

小鼠 *Bicc1* 基因 RNAi 序列的筛选与鉴定

周亮^{1,2}, 杨君兴^{1,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 通过网上提供的生物信息学分析软件进行搜索和比对, 初步筛选到3个较好的针对小鼠双尾-C (*Bicc1*) 基因的RNA干扰 (RNAi) 序列。合成这3个干涉序列片段后克隆到pRS-Hush shRNA载体中。构建*Bicc1*基因的真核表达载体pEGFP-C3-*Bicc1*, 将绿色荧光蛋白(GFP)标签标记在*Bicc1*蛋白上。利用细胞转染技术将pEGFP-C3-*Bicc1*与3个干涉序列载体共转染至体外培养的HEK-293细胞中, 最后通过细胞荧光强度、半定量PCR和Western blotting鉴定出其中两个序列(pRS-Hush-RNAi-*Bicc1*-N/-C)能明显降低*Bicc1*蛋白在HEK-293细胞中的表达水平, 为下一步建立起低表达*Bicc1*的稳定细胞株和研究小鼠*Bicc1*的功能提供了良好的材料。

关键词: 小鼠*Bicc1*基因; RNA干扰; pRS-Hush; pEGFP-C3-*Bicc1*; 转染

中图分类号: Q344; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2010)01-0084-05

Screening and Identification of Mouse *Bicc1* RNAi

ZHOU Liang^{1,2}, YANG Jun-Xing^{1,*}

(1. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Based on the online bioinformatics analysis and alignment results, three RNAi sequences target to the *Mus musculus Bicc1* gene were obtained. The three interference fragments were synthesized and cloned into pRS-Hush shRNA Vector. The *Bicc1* eukaryotic expression vector pEGFP-C3-*Bicc1* was constructed, tagging the GFP to the N-terminal of the *Bicc1* protein. The pEGFP-C3-*Bicc1* and three pRS-Hush-RNAi were co-transfected into the cultured HEK-293 cells line, respectively. The two RNAi (pRS-Hush-RNAi-*Bicc1*-N/-C) that could knock-down the *Bicc1* expression levels in HEK-293cells significantly were confirmed by cell immunofluorescent staining, semi-quantitative PCR and Western blotting. The results demonstrate that we have successfully obtained two efficient *Bicc1* RNAi sequences, which lays a foundation for further studying on the construction of *Bicc1* knock-down stable cell lines and biological function of mouse *Bicc1* product.

Key words: Mouse *Bicc1* gene; RNAi; pRS-Hush; pEGFP-C3-*Bicc1*; Transfect

小鼠的 *Bicc1* 基因定位于 10 号染色体的 C1 区域, 其蛋白质 N 端含有 KH 结构域, 用于介导蛋白质与 RNA 的相互作用; C 端的 SAM 结构域则在蛋白质与蛋白质相互结合中发挥作用 (Michele et al, 1995; Wessely et al, 2001; Bouvrette et al, 2008; Schultz et al, 1997)。目前已发现 3 种与 *Bicc1* 基因相关的小鼠突变体模型——jcpk、bpc 和 67Gso, 这些小鼠突变体中 *Bicc1* 基因在不同位点发生突变, 产生异常的蛋白质产物, 结果导致小鼠肾脏发生胞囊化, 并且影响身体其他器官的正常形态及功能, 病理表型特征与人类的多囊肾病极为相似

(Cogswell et al, 2003; Chittenden et al, 2002)。因此, *Bicc1* 小鼠突变体模型已经成为研究人类多囊肾病的重要工具。研究表明, *Bicc1* 突变体会导致纤毛形成异常以及胞囊的形成, 因而推测 *Bicc1* 可能是负责维持表皮细胞动态平衡的信号通路的成分之一 (Zhou et al, 2008; Nauta et al, 1993)。本文部分研究希望能够找到 *Bicc1* 基因的有效 RNAi 序列, 通过 RNAi 诱发的基因沉默现象来建立 *Bicc1* 低表达的稳定细胞株, 从而通过研究这些细胞形态结构以及功能的变化来揭示 *Bicc1* 基因对于细胞正常生长增殖的必要性, 以及缺失该蛋白后细胞出现的异常

