

小分子 G 蛋白 Rap1 shRNA 表达载体的构建和鉴定

郑霞¹, 贺爱兰², 叶启发³, 蒋圣军^{4*}

(1. 荆州市中心医院 妇产科, 中国湖北 荆州 430043; 2. 湖南人文科技学院 生命科学系, 中国湖南 娄底 417000; 3. 中南大学 湘雅三医院 卫生部器官移植中心, 中国湖南 长沙 410013; 4. 北京市垂杨柳医院, 北京市微创医院, 中国北京 100710)

摘要: 应用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术抑制 Rap1 基因的表达, 构建 Rap1 shRNA (small hairpin RNA, shRNA) 表达载体, 观察其对小鼠肝脏细胞中 Rap1 mRNA 和蛋白表达的干扰作用. 根据小鼠 Rap1 mRNA 的全序列, 设计了 3 种 Rap1 siRNA 序列 (Rap1 siRNA1、Rap1 siRNA2、Rap1 siRNA3) 和阴性对照序列 (HK); 采用克隆技术, 将其插入带有报告基因绿色荧光 (EGFP) 的 pGenesil-3 载体, 构建 Rap1 shRNA 表达载体; 经双酶切和测序证实 Rap1 siRNA 表达载体克隆构建成功, 插入片段测序结果与合成的 siRNA 结果一致; 昆明小鼠 40 只, 体重 18~20 g, 随机分成 4 组: 组 (转染 HK 组)、组 (转染 Rap1 shRNA1 组)、组 (转染 Rap1 shRNA2 组)、组 (转染 Rap1 shRNA3 组). 于 0、16、24 h 腹腔内注射 Rap1 shRNA 2.0~2.5 mg/kg (用 PBS 稀释至 1 mL); 48 h 后收集小鼠肝脏, 用显微荧光、定量 RT-PCR、免疫组化检测小鼠肝细胞中 Rap1 shRNA 的转染率、Rap1 基因表达以及蛋白质表达水平. 组、组、组、组小鼠肝脏细胞体内转染率均大于 60%, 组、组、组的 Rap1 mRNA 表达、Rap1 蛋白表达均降低, 其中 Rap1 shRNA1 干扰效果最佳.

关键词: Rap1; siRNA; shRNA; 小鼠肝细胞

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)02-0142-04

Construction and Identification of shRNA Expression Vector Specific for Small GTPase Rap1

ZHENG Xia¹, HE Ai-lan², YE Qi-fa³, JIANG Sheng-jun^{4*}

(1. Department of Jingzhou City Central Hospital, Jingzhou 430043 Hubei, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Institute of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000 Hunan, China; 3. Research Center of Transplantation Medicine Engineering and Technology, the 3rd Affiliated Hospital of Xiangya Medical Institute, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China; 4. Peking Minimally Invasive Hospital, Beijing 100710, China)

Abstract: Rap1 shRNA expression vector was constructed to suppress the expression of Rap1 by RNA interference (RNAi) technology and study the interference role of Rap1 shRNA in the mouse liver cells. Based on the mRNA sequence of Rap1, Three target sequences (Rap1 siRNA1, Rap1 siRNA2, Rap1 siRNA3) and one corresponding negative control (HK) were designed. Rap1 siRNA and HK were synthesized and cloned into the EGFP reporter plasmid pGenesil-3. The Rap1 siRNA expression vector was successfully constructed and identified by double endonuclease digestion and sequence analysis. Forty Kunming mice weighing 18~22 g were randomly divided into 4 groups: group , HK was transfected (n=10); group , Rap1 shRNA1 was transfected (n=10); group , Rap1 shRNA2 was transfected (n=10); group , Rap1 shRNA3 was transfected (n=10). The intraperitoneal dosing of expression vectors was 2.0~2.5 mg/kg at 0, 16, 24 h. The mouse live cells were collected at 48 h after transfection. RT-PCR and immunofluorescence were used to determine the transfection rate and the mRNA and protein level of Rap1.

