

东北梅花鹿 *Galectin-1* 基因 RNAi 载体的构建

秦欣欣^{1,2}, 孙红梅², 褚文辉², 王大涛², 郭倩倩^{1,2}, 章秀婷², 李春义^{2*}

(1. 江苏科技大学生物与化学工程学院, 江苏 镇江 212018; 2. 中国农业科学院特产研究所,

吉林省特种经济动物分子生物学国家重点实验室培育基地, 长春 130112)

摘要: 构建东北梅花鹿 *galectin-1* 基因特异小分子干扰 RNA(shRNAs)真核干扰载体, 并获得稳定感染生茸区骨膜细胞系。设计 2 对 *galectin-1* mRNA 特异性 shRNAs, 两端分别带有 Cla I/Mlu I 酶切位点和一个 9 nt 发夹结构, 通过基因克隆技术将其插入真核表达质粒 pLVTHM 中, 构建 *galectin-1* shRNA 表达载体, 利用 PCR 和测序筛选出阳性质粒。将重组质粒与 PPAX 及 pMD2.G 共转染到 293 t 细胞中, 在倒置显微镜下观察转染效果并收集、浓缩病毒质粒, 感染生茸区骨膜细胞。结果表明, 成功构建东北梅花鹿 *galectin-1* 基因 RNAi 载体, 获得稳定传代被感染生茸区骨膜细胞系, 为进一步研究 *galectin-1* 基因在鹿茸再生中的作用奠定基础。

关键词: 鹿茸再生; *galectin-1* 基因; RNAi; 生茸骨膜细胞

中图分类号: S767.5; X172

文献标志码: A

文章编号: 1005-9369(2013)09-0057-06

秦欣欣, 孙红梅, 褚文辉, 等. 东北梅花鹿 *Galectin-1* 基因 RNAi 载体的构建[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(9): 57-62.

Qin Xinxin, Sun Hongmei, Chu Wenhui, et al. Construction of vector for northeast China deer *Galectin-1* gene RNAi[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(9): 57-62. (in Chinese with English abstract)

Construction of vector for northeast China deer *Galectin-1* gene RNAi/

QIN Xinxin^{1,2}, SUN Hongmei², CHU Wenhui², WANG Datao², Guo Qianqian^{1,2}, ZHANG Xiuting², LI Chunyi²(1. Biological and chemical engineering institute, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212018, China; 2. Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, CAAS, Changchun 130112, China)

Abstract: To construct the RNA interference eukaryotic expression vectors for the deer *galectin-1*, and establish the antlerogenic periosteal cell lines infected by RNAi vectors. Two pairs of small interfering RNAs targeting *galectin-1* mRNA were designed. With both ends are equipped with Cla I/Mlu I enzyme site and a 9 nt hairpin structure, through the gene cloning technology, constructing *galectin-1* shRNA expression vectors were inserted into the eukaryotic expression plasmid pLVTHM, The positive plasmids were screened by PCR and then sequenced. The recombinant plasmid with PPAX and pMD2.G was co-transfected into 293 t cells, the transfection effects were observed under an inverted microscope, the virus plasmids were collected and concentrated, and used to infect antlerogenic periosteal cells. RNAi eukaryotic expression vector of the deer *galectin-1* mRNA was successfully constructed. Establishment of the stably transfected antlerogenic periosteal cell lines may lay a foundation for the exploration of the roles of *galectin-1* in the antler regeneration.

Key words: antler regeneration; *galectin-1* gene; RNAi; antlerogenic periosteal cell

收稿日期: 2013-04-24

基金项目: 国家自然科学基金(31070878), 973 前期研究专项(2011CB111515)