变化。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的基因沉默现象。当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时, 该 mRNA 发生降解而导致基因表达水平下降 (Tuschl et al, 2002; Srensen et al, 2003)。近几年来 RNAi 研究取得了突破性进展, 使用 RNAi 技术可以特异性剔除或关闭靶标基因的表达, 所以该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。

我们通过设计针对 *Bicc1* 基因 3 个不同部位的 RNAi 序列, 合成相应的 shRNA, 将 pEGFP-C3-*Bicc1* 与不同的干涉序列载体共转染。通过 GFP 荧光强度改变、半定量 PCR (semi-quantitative PCR, SQ-PCR) 和 Western blotting 鉴定出其中两个序列 (pRS-Hush-RNAi-*Bicc1*-N/-C) 能明显降低体外培养的 HEK-293 细胞瞬时转染 *Bicc1* 后的该蛋白表达水平, 从而得到了两个高效能的能明显降低细胞内 *Bicc1* 蛋白表达水平的 RNAi 序列, 并以此为基础建立稳定的 *Bicc1* 低表达的细胞系, 为进一步研究 *Bicc1* 蛋白对细胞发育生长增殖以及迁移的重要性作用提供了良好的材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Bicc1 基因和兔源 *Bicc1* 的抗体由中国医学科学院肿瘤医院中心实验室吴冠青教授课题组制备并得到验证 (Dai et al, 2008); DH5a 大肠杆菌菌株和人胚肾细胞 HEK-293 细胞由实验室保存; pRS-Hush 载体产品购于 OriGene 公司 (含阳性对照和阴性对照质粒); 三条靶标 dsDNA 以及 PCR 引物都由 Takara 公司合成; 质粒提取和胶回收试剂盒购于天根; 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购于 Takara; 胎牛血清和高糖 DMEM (Gibco); Opti-MEM (GIBCO); 脂质体 2000 和 Trizol 购自 Invitrogen 公司; PCR 相关的试剂盒购自天根公司。

1.2 构建 *Bicc1* 的真核表达载体 pEGFP-C3-*Bicc1*

构建此载体是为了得到带有 GFP 荧光标签的 *Bicc1* 融合蛋白, 因而可以通过 GFP 的荧光强度得知 *Bicc1* 蛋白的相对表达量, 同时还可以通过荧光计算出 HEK-293 细胞的转染效率。

1.3 通过 pRS-shRNA 载体构建 *Bicc1*-RNAi 的策略

通过 pRS-Hush 载体构建 *Bicc1*-RNAi 的策略如图 1。具体步骤如下:

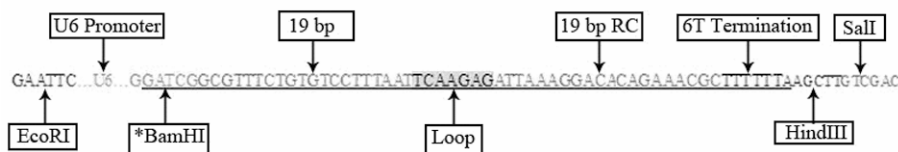


图 1 通过 pRS-Hush 载体构建 *Bicc1*-RNAi 的策略示意图

Fig. 1 The construction of the *Bicc1*-RNAi by pRS-Hush vector

① RNAi 干扰序列设计首先通过 PubMed 搜索 *Bicc1* 基因的 mRNA 序列 (AF319464, 长度为 3 112 bp), 然后通过 Genhunter、Invitrogen、Genscript、Qiagen、Ambion 等公司网站提供的软件, 设计多个 RNAi 序列, 根据设计经验进行评估测定, 选择最佳的动力学参数 3 个靶点进入后续实验流程。

pRS-Hush-RNAi-*Bicc1* 的 3 段干涉序列如下:

RNAi-*Bicc1*-N: GATCGGCGTTTCTGTGTCCTTAAATCAAGAGATTAAAGGACACAGAAACGCTTTTTTA; RNAi-*Bicc1*-M: GATCGCAGGCCA-CATTAACCAATATTCAAGAGATATTGGTTAATGTGGCCTGTTTTTTA; RNAi-*Bicc1*-C: GATCGC-CAACCACGTATCCTATAATTCAAGAGATTATAG

GATACGTGGTTGGTTTTTTA.

