

[文章编号] 1000- 4718(2005)06- 1117- 07

线粒体细胞色素 C 氧化酶 RNAi 慢病毒载体的构建*

陈 艳¹, 邵建永^{1△}, 吴秋良¹, 江高峰², 夏云飞², 陈忠平²(中山大学肿瘤防治中心 ¹病理科, ²实验研究部, 广东 广州 510060)

[摘要] 目的: 通过构建携带细胞色素 C 氧化酶基因的 RNAi 慢病毒载体, 获得可供转染的滴度, 为下一步研究该基因缺陷在真核细胞中的影响提供物质基础。方法: 根据线粒体细胞色素 C 氧化酶设计的两条互补的单链寡核苷酸退火后形成双链, 插入到 pENTR/U6 质粒缺口末端, 连接在质粒上生成含 RNAi 盒的 pENTR/U6 载体; 通过重组作用将 pENTR/U6 载体的 RNAi 盒重组到 pLenti6/ BLOCK- i^T- Dest 载体上, 构建含 U6 启动子、靶序列和 Pol III 终止子表达框的 MTCOX- I shRNA 表达重组体; 经脂质体导入 293FT 细胞, 包装成慢病毒, 收集病毒上清并检测其滴度。Western blotting 检测干扰后细胞内线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基的表达。结果: 将目的序列成功连接到载体上, 并经测序分析证实载体构建成功; 成功包装成高滴度的慢病毒。Western blotting 检测结果证实构建的 MTCOX- I shRNA 表达重组体可显著抑制线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基的表达。结论: 成功构建了携带细胞色素 C 氧化酶基因的 RNAi 慢病毒载体。

[关键词] 基因; 线粒体; 重组; 慢病毒属; 载体; 细胞色素 C 氧化酶

[中图分类号] R730.54; Q785

[文献标识码] A

The construction of lentivirus- mediated RNAi vector containing cytochrome C oxidase

CHEN Yan¹, SHAO Jian- yong¹, WU Qiu- liang¹, JIANG Gao- feng², XIA Yun- fei², CHEN Zhong- ping²¹Department of Pathology, ²Department of Research, Cancer Center, Sun Yat- sen University, Guangzhou 510060, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To construct a recombinant lentivirus RNAi vector carrying cytochrome C oxidase gene to obtain the titer of the lentiviral stock for investigation of the expression in the eukaryotic cell and the affection of the COX gene silencing in the eukaryotic cells. **METHODS:** According to the DNA of the cytochrome C oxidase gene, we designed and synthesized complementary single- strand DNA oligos, annealed the single- stranded oligos to generate a ds oligo, cloned the ds oligo into pENTR/U6 to obtain an entry clone; An LR recombination reaction was performed between the pENTR/U6 entry construct and pLenti6/ BLOCK- i^T- Dest to generate expression construct, the 293FT cell line was cotransfected with pLenti6/ BLOCK- i^T expression construct, and the viral packaging mix, viral supernatant was harvested to determine the titer. **RESULTS:** The DNA sequence of interest clone to the vector was constructed to generate an entry clone and an expression clone successfully, which were proved by sequence determination. A vector producing cell line 293FT was established, and the titer for transfection was obtained. Western blotting analysis demonstrated that COX shRNA expression construction could suppress the expression of MTCOX- I. **CONCLUSION:** A lentivirus RNAi vector containing cytochrome C oxidase gene was successfully constructed.

[KEY WORDS] Genes; Mitochondria; Recombinant; Lentivirus; Vectors; Cytochrome- C oxidase

细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome c oxidase, COX) 即呼吸链复合物 IV, 是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物, 催化以细胞色素 C (cytochrome c, Cyt- c) 和氧为底物的氧化还原反应, 同时驱动 ATP 的合成,

是线粒体氧化能力的关键调节部位, 也是线粒体能量代谢的关键酶之一^[1]。其一旦受损, 线粒体功能降低, 导致 ATP 合成减少, 并且还有可能导致线粒体呼吸链电子单价泄漏增强而产生更多的活性氧产物

[收稿日期] 2005- 02- 28 [修回日期] 2005- 05- 11

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30371593); 广东省科技计划项目 (No. 2003A3080202); 广州市科技计划项目 (No. 200323- E0341)

