

## 膜联蛋白 基因短发夹 RNA 表达载体的构建和鉴定

刘亚伟,戴兵,梅长林\*,付莉莉,蔡厚安

(第二军医大学长征医院肾内科,解放军肾脏病研究所,上海 200003)

**[摘要]** 目的:构建针对膜联蛋白(annexin) 的短发夹 RNA (shRNA) 的表达载体,观察其对目的基因表达的影响。方法:根据 GenBank 中 annexin 基因已知序列设计了 2 条序列,即 annexin shRNA1、annexin shRNA2,同时设计 1 条非特异性序列作为阴性对照。据此设计合成各自的寡核苷酸链,退火后连接入 p Genesil1 载体,转化扩增后进行序列测定。3 种重组表达载体均转染 HEK293 细胞,通过实时荧光定量 RT-PCR 和 Western 印迹法分别在基因和蛋白水平上检测各自 annexin 的表达,以未转染细胞作为空白对照。结果:3 种重组表达载体(p Genesil1-annexin shRNA1、p Genesil1-annexin shRNA2 和 p Genesil1-negative shRNA)经限制性酶切及测序分析证明基因插入正确。转染 HEK293 细胞后,转染 p Genesil1-annexin shRNA2 组细胞 annexin 基因和蛋白表达明显低于转染 p Genesil1-annexin shRNA1、p Genesil1-negative shRNA 以及空转染细胞( $P < 0.05$ ),而后三者间没有明显差异。结论:成功构建了针对 annexin 的 shRNA 表达载体(p Genesil1-annexin shRNA2),转染细胞后可抑制 annexin 基因表达。

**[关键词]** 膜联蛋白质类;RNA 干扰;短发夹 RNA

**[中图分类号]** Q 786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1181-05

### Construction and identification of a vector expressing short hairpin RNA targeting annexin gene

LIU Ya-wei, DAI Bing, MEI Chang-lin\*, FU Li-li, CAI Houran (Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Kidney Disease Research Institute of PLA, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct a vector encoding short hairpin RNA (shRNA) targeting annexin and to observe its influence on annexin expression. **Methods:** Annexin-targeted hairpin RNA1 and RNA2 were devised according to the GenBank annexin sequence. Meanwhile, a nonspecific sequence was taken as negative control. The oligonucleotide strands of DNA fragments encoding the above shRNAs were synthesized. After annealing of the complementary strands, the DNA fragments were cloned into human p Genesil1 plasmid followed by amplification in *E. coli* and sequencing. The 3 p Genesil1 constructs were then transfected into HEK293 cells and the expression of annexin was examined by real-time fluorescence quantitative RT-PCR and Western blot. The non-transfected cells were taken as blank control. **Results:** Restrictive enzyme digestion and sequencing verified that the 3 recombinants (p Genesil1-annexin shRNA1, p Genesil1-annexin shRNA2, and p Genesil1-negative shRNA) were correct. The annexin expression was significantly lower in HEK293 cells transfected with p Genesil1-annexin shRNA2 compared with those transfected with p Genesil1-annexin shRNA1, p Genesil1-negative shRNA, and blank control ( $P < 0.05$ ); and there was no significant difference between the latter 3. **Conclusion:** We have successfully generated an annexin-targeted shRNA construct, which can significantly inhibit the expression of annexin.

**[KEY WORDS]** annexins; RNA interference; short hairpin RNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1181-1185]

膜联蛋白(annexins)是一类受  $Ca^{2+}$  调节、能够结合到带负电荷的膜磷脂上的蛋白家族,参与一系列与  $Ca^{2+}$  相关的生物学活动。该家族的成员之一 annexin 在生物膜的形成、细胞的吞噬和胞饮、离子转运、DNA 合成及细胞增殖等方面起重要作用<sup>[1-4]</sup>。

近年来研究发现 annexin 在多种肾脏疾病中表达增高,本研究利用构建 annexin 基因短发夹 RNA (short-hairpin RNA, shRNA) 表达载体,特异性抑制 annexin 的表达,为研究其在肾脏疾病中的作用,以及基因治疗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂 HEK293 细胞和大肠杆菌

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(30330640);国家自然科学基金面上项目(30271523);国家自然科学基金(30576867)。Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (30330640), General Program of National Natural Science Foundation of China (30271523), and National Natural Science Foundation of China (30576867)。