② 将合成的寡核苷酸正义链与反义链, 在退火缓冲液中进行连接成双链结构, 同时用内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III, 对 pRS-Hush 载体进行酶切、电泳、纯化, 回收线性化载体片段。

③ 回收的载体片段与退火形成的 RNAi 寡核苷酸双链进行连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5a, 转化后的 DH5a 在含氨苄青霉素的 LB 培养板上 37°C 培养过夜。

④ 酶切鉴定正确插入 shRNA 的克隆: 直接挑取转化后的单菌落, 摇菌培养后提质粒, 用 *Bam*HI 酶切鉴定是否正确插入有效的 shRNA 序列。shRNA 插入到 pRS-Hush 载体上后, *Bam*HI 的酶切位点将丧

失 (GGATCC变为GATCG), 因此BamHI不能将正确插入shRNA后的pRS-Hush载体切开。

⑤ 挑选阳性克隆菌液送测序, 测序引物为5'-ACGATACAAGGCTGTTAGAGAG-3'。

1.4 HEK-293细胞的培养与转染

人胚肾细胞HEK-293的培养于高糖DMEM+10%胎牛血清, 37°C, 5%CO₂孵箱。转染前1天接种细胞于6孔板, 每孔接种1×10⁶个细胞于2 mL Opti-MEM。转染实验分为A、B、C、D、E组, 其中A、B组为对照组, A组用于检测细胞中Bicc1蛋白的本底表达量, 共转染pEGFP-C3-Bicc1与pRS-Hush载体; B组共转染pEGFP-C3-Bicc1与RNAi-GFP, 检测对照质粒干涉GFP mRNA后Bicc1-GFP表达量的下降。实验组为pEGFP-C3-Bicc1分别与RNAi-Bicc1-N、-M、-C共转染。转染24 h后倒置荧光显微镜下观察荧光表达强度并拍照。各组加两种质粒的质量比为pEGFP-C3-Bicc1:pRS-Hush为5:1。

1.5 半定量PCR分析

如上方法转染48 h后, 按照Trizol试剂盒说明书提取各组HEK-293细胞总RNA; 逆转录得到cDNA; 以GAPDH为内参, PCR扩增GAPDH与Bicc1; 电泳检测条带。其中Bicc1上游引物为: 5'-GGAGTGGAGCGAGGAGC-3', 下游为: 5'-GCTCGGCTGTTGGGC-3', 产物大小为1 045 bp; GAPDH上游引物为5'-CCATGTTCGTCATGGGTGTGA-3', 下游为5'-CATGGATGTGGTCATGAGT-3', 产物大小为245 bp。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在成像系统下分析。用BandScan软件分析Bicc1和GAPDH条带光密度的相对值, 以A组阳性对照值为1, 计算出各组相对百分比。

1.6 Western Blotting 检测各组目的基因表达水平

如上方法转染48 h后提取HEK-293细胞总蛋白, 加适量的裂解液冰上放置30 min, 转至EP管中, 离心15 min后收集上清, BCA法定量后上样SDS-PAGE胶, 转膜至PVDF, 5%奶粉/PBS室温封闭1 h, 加兔源Bicc1多抗(1:500)室温1 h, 羊抗兔二抗, 室温30 min。TBS-T轻摇洗膜后,ECL显色, X-film曝光, 显影, 定影。

2 结果

2.1 将全长Bicc1基因插入真核表达载体pEGFP-C3

通过酶切和测序鉴定pEGFP-C3-Bicc1质粒构建成功, 并通过转染至HEK-293细胞中, 计算出大约有80%以上的细胞均带荧光, 说明转染效率很高。

2.2 通过观察瞬时转染后HEK-293细胞的荧光强度来验证干涉的效果

通过pEGFP-C3-Bicc1质粒与各组pRS-Hush-RNAi及对照载体瞬转六孔板培养的HEK-293细胞, 24 h后于倒置荧光显微镜下观察荧光表达强度(图2), 可以观察到阴性对照B组RNAi-GFP能明显减弱pEGFP-C3-Bicc1的荧光强度, 而作为阳性对照的pRS-Hush空载的共转染荧光强度则很高。RNAi-Bicc1-M干涉Bicc1-GFP效果不明显, 而RNAi-Bicc1-N与RNAi-Bicc1-C有很明显的干涉效果(图2C,D,E)。