收稿日期: 2008-06-19; 修回日期: 2008-10-18

基金项目: 卫生部重大支持项目(43011004541)

作者简介: 郑霞 (1972-), 女, 湖北公安人, 硕士研究生, 主要从事妇科疾病的研究, E-mail: zhengxia717188@163.com; * 通讯作者: 蒋圣军 (1970-), 男, 湖北公安人, 北京市垂杨柳医院副主任医师, 博士, 主要从事肝脏外科方面的研究, E-mail: docjsj@sina.com

The transfection efficiency of group , , , was more than 60%. Rap1 mRNA and protein expression of group was obvious higher than group , , ($P < 0.05$). Rap1 mRNA and protein expression of group was significantly degrader than group , ($P < 0.05$).

Key words : Rap1 ; siRNA ; shRNA ; mouse liver cell

(*Life Science Research* 2009 ,13(2) :142~145)

Rap1 属于小分子 G 蛋白 Ras 超家族成员之一,具有逆转原癌基因 Ras 激活突变体(K-ras)引起的细胞形态改变的功能和传递致癌信号两种相反的作用. Rap1 和其他 G 蛋白一样,表现为无活性的 GDP 结合形式和有活性的 GTP 结合形式两种构象. 通过两种构象之间的转换,起到分子开关的作用,调节细胞对外界刺激作出相应的反应. RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 是指双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 分子诱导细胞内与其序列同源的基因 mRNA 降解而引起的基因转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 的现象^[1,2]. RNA 干扰的特点是能高效特异性抑制基因的表达. RNAi 干扰效率受到许多因素的影响,如:启动子的选择、siRNA 化学修饰、siRNA 序列中 G/C 含量的选择^[3]等,但靶位点的选择是最重要的因素. 本实验的目的在于通过腹腔内注射,体内转染 Rap1 shRNA 质粒,观察最佳靶位点.

1 材料与方 法

1.1 材 料

昆明小鼠购自湖南农业大学动物中心, pGenesil-3 质粒、感受态大肠杆菌 DH5(alfa)购自武汉晶赛生物工程技术公司,限制性核酸内切酶 *Bam*H 、 *Hind* 、 *Sal* 、T4 多聚核苷酸激酶

- 1) Rap1 shRNA1 5'-GATCCG AAGATTCTACAGAAAGC TTCAAGACGGCTTTCTGTAGGAATCTTC TTTTTGTGCGAC A-3'
 2) Rap1 shRNA2 5'-GATCCG GGACAGAGCAATTTACAG TTCAAGACGCTGTAAATTGCTCTGTCCC TTTTTGTGCGAC A-3'
 3) Rap1 shRNA3 5'-GATCCG CTCAGTCTACGTTTAATG TTCAAGACGCATTAACGTAGACTGAGC TTTTTGTGCGAC A-3'
 4) HK 5'-GATCCG ACTTCATAAGGCGCATGC TTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTC TTTTTGTGCGAC A-3'

1.2.3 细胞转染

昆明小鼠 40 只,体重 18~22 g (湖南农业大学实验动物中心提供). 随机分成 4 组:1) 空白对照组:转染液中无 siRNA,其余同各实验组;2) Rap1 shRNA RNA 位点 1 组;3) Rap1 shRNA 位点 2 组;4) Rap1 shRNA 位点 3 组. 在 0、16、24 h 分别采用腹腔注射 Rap1 shRNA 2.0~2.5 mg/kg (用 PBS 稀释至 1 mL),注射速率为 0.5

和 Taq 酶购自上海生物工程有限公司,T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs,凝胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒购自宁波中鼎公司,寡核苷酸 DNA 单链和 RaP-1 引物由上海生工合成. Rap-1 Gap、actin 羊抗人多克隆一抗和辣根酶标记兔抗山羊 IgG 购自武汉公司.