**[作者简介]** 刘亚伟,博士生。E-mail: lyw1025@163.com

\*Corresponding author. E-mail: chlmei1954@126.com

DH5 为本实验室保存。pGenesil1 质粒(武汉晶赛公司)为编码 shRNA 载体,由 pEGFP-C1 质粒改造获得。T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sal*、*Bam*H、*Hind* (NEB 公司),质粒抽提试剂盒(北京天为时代公司),脂质体转染剂 Lipofectamine 2000 及 Opti-MEM 低血清培养基(美国 Invitrogen 公司)。胶回收试剂盒及 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物科技有限公司),DMEM 培养基及胎牛血清(美国 Gibco 公司),荧光定量 PCR 检测试剂盒(日本 TaKaRa 公司),SYBR Green 和 Calibration (美国 BioRad 公司),山羊抗人 annexin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),HRP 标记小鼠抗人  $\alpha$ -actin 单

克隆抗体(上海康成生物工程有限公司),HRP 标记兔抗山羊 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。引物由上海申能博彩生物科技有限公司合成。

1.2 载体设计(序列的选择、合成)

1.2.1 shRNA 的设计 根据 GenBank annexin 基因已知序列(gi:50845385)。在 Tuschl 设计原则基础上,结合 annexin mRNA 的二级结构,设计了 2 条序列 annexin shRNA1、annexin shRNA2,同时设计 1 条经 BLAST 与现有基因文库中所有人源基因均无同源性的非特异性序列为阴性对照序列。

1.2.2 合成编码 shRNA 的 DNA 序列 具体引物序列详见表 1。

表 1 编码 shRNA 的 DNA 序列  
Tab 1 DNA sequences encoding shRNA

Sequence	Annexin shRNA1	Annexin shRNA2	Negative shRNA
Target	5'-GAG TTA CAG CCC TTA TGA C-3' (833-853 bp)	5'-GGT CCT GAT CAG AAT CAT G-3' (992-1 012 bp)	5'-GAC TTC ATA AGG CGC ATG C-3'
RNA	5'-GAG UUA CAG CCC UUA UGA C-3' 3'-CUC AAU GUC GGG AAU AC UG-5	5'-GGU CCU GAU CAG AAU CAU G-3' 3'-CCA GGA CUA GUC UUA GUA C-5	5'-GAC UUC AUA AG GCG CAU GC-3' 3'-CUG AAG UAU UCC GCG UAC G-5
DNA	5'- <u>GAT</u> CCG AGT TAC AGC CCT TAT GAC TTC AAG ACG GTC ATA AGG GCT GTA ACT CTT TTT TGT CGA C $\Delta$ -3' 3'- <u>GCT</u> CAA TGT CGG GAA TAC TGA AGT TCT GCC AGT ATT CCC GAC ATT GAG AAA AAA CAG CTG <u>TTC</u> GA-5	5'- <u>GAT</u> CCG GTC CTG ATC AGA ATC ATG TTC AAG ACG CAT GAT TCT GAT CAG GAC CTT TTT TGT CGA C $\Delta$ -3' 3'- <u>GCC</u> AGG ACT AGT CTT AGT ACA AGT TCT GCG TAC TAA GAC TAG TCC TGG AAA AAA CAG CTG <u>TTC</u> GA-5	5'- <u>GAT</u> CCG ACT TCA TAA GGC GCA TGC TTC AAG ACG GCA TGC GC CTT ATG AAG TCT TTT TTG TCG AC $\Delta$ -3' 3'- <u>GCT</u> GAA GTA TTC CGC GTA CGA AGT TCT GCC GTA CGC GGA ATA CTT CAG AAA AAA CAG CTG <u>TTC</u> GA-5

Encoding shRNA: BamH + Sense + Loop + Antisense + Termination signal + *Sal* + *Hind*

1.3 shRNA 真核表达载体的构建

1.3.1 单链目的基因片段退火连接 分别用 50  $\mu$ l 退火缓冲液充分溶解上述单链目的基因片段。分别取 2  $\mu$ l、16  $\mu$ l 退火缓冲液充分混匀,94  $^{\circ}$ C 退火自然冷却至室温。各取 1  $\mu$ l 退火产物稀释 100 倍。

