

. 实验研究 .

大鼠 Rars 基因 siRNA 重组腺病毒载体的构建与鉴定

沈 寅 符 荣 赵洪洋 王海均 王文良 张立志

【摘要】目的 构建针对大鼠 Rars 基因的 siRNA 重组腺病毒载体,并观察大鼠神经元细胞病毒转染前后目的蛋白表达量变化。**方法** 将原代培养的大鼠神经元细胞随机分为观察组、阴性对照组及空白对照组。观察组细胞转染携带 Rars siRNA 序列的重组腺病毒,阴性对照组细胞转染携带 Scramble 无意义序列的重组腺病毒,空白对照组不转染任何病毒。观察各对照组表达绿色荧光蛋白(GFP)的阳性细胞数,计算转染率,并检测转染前后 Rars 基因对应产物精氨酰-tRNA 合成酶(ArgRS)蛋白的表达量,评价基因沉默效率。**结果** 成功构建包含 Rars 基因干扰序列及 Scramble 序列的重组腺病毒,病毒滴度达 10^{10} 级。利用重组腺病毒感染大鼠神经元细胞 48 h 后,绝大部分细胞表达 GFP,转染率 >95%。含 Rars 干扰序列的病毒转染细胞可使 ArgRS 蛋白表达量显著降低($P<0.01$),沉默效率 >60%。含 Scramble 对照序列的病毒则不能产生明显的基因沉默效应。**结论** 本实验所构建的 siRNA 重组腺病毒载体可有效沉默大鼠 Rars 基因,降低 ArgRS 蛋白表达。

【关键词】 Rars 基因;小分子干扰 RNA;重组腺病毒载体;精氨酰-tRNA 合成酶

【文章编号】 1009-153X(2016)05-0290-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.2; R 363.2¹

Construction and evaluation of rat Rars siRNA recombinant adenoviral vector

SHEN Yin, FU Rong, ZHAO Hong-yang, WANG Hai-jun, WANG Wen-liang, ZHANG Li-zhi. Department of Neurosurgery, Union Hospital, Tongji Medical School, Huazhong University of Sciences and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objectives To construct the recombinant adenoviral vector carrying rat Rars small interfering RNA (siRNA) gene and to investigate changes in the ArgRS protein (the translation product of Rars) level after the viral transfection in rat neurons. **Methods** The neurons derived from SD rat brain which were primarily cultured were randomly divided into three groups, i.e. experimental group in which the neuron were transfected with recombinant viral vectors carrying Rars siRNA sequence, negative control group in which the neurons were trhansfected with vectors carrying Scramble sequence (nonsense sequence) and the blank control group. The transfection rate was calculated by counting green fluorescence protein (GFP) positive cells 48h after the transfection. The inhibition rate of Rars gene was evaluated by observing the ArgRS expressions levels before and after the virus transfection. **Results** The recombinant adenoviral vectors carrying Rars siRNA sequence and Scramble sequence were successfully constructed and the tilter of the virus was 10^{10} pfu/ml. The most cells expressed GFP and the transfection rate was above 95% 48 hours after transfection. The levels of ArgRS expression in the neurons was significantly lower in the experimental group in which the inhibition rate was over 60% than those in both the control groups ($P<0.01$). **Conclusions** Rars siRNA recombinant adenoviral vector constructed in the present study can effectively silence Rars gene and downregulate ArgRS expression in the neurons of the rats.

【Key words】 Rars gene; Small interfering RNA; Recombinant adenoviral vector; Rats

大鼠 Rars 基因位于大鼠 10 号染色体 1 区 2 带,含有 15 个外显子,其编码的蛋白产物为精氨酰-tRNA 合成酶(arginyl-tRNA synthetase, ArgRS)。ArgRS 能够催化精氨酸与相应 tRNA 分子结合,参与蛋白质的合成,是 mRNA 与蛋白质之间信息传递相互衔接的关键酶。最近的研究发现,在大鼠急性脑缺血模型中,可以观察到缺血损伤的组织中 ArgRS

表达水平增高,这提示了 Rars 基因可能参与脑缺血损伤的发病过程^[1]。小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 是一种短双链 RNA,在细胞内 siRNA 可诱导特定的 mRNA 降解,对靶基因产生沉默效应。本研究试图设计并构建针对大鼠 Rars 基因的 siRNA 重组腺病毒载体,观察病毒转染前后大鼠神经元细胞中 ArgRS 蛋白表达量的变化,以评价此种 siRNA 重组病毒载体对于靶基因的沉默效率。