△ 通讯作者 Tel: 86- 020- 87343391; E- mail: jyshao@gzsums.edu.cn

(reactive oxygen species, ROS), 介导程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 或细胞凋亡 (apoptosis) 中信号转导通路的活化, 严重者将导致细胞死亡。细胞色素 C 氧化酶是细胞核基因组与线粒体基因组分别编码的亚基共同组成的复杂的复合物, 研究两基因组间的表达和调控机制方面一直处于探索阶段。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象^[2-6] 是指, 当与内源性 mRNA 编码区某段序列同源的双链 RNA (dsRNA) 导入细胞后, 该 mRNA 发生特异性的降解, 而导致该基因表达的沉默。从理论上讲, 只要知道某种基因的 DNA 序列, 就可以设计出序列特异性的双链 RNA 分子, 作为这种基因的特异性抑制物而影响此基因的表达。本研究针对 MTCOX- I 基因, 选择了一段靶序列连接到 pENTR/U6 质粒中, 通过构建 MTCOX- I shRNA 表达重组体, 初步研究了将 COX 基因重组至慢病毒载体中, 通过构建携带 COX 基因的重组慢病毒载体, 为进一步在体内外研究 COX 基因的功能奠定基础。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 质粒和菌株 含 U6 启动子和 Pol III 终止子的

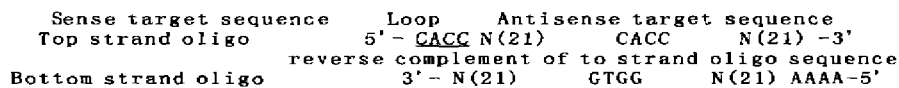


Fig 1 shRNA design sketch map.

图 1 shRNA 设计示意图

2.2 pENTR/U6 载体的构建 (图 2) ①采用化学合成法合成两条单链 DNA 寡核苷酸, 取等量的 DNA 合成片段在退火缓冲液中 95 °C 孵育 4 min, 让反应混合物冷却至室温, 在这段时间内单链寡核苷酸退火, 生成双链 DNA; 所获得的靶序列双链 DNA 在 4% 琼脂糖凝胶上电泳, 检查退火产物的生成。将退火所得双链 DNA 与 pENTR/U6 质粒连接, 线性化的 pENTR/U6 质粒每条链 5' 末端均有 4 个核苷酸的突出序列, 粘性末端方便双链核苷酸的定位插入, 编码 shRNA 的双链核苷酸连接到 pENTR/U6 质粒上, 生成含 RNAi 盒 (人 U6 启动子+ 双链核苷酸+ Pol III 终止子) 的 pENTR/U6 载体。连接产物转化宿主菌 ONE SHOT TOP10 *E. coli*, 并在含卡那霉素的 LB 细菌培养板进行重组克隆筛选, pENTR/U6 载体上所携带的抗性基因可使转化的宿主菌在含卡那霉素的 LB 培养板上生长; 挑选单克隆抗性菌落接种到含卡那霉素

转录载体 pENTR/U6 和 pLenti6/ BLOCK- iT- Dest 载体, 大肠杆菌 ONE SHOT TOP10 *E. coli* 和 ONE SHOT Stb13 Competent *E. coli* 均购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 细胞及试剂 鼻咽癌细胞系 CNE2 细胞及 5-8F 由中山大学肿瘤研究所提供。人胚肾上皮细胞 293FT 由美国 Invotrohgen 公司提供。质粒小量快速抽提试剂盒购于北京天为时代。S. N. A. P. Midi Prep Kit 质粒抽提试剂盒 LR 克隆酶混合物、病毒包装混合物、lipofectamin 2000 为美国 Invitrogen 公司产品。DMEM Opti- MEMI 为 Gibco 公司产品。胎牛血清为杭州四季青公司产品, 设计的单链 DNA 由上海博亚有限公司合成。

2 方法

2.1 根据 GenBank 中报道的线粒体细胞色素氧化酶 I 亚基 (MTCOX- I) 的核苷酸序列 (NM173704), 参考小干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 的设计策略^[7,8], 寻找复合特征的靶序列, 合成针对其编码区 (641- 661) 碱基序列的 DNA 寡核苷酸链如下 (图 1): 正义链 5' - CACCGCAACCTCAACACCACCTTCT AACGAGAAGGTGGTGTGAGGTTGC - 3'; 反义链 5' - AAAAGCAACCTCAACACCACCTTCT CGTTAGAAGGTGGTGTGAGGTTGC- 3'。

