

人上皮细胞黏附分子 shRNA 表达载体的构建及鉴定

张敏娜 庄英杰

摘要 **目的** 以人上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)基因为靶基因,构建 shRNA 重组表达载体。**方法** 根据 GenBank 中 EpCAM 序列(BC014785.1)的 mRNA 设计 4 组 shRNA 序列,插入 pSGU6/GFP/Neo 载体,构建重组载体,转化至 Top10 感受态细胞,经卡那霉素筛选并挑取阳性克隆,进行 PCR 鉴定及 DNA 测序分析。**结果** PCR 鉴定及 DNA 测序结果显示重组载体 EpCAM - pSGU6/GFP/Neo - shRNA 构建成功。**结论** 成功构建了干扰人 EpCAM 基因的重组表达载体,为研究 EpCAM 分子的生物学功能打下基础。

关键词 上皮细胞黏附分子 RNA 干扰 短发夹 RNA

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.009

Construction of ShRNA Eukaryotic Recombinant Plasmid Targeting Human EpCAM. Zhang Minna, Zhuang Yingjie. Treatment and Research Center for Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Abstract **Objective** To construct the recombinant eukaryotic vector expressing short hairpin RNA(shRNA) section targeting human EpCAM gene. **Methods** According to the sequence of human EpCAM mRNA (GenBank ID :BC014785.1), four groups of shRNA sequence were designed and cloned into pSGU6/GFP/Neo vector to construct the recombinant plasmids, which were transformed into Top10 competent cells, screened by kanamycin. The positive clones were selected, and the extracted plasmids were identified by PCR analysis and gene sequencing. **Results** PCR analysis and DNA sequencing results showed that the eukaryotic expression vector of EpCAM - pSGU6/GFP/Neo - shRNA were successfully constructed. **Conclusion** The eukaryotic expression vector expressing shRNA targetin human EpCAM is successfully constructed, which provide a foundation for further study on the function of EpCAM.

Key words Epithelia cell adhesion molecule; RNA interference; Short hairpin RNA

人上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)是最早在结肠癌中发现的一种跨膜糖蛋白,也是第 1 个用单克隆抗体技术鉴定出来的人肿瘤相关抗原^[1]。EpCAM 广泛表达于上皮来源的正常组织,并在多种上皮源性癌组织中不同程度的过表达,已被多项研究证实与肿瘤的诊断和预后密切相关^[2,3]。本研究旨在构建 EpCAM 特异性 shRNA (short hairpin RNA,短发夹 RNA)真核表达载体,靶向干扰 EpCAM 基因的表达,为研究 EpCAM 基因的功能打下基础。

材料与方法

1. 组织 RNA、细胞和试剂:PCR 试剂盒(SK2491)、质粒提取试剂盒(无内毒素)、pSGU6/GFP/Neo 载体购自上海生工公司。DNA 内切酶 Hind

Ⅲ、Bbs I、DNA marker(载体线性化)、DNA marker(质粒检测)购自 MBI 公司。DNA 连接酶购自 BBI 公司。Huh7 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2. 设计路线:ShRNA 模板中的茎环结构选取 TTCAAGAGA 序列,以避免形成终止信号,转录终止序列采用 T6 结构。在模板正义链的 5'端添加 CACC 序列,与 Bbs I 酶切后所形成的黏性末端互补,模板反义链的 5'端添加 AGCT 序列,与 Hind Ⅲ酶切后的黏性末端互补;如果 shRNA 的第 1 个碱基不是 G,则在 CACC 序列后补加 1 个 G。

3. 目的基因靶序列设计:根据人 GenBank 中的 EpCAM 序列 BC014785.1 的 mRNA (cDNA clone MGC:9040 IMAGE:3861826)设计 ShRNA 序列,结构示意图见图 1。设计参数:Query sequence: 1458bp, Functional shRNA selection: Ui - Tei, Seed - duplex stability - Max Tm: 21.5℃,靶核苷酸位置:183 ~ 1127,避免连续的 G's 或 C's: 4 nt,避免连续的 A's 或 T's: 4 nt,GC 含量: 30% ~ 60%。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81372248)

