

端粒酶 RNA 亚基的 shRNA 对细胞端粒酶活性影响的研究

张哲^{1,2}, 明宇², 于聪, 张玉静^{2*}

(1. 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林长春 130062; 2. 吉林大学人兽共患病研究所, 吉林长春

130062; 3. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林长春 130022)

摘要 [目的] 探讨端粒酶 RNA 亚基(chTR)的短发 RNA(shRNA) shRNA 对 MDCG MSB1 细胞端粒酶活性的影响。[方法] 设计合成 chTR shRNA 并构建表达载体, 转染 MDCG MSB1 细胞, 应用改良 TRAP 法检测端粒酶活性。[结果] 与对照组相比, 转染 24 h 后, 各组端粒酶活性变化不明显; 转染 48 h 后, 端粒酶活性均显著地下降, 且针对模板区设计的干扰载体 pSi-chTR-sh1 转染后抑制效果最明显。[结论] chTR shRNA 表达载体能够有效地抑制 MDCG MSB1 细胞的端粒酶活性。

关键词 端粒酶; 端粒酶 RNA; shRNA

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00147-03

Study on the Effect of shRNA of chTR on Telomerase Activity of Cell

ZHANG Zhe et al (College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun Jilin 130062)

Abstract [Objective] The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of shRNA of chTR on telomerase activity in MDCG MSB1 cells. [Method] The artificially designed and synthesized short hairpin RNA(shRNA) of chicken telomerase RNA(chTR) was used to construct the expression vector that was subsequently transfected to MDCG MSB1 cells, then the telomerase activity of these cells was measured by improved TRAP method. [Result] Compared to the CK group, the telomerase activities in the treatment cells showed no obvious decrease in 24 h after transfection, while decreased remarkably 48 h later, among which in the cells transfected by interference vector pSi-chTR-sh1 presented the most obvious inhibitory effects. [Conclusion] This vector could effectively inhibit the telomerase activities in MDCG MSB1 cells.

Key words Telomerase; Telomerase RNA; shRNA

端粒酶是 1985 年 Greider 和 Blackburn 首次从四膜虫细胞提取物中发现的一种由 RNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白复合物, 具有逆转录酶活性^[1]。该酶在 85% 以上的恶性肿瘤发展进程中都有表达, 但良性病变和正常组织中除生殖细胞和干细胞外均不表达。由于其广泛表达和可能作为癌症治疗的新靶点, 使得端粒酶成为目前全世界的研究热点, 并成为诊断恶性肿瘤的重要标记物之一。端粒酶由 3 个主要亚单位构成: 端粒酶 RNA(telomerase RNA, TR)、端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT) 和端粒酶相关蛋白(telomerase-associated protein, TP)。TR 是端粒合成重复序列的模板, 在不同物种之间其一级结构有很大差别, 其链长及核苷酸序列均不相同。但这些不同来源的 TR 的二级结构却比较保守^[2]。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 是最近几年发现和发展起来的一门在转录水平上的基因阻断技术^[3]。反义 RNA 与正链 RNA 形成双链 RNA 可特异性地抑制靶基因的表达, 因而可人为地引入与内源靶基因具有相同序列的双链 RNA (有义 RNA 和反义 RNA), 诱导内源靶基因的 mRNA 降解, 达到阻止基因表达的目的^[4]。而小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA) 是比较广泛的端粒酶抑制剂^[5]。因此, 该研究根据 TR 基因序列设计并合成编码短发夹(shRNA) 的 DNA 序列, 构建 shRNA 表达载体, 转染 MDCG MSB1 细胞, 探讨 TR 对端粒酶活性的影响, 以期为研究端粒酶和肿瘤之间关系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 菌株与质粒载体: 大肠杆菌(Escherichia coli) JM109 感受态菌和 pSilencer 1.0-U6(Ambion) 由吉林大学畜牧兽医学院生物化学与分子生物学研究室保存。MDCG MSB1 细胞系购于中国兽医药品监察所。酶与试剂: -EcoT14

