mRNA 的表达不受影响; ②高效性: 只需要几个小片段 RNA (siRNA) 就能显著抑

制细胞靶基因表达甚至完全敲除; ③可传播性: siRNA 具有跨越细胞界限的能力, 能够在细胞间传递和维持; ④可遗传性: RNAi 的基因沉默在低等动物中可被遗传。

鉴于 caspase - 3 在细胞凋亡信号转导通路中的关键作用, 利用 RNA 干扰序列设计原则: ①从 mRNA 的 AUG 起始密码开始, 寻找“AA”二连序列, 并记下其 3' 端的 19 个碱基序列, 作为潜在的 siRNA 靶位点; ②将潜在的序列和相应的基因组数据库进行比较, 排除那些和其他编码序列同源的序列; ③选出合适的目标序列进行合成。笔者根据此原则设计多个靶序列的 siRNA, 然后根据设计软件进行初步评估测定, 选择 4 个相对最佳动力学参数的靶点进入后续实验流程。然后, 将 4 组 caspase - 3 siRNA 转染细胞, 采用定量 PCR 的方法检测各组细胞中 caspase - 3 基因敲减效率, 以此确定最佳的 caspase - 3 siRNA 序列。

如何将 siRNA 基因导入靶细胞并长期稳定表达是实现 RNAi 的另一个难题, 因此转基因载体的选择是基因治疗深入研究的基础与关键。病毒载体是传递表达外源基因进靶细胞的工具, 腺病毒载体已被广泛应用, 其转染效率高, 但表达时间短且不稳定, 还具有较强的免疫原性, 将其运用于临床有一定的风险。最近研究的作为反转录病毒家族一员的慢病毒载体, 可转染有丝分裂期和有丝分裂后期的细胞, 宿主范围广, 可在体内长期稳定整合, 高效表达, 免疫反应小, 包装好的病毒无复制能力, 且自身失活特性^[7,8]。慢病毒载体的高效性和安全性, 使其成为有效的基因传递工具。本实验采用的 GV115 慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒 (HIV) 为基础发展起来的基因治疗载体。本实验结果显示 GV115 慢病毒载体表达时间较慢, 对于代谢较旺盛的人胚肾 293T 细胞 24h 后可以观察到绿色 (GFP) 荧光, 感染 4 天后绿色 (GFP) 荧光被完全表达; 视野中大部分细胞都可观察到 GFP 荧光, 说明 GV115 慢病毒载体可介导 caspase - 3 siRNA 高效转染真核细胞, 细胞中目的基因的 caspase - 3 基因敲减效率可高达 84.2%, 为进行转基因治疗实现高效的 RNAi 提供了希望。

参考文献

- 宋必卫, 王璐. 细胞程序性坏死一种细胞死亡新方式 [J]. 生理科学进展, 2013, 44(4): 281 - 286
- Li SJ, Wu CH, Zhu L, et al. By improving regional cortical blood flow, attenuating mitochondrial dysfunction and sequential apoptosis galangin acts as a potential neuroprotective agent after acute ischemic stroke [J]. Molecules, 2012, 17: 13403 - 13423

- 3 Wang H, Liu H, Zheng ZM, et al. Role of death receptor, mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in different stages of degenerative human lumbar disc [J]. Apoptosis, 2011, 16(10):990–1003
- 4 Yamada K, Sudo H, Iwasaki K, et al. Caspase-3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration [J]. Am J Pathol, 2014, 184(3):753–764
- 5 范璐, 樊剑鸣, 张改平, 等. RNA 干扰技术及其在动物疾病研究中的应用 [J]. 生物技术通报, 2013, 6: 63–69
- 6 胡有谷, 陈伯华. 椎间盘退变基因治疗进展 [J]. 中国骨与关节外科, 2013, 6(Suppl 1): 11–16
- 7 Huang S, Kamihira M. Development of hybrid viral vectors for gene therapy [J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(2): 208–223
- 8 Felizardo TC, Wang JC, McGraw RA, et al. Differential immune responses mediated by adenovirus- and lentivirus-transduced DCs in a HER-2/neu overexpressing tumor model [J]. Gene Ther, 2011, 18(10): 986–995