的 LB 液体培养基中, 37 °C 摇床, 220 r/min, 水平摇晃过夜; 10- 12 h 后收集菌液, 按照试剂盒说明书, 用质粒小量快速抽提试剂盒抽提 pENTR/U6 质粒 DNA。②pENTR/U6 载体的鉴定: 对获得的 pENTR/U6 载体进行 DNA 序列测定, 以证实插入的双链 DNA 序列正确。测序用上下游引物分别为 M13 forward 和 M13 reverse 引物。

2.3 MTCOX- I shRNA 表达重组体的构建 (图 3)

(1) 通过重组作用将 pENTR/U6 载体的 RNAi 盒连接到 pLenti6/ BLOCK- iT- Dest 载体上, 生成 MTCOX- I shRNA 表达重组体。pLenti6/ BLOCK- iT- Dest 载体不含有真核细胞启动子, 控制目的 shRNA 表达的启动子位于 pENTR/U6 载体的 RNAi 盒内^[9], 通过连接反应从 pENTR/U 载体转到 pLenti6/ BLOCK- iT- Dest 载体上, U6 RNAi 盒转入无启动子的 pLenti6/ BLOCK- iT- Dest 载体内, 生成表达框。构建的重组体转化

宿主菌 ONE SHOT Stb13 *E. coli*, 接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基上, pLenti6/ BLOCK- iT- Dest 载体上所携带的抗性基因可使转化的宿主菌在含氨苄青霉素的 LB 培养板上生长, 37 °C 培养 10- 12 h 得到阳性克隆; 挑取单克隆抗性菌落置于含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 °C 振摇过夜, 扩大培养; 16- 24 h 后收集菌液用 S. N. A. P. Midi Prep Kit 试剂盒抽提质粒 DNA。(2) MTCOX- I shRNA 表达重组体的鉴定: ① 抗性基因鉴定: 将获得的 COX shRNA 表达重组体在含氯霉素的 LB 培养板上, 正确的表达克隆氯霉素敏感, 若有突变, 则对氯霉素具有抗性, 培养板上可见菌落生长; ② 测序鉴定: 对 DNA 进行序列测定, 以证实表达克隆内表达框的正确连接, 引物分别为 U6 Forward 5' - GGACTATCATATGCCTACCG- 3' 和 V5 (C- tem) Reverse 5' - ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT- 3'。

2.4 慢病毒在 293FT 细胞内的包装 制备转染液 (溶液 A: 将 9 μg 病毒包装混合物和 3 μg 重组体质粒 DNA 溶于 1.5 mL 无血清的 Opti- MEMI 培养基中; 溶液 B: 将 36 μL 脂质体 2000 稀释于 1.5 mL 无血清的 Opti- MEMI 培养基中); 混匀 A、B 溶液, 室温孵育 20 min, 让 DNA- 脂质体复合物形成; 将 DNA- 脂质体复合物加入 250 mL 组织培养瓶中 (含 5 mL Opti- MEMI 生长培养基和血清); 将 5 mL 293FT 细胞悬液 (共 6 × 10⁶ 个细胞) 加入含 Opti- MEMI 培养基和 DNA- 脂质体复合物的瓶内, 细胞置于 CO₂ 孵箱内, 37 °C 孵育过夜; 第 2 d 换回含丙酮酸盐的 DMEM 完全培养基; 转染后 48- 72 h 去除培养基, 将含病毒的上清液移入 15 mL 无菌锥形管中, 4 °C 3 000 r/min 离心 5 min, 将悬液分装后, - 80 °C 保存备用。