1.2 方 法

1.2.1 Rap1 shRNA 的设计

采用生物信息学的方法设计 Rap1 shRNA 靶位点. 首先从 GenBank 获得小鼠 Rap1 mRNA 的全序列,经扫描 Rap1 mRNA 的全序列记录 AA 及下游 19 个核苷酸,并与基因组数据库比较,去除与其他基因有高度同源性的序列,且所选片段的 GC 含量控制在 30%~65%之间. 设计了 3 个作用位点以及一个阴性对照序列:

1.2.2 构建 Rap1 shRNA 表达载体

合成上述设计的双链 DNA,退火连接. 与 *Bam*H 和 *Hind* 酶切的质粒 pGenesil-3 连接,转化感受态细胞. 挑选克隆扩增,质粒提取,限制性核酸内切酶 *sal* 作酶切鉴定,对重组质粒测序(上海博亚),验证序列的准确性. 在插入的目的片段里. 我们设计了一个 *Sal* 的酶切位点,若插入正确,就能被 *Sal* 酶切出一条约 400 bp 的条带. 重组 shRNA 表达质粒均能被 *Sal* 酶切.

mL/s. 实验后 48 h 处死小鼠,断头取肝,80 °C 低温保存,进行以下指标的测定.

1.2.4 RT-PCR 法检测 mRNA 表达水平

取 50 mg 的小鼠肝脏组织加入 1 mL Trizol ,制成匀浆,按 Trizol 试剂盒(美国 GIBCO 公司产品)说明,一步法提取各组细胞总 RNA 以及逆转录,产物立即进行扩增,Rap1 和 β -actin 均采用如下扩增条件和程序:总扩增体积 20 μ L,其中

含反转录 cDNA 1.0 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.0 μ L, 200 μ mol/L dNTP, 0.2 μ mol/L 引物, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.5 U Taq 酶; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min. 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 拍照. 引物由上海生工合成, 引物序列为: 上游 5'-TGCTGAAATCCTGGACACC-3' 和下游 5'-TGCCAACTACCCGCTCATCT-3', 扩增产物长度 228 bp; 内参照 β -肌动蛋白(β -actin)的引物序列为: 上游 5'-GCGCGGCTACAGCTTCA-3' 和下游 5'-CTTAATGTCACGCACGATTTCC-3', 扩增产物长度为 68 bp.

1.2.5 免疫荧光法检测蛋白表达水平

用免疫组织化学(SP)的方法检测肝组织石蜡切片中 Rap1 的表达, 操作按说明书进行(Rap1 单克隆抗体均购自武汉博士德公司).

1.2.6 统计学处理

所有数据均用均数 \pm 标准差表示. 用 SPSS 12.0 进行统计处理, 统计学采用 *t* 检验或方差分析, 以 $P < 0.05$ 判定差异的显著性.

2 结果与分析

2.1 酶切鉴定

重组质粒 Pgenesil-3 的多克隆位点(MCS)为: *Hind* -ShRNA-*Bam*H -U6 Promotor-*Eco*R -*Sal* -*Xba* -*Dra*. 在插入的目的基因片段里, 我们分别设计了一个 *Sal* 的酶切位点, 插入在质粒 Pgenesil-3 的 *Bam*H 和 *Hind* 之间, 如若插入正确, 质粒就能被 *Sal* 酶切出一条约 400 bp 的 DNA 小带. 经酶切鉴定分析, 质粒 HK、Rap1 shRNA1、Rap1 shRNA2 和 Rap1 shRNA3 均符合设计要求(图 1).

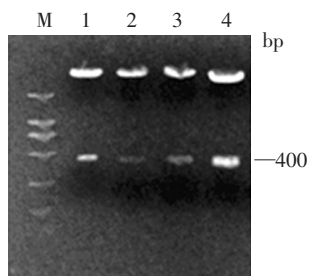


图 1 重组载体 Pgenesil-3 酶切后的琼脂糖电泳图
M: DNA 分子标准带; 1: 质粒 HK; 2: 质粒 Rap1 shRNA1; 3: 质粒 Rap1 shRNA2; 4: 质粒 Rap1 shRNA3.

Fig.1 The Agarose gel electrophoretic of the digested recombinant vector Pgenesil-3

Lane M: Molecular marker; Lane 1: plasmid HK; 2: plasmid Rap1 shRNA1; 3: plasmid Rap1 shRNA2; 4: plasmid Rap1 shRNA3.

2.2 重组质粒 Rap1 shRNA 的测序

送转化菌液 Rap1 shRNA1、Rap1 shRNA2、Rap1 shRNA3, HK 去测序, 测序结果表明插入片段与合成的 siRNA 的序列一致, 完全符合设计要求, Rap1 siRNA 表达载体克隆构建成功.