作者单位:100039 北京,中国人民解放军第 302 医院感染性疾病诊疗与研究中心(张敏娜),感染控制科(庄英杰)

通讯作者:庄英杰,电子信箱:Yingjiezhuaang@sina.com

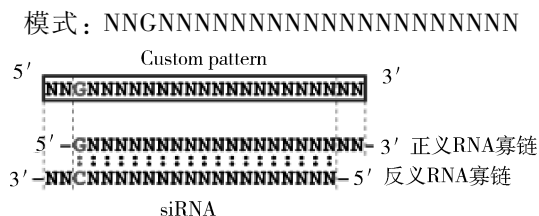


图1 ShRNA结构示意图

4. 设计序列如下: (1) shRNA1 (288) 正义序列: 5' - CACCGTAAACTGCTTTGTGAATAA **TTTCAAGAGA** ATTATTCACAAAGCAGTTTAC **TTTTTTG** - 3', 反义序列: 5' - AGCT **CAAAAAA** GTAAACTGCTTTGTGAATAAT **TCTCTTGAA** ATTATTCACAAAGCAGTTTAC3', shRNA DNA: GTAAACTGCTTTGTGAATAAT **TTCAAGAGA** ATTATTCACAAAGCAGTTTAC' **TT**。 (2) shRNA2 (689) 正义序列: 5' - CACCGATCACAAACGCGTTATCAACT **TTCAAGAGA** AGTTGATAACGCGTTGTGATCTTTTTTG - 3', 反义序列: 5' - AGCT **CAAAAAA** GATCA-CAACGCGTTATCAACT **TCTCTTGAA** AGTTGATA-ACGCGTTGTGATC - 3', shRNA DNA: GATCA-CAACGCGTTATCAACT **TTCAAGAGA** AGTTGATA-ACGCGTTGTGATC' **TT**。 (3) shRNA3 (849) 正义序列: 5' - CACCGAATCCTTGTTCATTCTAAG **TTCAAGAGA** CTTAGAATGAAACAAGGATTC **TTTTTTG** - 3' 反义序列: 5' - AGCT **CAAAAAA** GAATCCTTGTTCATTCTAAG **TCTCTTGAA** CTTAGAATGAAACAAGGATTC - 3', shRNA DNA: GAATCCTTGTTCATTCTAAG **TTCAAGAGA** CTTAGAATGAAACAAGGATTC **TT**。 (4) shRNA4 (1103) 正义序列: 5' - CACCGATGCATAGGGAAGTCAATGC **TTCAAGAGA** GCATTGAGTTCCTATGCATC **TTTTTTG** - 3', 反义序列: 5' - AGCT **CAAAAAA** GATGCATAGGGAAGTCAATGC **TCTCTTGAA** GCATTGAGTTCCTATGCATC - 3', shRNA DNA: GATGCATAGGGAAGTCAATGC **TTCAAGAGA** GCATTGAGTTCCTATGCATC **TT**。

5. 构建 EpCAM 特异性 shRNA 表达载体: (1) ShRNA DNA 模板退火: 将寡聚 DNA 分别用 TE 缓冲液 (浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$) 溶解。退火反应体系: 10 $\times$

PCR Buffer 5 μl , 正义链 (100 $\mu\text{mol/L}$) 5 μl , 反义链 (100 $\mu\text{mol/L}$) 5 μl , ddH₂O 35 μl 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5min, 75 $^{\circ}\text{C}$ 5min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 5min。将得到的 shRNA 模板溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$) 稀释至 200nmol/L 浓度进行连接反应。 (2) pSGU6/GFP/Neo 载体的线性化酶切反应体系: 10 $\times$ Buffer 15 μl , Bpi I (BbsI) 3 μl , Hind III 3 μl , pSGU6/GFP/Neo 10 μl , ddH₂O 119 μl ; 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切反应 2h; 琼脂糖凝胶电泳; DNA 纯化回收后将其稀释至浓度 50ng/ μl 。 (3) pSGU6/GFP/Neo 载体与 shRNA 模板连接反应体系: 10 $\times$ T₄ 缓冲液 2 μl , pSGU6/GFP/Neo (Bpi I + Hind III) 1 μl , shRNA 模板 (100nmol/L) 1 μl , T₄ DNA 连接酶 1 μl , ddH₂O 15 μl 。22 $^{\circ}\text{C}$ 连接反应 1h。 (4) 转化: 将连接产物转化至 Top10 感受态细胞, 通过卡那霉素筛选并挑取单克隆菌落进行扩大培养。提取质粒。 (5) 重组质粒鉴定: ①PCR 鉴定 将提取的质粒用 T₇ 和 T₃ 引物进行 PCR 鉴定, T₇ 引物序列: 5' - GTAATACGACTCACTAT-AGGGC - 3', T₃ 引物序列: 5' - AATTAACCCCTCACTA-AAGGG - 3', PCR 反应体系: 10 $\times$ Buffer (Mg²⁺) 2.5 μl , dNTP (各 2.5mmol/L) 1 μl , T₇ (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μl , T₃ (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μl , 重组质粒 1 μl , H₂O 25 μl ; ②测序鉴定 质粒送上海生工公司测序。