作者简介: 秦欣欣(1984-), 女, 博士, 研究方向为鹿茸分子生物学。E-mail: nacy_101@126.com

*通讯作者: 李春义, 研究员, 博士生导师, 研究方向为鹿茸生长发育机制与鹿茸基因工程学研究, E-mail: lichunyi1959@163.com

Galectin-1 是动物半乳糖凝集素家族(Galectins)成员之一,在神经修复^[1]、血管再生^[2-3]、软骨形成^[4]及免疫反应^[5]等多个生理过程中发挥重要作用。有研究认为 galectin-1 在肿瘤细胞中起重要调控作用,与肿瘤发生有密切关系,研究发现 galectin-1 在鹿茸生茸区骨膜细胞(Antlerogenic periosteal cell, APC)/角柄骨膜细胞(Pedicle periosteal cell, PPC)中表达与普通面部骨膜细胞(Facial periosteal cell, FPC)中相比存在明显差异^[6],鹿茸每年周期性再生能保持令人惊异的速度而不癌变,且鹿茸周期性完全再生主要依赖鹿茸干细胞(鹿茸干细胞包括生茸区骨膜干细胞和角柄骨膜干细胞)^[7],推测 galectin-1 可能与鹿茸再生过程有紧密联系,起信号分子作用,而 galectin-1 在鹿茸中作用机制对癌症研究很有意义。RNA 干扰首先发现于秀丽隐杆线虫中,是 1998 年由 Fire 等发现转录后基因沉默机制^[8-9]。本试验旨在建立东北梅花鹿 galectin-1 基因 RNAi 载体,并获得稳定感染生茸区骨膜细胞,为 galectin-1 在鹿茸再生中的进一步研究奠定基础。

1 材料及方法

1.1 材料与试剂

病毒系统:慢病毒载体系统由北京大学医学部刘国庆教授惠赠。该慢病毒系统由 pLVTHM, PPAX 和 pMD2.G 三质粒组成。*E. coli* 1DH5 α 为碧云天购买;293 t, 吉林大学宋宇博士惠赠;T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶为 NEB 产品;小量质粒提取试剂盒、大量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒为 QIAGEN 产品;HP 转染试剂为罗氏产品;氨苄青霉素为 Amresco 产品。

1.2 方法

1.2.1 galectin-1 基因 RNAi 靶位点筛选

根据 Angela 和 The RNAi Consortium (TRC) RNAi 靶位点筛选法则,进行 shRNA 干扰载体设计。

通过 NCBI 上进行同源性比对(BLAST 分析),确定 galectin-1 基因干扰靶位点 83~101 nt 及 281~299 nt,并根据实验经验在 RNAi 靶序列两端分别接上 *Cla* I、*Mlu* I 酶切位点、内成环结构、终止信号等以成 shRNA 结构。

plv-G-1-sense: cgcgtcccc AGACGGACCTAAC-

CATCAA ttcaagaga TTGATGGTTAGGTCCGTCT tttt ggaaat; plv-G-1-antisense: cgatttcc aaaaa AGACG-GACCTAACCATCAA tctcttgaa TTGATGGTTAGGT CCGTCT gggga 3'; plv-G-2-sense: cgcgtcccc CCA AGAGCTTCTCG CTGAA ttcaagaga TTCAGCGA GAAGCTCTTGG tttt ggaaat; plv-G-2-antisense: cgatttcc aaaaa CCAAGAGC TTCTCGCTGAA tctcttgaa TTCAGCGAGAAGCTCTT GG gggga 3'

其中下划线处为酶切位点,两个酶切位点间序列为发夹结构。四条寡核苷酸单链由上海宝生物公司合成。

1.2.2 shRNA 退火

按照引物合成单每 1 OD shRNA 正义链/反义链溶于一定体积无菌双蒸水中配成最终浓度为 50 mmol·L⁻¹溶液,分别各取 1 μ L 单链加入 48 μ L 退火缓冲液中,混合后在 PCR 仪上进行退火反应。

1.2.3 重组质粒构建及鉴定

将经 *Cla* I 和 *Mlu* I 双酶切胶回收后 pLVTHM 与稀释 100 倍后退火产物按照 1:3 在 T₄ DNA 连接酶作用下进行连接。将连接产物加入到超级感受态 DH5 α 中,进行涂布培养,并挑取阳性菌株提取质粒,以 PCR 及 *Cla* I 和 *Mlu* I 双酶切鉴定,并测序进一步验证。