2.5 病毒滴度的测定 CNE2 细胞胰酶消化并计数, 将适量细胞平铺于 6 孔板, 24h 后细胞达 30% - 50% 汇合, 加入不同稀释度 (10⁻² 到 10⁻⁶) 的病毒上清 1 mL, 每孔内加入 polybrene 达到终浓度为 6 mg/L; 转染后第 2 d 加入 2 mL RPMI 1640 完全培养基; 24 h 后换含适量杀稻瘟菌素 (blasticidin) 的选择培养液, 一旦慢病毒进入靶细胞, 病毒 RNA 逆转录, 进入细胞核中, 整合到宿主基因组中, 目的 shRNA 构成性表达, 慢病毒的抗 blasticidin 标记可选择稳定转染的细胞, 经 10- 12 d, 筛选获得的 blasticidin 抗性集落, 通过计数不同稀释度病毒上清液感染 CNE2 细胞所产生的 blasticidin 抗性集落形成单位, 确定病毒滴度 (1 × 10³ TU/L)。

2.6 慢病毒重组体感染细胞 复苏慢病毒重组体, 以 10 MOI 感染 5- 8F 细胞, 并加入 polybrene 达到终浓度为 6 mg/L, 37 °C 孵育过夜; 第 2 d, 除去含病毒培养液, 换以新鲜完全培养液。第 3 d 除去培养液, 换以含适量 blasticidin 的新鲜完全培养液, 以选择稳定的转导细胞; 定时换含适量 blasticidin 的新鲜培养基, 经过约 10- 14 d 出现可辨认的抗 blasticidin 细胞团。此时细胞内因含有 blasticidin 的抗性基因, 故可存活, 并获得 shRNA 的稳定表达。

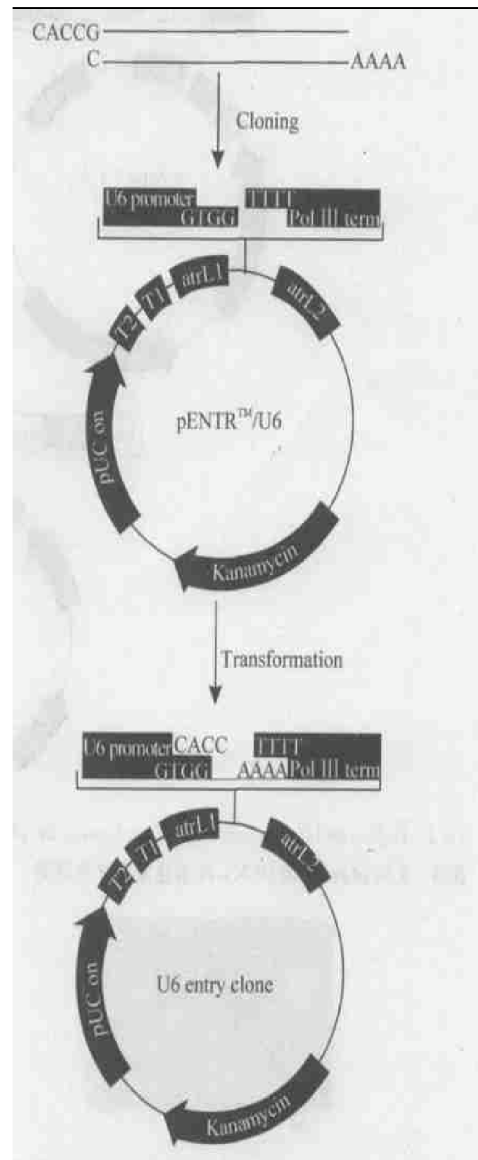


Fig 2 Generate the entry clone sktech map.

图 2 生成入门克隆示意图

2.7 Western blotting 检测 细胞在培养瓶内生长至约 80% - 90% 汇合时用 PBS 洗 2 次, 加入 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白。沸水浴 10 min 以变性蛋白, 用分光光度计定量, 以 30 μg 总蛋白行 10% SDS - PAGE 凝胶电泳。电泳后转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, 依次用 1: 500 鼠抗人 COX- I 的

单克隆抗体和1:1 000稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 反应,压片曝光显色。

结 果

1 退火产物电泳结果分析

退火产物经凝胶电泳后,紫外灯下可见一清晰高分子量的条带产生,大小与单链 DNA 寡核苷酸不同。而未退火的单链 DNA 仍可辨认(图 4)。

2 pENTR/ U6 载体测序分析结果如下(图 5)

