

筛选喉癌相关基因 *LCRG1* 的有效沉寂序列

段朝军¹, 蒋铁斌², 李萃¹, 章晓鹏¹, 李茂玉¹, 肖志强¹, 汤参娥¹, 易红¹, 陈主初¹
(中南大学 1. 湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008;
2. 湘雅三医院血液科, 长沙 410013)

[摘要] 目的:拟采用 RNA 干扰技术筛选有效的针对 *LCRG1* 基因的打靶序列。方法:首先采用 PCR 定点突变技术改造 pSuper 载体,而后利用该改造后的载体构建针对 *LCRG1* 基因的 5 对打靶序列的真核表达载体。将构建的重组 pSuper 362,398,432,789,903 表达载体和 pSuper 空白载体分别转染 HeLa 细胞,经抗性药物筛选获得抗性细胞克隆和池克隆;通过 RT-PCR 及荧光定量 PCR 鉴定阳性克隆,进行平板克隆集落形成试验,以检测打靶序列沉寂 *LCRG1* 基因 mRNA 表达水平的效果。结果:应用 PCR 定点突变技术改造的 pSuper 载体,可被 *Bgl* II 酶切;利用 RT-PCR 和荧光定量 PCR 检测各重组载体转染细胞池克隆 *LCRG1* mRNA 的表达发现,362 组,398 组,432 组的基因均能封闭内源性 *LCRG1* 基因表达,尤以 362 组为显著;鉴定 362 组筛选的各个抗性克隆,发现 A2 和 A5 克隆的 *LCRG1* mRNA 表达水平明显降低。平板克隆实验结果提示 362 组的 A2, A5 和池克隆的细胞增殖能力明显强于载体和空白对照组 ($P < 0.05$)。结论:成功改建了 pSuper 真核表达载体;362 siRNA 相对其他 siRNA 具有较好的打靶效果,这对于应用 RNAi 方法研究 *LCRG1* 基因的功能和其作用分子机制具有重要的指导意义。

[关键词] *LCRG1* 基因; PCR 定点突变; RNAi

[中图分类号] R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)06-0468-09

Screening the effective target sequences of laryngeal carcinoma related gene *LCRG1*

DUAN Chao-Jun¹, JIANG Tie-bin², LI Cui¹, ZHANG Xiao-peng¹,
LI Mao-yu¹, XIAO Zhi-qiang¹, TANG Can-e¹, YI Hong¹, CHEN Zhu-chu¹

(1. Key Laboratory of Cancer Proteomics, Ministry of Health of China, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. Department of Hamatology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To screen the effective target sequences of laryngeal carcinoma related gene *LCRG1* using RNAi. **Methods** PCR site mutation method was used to reconstruct pSuper vector. Five pairs of siRNA sequences designed by siRNA software were annealed and inserted into the reconstructed pSuper vector. The reconstructed pSuper 362, 398, 432, 789, 903, and pSuper vectors were transfected into HeLa cell lines and selected with the appropriate drugs to get resistant and pool cells, respectively. The colonies were identified by RT-PCR or real-time RT-PCR analysis. The silence effects were observed by cloning formation analysis. **Results** pSuper vector was reconstructed to restore *Bgl* II restriction enzyme sites using PCR mutation. The RT-PCR or real-time RT-PCR results of pool clones showed 362, 398, and 432 pool clones all had better effects of *LCRG1*

收稿日期 (Date of reception) 2007-12-03

作者简介 (Biography) 段朝军(1966-), 男, 湖南茶陵人, 博士, 副研究员, 主要从事喉癌发病的分子机制研究。蒋铁斌为并列第一作者。

通讯作者 (Corresponding author) 李萃, E-mail: licui@126.com; 陈主初, E-mail: tcb1@xysm.net

基金项目 (Foundation items) 国家“973”计划(2001CB510207); 国家自然科学基金项目(30500558, 30670990); 教育部新世纪优秀人才培养计划基金(教育部科技函[2007]70)。 This work was supported by National 973 Project of China (2001CB510207), National Natural Science Foundation of China (30500558, 30670990), and Program for New Century Excellent Talents in Central South University of P. R. China (NCET)(2007-70).

gene-silence, especially 362 pool clones. The expression level of *LCRG1* mRNA of selected 362 group anti-puromycin clones A2 and A5 was decreased. The results of clone forming efficiency revealed that the cellular proliferation in A2 of 362 group was significantly higher than that of the vector and control Hela cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The reconstructed pSuper vector is successfully constructed. The 362 group has better gene silence and has 2 effective 362 group anti-clones, suggesting that methodology has important values in studying the function and molecular mechanism of *LCRG1*.