1.3.2 退火片段与 pGenesil1 质粒表达载体的连接 稀释退火片段 1  $\mu$ l,线性化 pGenesil1 质粒载体 1  $\mu$ l,10  $\times$ 连接缓冲液 1  $\mu$ l,T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ l,H<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l,22  $^{\circ}$ C 水浴反应过夜。

1.3.3 载体的转化 各取 5  $\mu$ l 过夜连接产物转化感受态细菌 DH5,氨苄抗性的 LB 平板上,37  $^{\circ}$ C 恒温培养过夜。从每个培养皿上各挑取 4 个单克隆菌落接种于 3 ml 含氨苄抗性的 LB 培养液中,37  $^{\circ}$ C 恒温摇床培养过夜。

1.3.4 质粒提取及酶切鉴定 质粒抽提按照试剂盒说明书进行,酶切体系如下:质粒 DNA 8  $\mu$ l + 10  $\times$  Buffer H 1  $\mu$ l + *Sal* 1  $\mu$ l 充分混匀,37  $^{\circ}$ C 水浴反应 2 h。

1.3.5 插入片段序列分析 直接将挑选的转化克隆送上海申能博彩生物科技有限公司进行序列分析。

1.4 pGenesil1-annexin 质粒转染 HEK293 细胞 HEK293 细胞常规复苏,适时传代细胞增生至足量后按 5  $\times 10^5$ /孔的密度接种六孔板中,质粒转染按脂质体 Lipofectamine2000 试剂盒说明书进行,简述如下:90% ~ 95% 细胞融合时,将 pGenesil1-annexin 质粒 DNA 各 2  $\mu$ g、Lipofectamine2000 5  $\mu$ l 分别加入 250  $\mu$ l Opti-MEM 低血清培养液轻轻混合,室温放置 5 min 后将稀释后的质粒 DNA 及 Lipofectamine2000 混合,轻轻混匀室温放置 20 min 使 DNA-脂质体复合物形成,每孔中加入 500  $\mu$ l DNA-脂质体复合物,轻摇混匀。转染后 6 h 移除 DNA-脂质体复合物,改用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h,检测基因表达。

1.5 荧光定量 RT-PCR 检测 HEK293 细胞 annexin mRNA 的表达 实验共分 4 组:未转染组,pGenesil1-annexin shRNA1 转染组,pGenesil1-annexin shRNA2 转染组,pGenesil1-negative shRNA 转染组,每组细胞均设 3 个复孔。首先分别收集各组 HEK293 细胞约 1  $\times 10^6$  个,然后提取总

RNA 逆转录成 cDNA。同时取 2  $\mu$ g cDNA 为模板进行 annexin 荧光定量 PCR 分析,annexin 基因引物序列,上游:5'-AGA GTT TCC CGC TTG GTT GA-3',下游:5'-CCT TTG GTC TTG ATG GCT GT-3',扩增片段长度为 199 bp,反应体系 25  $\mu$ l,内含:10  $\times$ RT Buffer 2.5  $\mu$ l;250 mmol/L  $Mg^{2+}$  0.3  $\mu$ l;25 mmol/L dNTP 0.3  $\mu$ l;10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1.0  $\mu$ l;25  $\times$ SYBR Green 0.8  $\mu$ l; $10^{-3}$   $\times$  Calibration 1.0  $\mu$ l;5 U/ $\mu$ l Ex Taq 酶 0.25  $\mu$ l;1 U/ $\mu$ l UNG 0.4  $\mu$ l;双蒸水 17.45  $\mu$ l;模板 1.0  $\mu$ l。将加样的反应管置荧光实时定量 PCR 仪中,95 90 s,95 5 s,60 15 s,72 20 s,5 个循环后 95 5 s,55 30 s,40 个循环,荧光信号监测。看家基因 -actin 作为内参照,以同样体系进行荧光定量分析。-actin 基因引物序列,上游:5'-CTG TAC GCC AAC ACA GTG C-3',下游:5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3',扩增片段长度为 211 bp。目的基因扩增后的荧光信号与内参比较,以每百万看家基因中的含量表示。每次检测作复孔取平均值。