digest(19 329、7 743、6 223、4 254、3 472、2 690、1 882、1 489、925、421、74 bp)、DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、Apa^I、EcoR^I、Xho^I、Hind^{III} 均购于 TaKaRa 公司; DNA 小片段凝胶回收试剂盒购于上海道普化素国际贸易有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 shRNA 序列设计和筛选。 在 GenBank 内搜索已知 chTR 序列, 编号为 NR_001594, 利用专业网站以 Ambion 的在线服务软件(<http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNAfinder.html>) 设计 siRNA 序列作为候选序列, 并利用专业网站(<http://www.bidinfo.rpi.edu/applications/nfold/cgi-bin/rnaform1.cgi>) 对 chTR 序列进行二级结构模拟。chTR 二级结构的保守序列分析和检索分析, 按照 pSilencer 1.0-U6 hygro siRNA Expression Vector 的说明进行。如图 1, 在 19 nt 目的基因的正义链和反义链寡核苷酸序列之间加入 9 nt 的 Loop (TTCAAGAGA), 使其能形成发夹结构, 并在反义链的 3' 端加入 RNA polymerase 的终止序列 TTTTTT, 再分别加上 Apa^I 和 EcoR^I 酶切位点。最终设计合成针对 chTR 基因的模板区、假结区和 CR4-CR5 区的 shRNA 如下:

sh1 A: TGTGCCTAACCCCTAATCGGTTCAAGAACCGATTAGGGTTAGGCACATTTTTT;

sh1 B: AATTAAAAAATGTGCCTAACCCCTAATCGGTTCTTGAACCGATTAGGGTTAGGCACAGGCC;

sh2 A: TTA CTGCTGACTTTCAAGAGAGCTGAAAGTCAGCGAGTAAATTTTTT;

sh2 B: AATTAAAAAATTACTCGCTGACTTTCAAGCTCTTGAAGCTGAAGTCAGCGAGTAAAGGCC;

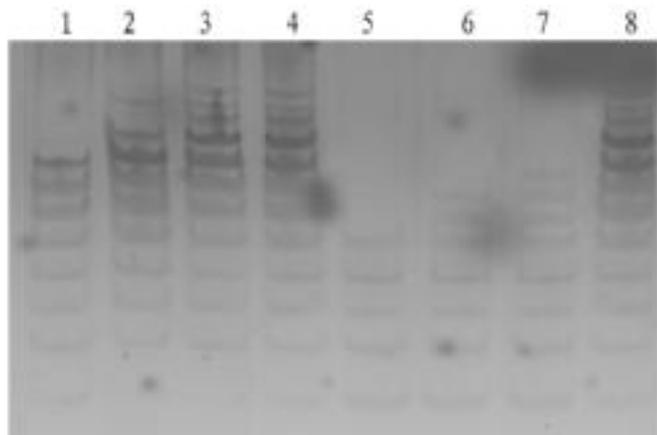
sh3 A: AAGAGTTCGCTCTGTCAGTTCAAGAGACTGACAGAGGCCGACTCTTTTTTTT;

sh3 B: AATTAAAAAAGAGTTCGCTCTGTCAGTTCTTGAAGCTGACAGAGGCCGAACTCTTGCC。

1.2.2 pSi-chTR-shRNAs 质粒载体的制备。 用 EcoR^I 和 Apa^I 双酶切 pSilencer 1.0-U6 的质粒。将编码 shRNA 的

作者简介 张哲(1974-), 女, 吉林长春人, 在读博士, 从事基因工程研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-11-03



注:1~3 分别为转染 pSi-TER-sh1, pSi-TER-sh2, pSi-TER-sh3 24 h 活性水平;4 为未转染的 MDCG-MSB1 的活性水平;5~7 分别为转染 pSi-TER-sh1, pSi-TER-sh2, pSi-TER-sh3 48 h 活性水平;8 为转染空质粒活性水平。

Note:1-3 stand for 24 h activity level with transfecting pSi-TER-sh1, pSi-TER-sh2 and pSi-TER-sh3 respectively; 4, the activity level of untransfected MDCG-MSB1; 5-7 stand for 48 h activity level with transfecting pSi-TER-sh1, pSi-TER-sh2 and pSi-TER-sh3 respectively; 8, the activity level with transfecting empty plasmid.

图5 TRAP 法检测转染后端粒酶活性水平

Fig.5 The detection of telomerase activity level by TRAP method

都有较高的端粒酶活性^[7]。它可使缩短的端粒不断修复,从而使细胞发生永生化和癌变。TR 是端粒合成重复序列的模板,构成端粒酶主要亚单位,具有介导端粒酶组装、活性调节、与其他相关蛋白结合等功能。不同来源的 TR 在二级结构上比较保守,有 P2a、P2b、P3、P4、P5、P6、P7a、P7b、P8a 和 P8b 等 10 个螺旋结构域和假结区、CR4-CR5 区、BoxH/ACA 区及 CR7 区 4 个保守区。RNA 干扰技术是一门新兴基因沉默技