1.2.4 重组质粒包装

将 293 t 细胞进行复苏、传代培养,使细胞在转染日融合度达到 90%。整个实验分为四组:①空白对照组,转染脂质体;②p-293t 组,转染脂质体和 pLVTHM、PPAX、pMD2.G;③p-shRNA1 组,转染脂质体和 p-shRNA1、PPAX、pMD2.G;④p-shRNA2 组,转染脂质体和 p-shRNA2、PPAX、pMD2.G。具体步骤见罗氏公司 HP 转染试剂盒说明书。将细胞培养皿在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下进行培养,24 h 后倒置荧光显微镜下检测 GFP 表达情况以确定转染效率。

1.2.5 感染生茸区骨膜细胞

将转染 24、48 h 病毒进行收集、浓缩,用于感染生茸区骨膜细胞,72 h 后在荧光显微镜下观察感染结果。

2 结果与分析

2.1 shRNA 退火结果

化学合成 shRNA 正义及反义链在体外经过退

火后形成适合线性载体 DNA 短片段其结果如图 1 所示。1 号泳道为 shRNA 正义链，为 67 nt 寡核苷酸单链；2 号泳道为 shRNA 反义链，为 65 nt 寡核苷酸单链；由于两者均为寡核苷酸单链，所以电泳结果均拖带。3 号泳道为退火后产物，略小于 100 bp Maker，与试验预期(约 65 bp DNA 片段)相符。

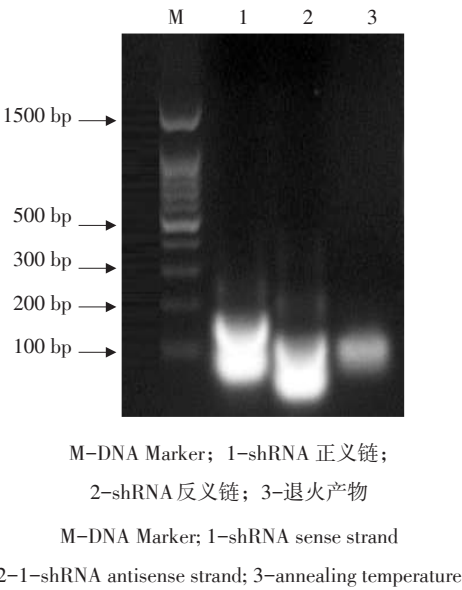


图1 shRNA 退火结果

Fig. 1 Gel electrophoresis of anealing shRNA

2.2 重组质粒构建及鉴定结果

重组后质粒和未处理空白质粒经 PCR 初步鉴定结果如图 2 所示。空白质粒 PCR 后条带长度与预期值(105 bp)相符，重组质粒 2 号和 3 号泳道 PCR 后条带长度与预期值(约 172 bp)相符，初步证明重组成功，通过测序进一步确定重组结果如图 3、4 所示。