Key words: laryngeal carcinoma related gene *LCRG1*; PCR site-specific mutagenesis; RNAi

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2008, 33(6):0468-09]

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 作为敲除特定基因的新技术,以其快速、简单、高效和高度特异性的特点,被广泛地应用到基因功能研究和肿瘤防治中,并被不断地改进和完善^[1-2]。利用 RNAi 技术特异性地抑制瘤基因、抑瘤基因的活性,可以抑制肿瘤细胞的生长,从而有利于揭示肿瘤发生、发展的机制,并可为肿瘤的治疗和防治提供新的靶点^[3-4]。喉癌相关基因 1 (laryngeal carcinoma related gene 1, *LCRG1*) 是本实验室采用 mRNA 差异显示技术克隆的一个新基因。GenBank 登陆号为 AF268387^[5-7]。*LCRG1* 在喉癌细胞系 Hep-2 中不表达,在 12/30 例 (40%) 喉癌组织中表达缺失或下调,这提示 *LCRG1* 表达缺失或下调与喉上皮癌变有关。先前的基因转染实验结果提示 *LCRG1* 具有抑制喉癌细胞 Hep-2 生长的作用^[5, 8-9], 并且在此基础上我们应用蛋白质组学方法建立了人喉癌细胞系 Hep-2 和 *LCRG1* 稳定转染的 Hep-2 细胞系 (Hep-2 / *LCRG1*) 的差异蛋白质表达谱,同时应用磷酸化蛋白质组研究技术建立了这两个细胞系的差异磷酸化蛋白质谱,并分别鉴定出 20 个与 *LCRG1* 作用相关的蛋白质、13 个与酪氨酸磷酸化作用相关的蛋白质。这提示, *LCRG1* 有可能通过调节这些蛋白质的表达和磷酸化水平而发挥抑瘤作用^[10-11]。但 *LCRG1* 与喉癌发生、发展的关系仍不是很明了,其抑瘤作用的分子机制尚待进一步阐明。因此,利用 RNAi 技术筛选有效的沉默 *LCRG1* 基因的打靶序列,并对该基因进行更深入的研究将有助于进一步阐明其功能及作用的分子机制。

本研究应用 PCR 定点突变的方法,特异性地突变 pSuper 载体的一个碱基,使其可以被 *Bgl* II 酶切。退火合成 64 bp 的对应组的正、反义序列,与突变的 pSuper 载体重组。将构建好的重组逆转录病毒真核表达载体转染 Hela 细胞,然后采用 RT-PCR 和荧光定量 PCR 鉴定阳性克隆,通过平板克

隆实验观察打靶 *LCRG1* 基因之后 Hela 细胞生物学特性的改变,以期为阐明 *LCRG1* 的作用机制提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 人宫颈癌上皮细胞 (Hela) 购自美国 ATCC 公司; pSuper-puro 空白质粒购自美国 Oligoengine 公司。

1.1.2 主要试剂 HEPES 和 puromycin 为美国 Sigma 公司产品; 限制性内切酶 (*Hind* III, *Bgl* II) 和 T₄ DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品; 引物及 siRNA 为上海博亚生物技术有限公司合成; 异丙醇、氯仿、无水乙醇和甲醛为湖南师范大学化学试剂厂产品; 低熔点琼脂糖, NaOH, EDTA, AgNO₃ 和 RNase 酶为华美生物公司产品; DNA 回收试剂盒为日本 Takara 公司产品; Advantage Taq 酶为日本 Clontech 公司产品。Lipofectamine™ 2000 和 Trizol 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品。

1.1.3 仪器 倒置显微镜为日本 Olympus 株式会社产品; 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司产品; PCR 仪和紫外分光光度计为德国 Eppendorf 公司产品; LightCycler system 荧光 PCR 仪为瑞士 Roche 公司产品; 手提式凝胶摄影仪为日本 Polaroid 公司产品; 37 °C 细胞培养箱为日本 ESPEC 公司产品; 蛋白电泳仪及电转移槽为美国 Bio-Rad 公司产品; 恒温循环水浴箱为美国 Cole-Parmer 公司产品; 垂直电泳仪为北京六一公司产品。

1.1.4 引物 (1) 突变 pSuper 载体引物序列: pSuper TL, 5'-CCCAAGCTTTTCCAAAAAGGAGATCTGTGG-3'; pSuper TR, 5'-CGGAATTCGAACGCTGACGT-CATCAACCCG-3'。扩增片断 245 bp。(2) pSuper 测序用引物: pSuper L, 5'-GGAAGCCTTGCTTTTG-3'; pSuper R, 5'-CGAACGCTGACGTCATC-3'。扩增产