1 材料与方法

1.1 siRNA 的设计 使用 Protein Lounge 数据库的 siRNA 在线设计工具设计,干扰序列为 GGAACAG

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.05.011

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科(沈 寅、符 荣、赵洪洋、王海均、王文良、张立志)

通讯作者:符 荣,E-mail: furonglp@163.com

TTACGAGAAGAA, 阴性对照序列(Scramble 序列)为 TTCTCCGAACGTGTCACGT, 并进行 BLAST 同源性分析。采用寡核苷酸链退火的方法合成双链 DNA。寡核苷酸链由 Genechem 公司合成, 包括两端作为 AgeI 和 EcoRI 酶切位点的序列, 作为 RNA 聚合酶 III 转录终止信号的 TTTT, 两个反向互补排列的 19 nt 特异性序列, 以及一个 6 nt 用于形成发夹结构的区域。干扰序列寡核苷酸链的正义链为 5'-CCGGGGAACAGTTACGAGAAGAACTCGAGTTCTTCTCGTAACTGTTCTTTT-3', 反义链为 5'-AATTCAAAAAGGAACAGTTACGAGAAGAACTCGAGTTCTTCTCGTAACTGTTCC-3'。

1.2 穿梭质粒的构建与鉴定 将合成的单链寡核苷酸退火形成双链 DNA。用限制性内切酶 AgeI 和 EcoRI(美国 NEB 公司)双酶切穿梭质粒 GV120(上海 Genechem 公司), 通过 T4 DNA 连接酶(美国 NEB 公司)将双酶切线性化的载体和 DNA 片段在适当的缓冲液中进行连接反应(16 ℃, 12 h), 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。在含有氨苄西林抗性的 LB 平板上培养(37 ℃, 16 h), 筛选阳性菌落。以质粒抽提试剂盒(德国 QIAGEN 公司)提取重组穿梭质粒, 进行测序鉴定。

1.3 重组腺病毒的包装、扩增及纯化 传代培养的 HEK293 细胞约有 80% 融合时可用于转染。采用 AdMax 腺病毒包装系统(加拿大 microbix 公司)进行病毒包装。将含有重组穿梭质粒和辅助包装质粒的 DNA 溶液与 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)混合, 转染 HEK293 细胞, 待大部分细胞出现典型的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 且有 50% 的细胞脱壁时, 反复冻融并裂解细胞, 收集病毒上清。将病毒上清再次感染 HEK293 细胞, 重复上述步骤。经过 3 轮扩增后, 使用 Adeno-X 病毒纯化试剂盒(美国 Clontech 公司)纯化重组腺病毒。

1.4 重组腺病毒滴度检测 重组腺病毒滴度检测采用终点稀释法。重组腺病毒载体携带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因, 转入 HEK293 细胞后可表达 GFP 利用 GFP 表达量测定病毒颗粒密度: HEK293 细胞培养于 96 孔板中, 待细胞汇合时, 加入 1:10 系列稀释的病毒颗粒, 每一稀释级别 10 复孔, 培养 48 h 后在荧光显微镜下观察每个稀释孔, 有 GFP 表达的为阳性孔, 并计算每个稀释级别中所含阳性孔的比率。病毒感染颗粒数(pfu/ml)= $10(X+0.8)$ (X=各个病毒稀释级别阳性比率的总和)。

1.5 转染效率与沉默效率的检测 新生 SD 大鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。将出生 24 h 以内的 SD 大鼠断头取脑, 去除脑干、小脑及端脑髓质, 手术显微镜下剥离皮质表面的软脑膜。以显微剪将皮质组织剪为匀浆状, 胰酶消化后经细胞筛过滤, 收集滤液种植于 6 孔培养板, 培养 72 h 后加入阿糖胞苷杀灭非神经元细胞, 换液后继续培养至 7~11 d, 取形态良好的神经元进行后续实验。

将原代培养的神经元细胞随机分为 3 组: 空白组为正常培养的神经元, 培养液中不加入任何病毒; 阴性对照组加入含 Scramble 序列的重组病毒; 观察组加入含 Rars 干扰序列的重组病毒。病毒转染 48 h 后, 荧光显微镜下观察表达 GFP 的阳性细胞比例。将细胞裂解提取蛋白, 免疫印迹法检测 ArgRS 表达水平。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 其结果的比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组穿梭质粒的测序鉴定 连接寡核苷酸链的载体质粒, 比空载体 GV120 多出 50 个左右的碱基。经 Chromas 测序软件分析后, 显示 siRNA 序列插入正确, 测序结果与设计序列完全一致(图 1)。表明重组穿梭质粒构建成功。