结果显示插入片段序列无核苷酸突变,插入位置正确;靶序列和U6 启动子、Pol III 终止子连接生成U6 RNAi 盒;生成正确的入门克隆。

3 MTCOX- I shRNA 表达重组体

转化宿主菌 ONE SHOT Stb13 *E. coli* 在含氯霉素的 LB 培养板上未见菌落生长,说明构建的 COX shRNA 表达重组体未发生突变。

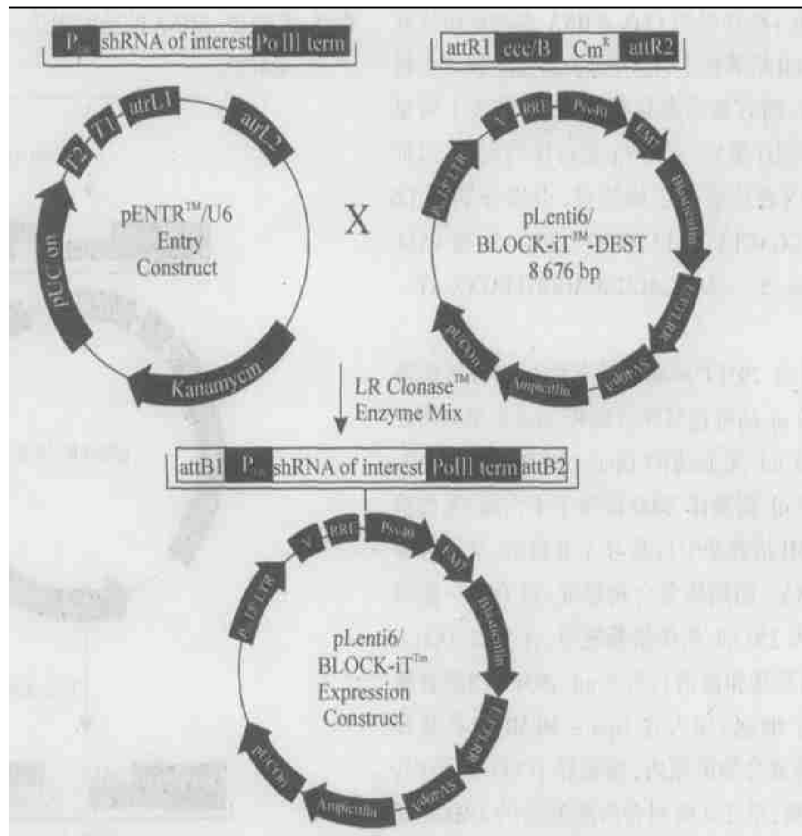


Fig 3 Perform an LR recombination reaction between the pENTR/ U6 entry construct and pLenti6/ BLOCK- iT expression construct.

图 3 生成 pLenti6/ BLOCK- iT 表达重组体示意图



Fig 4 ds oligo annealing rection. M: DNA marker; 1, 2: single strand oligo; 3: ds oligo (The oligo annealing reaction shows a clearly detectable, higher molecular weight band).

图 4 退火产物电泳图

4 MTCOX- I shRNA 表达重组体测序分析

上,表达载体构建成功。

5 稳定转染 293FT 细胞的效应

表达重组体经慢病毒包装后共转染 293FT 细胞,细胞部分融合,多核复合体出现,随着病毒增殖,细胞内可见多量病毒颗粒,并逐渐从壁上脱落,出现细胞病理效应(图 7)。