(收稿日期: 2015-02-10)

(修回日期: 2015-04-16)

SUMF2 基因过表达慢病毒载体的构建及鉴定

那春鑫 薛丽 梁红艳 姜晓峰

摘要 目的 构建硫酸酯酶修饰因子 2 (SUMF2) 基因过表达慢病毒载体, 以便进一步研究 SUMF2 功能。**方法** 针对人 SUMF2 DNA 序列设计带酶切位点的引物, PCR 法获得目的基因片段; 用 Age I 和 Nhe I 酶双酶切 SUMF2 基因片段及 PLJM1-EGFP 载体。用 T4 连接酶对两种酶切产物进行连接、PCR 鉴定、测序。将阳性克隆质粒与包装质粒及包膜蛋白质粒共转染 293T 细胞, 并荧光显微镜观察 EGFP 的表达。**结果** PCR 和测序证实成功构建了 SUMF2 的慢病毒表达载体, 病毒效价为 1×10^8 TU/ml。**结论** 成功构建 SUMF2-PLJM1-EGFP 慢病毒载体, 并在 293T 细胞中得到表达。

关键词 硫酸酯酶修饰因子 2 慢病毒过表达载体构建**中图分类号** R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.012

Construction and Identification of Lentiviral Vector Over-expressing Sulfatase-modifying Factor 2. Na Chunxin, Xue Li, Liang Hongyan, et al. Department of Laboratory, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China

Abstract Objective To construct a human sulfatase-modifying factor 2 (SUMF2) over-expressing lentiviral vector for further functional study. **Methods** The primers of SUMF2 with restriction endonuclease sites were designed, and gene were amplified by PCR. Purified SUMF2 fragments and PLJM1-EGFP plasmid were linked by T4 ligase after they were digested by Age I and Nhe I. Positive clones of SUMF2-PLJM1-EGFP vectors were confirmed by PCR and sequencing. The lentiviral vectors containing SUMF2 gene were transfected into 293T packaging cells together with envelope plasmid and packaging plasmid by lipofectamine 2000. The recombinant lentiviruses were transfected into 293T cells and the expression of EGFP observed by fluorescence microscopy. **Results** PCR and DNA sequencing demonstrated that the lentiviral vector was constructed successfully. The titer of concentrated virus was 1×10^8 TU/ml. **Conclusion** The lentiviral vector over-expressing SUMF2 gene was successfully constructed, which can be expressed in 293T cells.

Key words Sulfatase-modifying factor 2; Lentiviral vector construction

硫酸酯酶修饰因子 2 (sulfatase-modifying factor 2, SUMF2) 是于 2003 年首次报道的一种硫酸酯酶修饰因子, 其编码基因位于人染色体 7q11.1。由于 SUMF2 缺乏酶的催化活性, 因此它的具体生物学功能至今尚不明确。但最近笔者所在实验室研究发现, SUMF2 可以与 IL-13 相互作用, 并能够抑制其向细胞外的分泌。SUMF2 各亚型中能与 IL-13 相互作用

的主要为 SUMF2-V2、SUMF2-V3、SUMF2-V4、SUMF2-V5、SUMF2-V7, 其中以 SUMF2-V2、SUMF2-V5 亚型作用明显^[1,2]。众所周知, IL-13 是 Th2 细胞产生的一种炎性细胞因子, 并与多种变态反应性疾病密切相关。目前的研究认为 IL-13 是哮喘发生的始动因子^[3]。IL-13 不仅可以引起气道局部的慢性炎症, 造成气道高反应性, 还可引起气道的重构^[4]。基于上述的这些研究, 笔者猜想 SUMF2 或许会以 IL-13 为中介, 与哮喘的发病相关。如果二者之间真的存在相关性, 那么或许可以更加准确的揭示哮喘的发病机制, 同时也可以为哮喘的治疗及诊断

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81171657)

作者单位: 150001 哈尔滨医科大学附属第四临床医学院检验科
通讯作者: 姜晓峰, 电子信箱: jiangxiao Feng@ems.hrbmu.edu.cn