物 419 bp。(3)检测 LCRG1 的表达:LD2PL,5'-TGTCGCAGGAATGCAGGGATGAAGT-3';LD2PR,5'-TGGACAGCACCGCAAGCCTTCATAA-3'。扩增片断 206 bp。

1.1.5 寡核苷酸打靶序列 (1)398:398 pSuper L,5'-GATCCCCGAGTTCATTCAGCGACATTTCAAGAGAATGTCGCTGAATGAACTGCTTTTTGGAAA-3';398 pSuper R,5'-AGCTTTTCCAAAAAGCAGTTCATTCAGCGACATTCTCTTGAAATGTCGCTGAATGAACTGCGGG-3'。(2)362:362 pSuper L,5'-GATCCCCTCTC-GATGGACATCAGAATTTCAAGAGAATTCTGATGTCCA-TCGAGATTTTTGGAAA-3';362 pSuper R,5'-AGCTTTCCAAAAATCTCGATGGACATCAGAATTCTCTTGAAATTCTGATGTCCATCGAGAGGG-3'。(3)432:432 pSuper L,5'-GATCCCCCAGGATCTAAGTATTGCCATTC-AAGAGATGGCAATACTTAGATCCTGTTTTTGGAAA-3';432 pSuper R,5'-AGCTTTTCCAAAAACAGGATCTAAGTATTGCCATCTCTTGAATGGCAATACTTAGATCC-TGGGG-3'。(4)789:789 pSuper L,5'-GATCCCCCTAATGTCGCAGGAATGCATTCAAGAGATGCATTTCCT-GCGACATTAGTTTTTGGAAA-3';789 pSuper R,5'-AGCTTTTCCAAAAACTAATGTCGCAGGAATGCATCTC-TTGAATGCATTTCCTGCGACATTAGGGG-3'。(5)903:903 pSuper L,5'-GATCCCCGCTCCTCCGAGCATACAA-TATCAAGAGATATTGTATGCTCGGAGGACTTTTTGGAAA-3';903 pSuper R,5'-AGCTTTTCCAAAAAGTCCTCCGAGCATACAATATCTCTTGAATATTGTATGCTCGG-AGGACGGG-3'。

1.2 方法

1.2.1 定点突变 pSuper 载体 图 1 所示为本实验室改造 Oligoengine 公司的 pSuper-PURO-retro 载体图。具体是在 *Hind* III 和 *Bgl* II (改造前不能被该酶酶切)之间的插入序列为“**AAGCTTTTCCAAAAAGGAGATCTCTGG**”,即原序列 G 突变为 A (黑体所示),其他序列同其原载体序列。突变后则可以被 *Bgl* II 酶切。为此,以 pSuper-PURO-retro 原载体 DNA 为模板,用突变上、下游引物及 Clontech 的高保真 Taq 酶,进行 PCR 扩增(245 bp),PCR 反应条件:94 °C 预变性 1 min 后,30 个循环(94 °C 30 s,68 °C 3 min),延伸 68 °C 3 min。产物用 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳,按 Takara DNA 回收试剂盒操作指南进行回收。取 pSuper-PURO-retro 载体酶切回收产物和突变的 PCR 产物进行连接反应。采用 PCR 法(用 pSuper 突变引物扩增插入片断)和酶切重组质粒(*Bgl* II 单酶切和

Eco RI/*Hind* III 双酶切鉴定)对筛选克隆进行鉴定,PAGE 胶银染观察酶切片断,10% 非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,卸下凝胶,以 10% 乙醇和 0.5% 冰乙酸固定 10 min,0.2% AgNO_3 染色 10 min,蒸馏水漂洗 2 次,0.75% NaOH 和 0.2% 甲醛显色至出现清晰的条带。玻璃纸包裹凝胶,室温下干燥保存。同时,测序鉴定阳性克隆。

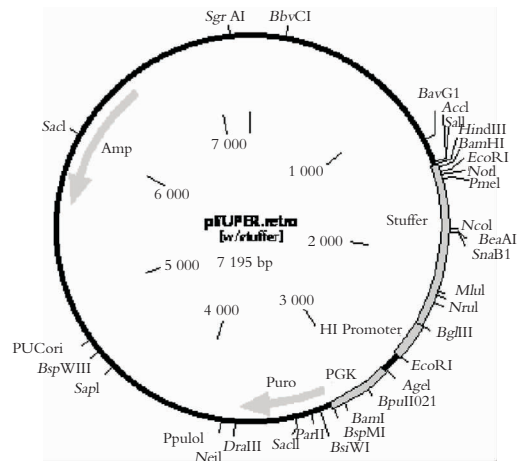


图 1 pSuper 载体图。

Fig. 1 Map of pSuper vector backbone.

1.2.2 构建重组 pSuper 打靶载体

1.2.2.1 寡核苷酸退火形成双链 用无菌、无核苷酸的 H_2O 溶解合成 64 bp 的寡核苷酸,并调节浓度为 3 g/L。吸取调整好浓度的对应上、下游引物寡核苷酸各 1 μL ,补退火 Buffer (100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L HEPES pH 7.4)至 50 μL 。94 °C 4 min,80 °C 4 min,75 °C 4 min,70 °C 10 min,37 °C 20 min,10 °C 30 min,4 °C 35 min,退火产物于 -20 °C 保存。

1.2.2.2 构建重组打靶载体 将 pSuper 改造后载体酶切回收产物与退火的正、反义寡核苷酸混合物进行连接。利用 PCR 法、*Bgl* II 单酶切和测序鉴定阳性克隆。

1.2.3 细胞转染 按照 Lipofectamine™ 2000 说明书操作,分别转染重组 362,398,432,789,903 和空白 pSuper 载体质粒入 Hela 细胞。经 2 mg/L puromycin 进行筛选;培养 2~3 周后,得到抗性克隆。