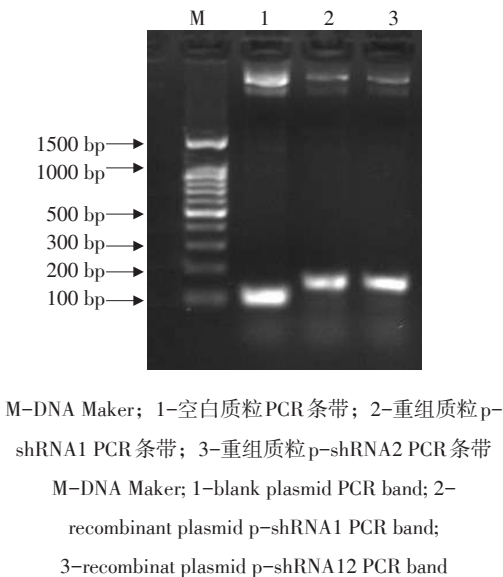


图2 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification results of PCR

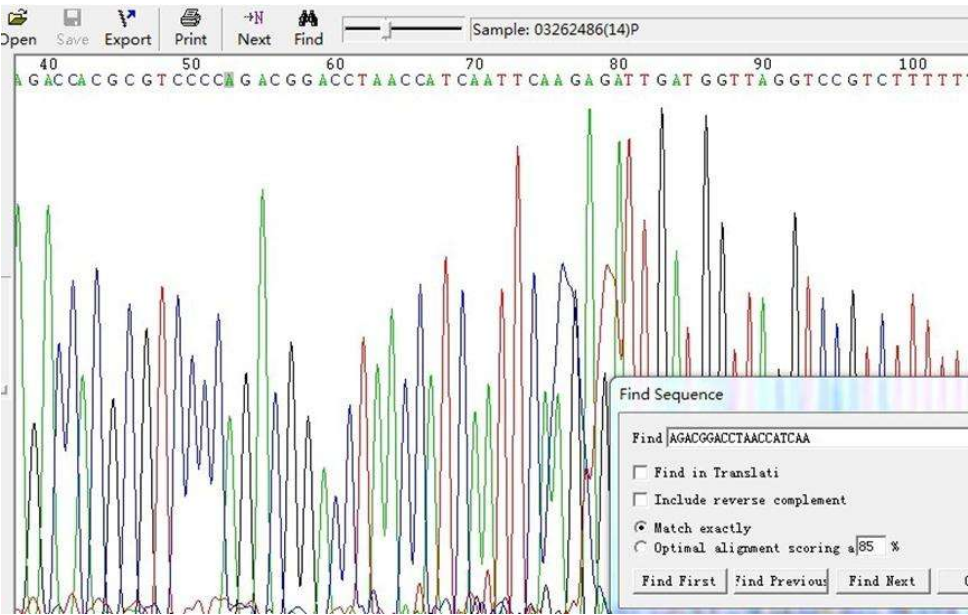


图3 插入 shRNA1pLVTHM 质粒测序结果部分序列

Fig. 3 Partial sequencing result of pLVTHM inserted shRNA1

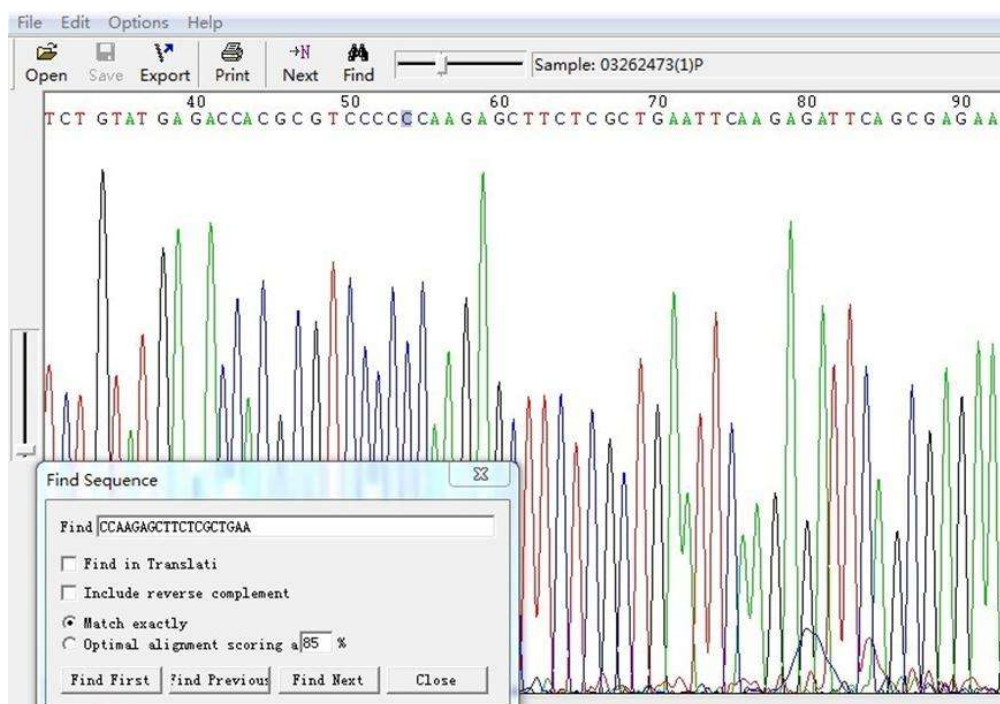


图4 插入shRNA2pLVTHM质粒测序结果部分序列

Fig. 4 Partial sequencing result of pLVTHM inserted shRNA2

2.3 重组质粒转染结果

在293 t细胞中进行HP转染试剂介导p-shRNA1/ p-shRNA2、psPAX2、pMD2.G慢病毒三质粒共转染结果如图5所示(彩版见封二)。转染24 h后,在倒置荧光显微镜下可观察到大量GFP荧光,且均匀分布于视野中,明暗交替无规则。在可见光下,293 t细胞生长旺盛、排列紧密、呈圆粒型,上清中无死细胞和细胞碎片。这说明质粒成功共转染293 t并包装成慢病毒粒子。

2.4 感染生茸区骨膜细胞结果

将收集、浓缩病毒加入到第三代生茸区骨膜干细胞中进行感染,72 h后在倒置荧光显微镜中观察到大量绿色荧光,约占细胞总数60%;在可见光下观察生茸区骨膜干细胞生长状态,并未发生畸变现象,结果如图6所示(彩版见封二)。