1.6 Western 印迹检测 HEK293 细胞中 annexin 蛋白的表达 细胞分组同上,每组细胞均设 3 个复孔。收集每组细胞约  $1 \times 10^6$  个,加入蛋白裂解液 RIPA 充分裂解细胞后,-70 冻存,BCA 法进行蛋白定量。取 80  $\mu$ g 进行 12% SDS-PAGE 电泳,并转印到硝酸纤维素膜上,进行 Western 印迹。含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液室温下封闭 2 h。按 1:200 稀释山羊抗人 annexin 单克隆抗体,1:8000 稀释小鼠抗人 -actin 单克隆抗体,4 孵育过夜。TBST 充分洗膜后加入 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG,室温下孵育 2 h,TBST 再次洗膜,ECL 显影。

1.7 统计学处理 所有数据结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。两组之间统计分析采用 Student's *t* 检验。

## 2 结果

2.1 酶切鉴定重组质粒 pGenesil1 的多克隆位点如下:-Hind -Xba -Sal -Pst -BamH -U6 Promotor-EcoR -Sal -Xba -Dra。我们将目的基因片段插入在质粒 pGenesil1 的 BamH 和 Hind 之间,并且在插入的目的基因片段里设计了一个 Sal 的酶切位点,如若插入正确,就能被 Sal 酶切出一条约 400 bp 的 DNA 条带。本研究

中质粒均能被 Sal 酶切,并切出 400 bp 片段,即均

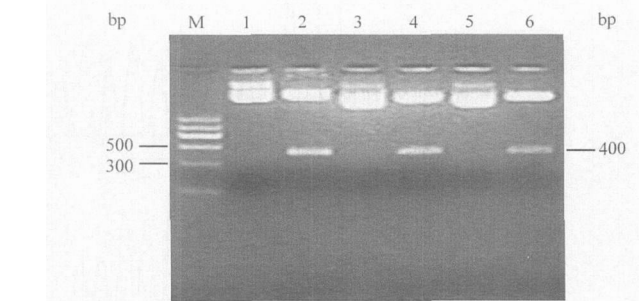


图 1 pGenesil1 重组质粒的酶切鉴定

Fig 1 pGenesil1 recombinant plasmid identified by enzyme digestion

M:DNA Marker; 1:p Genesil1-negative shRNA ;2:p Genesil1-negative shRNA/SalI ; 3:p Genesil1-annexin shRNA1 ;4:p Genesil1-annexin shRNA1/SalI ; 5:p Genesil1-annexin shRNA2; 6:p Genesil1-annexin shRNA2/SalI

2.2 重组质粒序列测定 挑取已转化质粒菌液去测序。测序结果均与目的序列相同,均符合设计要求。测序结果见图 2。

2.3 转染 shRNA 后 annexin mRNA 的表达 转染 48 h 后,pGenesil1-annexin shRNA2 转染组与空白对照组相比,annexin mRNA 表达明显下降,而 pGenesil1-annexin shRNA1 转染组和 pGenesil1-negative shRNA 转染组与空白对照组相比没有明显差别(图 3)。

2.4 转染 shRNA 后 annexin 蛋白表达的变化 转染 48 h 后,发现 pGenesil1-annexin shRNA2 可明显抑制 annexin 蛋白的表达,而 pGenesil1-annexin shRNA1 和 pGenesil1-negative shRNA 无明显抑制作用(图 4)。结果与荧光定量 RT-PCR 结果相符。

## 3 讨论

Annexin 最早是作为 Rous 肉瘤病毒转化基因的酪氨酸激酶底物于 1982 年被发现的<sup>[5]</sup>。其基因定位于 15q21-q22,长 40 kb,包括 13 个外显子,mRNA 为 1644 bp,其中编码区 CDS 是 137~1156 bp。Annexin 基因编码的蛋白有 339 个氨基酸,相对分子质量 36000,属于 annexins 蛋白家族,在维持生物膜结构域的稳定、胞膜运输、形成离子通道以及 DNA 合成、细胞增殖等方面起重要作用,并且细胞外的 annexin 还作为受体,参与了纤溶、细胞间黏附,配体介导的细胞信号转导、病毒感染等<sup>[6]</sup>。