1.2.4 抗性克隆的 RT-PCR 鉴定 依据 Trizol 说明书操作,抽提各组抗性克隆细胞的 RNA。按照 Promega 逆转录酶试剂盒说明书操作合成

cDNA,取逆转录产物 2 μ L 在 LightCycler system Real-time RT-PCR 反应。反应体系如下:2 μ L cDNA,2 μ L SYBR Green1 混合染料,0.5 μ L 10 μ mol/L 上游引物,0.5 μ L 10 μ mol/L 下游引物,1 μ L 25 mmol/L $MgCl_2$ 和 14 μ L H_2O 。反应条件:94 $^{\circ}C$ 5 min,94 $^{\circ}C$ 10 s,57 $^{\circ}C$ 15 s,循环 40 周期。*GAPDH* 为内对照。实验结果自动以样本的域值循环数值 (threshold cycle, CT) 给出,每个样品浓度除以 *GAPDH* 基因浓度,即为此样品的相对含量,实验重复 3 次。

1.2.5 平板克隆形成试验 取对数生长期细胞,0.5% 胰酶和 0.01% EDTA 消化后,制成细胞悬液,稀释后按 500 个细胞/孔,接种于六孔板中,静置培养 2 周。取出培养皿,弃去培养液,用 1 \times PBS 洗 2 次,甲醇固定 15 min。弃去固定液,0.4% 结晶紫染色。用肉眼直接计数克隆数,或在显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆。然后,按公式计算克隆形成率。克隆形成率 (%) = (克隆数/接种细胞数) \times 100%。应用统计学软件 SPSS10.0 和 Excel 对各组细胞的集落形成率进行分析比较,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间计量资料的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 pSuper 载体的改造 用 pSuper 突变引物 PCR 扩增 pSuper 载体质粒 DNA,得到 245 bp 大小的片断(图 2)。连接回收的片断,用 pSuper 突变引物 PCR 鉴定重组克隆 DNA,其中重组克隆 A2, A4, T1, T2, T3, T4, T5 可扩增到插入的突变片断(图 3)。进一步行 *Bgl* II 酶切鉴定,发现仅 A4, T3, T4 可以被 *Bgl* II 完全酶切(图 4)。选取 A4 克隆进行测序,结果显示 pSuper 突变引物扩增区域除预定的 *Bgl* II 酶切位点突变外,其余序列碱基无突变和缺失,说明 pSuper 载体改造成功。

2.2 构建 pSuper 重组打靶 *LCRG1* 载体 利用 siRNA 设计软件,共设计 5 对 RNAi 打靶序列,退火相应的上、下游引物,与 pSuper 改造后载体质粒 DNA 经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切回收片断进行连接。由于是定向克隆,不需要鉴定 64 bp 打靶序列的插入方向。因此,插入成功的话,则载体的 *Bgl* II 酶切位点消失。如图 5 所示,重组 362, 398 和 432 阳性克隆质粒不能被 *Bgl* II 酶切。进一步测序结果也显示每一个重组表达 pSuper 载

体 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点之间恰好包括本实验设计的打靶插入序列,而 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点间包含的 H1 启动子区域无碱基突变和缺失(图 6)。

2.3 转染后筛选各抗性克隆细胞 *LCRG1* mRNA 表达分析 以脂质体 LipofectamineTM 2000 为介导,分别将各重组表达载体转染 Hela 细胞,采用实时定量 PCR 鉴定筛选的各组细胞池克隆(图 7)。重组 362, 398 和 432 载体转染 Hela 细胞后,*LCRG1* mRNA 相对表达量与转染空载体相比分别降低了 25.24 ± 2.42 , 5.79 ± 1.90 和 2.24 ± 0.19 倍。

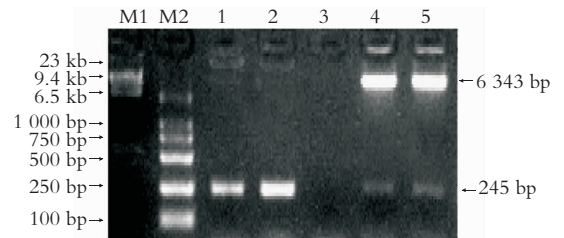


图 2 pSuper 载体 PCR 及 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切图。M1: λ DNA/*Hind*III marker; M2: DL2000 marker; 2: pSuper 载体突变引物 PCR 扩增产物; 3: 突变引物 PCR 扩增空白对照; 4, 5: pSuper 载体经 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切产物。

Fig. 2 *Eco*RI and *Hind*III digestion analysis of PCR amplification of pSuper vector. M1: λ DNA/*Hind*III marker; M2: DL2000 marker; 2: PCR amplification of the pSuper vector mutation primers; 3: PCR amplification of the empty control; 4, 5: *Eco*RI and *Hind*III digestion product.