术,是针对转录后阶段的基因沉默,相对于传统基因治疗在基因水平上进行敲除,整个流程设计更简便,且作用迅速,效果明显,为基因治疗开辟了新途径^[8]。

该研究构建了 3 个针对 chTR 的 shRNA 载体,经酶切鉴定表明载体构建成功。通过端粒酶活性检测法 TRAP 法检测干扰载体转染 MDCG-MSB1 细胞后的端粒酶活性,与对照组比较,在 24 h 时端粒酶活性变化不显著,在 48 h 时端粒酶活性显著降低,而 3 个干扰载体中,针对模板区设计的干扰载体 pSi-chTR-sh1 转染后抑制效果最明显。针对 chTR 的 shRNA 能有效地降解 chTR,抑制端粒酶活性,并且与 chTR 的二级结构有关。因此,干扰 RNA 可以抑制 MDCG-MSB1 细胞端粒酶活性,为应用 RNA 干扰技术治疗肿瘤提供理论依据。

参考文献

- [1] CHAN S R, BLACKBURN H. Telomeres and telomerase[J]. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci*, 2004, 359: 109-121.
- [2] CHEN J L, BLASCO M A, GRIDER C W. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA[J]. *Cell*, 2000, 100: 503-514.
- [3] WANG Q C, NE Q H, FENG Z H. RNA interference: antiviral weapon and beyond[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(8): 1657-1661.
- [4] TUSIEMAN M, KETTING R F, PLASTERK R H. The genetics of RNA silencing[J]. *Annu Rev Genet*, 2002, 36: 489-519.
- [5] SHAMMAS M A, KOLEY H, BAICHU R B. Telomerase inhibition by siRNA causes senescence and apoptosis in Barrett's adenocarcinoma cells: mechanism and therapeutic potential[J]. *Mol Cancer*, 2005, 4: 24.
- [6] KIM N W, PIATYSZEK M A, PROVSE K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer[J]. *Science*, 1994, 266: 2011-2015.
- [7] SUSAN M BAILEY, JOHN P MURPHY. Telomeres, chromosome instability and cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(8): 2408-2417.
- [8] PADDISON P J, SILVA J M, CONKLIN D S, et al. A resource for large-scale RNA interference-based screens in mammals[J]. *Nature*, 2004, 428(6981): 427-431.

(上接第 146 页)

表1 淡水鱼体内汞含量

Table 1 Mercury content in fresh water fish ng/kg

品种 Varieties	平均值 Mean value				ng/kg
白鲢鱼 Silver carp	0.218	0.220	0.213	0.225	0.219
武昌鱼 Burt-snout	0.190	0.183	0.188	0.178	0.185
鲢鱼 Catfish	0.200	0.210	0.208	0.205	0.206
黑鱼 Millet	0.163	0.160	0.165	0.163	0.163
草鱼 Grass carp	0.148	0.143	0.150	0.153	0.148
鲤鱼 Carp	0.223	0.235	0.225	0.233	0.229
胖头鱼 Fat head fish	0.225	0.233	0.228	0.233	0.230
罗非鱼 Tilapia	0.173	0.170	0.173	0.175	0.173
花鲢鱼 Spotted silver carp	0.160	0.163	0.165	0.165	0.163
鲫鱼 Crucian carp	0.188	0.190	0.190	0.178	0.187

3 结论与讨论

- (1) 10 种市售淡水鱼体内汞含量均符合国家标准。
- (2) 实验用的各种玻璃器皿必须用稀硝酸浸泡处理,以

清除汞及其他金属离子的污染。

(3) 实验中产生的汞废气必须用高锰酸钾溶液吸收,不能直接排放到空气中,以免对人造成危害。

(4) 样品处理应注意的问题。消化过程中由于硝酸用量大,消化彻底后需要加水回流 10 min 以上,使剩余二氧化氮等氮氧化物排尽,消除由于残存的氮氧化物对测定结果的严重干扰,保证实验结果的准确性。

(5) 仪器操作应注意的事项。测汞仪的光路、气路要干燥、光滑、无水汽凝集,否则会产生汞吸附,降低检测灵敏度。每次加入样品液前要将测汞仪清洗干净。

参考文献

- [1] 蓝天. 膳食接触铅、镉、汞和多氯联苯[J]. *国外医学:卫生分册*, 1993(5): 57-59.
- [2] 张宝元, 陈小宁, 葛红瑞, 等. 柬埔寨居民头发和鱼类汞含量的测定[EB/OL]. (2007-06-19) www.hdvj.gov.cn.
- [3] 曲祖乙, 刘靖. 食品分析与检验[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
- [4] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 2733-2005 鲜、冻动物性水产品卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.