

人 TGF- β_2 特异性 siRNA 质粒的构建

乔芳,傅培,张芳婷,李明华,李金璞,伍友春

基金项目:中国深圳市科技计划资助项目(No. 2009036)
作者单位:(518036) 中国广东省深圳市,北京大学深圳医院眼科
作者简介:乔芳,女,副主任医师,研究方向:小儿眼科。
通讯作者:张芳婷,主任医师,研究方向:干细胞可塑性及肿瘤发生机制. fangtingzhang@126.com
收稿日期:2011-06-15 **修回日期:**2011-09-27

Construction of TGF- β_2 -targeting siRNA interference recombinant plasmids

Fang Qiao, Pei Fu, Fang-Ting Zhang, Ming-Hua Li, Jin-Ying Li, You-Chun Wu

Foundation item: Shenzhen Municipal Science and Technology Program, China (No. 2009036)

Department of Ophthalmology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China

Correspondence to: Fang-Ting Zhang, Department of Ophthalmology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China. fangtingzhang@126.com

Received: 2011-06-15 Accepted: 2011-09-27

Abstract

• **AIM:** To construct specific siRNA expression vector targeting human TGF- β_2 .

• **METHODS:** The mRNA sequences of human TGF- β_2 in NCBI were analysed in silico. The best sequence of siRNA were designed according to the siRNA designing principle. The double-stranded DNA was inserted into the GPU6/GFP/Neo vector by the BamH I and Bbs I. The recombinant plasmid was identified by the BamH I and Pst I single enzyme digestion and verified by DNA sequencing further.

• **RESULTS:** The positions of 1016-1034 in TGF- β_2 mRNA were chosen as the RNAi target. The result of the enzyme digestion to the recombinant plasmid showed that the double-stranded DNA was successfully inserted into the GPU6/GFP/Neo vector. The inserted sequence was the same as the designed sequences and was proved by the DNA sequencing.

• **CONCLUSION:** The human TGF- β_2 specified siRNA interference plasmid was successfully constructed, and this plasmid can be used for the study of the function of TGF- β_2 gene and improve the success rate of glaucoma filtration surgery by gene therapy.

• **KEYWORDS:** TGF- β_2 ; siRNA vector; plasmid construction

Qiao F, Fu P, Zhang FT, et al. Construction of TGF- β_2 -targeting siRNA interference recombinant plasmids. *Guji Yanke Zazhi(Int J Ophthalmol)* 2011;11(11):1890-1892

摘要

目的:构建人 TGF- β_2 特异性 siRNA 质粒。

方法:从 NCBI 中查找人 TGF- β_2 的 mRNA 序列,并利用生物信息学对序列进行分析;根据 siRNA 的设计原则,选择最佳的 siRNA 序列;利用限制性内切酶 BamH I 和 Bbs I 将相应的双链 DNA 插入到 GPU6/GFP/Neo 载体中;重组质粒经限制性内切酶 BamH I 和 Pst I 单酶切进行鉴定,鉴定正确的质粒进一步通过基因测序的方法进行验证。

结果:根据生物信息学选择 TGF- β_2 mRNA 的 1016 ~ 1034 区域作为干扰位点;重组质粒酶切结果表明双链 DNA 序列成功插入到了 GPU6/GFP/Neo 载体中;测序分析结果进一步证明插入序列与设计完全一致。

结论:成功构建了人 TGF- β_2 特异性 siRNA 干扰质粒,为研究 TGF- β_2 基因功能和利用基因治疗的方法提高青光眼滤过手术成功率奠定了实验基础。