2.3 半定量PCR(SQ-PCR)分析瞬时转染后HEK-293细胞的Bicc1 mRNA表达量

反转录PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在成像系统下分析, 然后用BandScan软件分析得到Bicc1和GAPDH条带光密度的相对值, 以A组阳性对照值为1.00, 计算出各组相对A组的光密度相对值。结果显示(图3), pRS-Hush-RNAi-Bicc1-N与pRS-Hush-RNAi-Bicc1-C的干涉效果明显, Bicc1/GAPDH比值分别比A组对照降低了86%和82%。

2.4 通过Western blotting检测瞬时转染后HEK-293细胞的Bicc1蛋白表达量

通过pEGFP-C3-Bicc1质粒与干涉载体pRS-Hush-RNAi-Bicc1-N/-C/-M分别共转染HEK-293细胞, 48 h后抽提细胞总蛋白做Western blotting, 检测Bicc1-GFP(约130 K)。由图4观察到HEK-293细胞本身并没有Bicc1-GFP表达, RNAi-GFP与RNAi-Bicc1-N/-C能明显降低pEGFP-C3-Bicc1蛋白的表达量, 而作为对照的pRS-Hush空载共转后的pEGFP-C3-Bicc1的融合蛋白的表达量则很高。

3 讨论

小鼠mBicc1蛋白是高度保守的Bic-C蛋白家族成员, 含有3个用于介导蛋白质与RNA的相互作用的KH结构域和一个在蛋白质与蛋白质相互作用中发挥作用的C端的SAM结构域。Bicc1基因突变与小鼠多囊肾的形成密切相关, 提示人的Bicc1蛋白可能与人类多囊肾疾病的发生相关。因

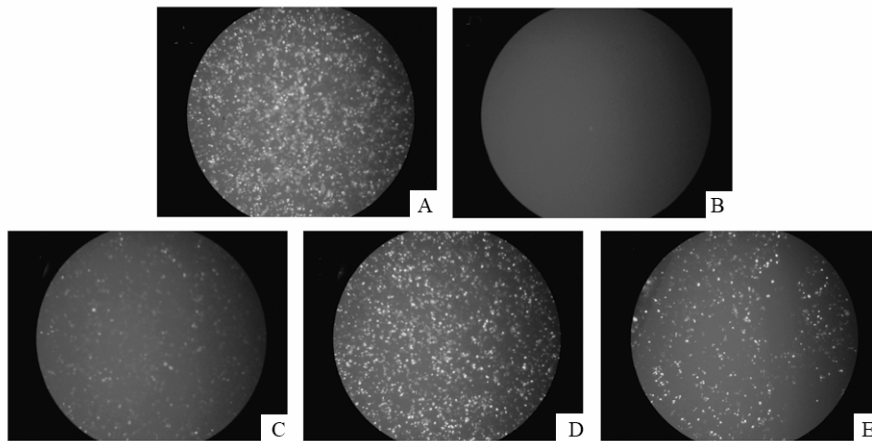


图 2 pEGFP-C3- *Bicc1* 质粒与 pRS-Hush-RNAi 干扰载体共转 HEK-293 细胞后的荧光图

Fig. 2 The fluorescence of HEK-293 co-transfected with the pEGFP-C3-*Bicc1* and pRS-Hush-RNAi pEGFP-C3-*Bicc1* 分别与 A: pRS-Hush 载体; B: RNAi-GFP; C: RNAi-*Bicc1*-N; D: RNAi-*Bicc1*-M; E: RNAi-*Bicc1*-C 共转染。
pEGFP-C3-*Bicc1* was co-transfected with A: pRS-Hush vector; B: RNAi-GFP; C: RNAi-*Bicc1*-N; D: RNAi-*Bicc1*-M; E: RNAi-*Bicc1*-C.