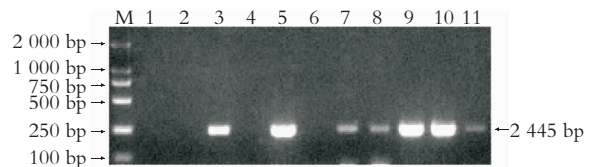


图 3 pSuper 改造后载体筛选克隆 PCR 鉴定图。M: DL2000 marker; 1~11: 质粒 pSuper 载体改造后 PCR 扩增; 1: pSuper 载体; 2~11: 分别为 pSuper 改造后载体 A1, A2, A3, A4, A5, T1, T2, T3, T4, T5。

Fig. 3 PCR analysis of screening clones of the reconstructed pSuper vector. M: DL2000 marker; 1~11: PCR amplification of the reconstructed pSuper vector; 1: pSuper vector; 2~11: Reconstructed pSuper vectors A1, A2, A3, A4, A5, T1, T2, T3, T4, and T5.

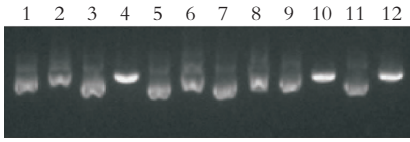


图4 pSuper改造后载体筛选克隆 *Bgl* II 单酶切鉴定图。1, 3, 5, 7, 9, 11: pSuper改造后载体质粒DNA; 2, 4, 6, 8, 10, 12: pSuper改造后载体 *Bgl* II 单酶切鉴定图; 1, 2: pSuper改造后载体 A2; 3, 4: pSuper改造后载体 A4; 5, 6: pSuper改造后载体 T1; 7, 8: pSuper改造后载体 T2; 9, 10: pSuper改造后载体 T3; 11, 12: pSuper改造后载体 T4。

Fig. 4 *Bgl* II digestion analysis of screening clones of the reconstructed pSuper vector. 1, 3, 5, 7, 9, 11: Reconstructed pSuper vector DNA; 2, 4, 6, 8, 10, 12: *Bgl* II digestion analysis of the reconstructed pSuper vector DNA; 1, 2: Reconstructed pSuper vector A2; 3, 4: Reconstructed pSuper vector A4; 5, 6: Reconstructed pSuper vector T1; 7, 8: Reconstructed pSuper vector T2; 9, 10: Reconstructed pSuper vector T3; 11, 12: Reconstructed pSuper vector T4.

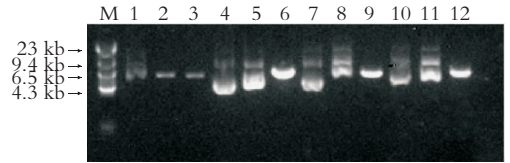


图5 pSuper改造后载体及重组质粒 362, 398 和 432 酶切图。M: λ -*Hin* dIII Marker; 1, 4, 7, 10: 各质粒DNA; 2, 5, 8, 11: 各质粒DNA经 *Bgl* II 酶切; 3, 6, 9, 12: 各质粒经 *Eco* RI 和 *Hin* dIII 双酶切; 1~3: pSuper改造后质粒; 4~6: 重组 362 质粒; 7~9: 重组 398 质粒; 10~12: 重组 432 质粒。

Fig. 5 Restriction endonuclease digestion analysis of the reconstructed pSuper vectors, 362, 398, and 432. M: λ -*Hin* dIII Marker; 1, 4, 7, 10: all plasmid DNA; 2, 5, 8, 11: *Bgl* II digestion analysis of all plasmid DNA; 3, 6, 9, 12: *Eco* RI and *Hin* dIII digestion analysis of all plasmid DNA; 1~3: Reconstructed pSuper vector DNA; 4~6: Reconstructed 362 plasmid; 7~9: Reconstructed 398 plasmid; 10~12: Reconstructed 432 plasmid.