2.2 重组腺病毒的包装和滴度测定 转染的 HEK293 细胞培养 24 h 后开始出现 GFP 表达, 随着时间延长, GFP 表达增多并出现 CPE。培养至 10 d 左右细胞开始呈团状脱落(图 2)。收集病毒上清, 并反复感染 HEK293 细胞进行扩增。病毒第三轮扩增时, 几乎所有细胞均表达 GFP。以终点稀释法计算病毒滴度, 经计算重组腺病毒滴度为 2×10^{10} pfu/ml。

2.3 重组腺病毒载体的转染率及转染细胞后 ArgRS 蛋白的表达变化 转染成功的神经元可表达 GFP。病毒转 48 h 后, GFP 阳性细胞比例 >95% (图 3)。空白组与阴性对照组相比, ArgRS 表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 观察组 ArgRS 表达量显著低于空白组和阴性对照组 ($P < 0.01$), 基因沉默效率 >60% (图 4)。

3 讨论

氨基酰-tRNA 合成酶(aminoacyl-tRNA synthetase, AARS)是一类能够催化特定氨基酸与相应 tRNA 分子结合的酶, 是 mRNA 与蛋白质之间信息传递相互衔接的关键酶^[2]。ArgRS 属于 AARS 的一

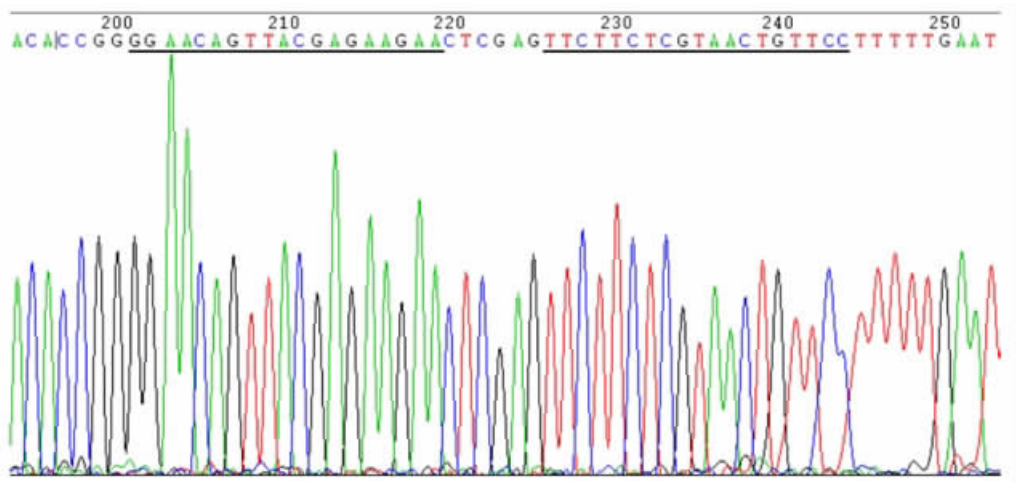


图1 重组穿梭质粒的测序鉴定结果

重组穿梭质粒经测序软件分析后,显示测序结果与设计序列完全一致,图中下划线部分为两段反向互补排列的特异性序列

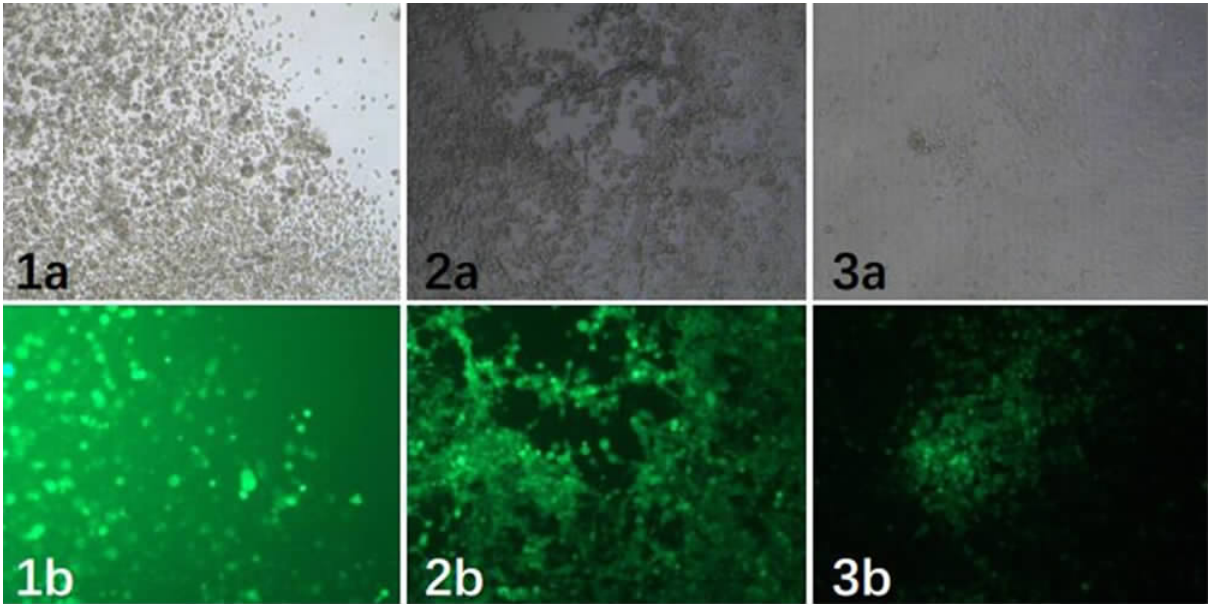


图2 转染HEK293细胞后不同时间点的光学显微镜和荧光显微镜下表现

1a、1b.转染后第6天,细胞开始表达GFP;2a、2b.转染后第8天,绝大部分细胞均出现GFP阳性表达,可见细胞病变效应,部分细胞脱落;3a、3b. 转染后第10天,细胞呈大片团块状脱落,残存细胞几乎均表达GFP;a光学显微镜观察;1b、2b、3b. 荧光显微镜观察;GFP:绿色荧光蛋白