6 病毒滴度测定结果

重组慢病毒表达克隆的滴度分别为 3.85×10^9 TU/L。

7 Western blotting 检测结果(图 8)

已转染后细胞上清液检测病毒蛋白表达结果如下

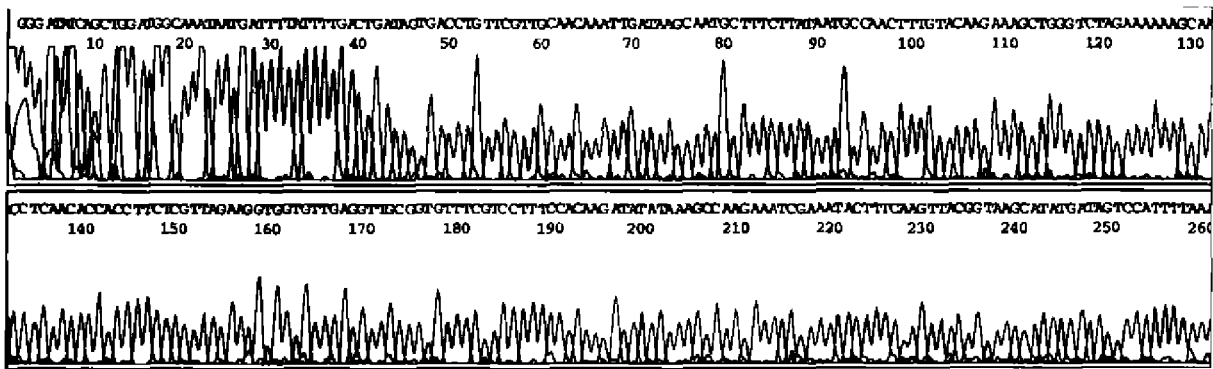


Fig 5 DNA sequencing result of the pENTR/U6 entry clone (part).

图 5 pENTR/U6 入门克隆测序结果(部分)

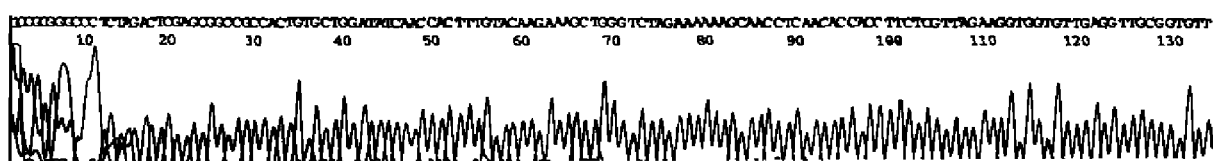


Fig 6 DNA sequencing result of the pLenti6/BLOCK-iT expression construct (part).

图 6 pLenti6/BLOCK-iT 表达重组体测序结果(部分)

讨 论

COX 是由线粒体基因组与核基因组各自编码的亚基共同组成的复合物,其中 I、II、III 3 个大亚基由线粒体基因编码并定位合成,其余 10 个小亚基由核基因编码合成,然后进入线粒体,起调节线粒体催化亚基的活性的作用。COX 的表达在不同的生物种类甚至在同一生物种类、同一器官的不同部分,皆存在着一定的差异。在哺乳动物组织中,COX 核编码的特定亚基同构体的功能至今还没弄清,COX 亚基的表达及其调节机制还需进一步研究。本研究通过构建 MTCOX-I shRNA 表达重组体,将携带 MTCOX-I shRNA 的慢病毒整合到宿主基因组中,靶向性沉默 COX 基因。

根据 siRNA 作用靶向序列的设计策略:①所选目的片段不含有 3 个以上的相同的核苷酸,尤其是不要选择有连续 4 个 T 的序列;②5' 端开始为 21 个核苷酸的 DNA 序列,中间以 4 个核苷酸的 AACG 间隔形成发夹结构,最后为 DNA 目的序列的反向重复序列;③上游序列在 5' 末端加入 CACC,下游序列在 5' 末端加入 AAAA,上下游序列 5' 末端均磷酸化修饰;④所选目的序列 GC 含量 40% - 50%,并用 BLAST 软件进行同源性分析,确保目的序列与其它基因没有同源性。我们针对 MTCOX-I 基因序列设计了 21nt 的 siRNA 作用的靶向序列。并非所有针对

靶基因的 21 个特异的序列都能起到沉默基因的作用,在我们的实验中,共设计合成了 3 对 siRNA 序列,在人鼻咽癌细胞中只有 641 位点的抑制效果最好,说明靶位点的选择很关键。

本实验采用的是人 U6 启动子控制的 pENTR/U6 载体,模板为含有靶点序列回文结构,这样细胞内合成的 RNA 为发夹样双链结构,可产生分子内茎-环结构,被内源性 Dicer 酶处理成 21nt 的双链 RNA(小干扰 RNA)^[10],发挥 siRNA 的效应,达到特异性抑制靶基因表达的目的。本实验所采用的基于慢病毒介导的发夹样小干扰 RNA 生成的导入途径,将 U6 RNAi 表达盒接入 pLenti6/BLOCK-iT-Dest 载体,通过慢病毒的包装,这样转录生成的 siRNA 具有了 blasticidin 抗性。一旦慢病毒进入靶细胞,病毒 RNA 逆转录,进入细胞核中,整合到宿主基因组中,目的 shRNA 构成性表达,慢病毒的 blasticidin 标记可选择稳定转染的细胞。