结 果

1EpCAM 特异性 shRNA 重组质粒 PCR 鉴定结果: PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析, 空载体可见 413bp 电泳条带, 构建成功的载体可见 429bp 条带, 详见图 2。

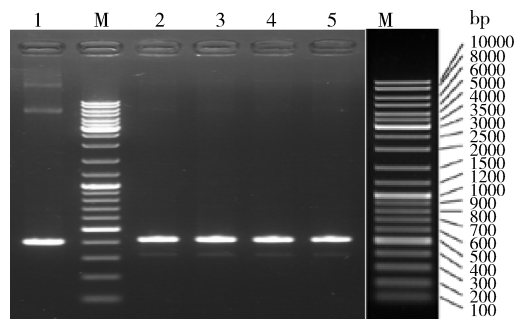


图2 重组质粒 PCR 鉴定分析图

1. 空载体条带 (413bp); M. Marker; 2 ~ 5. 重组质粒条带 (429bp)

2. 重组质粒测序结果: 将 PCR 鉴定正确的质粒送测序, shRNA DNA - 1、shRNA DNA - 2、shRNA DNA - 3、shRNA DNA - 4 测序图见图 3 ~ 图 6, 经序列比对均正确。

讨 论

RNA 干扰技术是通过 siRNA (small interfering RNA, 小干扰 RNA) 介导的靶向识别同源性 mRNA 分

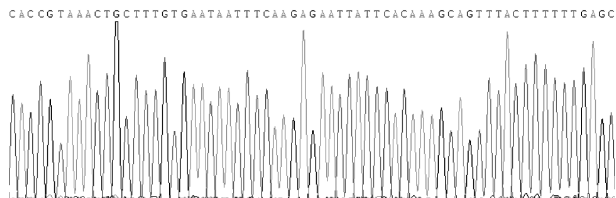


图 3 shRNA DNA - 1 测序图

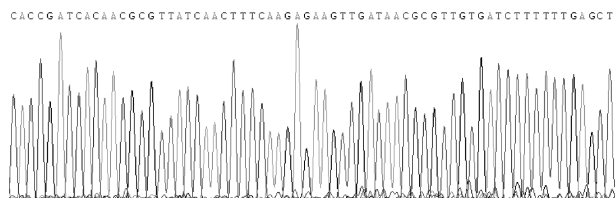


图 4 shRNA DNA - 2 测序图

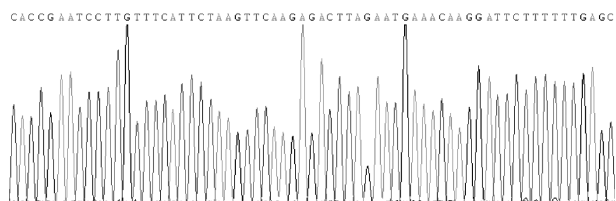


图 5 shRNA DNA - 3 测序图

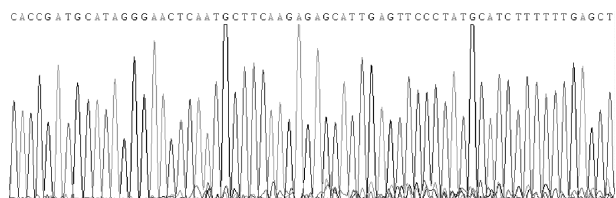


图 6 shRNA DNA - 4 测序图

子而沉默基因表达的技术^[4]。但 siRNA 在细胞内半衰期短、易被降解,故对靶基因的抑制效应短暂。特异性 shRNA 真核表达载体在细胞内可持续生成大量 siRNA,对靶基因产生较持久的沉默效应^[5]。并可大量制备、成本较低,是目前唯一可以用于长时间功能研究的方法^[6]。由于针对同一基因不同靶序列的 shRNA 对基因表达的沉默活性可呈现显著差异,本研究利用 4 组针对 EpCAM 不同序列的特异性 shRNA 序列。在构建载体时选用 pSGU6/GFP/Neo 作为表达载体,此载体带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因,目的基因所表达的蛋白与荧光蛋白形成融合蛋白,在荧光显微镜下呈现绿色荧光,可以方便的判断目的基因的转染和表达情况;并可以通过 GFP 荧光标记对成功表达目的基因的细胞进行流式筛选;而且载体带有 Kan⁺/Neo⁺ 基因,具有卡那霉素抗性,可用 G418 对转染后的细胞进行筛选。

EpCAM 为 I 型跨膜糖蛋白,分子质量为 40kDa,

由 314 个氨基酸残基构成,分子结构包括细胞外结构域 (EpEX)、单次跨膜结构域和细胞内结构域 (EpICD)。EpCAM 可介导非 Ca²⁺ 依赖性同源细胞间的黏附,促进细胞周期和细胞增殖,并与肿瘤的发生、进展、侵袭及转移等相关^[7,8]。近年来,EpCAM 被多项研究证实为肿瘤干细胞标志物^[9]。在肝细胞癌方面,近年研究认为 EpCAM 为肝癌干细胞标志物,EpCAM 表达阳性的肝癌细胞也同时表达其他肝干细胞标志物,具备自我更新和分化能力及较高的侵袭性,能够在非肥胖糖尿病严重联合免疫缺陷 (NOD/SCID) 小鼠中诱生高侵袭性的肝癌^[10]。但对于 EpCAM 在肝癌中的作用机制及未来可能的诊疗方面的应用还有待于进一步研究。笔者在前期由人肝癌组织成功扩增出 EpCAM 全基因序列的基础上,针对 EpCAM 基因的不同靶序列设计了 4 组 shRNA 干扰质粒,其中 shRNA1、2、3 干扰 EpCAM 胞外域所对应的 3 处不同靶序列,shRNA - 4 干扰 EpCAM 胞内域所对应序列,PCR 及测序结果均显示 EpCAM - shRNA 表达质粒构建成功,为下一步研究 EpCAM 表达在肝细胞癌中的作用机制的研究打下基础。