关键词:转化生长因子- β_2 ; siRNA 载体;质粒构建

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.11.006

乔芳,傅培,张芳婷,等.人 TGF- β_2 特异性 siRNA 质粒的构建. 国际眼科杂志 2011;11(11):1890-1892

0 引言

滤过泡的瘢痕化是青光眼滤过手术失败的主要原因,而瘢痕化是由成纤维细胞的异常增殖造成的,研究表明转化生长因子- β_2 (transforming growth factor-beta 2, TGF- β_2) 在这一过程中起关键作用^[1]。目前,临床上通常采用药物处理的方法来抑制成纤维细胞的增殖^[2,3],但是所使用的药物,如:5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC)、环孢霉素 A (cyclosporin A, CsA) 均是非特异性药物,可能带来严重的副作用;因此寻找一种特异性阻断瘢痕化形成的方法是当前的一个研究热点。RNAi 是近年来发展起来的一套研究手段,由于其可以特异性地抑制某个基因的表达,已被广泛应用于探索基因功能和传染性疾疾病及恶性肿瘤的基因治疗中^[4]。本实验拟设计和构建一个用于干扰人 TGF- β_2 表达的 siRNA 质粒,为研究 TGF- β_2 基因功能和利用基因治疗的方法提高青光眼滤过手术成功率奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 PCR 仪、水平电泳系统和凝胶成像系统 (Bio-Rad); DNA 序列合成 (南京金斯瑞); GPU6/GFP/Neo 载体 (吉玛公司); 质粒提取和 DNA 纯化试剂盒 (Promega); T4 连接酶和限制性内切酶 (大连宝生物公司); DNA Marker (Fermentas); DNA 测序 (上海英骏生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 靶点选择及合成 从 NCBI 中查到人 TGF- β_2 的 mRNA 序列,利用 Ambion 和 InvitroGene 公司的在线 siRNA 设计工具对 TGF- β_2 基因序列进行分析,并使用 BLAST 软件对其同源性进行检测,从中选择一条最佳的 siRNA 序列。

1.2.2 载体构建 将合成好的 DNA oligo 分别用 TE (pH = 8.0) 溶解,浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$;取相应的正义链和反义链 oligo 溶液,按照如下配比配置退火反应体系:10 \times shDNA 退火缓冲液 5 μL ,正义链 5 μL ,反义链 5 μL ,ddH₂O 35 μL ;在 PCR 仪上按照如下程序进行退火处理:95 $^{\circ}\text{C}$,5 min;85 $^{\circ}\text{C}$,5 min;75 $^{\circ}\text{C}$,5 min;70 $^{\circ}\text{C}$,5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按限制性内切酶 BamH I 和 Bbs I 操作说明对 GPU6/GFP/Neo 载体进行双酶切;酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测并利用 DNA 胶回收试剂盒对酶切后的质粒进行回收;回收产物经琼脂糖电泳和紫外分光光度计检测纯度和浓度。按照 T4 DNA 连接酶操作说明将 DNA 片段与载体混合,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜;将连接产物加入到 50 μL 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,轻轻混匀,冰上放置 30 min;42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 90 s;冰上放置 2 min;加入 900 μL 新鲜 LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 培养 1 h;4000 r/min 离心 5 min;吸弃 900 μL 上清,用剩余液体重悬菌体,均匀涂布于 LB^{kan} 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。

1.2.3 质粒鉴定 分别挑取 5 个单克隆至 3 mL 液体 LB^{kan} 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 培养过夜;取 2 mL 菌液按照质粒小提试剂盒操作说明提取重组质粒;重组质粒进一步利用限制性内切酶 BamH I 和 Pst I 酶切后经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定;选取酶切鉴定阳性的质粒送上海英骏生物技术有限公司进行测序分析。

2 结果

2.1 靶点选择 从 NCBI 中查到人 TGF- β_2 的 mRNA 序列 (NM_001135599);根据软件分析结果,并按照 siRNA 的设计原则,以及考虑到所设计的寡核苷酸链在 TGF- β_2 mRNA 序列中分布等因素,最终选定对应序列为 TGF- β_2 mRNA 的 1016 ~ 1034 区域 (GAAAT GTGCAGGATAATTG),正义链与反义链间由 9 核苷酸序列的间隔 (TTCAAGAGA) 和多聚 (T) 的延伸,作为 RNA 的终止密码子。在正义链的 5' 端添加 CACC,与 Bbs I 酶切后形成的黏性末端互补;在反义链的 5' 端添加 GATC,与 BamH I 酶切后形成的黏性末端互补。正义链:5'-CACCGAAATGTGCAGGATAATTGTTCAAGAGACAATTATCCTGCACATTTCTTTTTT-3';反义链:5'-GATCCAAAAAAGAAATGTGCAGGATAATTGTCTCTTGAACAATTATCCTGCACATTTT-3'。