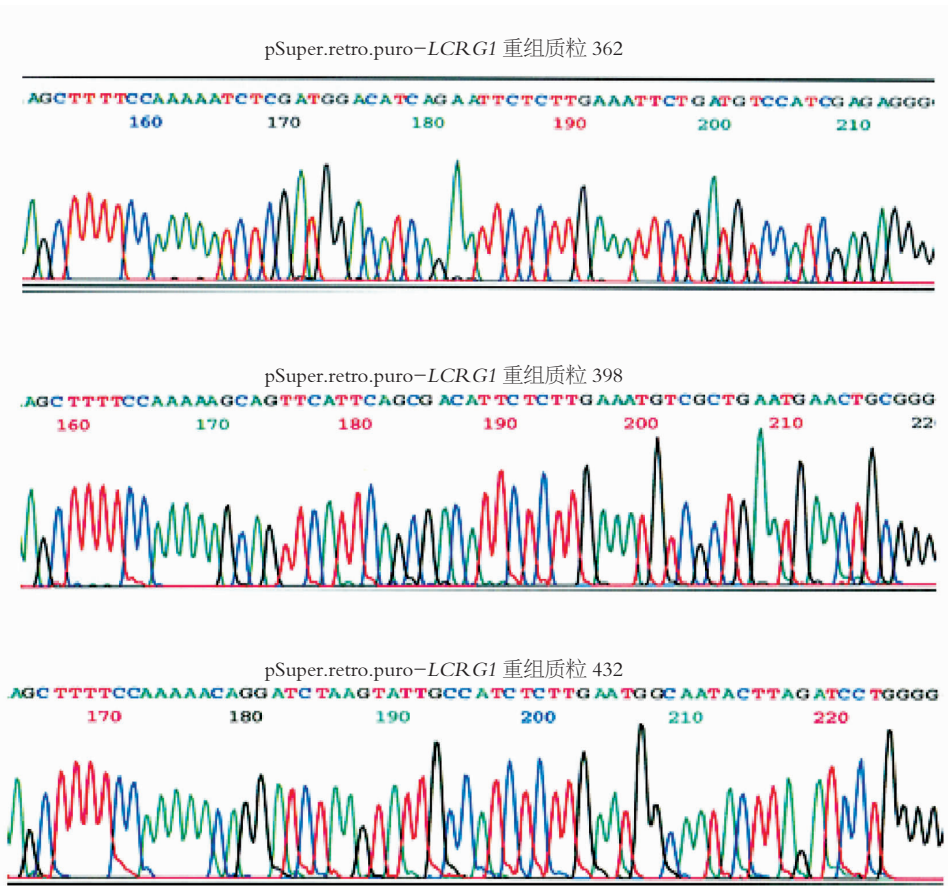


图6 pSuper. retro. puro-*LCRG1* 重组载体测序鉴定。

Fig. 6 Sequence analysis of the reconstructed pSuper. retro. puro-*LCRG1*.

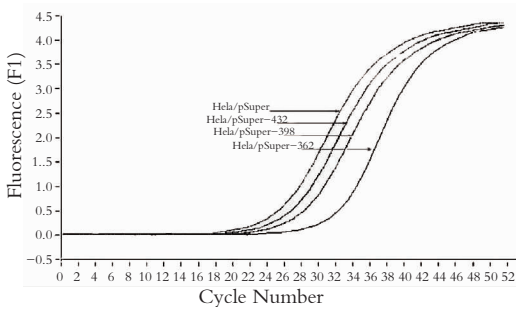


图7 转染 siRNA 重组子细胞池克隆的定量 PCR 结果。

Fig. 7 Real-time quantitative PCR analysis of pool clones transfected by reconstructed siRNA.

2.4 转染后筛选 362 组抗性克隆细胞 *LCRG1* 表达分析 应用 RT-PCR 的方法鉴定 362 组各抗性克隆细胞的 *LCRG1* mRNA 表达情况,结果示筛选克隆 A2 和 A5 的 *LCRG1* mRNA 表达水平明显降低;对扩增片段进行灰度扫描定量,A2 和 A5 克隆 *LCRG1* 表达被沉默分别达 48% 和 30% (图 8)。

2.5 362 组筛选克隆 A2, A5 和池克隆平板克隆实验 以空白组 HeLa 细胞、HeLa/pSuper 细胞为对照,分别接种 A2, A5 和池克隆于六孔板中。结果示,A2, A5 和池克隆的平板克隆数均高于载体和空白对照组 ($P < 0.05$),两对照组间无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 9,表 1)。

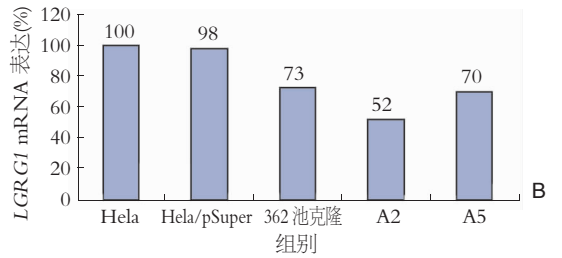
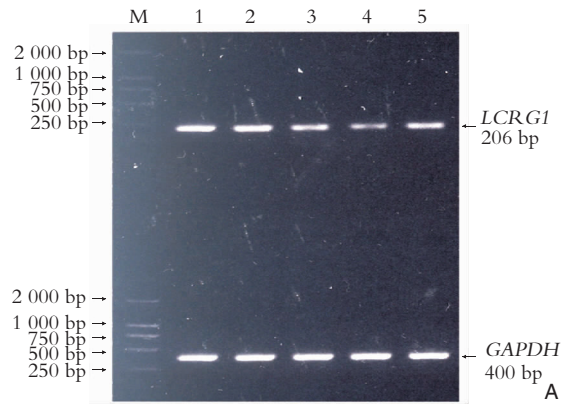


图 8 362 组各筛选抗性克隆的 RT-PCR 鉴定结果。A: 电泳图; B: 灰度扫描比值; M: DL2000 marker; 1: HeLa 细胞; 2: HeLa/pSuper 载体; 3: 池克隆; 4: A2; 5: A5。

Fig. 8 RT-PCR analysis of anti-clones in 362 group. A: Agarose gel electrophoresis showing the RT-PCR product of anti-clones in 362 group; B: Grey value of *LCRG1*/*GAPDH*; M: DL2000 marker; 1: HeLa; 2: HeLa/pSuper vector; 3: Pool anti-clones; 4: Anti-clone A2; 5: Anti-clone A5.