表明利用重组病毒成功感染生茸区骨膜干细胞,并获得能够稳定表达重组慢病毒系统生茸区骨膜干细胞。

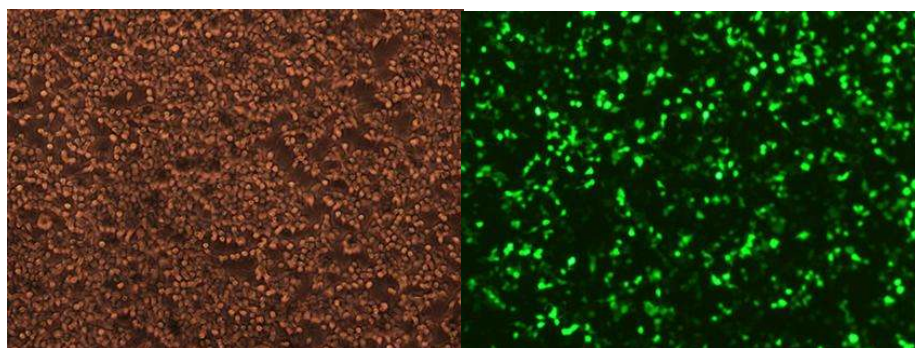


图5 三质粒共转染24 h后293 t细胞生长(右,光学显微镜)及GFP表达情况(左,荧光显微镜)

Fig.5 293 t cells at 24 h after co-transfection (right, light microscope)

GFP expression of 293 t cells 24 h after co-transfection (left, fluorescence microscope)

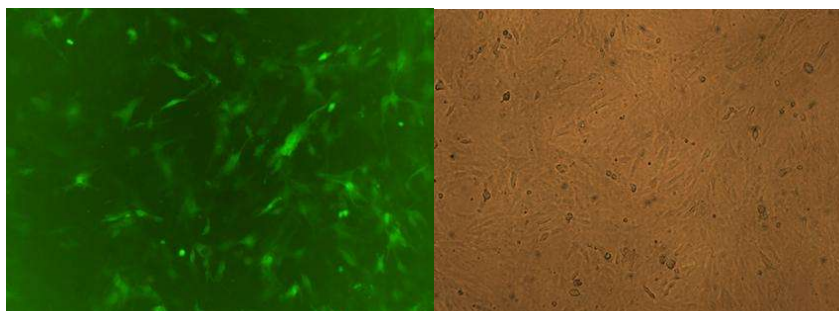


图6 感染生茸区骨膜细胞GFP表达(左, 荧光显微镜)及生长(右, 光学显微镜)情况

Fig. 6 Periosteal cells infected antler GFP expression (left) and growth (right)

3 讨论与结论

鹿茸是哺乳动物中唯一能够完全再生的附属器官, 鹿茸再生不同于蝾螈肢体再生, 通过组织学和形态学研究发现, 鹿茸再生源于角柄骨膜组织。角柄骨膜并非与生俱来是由生茸骨膜衍生而来, 进一步研究发现, 生茸区骨膜细胞和角柄骨膜细胞均为干细胞, 并进一步证明鹿茸再生是基于干细胞的过程。