2.2 质粒鉴定 经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示所挑取的 5 个质粒均不可以被 Pst I 切开,均可以被 BamH I 切开,均为阳性质粒 (图 1)。选取 3 号质粒送测序公司进行测序分析 (图 2),结果表明插入序列与设计完全一致。将 3 号菌株扩大培养至对数生长期,离心后弃上清,以含有 250 mL/L 甘油的液体 LB 重悬菌体,分装到 1.5 mL EP 管中,至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

3 讨论

创伤修复过程主要包括炎症反应、成纤维细胞等增殖和细胞外基质合成等阶段。这一过程复杂且受多种因素调控,一旦出现异常,就会导致瘢痕的形成,而瘢痕形成是导致青光眼滤过手术失败的主要原因^[1]。目前的研究证实,TGF- β 在创伤修复过程中起着重要作用^[5]。

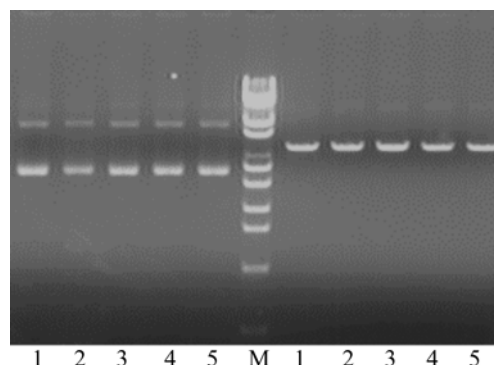


图 1 质粒酶切结果 M: lamda/Eco130I;左侧 1 ~ 5: 重组质粒 Pst I 酶切结果;右侧 1 ~ 5: 重组质粒 BamH I 酶切结果。

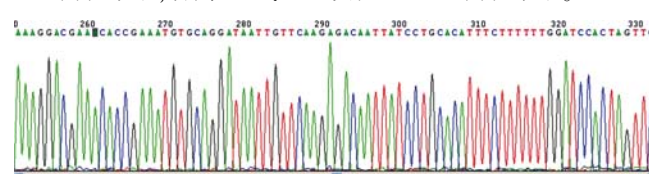


图 2 质粒测序结果。

TGF- β 是一组具有多种生物学功能的蛋白家族,广泛参与细胞分裂、增殖、分化和迁移过程^[6-8]。目前在哺乳动物中已经证实的 TGF- β 有三种亚型, β_1 , β_2 和 β_3 ^[9-11]。在损伤的组织中,作为组织纤维化的主要调控者 TGF- β_2 大量存在于上皮细胞中^[12]。

近年来的研究表明,TGF- β_2 不仅对人 Tenon 囊成纤维细胞的增生和移行以及成纤维细胞介导的胶原收缩具有促进作用^[13],而且还可使结膜炎性细胞获得高峰前移及胶原沉淀,促进瘢痕的形成^[1];Esson 等^[14]的进一步研究发现滤过术后 TGF- β_2 高表达,并且外源的 TGF- β_2 可以促进瘢痕的形成。因此,如何阻断 TGF- β_2 表达以达到有效抑制滤过泡瘢痕的形成,提高手术的成功率^[15] 是目前研究的热点。RNAi 是近年来发展起来的一套研究手段,已被广泛应用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗中。这一技术可以非常特异地降解与之序列相应的单个内源基因的 mRNA,并且相对少量的 dsRNA 就可以使相应的基因表达受抑制。因此我们拟利用针对 TGF- β_2 的 siRNA 来阻断 TGF- β_2 表达,以期达到有效抑制滤过泡瘢痕的形成,提高手术的成功率的目的。目前 siRNA 的获得主要有两种手段:(1) 在体外直接制备 siRNA,并通过专门的 RNA 转染试剂将其转到细胞内;(2) 采用表达载体和基于 PCR 的表达框架从转染到细胞的体内转录得到 siRNAs。后一种方法与前一种方法相比的优点在于不用直接操作 RNA,并且更具有经济性和长期稳定性。通过这两种方法的比较,我们选择利用表达载体的方法制备 siRNA。