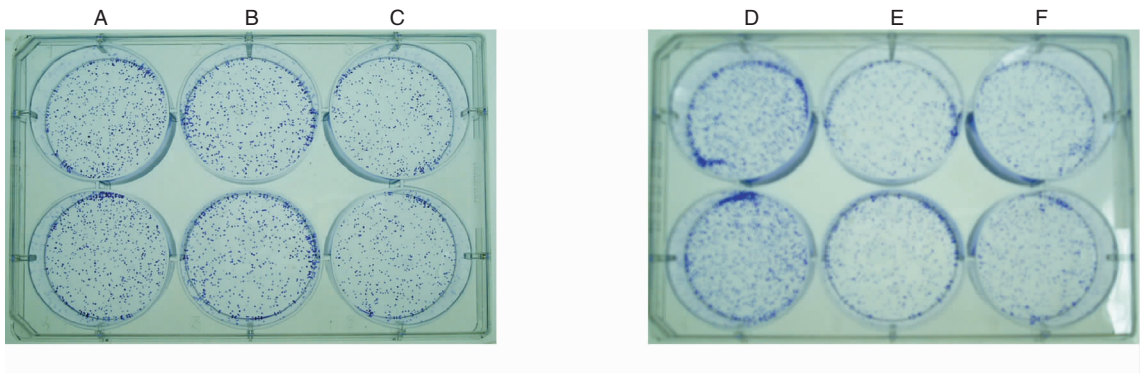


图 9 362 组筛选克隆细胞平板克隆形成实验。上下对应的两个孔为同一组的细胞, A, D:池克隆; B: A2 克隆; C: A5 克隆; E: HeLa/pSuper 载体组细胞; F: HeLa 组细胞。

Fig. 9 Results of cloning forming efficiency of anti-clones in 362 group. The corresponding 2 holes from top to bottom are the same group of cells. A, D: Pool anti-clones; B: Anti-clone A2; C: Anti-clone A5; E: HeLa/pSuper; F: HeLa.

表 1 362 组筛选克隆平板克隆形成实验

Tab. 1 Results of cloning forming efficiency of anti-clones in 362 groups

细胞分组	平板克隆形成数(个)	平板克隆形成率(%)
A2	412 ± 18 *	82.4
A5	358 ± 10 *	71.6
池克隆 P	406 ± 17 *	81.2
pSuper 组	290 ± 10	58.0
Hela 空白组	293 ± 7	58.6

与载体和空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

随着人类基因组计划的顺利进行,基因草图的完成,基因功能研究成为生命科学的热点。RNA 干扰技术以其特有的高效性、高度特异性和高穿透性的重要特征及快速、简单的优势,成为关闭特定基因抑制其表达的新技术。目前利用 RNA 聚合酶 III 依赖的启动子(RNA polymerase III-dependent promoter)(如 U6 和 H1 RNA)控制 RNAi 作用的真核表达载体被较多采用^[12-13]。将插入打靶序列的真核表达载体转染哺乳动物细胞后,通过建立稳定基因敲除的细胞系,dsRNA 有效地抑制靶基因的表达,便于进行长期研究。本研究应用的 pSuper 逆病毒表达载体,具有 polymerase-III H1-RNA 基因的启动子,包含真核表达载体的筛选标志嘌呤霉素(puromycin),含有 9 个碱基的 loop 环“TCAAGAGA”。合成的 siRNA 以回文结构的形式连接在启动子下游,使转录后产物自身互补形成发夹结构的 dsRNA^[14]。图 10 为本实验室合成的 362 序列的 RNAi 机制图。

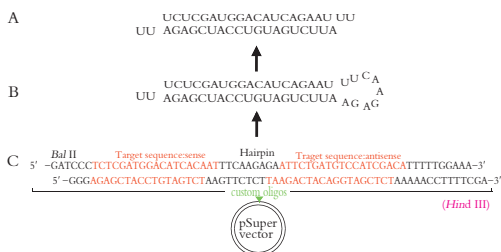


图 10 合成的 362 打靶序列 RNAi 作用的机制图。

Fig. 10 Schematic illustration of the mechanism for the synthetic 362 sequence of RNAi target.

由于 pSuper-PURO-retro 载体(Oligoengine 公司)在 *Hind*III 和 *Eco*RI 之间缺乏一个合适限制性内切酶位点,为了鉴定外援 DNA 重组是否成功,笔者通过 PCR 定点突变,在上述两限制性内切酶位点引入一个 *Bgl* II。通常,一个 17 ~ 20 个碱基的引物如错配在中心位置,可有效获得单个碱基的突变。笔者在遵照 PCR 引物设计的原则同时,将突变的位点放置在上游引物的中间位置。在两对引物的 5' 端各引入两个酶切位点 *Hind*III 和 *Eco*RI,便于进行后面的连接重组反应。由于扩增的序列正好包含 pSuper 载体的 H1 启动子和 loop 环结构,为减少其他位点碱基发生随机突变的可能性,采用高保真的 DNA 聚合酶进行 PCR 反应。该酶不仅具有高度的可信性,而且具有普通 Taq 酶的扩增效果。改造后的载体测序结果显示,突变的 *Bgl* II 酶切位点碱基被改造,可被该酶识别和酶切。PCR 扩增区域的 H1 启动子和 loop 环位置碱基序列并无缺失、重排和突变,说明该载体功能并未发生改变,可以继续进行下面的实验。