Galectin-1是最先被报道的一种内源糖结合蛋白, 分子结构简单, 只有一个糖类识别结构域, 常以同源二聚体形式存在, 对 β -半乳糖苷具有亲和力和^[10], 可以作为多种癌症诊断指标^[11]。galectin-1与肿瘤发生、生长、迁移、血管再生等多个过程相关, 鹿茸再生过程包括鹿茸发生、生长、血管生成、神经再生、软骨形成等, 体外培养研究发现与FPC相比, galectin-1在APC中表达倍数为15, 在PPC细胞中表达倍数为20^[6], 而人体内galectin-1过表达一般会引发癌症, 鹿茸干细胞中galectin-1高表达, 却并未引起鹿茸组织癌变, 使其在鹿茸干细胞中研究至关重要^[12]。galectin-1在鹿茸再生过程中的作用, 以及未引起鹿茸组织癌变的原因值得关注。虽然生茸区骨膜只在初茸形成之前存在, 在鹿茸再生过程中是角柄骨膜在起作用^[13, 14], 但角柄骨膜是由生茸区骨膜转化而来^[15], 故将研究焦点首先放在APC中, 而表达倍数更高的PPC则是下一步研究对象。对APC中galectin-1进行RNA干扰, 可为研究APC与PPC之间差异原因, 推测其与鹿茸再生关系, 进一步解析鹿茸再生机制及癌症之谜奠定基础。

目前RNAi应用十分广泛, 是继基因敲除技术

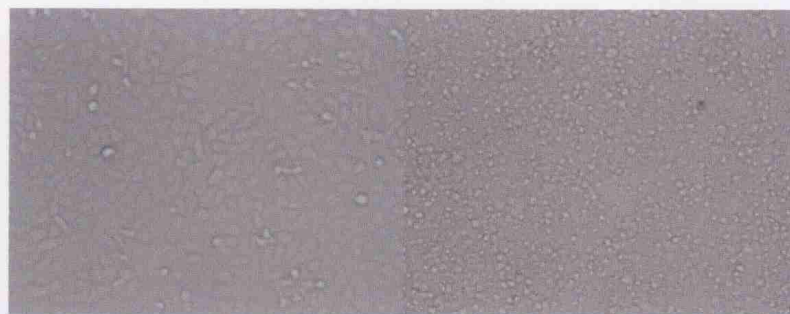
之后一项最有效的基因沉默技术, 也是一种比较成熟、易于操作技术。本试验研究方法与多种载体构建实验相似, 但所采用慢病毒三质粒系统经过多次试验选出, 具有较高转染效率, 质粒系统选择对试验成败至关重要。本试验创新点是成功筛选针对梅花鹿 *galectin-1* 基因 RNA 干扰的位点, 对鹿茸生茸区骨膜细胞中 *galectin-1* 基因进行干扰, 且感染APC可以进行稳定传代。虽然成功构建载体系统且成功感染APC, 但并未对干扰效果进行检测。

本试验成功筛选2对针对东北梅花鹿 *galectin-1* 基因特异小分子干扰RNA, 首次成功构建东北梅花鹿 *galectin-1* 基因 RNAi 慢病毒三质粒载体系统载体, 获得稳定传代被感染生茸区骨膜细胞系, 为鹿茸再生机制研究奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Fischer I, Jeschke U, Friese K, et al. The role of *galectin-1* in trophoblast differentiation and signal transduction[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2011, 90(1): 35-40.
- [2] 李富新, 何小玲, 付强, 等. Galectin-1 在胃癌组织中表达及在胃癌血管生成中作用[J]. 山东医药, 2010, 24: 15-17.
- [3] 邱达泰, 黄芝, 欧阳高亮, 等. 肿瘤血管生成促进因子和抑制因子[J]. 中国药物与临床, 2005(7): 485-488.
- [4] Marcon P, Marsich E, Vetere A, et al. The role of Galectin-1 in the interaction between chondrocytes and a lactose-modified chitosan[J]. Biomaterials, 2005, 26(24): 4975-4984.
- [5] Kovács-Sólyom F, Blaskó A, Fajka-Boja R, et al. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by *galectin-1*[J]. Immunology Letters, 2010, 127(2): 108-118.