与其它几种常用的病毒载体相比较,逆转录病毒载体病毒滴度低,只能感染分裂期细胞^[11],容纳外源基因的 DNA 片段长度不超过 8 kb;而腺病毒载体感染细胞时,病毒 DNA 游离在细胞核内,并不整合到染色体上,在体内不能实现稳定的长期表达,且反复应用容易引起免疫反应,因而在应用上这两种病毒载体都受到一定的限制^[12]。慢病毒载体最大的特点是可以感染分裂期及非分裂期细胞^[13],容纳外源性

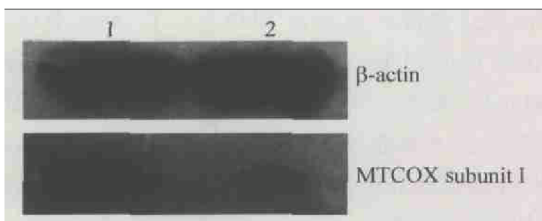
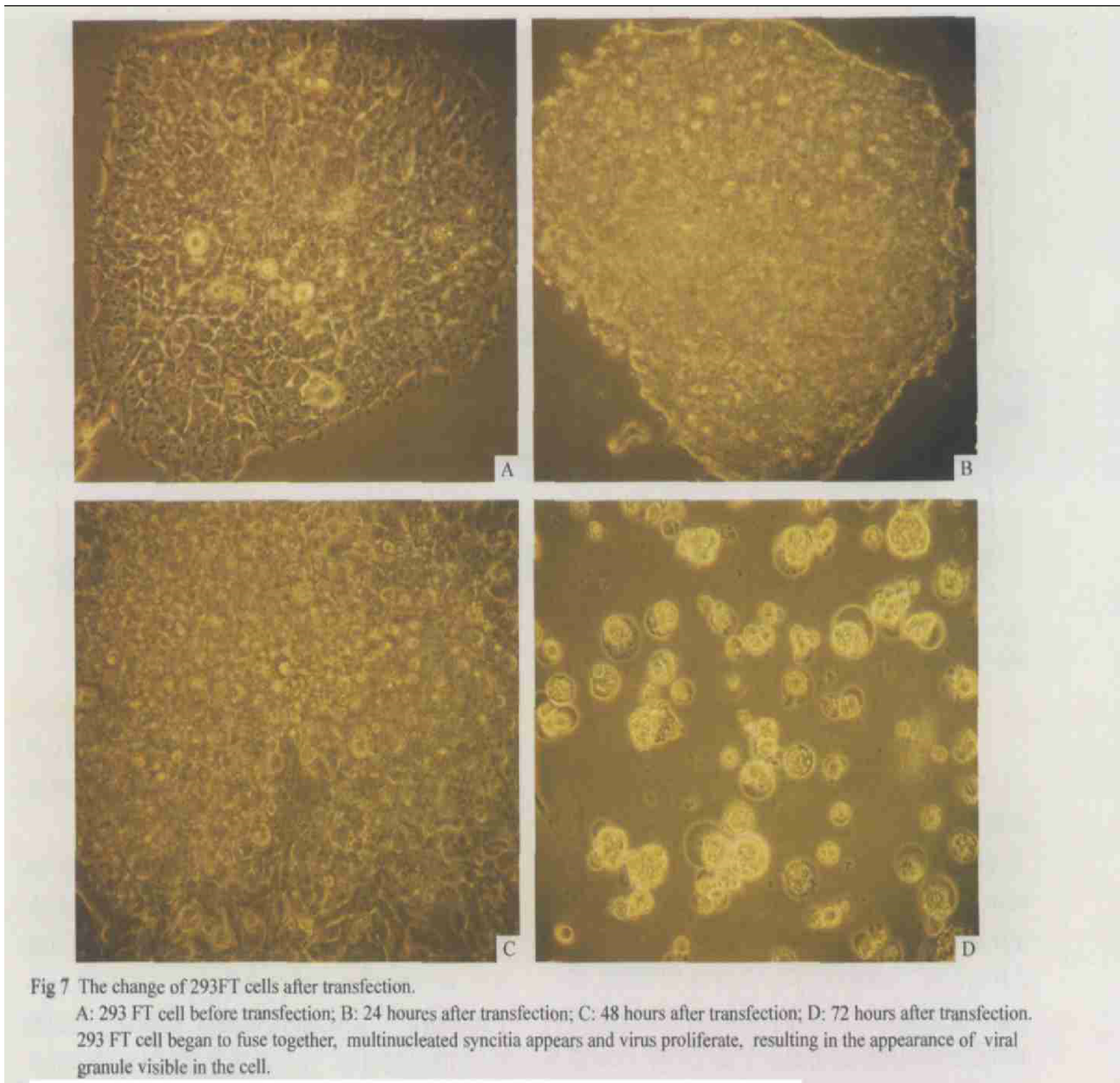