根据 siRNA 的设计原则,利用 Oligoengine 公司的 siRNA 设计软件设计了针对 *LCRG1* mRNA 的 siRNA 打靶序列,通过与 NCBI 数据库中人类基因组数据库进行比较,筛选出与其他基因无同源性的打靶序列。此后共选择了 5 对打靶序列,分别位于 *LCRG1* mRNA 的 362 ~ 380, 398 ~ 416, 432 ~ 450, 789 ~ 807 和 903 ~ 921 碱基位置。合成、退火,与 pSuper 改造后载体重组,构建了 362, 398, 432, 789 和 903 重组打靶载体。将各重组载体分别转染 Hela 细胞,嘌呤霉素筛选阳性克隆,建立稳定表达 siRNAs 的细胞系。对各重组载体的池克隆(pool)进行荧光定量 PCR 检测,发现 362 组, 398 组及 432 组 *LCRG1* mRNA 的表达明显降低,提示 362, 398 及 432 碱基序列的 siRNA 可能能够封闭细胞内源性 *LCRG1* mRNA 的表达且 362 较其他组更具有一定的干扰效果。前期的基因转染实验结果提示 *LCRG1* 具有抑制喉癌细胞 Hep-2 生长的作用^[8,9],为了进一步确定 362 siRNA 干扰效果,我们挑选了 362 组池克隆和 362 组两个在 RNA 水平表达明显降低的抗性克隆 A2 和 A5 扩增,并对其 *LCRG1* mRNA 表达及平板克隆形成率进行检测,结果发现 A2, A5 和池克隆的平板克隆数均高于载体和空白对照组,进一步说明 362 siRNA 具有较好的打靶效果,可以干扰 *LCRG1* 的抑制细胞增殖的作用。

参考文献:

- [1] Barbacid M. Ras genes [J]. Annu Rev Biochem, 1987, 56:779-827.
- [2] Bos J L. Ras oncogenes in human cancer: a review [J]. Cancer Res, 1989, 49(17):4682-4689.
- [3] Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) [J]. Oncogene, 2002, 21(37):5716-5724.
- [4] Lima R T, Martins L M, Guimaraes J E, et al. Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells [J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(5):309-316.
- [5] Li Y, Chen Z. Molecular cloning and characterization of LCRG1: a novel gene localized to the tumor suppressor locus D17S800-D17S930 [J]. Cancer Lett, 2004, 209(1):75-85.
- [6] 李友军, 谢海龙, 陈主初, 等. 喉癌相关基因 *LCRG1* 的克隆和表达分析 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(3):315-319.
LI You-jun, XIE Hai-long, CHEN Zhu-chu, et al. Cloning and expression analysis of a laryngeal carcinoma related gene, *LCRG1* [J]. Acta Biochemica Et Biophysica Sinica, 2001, 33(3):315-319.
- [7] 李友军, 田芳, 陈主初, 等. 喉癌差异表达 cDNA 序列的分离与初步鉴定 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(2):153-157.
LI You-jun, TIAN Fang, CHEN Zhu-chu, et al. Isolation and identification of laryngeal cancer differentially expressed cDNA sequences [J]. Acta Biochemica Et Biophysica Sinica, 2000, 32(2):153-157.
- [8] 李友军, 关勇军, 陈主初, 等. 喉癌相关基因 *LCRG1* 蛋白的细胞亚定位及生物学特性研究 [J]. 癌症, 2001, 20(9):911-915.
LI You-jun, GUAN Yong-jun, CHEN Zhu-chu, et al. Subcellular location and studies on biological characteristics of the protein encoded by laryngeal carcinoma related gene *LCRG1* [J]. Aizheng, 2001, 20(9):911-915.
- [9] Youjun Li, Xiaopeng Zhang, Zhuchu Chen, et al. *LCRG1* suppresses tumor growth in vivo by liposome-mediated gene transfer [J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2002, 14(2):113-117.
- [10] Zhang X P, Chen Z C, Xiao Z Q, et al. Comparative proteomics analysis of the proteins associated with laryngeal carcinoma related gene [J]. Laryngoscope, 2006, 116(2):224-230.
- [11] 章晓鹏, 肖志强, 李萃, 等. 应用磷酸化蛋白质组学方法初步研究喉癌相关基因 *LCRG1* 的功能 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(6):508-516.
ZHANG Xiao-peng, XIAO Zhi-qiang, LI Cui, et al. Preliminary function study of laryngeal carcinoma related gene *LCRG1* using phosphorproteomics methods [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2005, 32(6):508-516.
- [12] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296(5567):550-553.
- [13] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5):497-500.
- [14] Yu J Y, DeRuiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(9):6047-6052.

(本文编辑 陈丽文)