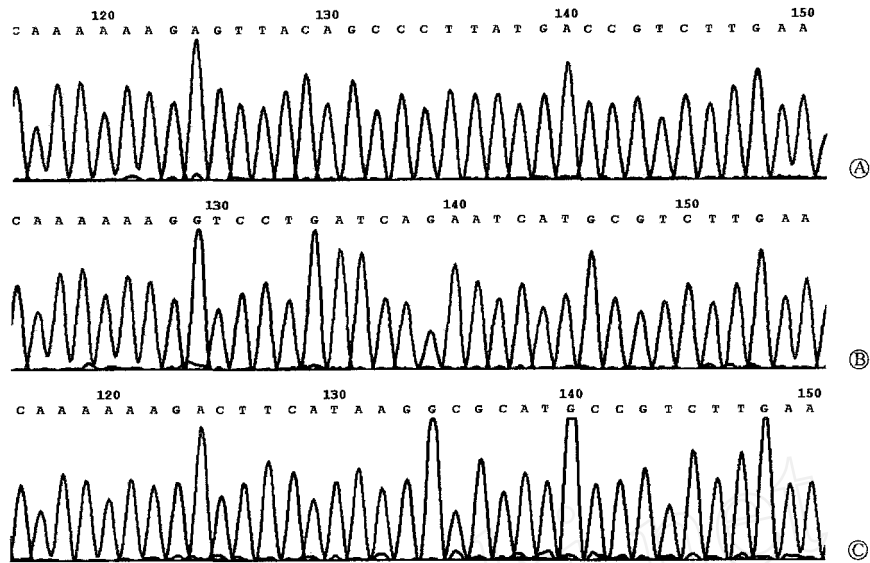


图 2 pGenesil1 重组质粒的测序结果

Fig 2 pGenesil1 recombinant plasmid identified by sequencing

A :p Genesil1-annexin shRNA1 ;B :p Genesil1-annexin shRNA2 ;C:p Genesil1-negative shRNA

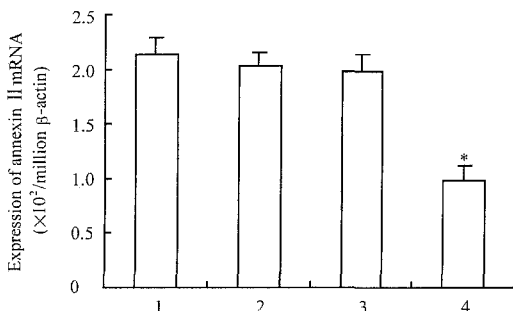


图 3 HEK293 细胞转染 pGenesil1-annexin shRNA 后 annexin mRNA 的表达

Fig 3 Annexin mRNA expression in HEK293 cells after transfected by pGenesil1-annexin shRNA

1:Blank control ;2:p Genesil1-negative shRNA ;3:p Genesil1-annexin shRNA1 ;4:p Genesil1-annexin shRNA2. \* P < 0. 05 vs blank control

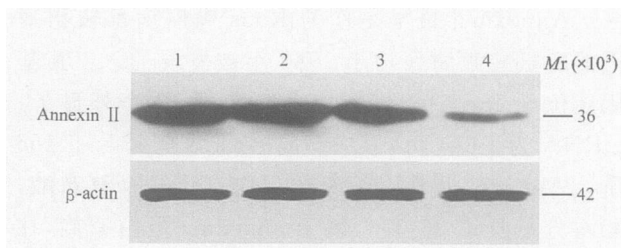


图 4 HEK293 细胞转染 pGenesil1-annexin shRNA 后 annexin 蛋白的表达

Fig 4 Annexin protein expression in HEK293 cells after transfected by pGenesil1-annexin shRNA

1:Blank control ;2:p Genesil1-negative shRNA ;3:p Genesil1-annexin shRNA1 ;4:p Genesil1-annexin shRNA2

近年来,annexin 与肾脏之间的关系,已经受到越来越多的关注<sup>[7]</sup>。Yamada 等<sup>[8]</sup>和 Benaud 等<sup>[9]</sup>分别报道了 annexin / S100A10 蛋白异四聚体在犬远端肾小管细胞 (Madin-Darby canine kidney cells, MDCK) 中参与形成 E-钙黏蛋白介导的黏附连接以及维持细胞极性。Lee 等<sup>[10]</sup>采用免疫胶体金标记试验也证明了 annexin 蛋白和一些紧密连接蛋白共定位于 MDCK 细胞的连接处,并且通过合成肽段干扰 annexin 蛋白异四聚体的形成,可以完全抑制紧密连接的形成。此外和该家族其他成员一样,annexin 蛋白与离子通道也密切相关。肾小管上皮细胞 TRPV5 Ca<sup>2+</sup> 通道(transient receptor potential cation channel subfamily V member 5) 的羧基端具有保守的 VATTV 序列,该序列和 annexin 蛋白的异四聚体相互作用,使异四聚体成为该离子通道的重要辅助蛋白<sup>[11]</sup>。