Fig 8 Western blotting analysis of MTCOX- I expression in cells after postinfection with COX shRNA expression construct. Lane 1: untransduced; Lane 2: COX shRNA expression construct.

图 8 感染细胞内细胞色素 C 氧化酶 I 亚基表达分析

目的基因的片段大,可以在体内长期地表达,免疫反应小,安全性较好^[14],可在更多范围的宿主细胞内生成高滴度的病毒。因此,慢病毒包装体系的成分可生成复制缺陷的慢病毒重组体,能够将 U6 RNAi 表

达盒中的目的 shRNA 在分裂和非分裂哺乳细胞内稳定表达^[15],应用范围比传统的逆转录病毒广,与腺病毒体系相比可长期稳定表达 shRNA。

我们设计和构建了针对靶基因的 MTCOX- I shRNA 表达重组体,并经过慢病毒包装后感染 5- 8F 细胞,检测靶基因蛋白表达的改变。结果表明, MTCOX- I RNAi 慢病毒载体感染 5- 8F 细胞能够下调 MTCOX- I 蛋白的表达。本实验从蛋白质水平证明 U6 启动子介导的细胞内合成 siRNA 的策略,能够成功地在鼻咽癌 5- 8F 细胞中应用,并且经慢病毒感染 5- 8F 细胞及药物筛选,最终建立了 MTCOX- I 基因被长期稳定抑制的细胞系。本研究成功构建线粒体细胞色素 C 氧化酶 RNAi 慢病毒载体,为进一步研究该基因功能缺陷在真核细胞内的影响奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Ostermeier C, Iwata S, Michel H. Cytochrome C oxidase[J]. *Curr Opin Structural Biol*, 1996, 6(4): 460– 466.
- [2] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21 – nucleotide RNAs interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 441(6836): 494– 498.
- [3] Fire A. RNA – triggered gene silencing[J]. *Trends Genet*, 1999, 15(9): 358– 363.
- [4] Catalano C, Azzalin G, Macino G, et al. Gene silencing in worms and fungi[J]. *Nature*, 2000, 404(6775): 245.
- [5] Sharp PA, Zamore PD. Molecular biology. RNA interference [J]. *Science*, 2000, 287(5462): 2431– 2433.
- [6] Sharp PA. RNA interference– 2001[J]. *Genes Dev*, 2001, 15 (5): 485– 490.
- [7] McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(10): 737– 747.
- [8] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *Methods*, 2002, 26(2): 199– 213.
- [9] Van den Haute C, Eggemont K, Nuttin B, et al. Lentiviral vector– mediated delivery of short hairpin RNA results in persistent knockdown of gene expression in mouse brain[J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(18): 1799– 1807.
- [10] Shin JJ, Katayama T, Michaud WA, et al. Short hairpin RNA system to inhibit human p16 in squamous cell carcinoma [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, 130(1): 68 – 73.
- [11] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus – mediated RNA interference[J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(3): 243– 247.
- [12] 李振宇, 徐开林, 潘秀英. 慢病毒载体构建及结构优化 [J]. *国外医学: 分子生物学分册*, 2002, 24(5): 310– 313.
- [13] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, et al. A lentivirus– based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 401– 406.
- [14] Naldini L, Blomer U, Gally P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. *Science*, 1996, 272(5259): 263– 267.
- [15] Naldini Luigi. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non – dividing cells[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9 (5): 457– 463.