本研究从 NCBI 数据库得到人 TGF- β_2 的 mRNA 序列,并利用生物信息学对序列进行分析;综合考虑各项因素后,选择 TGF- β_2 mRNA 的 1016 ~ 1034 区域 (GAAATGTGCAG GATAATTG) 作为干扰作用位点。对比各商业化的载体后,我们选择了上海吉玛公司的 GPU6/GFP/Neo 载体,该载体的 Bbs I 位点可以有效保证插入方向的正确性,Neomycin 耐受基因可以用于转染后的筛选,报告基因 GFP 可以帮助评价转染效率和指示 RNAi 发生位点,这些优点

可以为后续研究带来很大的便利。利用限制性内切酶 BamH I 和 Bbs I 将相应的双链 DNA 插入到 GPU6/GFP/Neo 载体中;所构建的干扰质粒经限制性内切酶 BamH I 和 Pst I 单酶切和测序的双重鉴定确保了质粒的正确性。该质粒的成功构建为下一步利用 RNAi 技术来阻断 TGF- β_2 表达奠定了方法学基础;另外,该质粒的获得为进一步研究人 TGF- β_2 的功能,以及利用基因治疗的方法提高青光眼手术成功率奠定了实验基础。

参考文献

- 1 Cordeiro MF, Reichel MB, Gay JA, *et al.* TGF- β_1 , - β_2 , and - β_3 *in vivo*: Effect on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(9):1975-1982
- 2 张欣,梁春玲,徐彦,等.非穿透性小梁手术中应用丝裂霉素 C32 例.国际眼科杂志 2005;5(1):107-111
- 3 张德秀,史传衣,刘思伟.小梁切除联合丝裂霉素术后晚期滤泡相关并发症的临床分析.国际眼科杂志 2005;5(6):1186-1189
- 4 Ameyar-Zazoua M, Guasconi V, Ait-Si-Ali S. siRNA as a route to new cancer therapies. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5(2):221-224
- 5 袁伟,李鑫,王昭领.创伤修复与转化生长因子 β 的相关性研究进展.实用医药杂志 2009;26(3):69-70
- 6 Massague J, Cheifetz S, Laiho M, *et al.* Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* 1992;12:81-103
- 7 Saarna M. GDNF-a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem* 2000;267(24):6968-6971
- 8 Anumanthan G, Halder SK, Osada H, *et al.* Restoration of TGF-beta signalling reduces tumorigenicity in human lung cancer cells. *Br J Cancer* 2005;93(10):1157-1167
- 9 Cordeiro MF. Beyond Mitomycin: TGF-beta and wound healing. *Prog Retin Eye Res* 2002;21(1):75-89
- 10 Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM, *et al.* Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 1990;265(2):1089-1093
- 11 Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, *et al.* Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 1990;265(33):20533-20538
- 12 Huh MI, Chang Y, Jung JC. Temporal and spatial distribution of TGF-beta isoforms and signaling intermediates in corneal regenerative wound repair. *Histol Histopathol* 2009;24(11):1405-1416
- 13 Cordeiro MF, Bhattacharya SS, Schultz GS, *et al.* TGF-beta1, -beta2, and -beta3 *in vitro*: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):756-763
- 14 Esson DW, Neelakantan A, Iyer SA, *et al.* Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):485-491
- 15 Cordeiro MF, Mead A, Ali RR, *et al.* Novel antisense oligonucleotides targeting TGF-beta inhibit *in vivo* scarring and improve surgical outcome. *Gene Ther* 2003;10(1):59-71