2.3 Rap1 shRNA 质粒转染效果鉴定

将 Rap1shRNA 质粒转染到小鼠体内 48 h 后, 取肝组织切片荧光显微镜下观察, 可见细胞发绿色的荧光, 表示 shRNA 已经成功地转染入细胞, 细胞的转染率都达到 60% 以上(图 2).

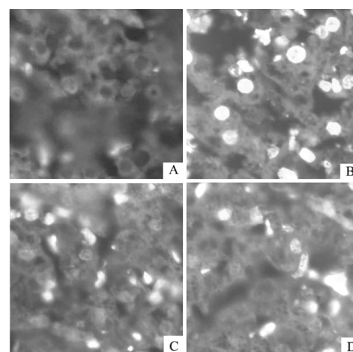


图 2 肝组织切片荧光显微镜图

(A) 转染质粒 HK; (B) 转染质粒 Rap1 shRNA1; (C) 转染质粒 Rap1 shRNA2; (D) 转染质粒 Rap1 shRNA3.

Fig.2 The fluorescence microscopy in hepatic tissue sections

(A) Transfected with plasmid HK; (B) Transfected with plasmid Rap1 shRNA1; (C) Transfected with plasmid Rap1 shRNA2; (D) Transfected with plasmid Rap1 shRNA3.

2.4 Rap1 shRNA 对肝组织中 Rap1 mRNA 的表达的影响

Rap1 和 β -actin 的 PCR 扩增产物分别为 228、68 bp, 凝胶成像系统扫描图像并计算相对灰度. 与 HK 组对比, 结果可见 3 组 Rap1 shRNA 肝脏组织中 Rap1 mRNA 的表达明显降低(与 HK 组比较, $P < 0.05$), 其中 Rap1 shRNA 位点 1 的降低程度最大, 并且具有显著的差异(与位点 2、3 比较, $P < 0.05$).

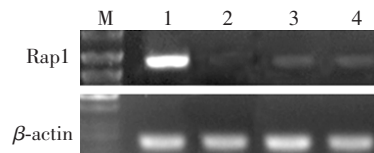


图 3 用半定量 RT-PCR 检测肝组织中 Rap1 mRNA 的表达

M: Marker; 1: 转染质粒 HK; 2: 转染质粒 Rap1 shRNA1; 3: 转染质粒 Rap1 shRNA2; 4: 转染质粒 Rap1 shRNA3.

Fig.3 Semi-quantitative RT-PCR method was used to detect the changes of Rap1 mRNA in hepatic tissue

M: Marker; 1: transfected with plasmid HK; 2: transfected with plasmid Rap1 shRNA1; 3: transfected with plasmid Rap1 shRNA2; 4: transfected with plasmid Rap1 shRNA3.

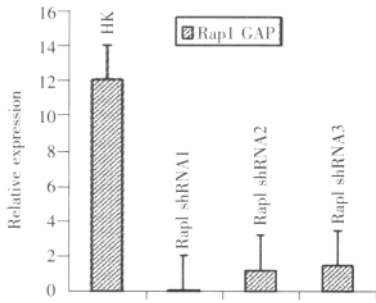


图 4 肝组织中 Rap1 mRNA 的相对表达量
Fig.4 The relative expression of Rap1 mRNA in hepatic tissue

2.5 shRNA 对 Rap1 蛋白表达的抑制情况

S-P 法检测体内转染 Rap1 shRNA 肝脏组织石蜡切片中 shRNA 蛋白表达的情况 (图 5)。Rap1 shRNA 组细胞阳性率与空白对照组比较明显降低,并且位点 2 和位点 3 的 siRNA 降低了 Rap1 蛋白的表达(图 5 B、C),但抑制作用弱于位点 1 (图 D),说明位点 1 的 siRNA 对 Rap1 基因的抑制作用强于其余两个位点。