- [6] Harper A, Li C. Identifying ligands for S100A4 and *galectin*-1 in antler stem cells[C]. New Zealand: Queenstown Molecular Biology Meetings, 2009.
- [7] Li C, Mackintosh C, Martin S, et al. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion[J]. Cell and Tissue Research, 2007, 328(1): 65-75.
- [8] 李成, 张滨丽, 李杰. RNAi 技术研究进展和发展前景[J]. 东北农业大学学报, 2005(3): 365-368.
- [9] 李丽文, 朱延明, 李杰, 等. RNAi 技术在植物功能基因组学中的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 200(1): 119-124.
- [10] Ion G, Fajka-Boja R, Toth G, et al. Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in *galectin*-1-induced cell death[J]. Cell Death and Differentiation, 2008, 12(8): 1145-1147.
- [11] Gaudet A, Leung M, Poirier F, et al. A role for *galectin*-1 in the immune response to peripheral nerve injury[J]. Experimental Neurology, 2009, 220(2): 320-327.
- [12] 秦欣欣, 孙红梅, 赵海平, 等. 半乳糖凝集素 1 蛋白及其生物学功能[J]. 中国畜牧兽医, 2012(6): 141-145.
- [13] Li C. Deer antler regeneration: A stem cell-based epimorphic process[J]. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2012, 96(1): 51-62.
- [14] Li C, Yang F, Sheppard A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration- insights from studying annual renewal of deer antlers[J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2009(4): 237-251.
- [15] Li C, Harper A, Puddick J, et al. Proteomes and signalling pathways of antler stem cells[J]. Proteomes in Antler Stem Cells, 2012, 7(1): 1-11.



A-细胞对照组

B-PEDV(1:100稀释)感染VERO细胞



C-细胞对照组免疫荧光

D-rS1636-789多抗血清与
PEDV特异性绿荧光反应

图5 PEDV感染VERO细胞的免疫荧光检测抗体特异性

Fig.5 Immunofluorescence analysis of PEDV infected VERO cell

任晓峰等：猪流行性腹泻病毒S1蛋白截短表达及多抗制备. 2013, 44(9): 46-50.

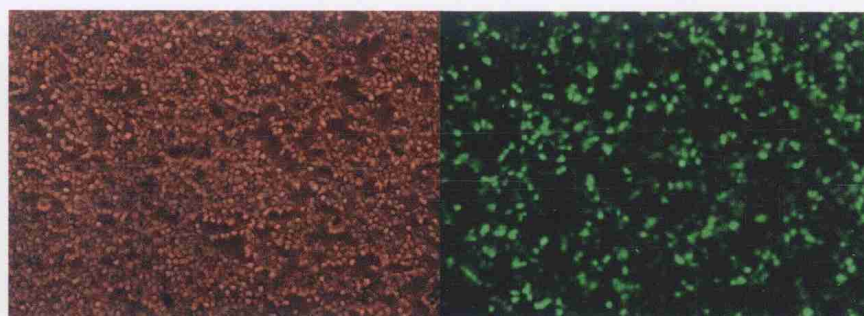


图5 三质粒共转染24 h后293 t细胞生长(右, 光学显微镜)及GFP表达情况(左, 荧光显微镜)

Fig.5 293 t cells at 24 h after co-transfection (right, light microscope)

GFP expression of 293 t cells 24 h after co-transfection (left, fluorescence microscope)



图6 感染生茸区骨膜细胞GFP表达(左, 荧光显微镜)及生长(右, 光学显微镜)情况

Fig. 6 Periosteal cells infected antler GFP expression (left) and growth (right)

秦欣欣等：东北梅花鹿 *Galectin-1* 基因 RNAi 载体的构建. 2013, 44(9): 57-62.