参考文献

- Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, *et al.* Colorectal carcinoma - specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979, 76(3): 1438 - 1442
- Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, *et al.* The epithelial cell adhesion molecule (Ep - CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(6): 139 - 148
- Went PT, Lugli A, Meier S, *et al.* Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2004, 35(1): 122 - 128
- Gunda V, Bucur O, Varnau J, *et al.* Blocks to thyroid cancer cell apoptosis can be overcome by inhibition of the MAPK and PI₃K/AKT pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1104
- Sashital DG, Doudna JA. Structural insights into RNA interference [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2010, 20(1): 90 - 97
- Paul CP, Good PD, Winer I, *et al.* Effective expression of small interfering RNA in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 505 - 508
- Münz M, Kieu C, Mack B, *et al.* The carcinoma - associated antigen EpCAM upregulates c - myc and induces cell proliferation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(34): 5748 - 5758
- Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, *et al.* The biology of the 17 - 1A antigen (EpCAM) [J]. *J Mol Med*, 1999, 77(10): 699 - 712
- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10): 755 - 768
- Yamashita T, Ji J, Budhu A, *et al.* EpCAM - positive hepatocellular carcinoma cells are tumor - initiating cells with stem/progenitor cell features [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012 - 1024

(收稿日期: 2015 - 10 - 09)

(修回日期: 2015 - 10 - 09)