除此之外,annexin 与多种肾脏疾病相关。Kumar 等<sup>[12]</sup>发现 MDCK 细胞表面的 annexin 蛋白能够紧密结合草酸钙结晶,因而 annexin 蛋白在肾小管表面的异常暴露,有可能是导致肾结石形成的原因之一。Cheng 等<sup>[13]</sup>发现在急性肾功能衰竭时,annexin 蛋白和 S100A6 蛋白在肾小管损伤早期开始表达上调,并贯穿于整个急性肾衰过程,与病情进展相一致,推测它们是肾小管损伤与修复的传感器。在氨基三醋酸铁诱导的氧化性肾损害的肾

癌小鼠模型中,annexin 表达明显上调,并且通过调节细胞增殖、凋亡发挥作用<sup>[14]</sup>。此外,常染色体显性多囊肾病(autosomal dominant polycystic kidney disease,ADPKD)的囊肿衬里上皮细胞上annexin 和 annexin 蛋白表达明显升高,二者可能作为离子通道,参与囊肿液体的异常分泌。

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是最近几年发现和发展起来的一门新兴的在转录水平上的基因阻断技术<sup>[15]</sup>。它是一种双链 RNA(double-stranded RNA,dsRNA)分子在 mRNA 水平上关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程,也就是序列特异性的转录后基因沉默(posttranscriptional gene silencing,PTGS)。用于 RNA 干扰的有小干扰 RNA(small interference RNA,siRNA)和 shRNA,转染外源合成的 siRNAs 在转染 7 d 以后或者 10 次细胞分裂后会从 mRNA 抑制中恢复<sup>[16]</sup>,而用 shRNA 载体转染细胞,使哺乳动物细胞内基因表达长期沉默成为可能。它不仅将是研究基因功能的一种有力工具,而且可为特异性基因治疗提供新的技术手段。

本研究利用构建 annexin 基因 shRNA 表达载体,在 HEK293 细胞中验证其特异性抑制 annexin 表达的效果,为研究其在肾脏疾病中的作用,以及寻求基因治疗方法奠定基础。

## [参考文献]

[1] Rescher U, Gerke V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117 (Pt 13): 2631-2639.

[2] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking  $Ca^{2+}$  signaling to membrane dynamics[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 449-461.

[3] Okuse K, Malik-Hall M, Baker MD, et al. Annexin light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression[J]. *Nature*, 2002, 417: 653-656.

[4] Chiang Y, Rizzino A, Sibenthaler ZA, et al. Specific down-regulation of annexin expression in human cells interferes with cell

proliferation[J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 199 (1-2): 139-147.

[5] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 331-371.

[6] Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, et al. S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors[J]. *Front Biosci*, 2005, 10: 300-325.

[7] Markoff A, Gerke V. Expression and functions of annexins in the kidney[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289: F949-F956.

[8] Yamada A, Irie K, Hirota T, et al. Involvement of the annexin-S100A10 complex in the formation of E-cadherin-based adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 6016-6027.

[9] Benaud C, Gentil BJ, Assard N, et al. A HNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164: 133-144.

[10] Lee DB, Jamgotchian N, Allen SG, et al. Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287: F481-F491.

[11] van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D, et al. Functional expression of the epithelial  $Ca^{2+}$  channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex[J]. *EMBO J*, 2003, 22: 1478-1487.

[12] Kumar V, Farrell G, Deganello S, et al. Annexin is present on renal epithelial cells and binds calcium oxalate monohydrate crystals[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 289-297.

[13] Cheng CW, Rifai A, Ka SM, et al. Calcium-binding proteins annexin A2 and S100A6 are sensors of tubular injury and recovery in acute renal failure[J]. *Kidney Int*, 2005, 68: 2694-2703.

[14] Tanaka T, Akatsuka S, Ozeki M, et al. Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 3980-3989.

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

[16] Karagiannis TC, El-Osta A. siRNAs: mechanism of RNA interference, *in vivo* and potential clinical applications[J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3: 1069-1074.

[收稿日期] 2006-06-01 [修回日期] 2006-10-11  
[本文编辑] 贾泽军