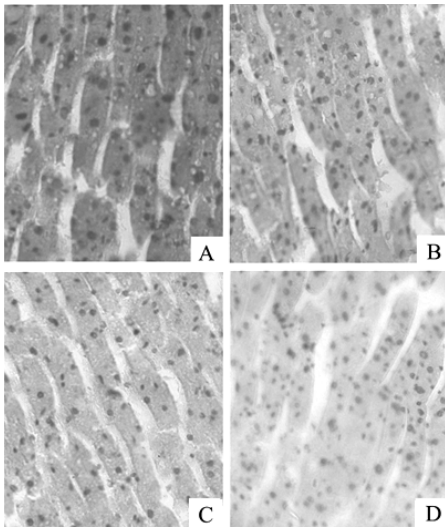


图 5 用免疫组织化学检测肝组织中 Rap1 蛋白的表达
(A) 转染质粒 HK; (B) 转染质粒 Rap1 shRNA3; (C) 转染质粒 Rap1 shRNA2; (D) 转染质粒 Rap1 shRNA1.

Fig.5 Immunohistochemistry to detect Rap1 protein in hepatic tissue sections

(A) Transfected with plasmid HK; (B) Transfected with plasmid Rap1 shRNA1; (C) Transfected with plasmid Rap1 shRNA2; (D) Transfected with plasmid Rap1 shRNA3.

3 讨论

Rap1 是一类小分子 G 蛋白,根据组成不同, Rap 被分成 Rap1 和 Rap2. Rap1 又分为两种亚型: Rap1A 和 Rap1B. 二者之间具有 90% 的同源性,常将二者通称为 Rap1. Rap1 和 Rap2 有

70% 的同源性,但二者功能有明显差异. Rap1 主要通过 3 种不同的效应子介导 3 项细胞生理活动: 1) 通过 B-raf 影响 MAPK 途径, B-Raf 仅存在于神经细胞和造血细胞中^[3]. 有 B-raf 表达的情况下, cAMP 激活 MAPK 途径, 而无 B-raf 表达的情况下, cAMP 抑制 MAPK 途径; 2) 通过 AF-6 (afa-6) 与 Rap1 结合后, 控制整合素介导的细胞粘附^[4,5]; 3) Rap1 通过与 Ras 的效应子 Raf-1 结合, 阻断信号通过 Ras 继续向下传导, 从而阻断了 Ras 的致癌作用. siRNA 是继基因敲除, 反义寡核苷酸之后的又一种基因干扰手段, 由于 RNAi 可以高效、高特异性、易操作地沉默特定基因, 容易使其产生功能丧失或降低突变, 它又是功能基因组学的一种强有力的研究工具. 已经成为医学研究的热点问题. 目前尚未见到有关应用 RNA 干扰技术抑制肝细胞 Rap1 基因表达的研究报道, 本实验在 Rap1A mRNA 序列中根据 siRNA 设计要求, 设计了三段针对编码 Rap1 不同序列的 shRNA 片段, 构建质粒, 设阴性对照质粒 HK, 使用阳离子脂质体转染肝细胞, 观察其对 Rap1 表达的影响. 结果表明, 质粒转染率在 60% 左右. 转染后 48 h, Rap1 shRNA1 质粒在 mRNA 水平和蛋白质水平对肝细胞中 Rap1 的表达抑制效率最高达到 99.9%. 说明位点 1 是最佳干扰靶点. 利用 shRNA 建立起来的 RNA 干扰肝细胞中 Rap1 表达的方法具有较强的可操作性, 从而为下一步研究重组质粒 pGenesil-3 沉默 Rap1 基因在肝再生动物模型中的作用, 为揭示有关肝再生发生、发展中的作用提供了实验基础, 为肝再生治疗的临床应用开辟了新的思路.

参考文献 (References):

- [1] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391: 806.
- [2] TUSCHL T, ZAMORE P D, LEHMANN R, *et al.* Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro* *Genes Dev*[J]. 1999, 13: 31-91.
- [3] REYNOLDS A, LEAKE D, BOESE Q, *et al.* Rational siRNA design for RNA interference[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3): 326-330.
- [4] STORK P J. Does Rap1 deserve a bad Rap? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28 (5): 267-275.
- [5] BOUSSIOTIS V A, FREEMAN G J, BEREZOVSKAYA A, *et al.* Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1[J]. *Science*, 1997, 278 (5335): 124-128.