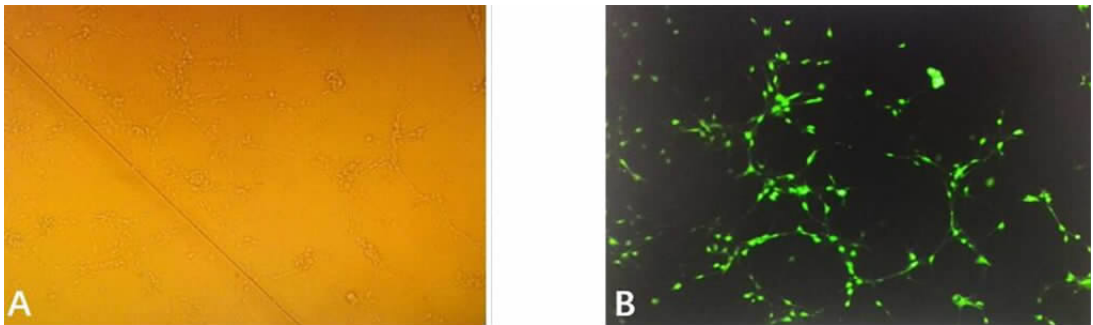


图3 重组腺病毒载体转染神经元后的显微镜下表现

A. 光学显微镜下观察;B.荧光显微镜下观察显示绿色荧光蛋白阳性

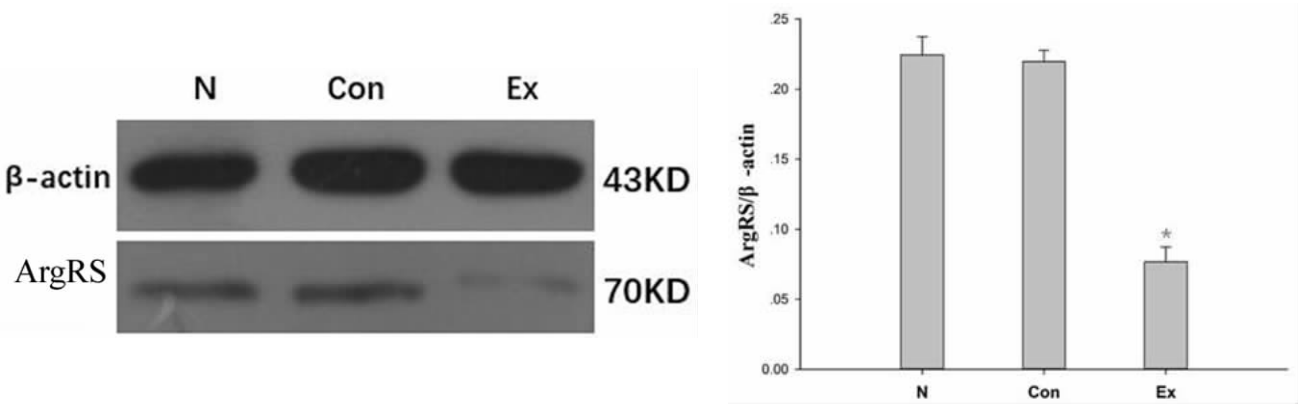


图4 各组细胞ArgRS蛋白表达量变化

与N(空白组)和Con(阴性对照组)相比,**P*<0.05;Ex:观察组;ArgRS:精氨酰-tRNA合成酶

种,在大鼠体内,ArgRS由 Rars 基因编码。Anderson 等^[3]研究秀丽线虫发现,编码 AARS 的基因的缺失,可使线虫对缺氧损伤产生耐受性。Fu 等^[1]在大鼠脑缺血模型中也观察到 ArgRS 表达升高。这些研究表明,AARS 尤其是 ArgRS 可能在脑缺血缺氧损伤后发生的病理生理变化中扮演重要角色,而抑制缺血后 ArgRS 的过表达,可能诱导细胞产生缺血耐受性,从而提供神经保护作用。

siRNA 是一类具有 21~25 个核苷酸长度的短双链 RNA,成熟的 siRNA 在细胞内可与某些蛋白质因子结合形成 RNA 诱导的沉默复合物,与特定的 mRNA 结合后,可引发 mRNA 降解,从而实现靶基因的沉默效应^[4,5]。siRNA 的序列设计不具有唯一性,针对某一特定靶基因可设计出多种不同 siRNA 序列,且沉默效率并不完全相同,而是具有一定程度的随机性^[6]。我们在预实验中设计了三种不同的 siRNA 序列并加以筛选,以确保得到高沉默效率的 siRNA。我们选择 Genechem 公司的 GV120 载体,其大小约为 5.7 kb,包含有氨苄西林抗性基因 Ampr,在穿梭质粒转染大肠杆菌感受态细胞后,可用于筛选阳性菌落。GV120 同时包含 GFP 报告基因,可在宿主细胞内表达 GFP,用于鉴定转染效率。腺病毒的包装则采用 AdMax 腺病毒包装系统,其辅助包装质粒携带了腺病毒大部分基因组,穿梭质粒与辅助包装质粒共转染 HEK293 细胞后,在 Cre/loxP 重组酶的作用下实现重组^[7]。利用这套系统可保证外源基因获得较高的重组效率。

本实验构建 siRNA 重组腺病毒载体的目的是实现对大鼠 Rars 基因的沉默效应,降低 ArgRS 表达

量。在后续实验中,我们将以病毒转染后低表达 ArgRS 蛋白的神经元作为研究对象,观察其与正常神经元在缺血耐受性方面的差异。

【参考文献】

[1] Fu R, Fan YZ, Fan YC, *et al.* Expression of arginyl-tRNA synthetase in rats with focal cerebral ischemia [J]. J Hua-zhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2014, 34(2): 172-175.

[2] Ling J, Reynolds N, Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control [J]. Annu Rev Microbiol, 2009, 63: 61-78.

[3] Anderson LL, Mao X, Scott BA, *et al.* Survival from hypoxia in *C. elegans* by inactivation of aminoacyl-tRNA synthetases [J]. Science, 2009, 323(5914): 630-633.

[4] Sijen T, Fleenor J, Simmer F, *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing [J]. Cell, 2001, 107(4): 465-476.

[5] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. Nature, 2001, 411(6836): 494-498.

[6] Reynolds A, Leake D, Boese Q, *et al.* Rational siRNA design for RNA interference [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(3): 326-330.

[7] Ng P, Parks RJ, Cummings DT, *et al.* A high-efficiency Cre/loxP-based system for construction of adenoviral vectors [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(16): 2667-2672.

(2016-02-19 收稿,2016-04-06 修回)