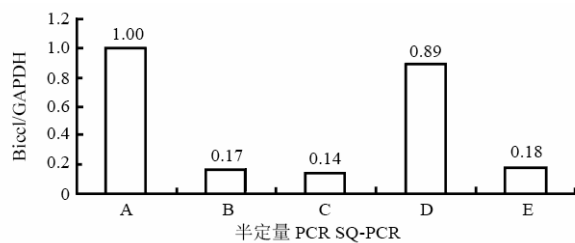


图 3 pEGFP-C3- *Bicc1* 质粒与 pRS-Hush-RNAi 干扰载体共转 HEK-293 细胞后的 SQ-PCR 图

Fig. 3 The SQ-PCR of HEK-293 co-transfected with the pEGFP-C3-*Bicc1* and pRS-Hush-RNAi

A: pRS-Hush 空载体; B: RNAi-GFP; C: RNAi- *Bicc1*-N; D: RNAi-*Bicc1*-M; E: RNAi- *Bicc1*-C.

A: pRS-Hush vector; B: RNAi-GFP; C: RNAi-*Bicc1*-N; D: RNAi-*Bicc1*-M; E: RNAi- *Bicc1*-C.

此, 可以通过对小鼠 *Bicc1* 的研究来揭示人类多囊肾病的发生机理。有文献推测认为 *Bicc1* 可能是通过其 KH、SAM 结构域与其他蛋白或 RNA 形成复合体并介导基因表达调控, 从而在肾脏发育中起着至关重要的作用(Michele et al, 1995; Wessely et al, 2001; Bouvrette et al, 2008)。小鼠 *Bicc1* 蛋白在细胞内的表达已经得到前人文献的证实。通过过表达和低表达以及敲除等方法来改变原有的天然状态下 *Bicc1* 蛋白的表达水平, 从而得到非正常的细胞株, 可以用于研究由此产生的细胞表型以及功能的变化。

在小鼠中, 考虑到 *Bicc1* 的功能域, 似乎 *Bicc1* 蛋白不太可能在纤毛形成的过程中起到结构上的

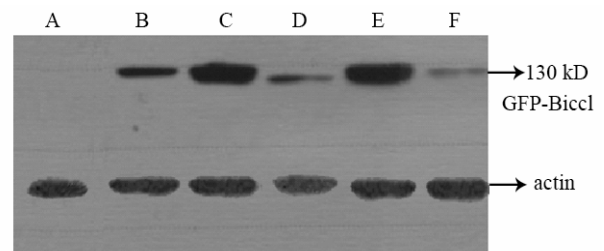


图 4 pEGFP-C3- *Bicc1* 质粒与 pRS-Hush-RNAi 干扰载体共转 HEK-293 细胞后的 W-B

Fig. 4 The W-B of HEK-293 co-transfected with the pEGFP-C3-*Bicc1* and pRS-Hush-RNAi

A: HEK-293 细胞; B: RNAi-GFP; C: pRS-Hush 空载体; D: RNAi-*Bicc1*-N; E: RNAi-*Bicc1*-M; F: RNAi- *Bicc1*-C.

A: HEK-293 cell; B: RNAi-GFP; C: pRS-Hush vector; D: RNAi- *Bicc1*-N; E: RNAi- *Bicc1*-M; F: RNAi- *Bicc1*-C..

作用, 但是 *Bicc1* 可能影响纤毛发生相关 mRNA 的定位, 或是在纤毛蛋白的转录抑制中起作用。*Bicc1* 突变体会导致纤毛形成的异常并导致胞囊的形成, 因而推测 *Bicc1* 可能是负责维持表皮细胞动态平衡的信号通路成分(Zhou et al, 2008; Nauta et al, 1993)。

RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达, 近几年来 RNAi 的研究取得了突破性进展, 该技术已被广泛用于探索基因功能及疾病的基因治疗领域。本文所设计的 siRNA 主要依照下列原则: 从起始密码下游 50~100 nt 开始, 避开 5'端或 3'端的非翻译区(UTR)。搜索 AA(N19)序列; 有义链 1 位为 G 或 C, 19 位为 A 或 U。双链 5'端能量应比

3'端高,即有义链15~19位至少有3个A或U,或13~19位至少有5个A或U;siRNA 5'端须磷酸化,3'端有两个dTdT,对mRNA目标区域进行二级结构预测,排除那些作用于复杂二级结构的siRNA序列;Blast对照,并进一步用mRNA相似性软件或脱靶控制软件筛选,把脱靶控制到最低水平;避免出现连续的多个G或C,GC含量最好为35%~50%。

我们通过设计针对Bicc1基因3个不同部位的RNAi序列,通过瞬时转染后观察荧光强度,SQ-PCR和Western-Blot来选择最佳的干扰序列,

结果找到了两个较好的干扰序列,分别为pRS-Hush-RNAi-Bicc1-N与pRS-Hush-RNAi-Bicc1-C。通过SQ-PCR实验,发现这两个片段的干扰效果达到80%以上;通过Western blotting检测瞬转后Bicc1的表达,也同样验证了这两个序列能够有效抑制Bicc1表达。其中RNAi-Bicc1-N序列位于Bicc1 mRNA的732 bp, RNAi-Bicc1-C序列位于Bicc1 mRNA的2358 bp处。该研究为得到了高效率的Bicc1蛋白低表达的细胞株奠定了基础,从而为进一步研究Bicc1蛋白对细胞发育生长增殖以及迁移的重要性作用提供了良好的材料。

参考文献:

- Bouvrette DJ, Price SJ, Bryda EC. 2008. K homology domains of the mouse polycystic kidney disease-related protein, Bicaudal-C (Bicc1), mediate RNA binding *in vitro* [J]. *Nephron Exp Nephrol*, **108** (1): e27-34.
- Chittenden L, Lu X, Cacheiro NL, Cain KT, Generoso W, Bryda EC, Stubbs L. 2002. A new mouse model for autosomal recessive polycystic kidney disease. [J]. *Genomics*, **79**(4): 499-504.
- Cogswell C, Price SJ, Hou X, Guay-Woodford LM, Flaherty L, Bryda EC. 2003. Positional cloning of jcpk/bpk locus of the mouse [J]. *Mamm Genome*, **14**(4): 242-249.
- Dai BZ, Zhou L, Fu YL, Ding ZW, Li Y, Wu GQ. 2008. Preparation and characterization of an anti-Bicc1 polyclonal antibody [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, **24**(11): 1106-1110. [戴宝贞, 周亮, 付玉龙, 丁振伟, 李煜, 吴冠青. 2008. 小鼠双尾C蛋白的多克隆抗体的制备及特异性鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, **24**(11): 1106-1110.]
- Michele M, Saffman EE, Lasko PF. 1995. Localized Bicaudal-C RNA encodes a protein containing a KH domain, the RNA binding motif of FMR1 [J]. *EMBO J*, **14**(9): 2043-2055.
- Nauta J, Ozawa Y, Sweeney WE Jr, Rutledge JC, Avner ED. 1993. Renal and biliary abnormalities in a new murine model of autosomal recessive polycystic kidney disease [J]. *Pediatr Nephrol*, **7**(2): 163-172.
- Schultz J, Ponting CP, Hofmann K, Bork P. 1997. SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation [J]. *Protein Sci*, **6**: 249-53.
- Srensen DR, Leirdal M, Sioud M. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice [J]. *J Mol Biol*, **327**(4): 761-766.
- Tuschl T. 2002. Expanding small RNA interference [J]. *Nat Biotechnol*, **20**: 446-448.
- Wessely O, Tran U, Zakin L, De Robertis EM. 2001. Identification and expression of the mammalian homologue of Bicaudal-C [J]. *Mech Dev*, **101**(1-2): 267-270.
- Zhou L, Dai BZ, Wu GQ. 2008. Molecular characteristics and functions of Bicaudal-C [J]. *Int J Genet*, **13**(6): 432-435. [周亮, 戴宝贞, 吴冠青. 2008. Bicaudal-C 基因分子特征和生物功能. 国际遗传学杂志, **13**(6): 432-435.]