

针对 DREAM 基因序列外显子的 siRNA 设计 *

张永福¹ 项红兵² 毕小宝¹ 劳建新¹ 姚 侠¹ 程秋菊¹

(1 广州市妇女儿童医疗中心麻醉科 广东 广州 510180 ;2 广东省中医院麻醉科 广东 广州 510180)

摘要 目的:针对 DREAM 基因中外显子序列,设计并筛选出起作用的 siRNA,为进一步研究以 DREAM 为靶标的基因治疗提供依据。方法:通过利用生物信息学的方法设计出 66 条潜在的针对 DREAM 基因中外显子序列的 siRNA 序列。潜在的序列根据 G+C 含量分析及 Genbank BLAST 检测,我们筛选了三条较理想的 DREAM 基因 siRNA 靶标,并将其构建到 pENTR/H1/TO 载体中,转染细胞后提取总蛋白并用 Western blot 方法检测 DREAM 蛋白的表达水平。结果:示外显子 9 中 5' 末端位置为 1253 的序列能够抑制 80% 的 DREAM 的蛋白表达。结论:这一研究结果为进一步 siRNA 类药物的实验研究提供了理论基础。

关键词 DREAM; 外显子; siRNA

中图分类号 R-058, Q75, Q78 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)01-42-04

Design of siRNA focusing on the exons of DREAM gene*

ZHANG Yong-fu¹, XIANG Hong-bing², BI Xiao-bao¹, LAO Jian-xin¹, YAO Xia¹, CHENG Qiu-ju¹

(1 Department of Anesthesiology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, 510180, Guangzhou, China;

2 Department of Anesthesiology, Guangdong provincial hospital of TCM, 510180, Guangzhou, China)

ABSTRACT Objective: According to the sequence of exons in the DREAM gene, functional siRNA was designed and screened. This provides a theoretical basis on the further study of DREAM-targeted gene therapy. **Methods:** Focusing on the exons of DREAM gene respectively, 66 siRNA candidate targets were obtained following bioinformatics methods. Three ideal siRNA targets were further screened according to the contents of G+C and Genbank BLAST analysis, and they were constructed into the pENTR/H1/TO vector, the constructs were then transfected into cells, the total proteins were extracted and to detect the expression of DREAM protein using Western blot analysis. **Results:** The sequence located in exon 9 whose 5' end location is 1253 can inhibit 80% expression of DREAM protein. **Conclusion:** It would lay a foundation for the further experimental researches on the siRNA-like drug design for the DREAM.

Key words: DREAM; Exons; Small interfering RNA

Chinese Library Classification: R-058, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-42-04

前言

内源性镇痛系统大部分依赖于阿片与其相关受体的结合,进而调节伤害性疼痛信号在神经系统的传导^[1]。内源性阿片肽包括脑啡肽、 β -内啡肽、强啡肽、孤啡肽和内阿片肽,其中脑啡肽主要作用于 δ 受体, β -内啡肽和内阿片肽主要作用于 μ 受体,而强啡肽则特异性作用于 κ 受体^[2]。近年来由于发现了对编码强啡肽的前强啡肽基因转录具有反式阻抑作用的下游调控元件拮抗剂调节子(downstream regulatory element antagonistic modulator, DREAM),因而 DREAM-强啡肽通路成为当前慢性疼痛研究的热点^[3,4]。研究表明,内源性强啡肽对选择性 κ 阿片受体的活化是 DREAM 基因缺失小鼠出现疼痛性反应减少的原因,此提供了一个疼痛调控的新范例,也阐明了 DREAM 在疼痛调控中扮演转录抑制物的角色^[5]。因此, DREAM 的抑制物可能成为疼痛治疗的新进展。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指真核细胞中双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)介导的同源 mRNA 降解的

一种高度保守的转录后基因沉默机制(post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[6],是近年来产生的特异性高效基因阻断生物技术,是一种简单的代替基因敲除的分子生物学研究工具。RNAi 作用的基本原理是一些双链 siRNA (small interfering RNA) 结合一个核酶复合物形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上并切割它,从而阻断目的基因转录,并产生相应的功能表型缺失^[7]。双链 RNA(dsRNA)在体内无法稳定表达,人们发现短发夹样 RNA (short hairpin RNA, shRNA)可以发挥与双链 RNA 相同的作用,故目前研究集中在设计短发夹样 RNA(shRNA)序列,进而制备特异性 siRNA。本课题组已经成功设计和制备用于沉默 DREAM 基因表达的 shRNA,现介绍如下。

1 资料和方法

1.1 文献检索

在 PubMed 网站 Genbank 中页面,点击 Search 中的

* 基金项目 广州市医药卫生科技项目(2009-YB-063)

作者简介 张永福(1964-)男,本科,主任医师,主要研究方向:麻醉与疼痛治疗

电话:020-81330398 E-mail: zyongfu@126.com

(收稿日期:2011-06-29 接受日期:2011-07-23)

"CoreNucleotide" 在 "for" 后填写 "DREAM" ,点击 "Go" 即可见到 DREAM 相应的基因组数据库页面,共查找找到相关的 DREAM 基因序列 75 种,其中人类(*Homo sapiens*)22 种、小鼠(*Mus musculus*)21 种、犬狼属(*Canis lupus familiaris*)5 种、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)4 种、(*Drosophila pseudoobscura*)特异果蝇属 3 种、其他种属 20 种。选择 Genbank 中小鼠 DREAM 基因编码区序列作为分析序列,序号为 NM_019789,全长为 2732 bp,设计出多对针对 DREAM 基因的发夹寡核苷酸序列。

DREAM 是一个含有 256 个氨基酸残基的蛋白,主要表达在哺乳类动物的中枢神经系统,属于 EF 模体(EF-hand)超家族的恢复蛋白(recoverin)亚类的一员^[8],其 N 末端(1-70 残基)不受钙离子的影响,与下游调控元件(downstream regulatory element,DRE)非特异性的结合,而 C 末端(65-256 残基)中含有 4 个 EF 模体,后者与钙调素、肌钙蛋白以及恢复蛋白中的钙离子结合位点相似,能够在钙离子的调节下特异性结合 DRE 序列^[9,10]。基于最新的研究进展,从转录本(mRNA)的 AUG 起始密码开始,寻找 "AA" 二连序列,并记下其碱基序列,依据以下方法设计针对 DREAM 基因 (Genbank NM_019789)siRNA 的成对候选靶序列:长度为 19nt,5' 末端结构为 AA 二连序列;候选 66 条 siRNA 序列进行 G+C 含量分析及 Genbank BLAST 分析:G+C 含量接近 50%,不含 TTT 或 GGG 碱基序列,经 BLAST 数据库分析,与其他分子无同源序列。

1.2 pENTR/H1/TO-DREAM RNAi 重组质粒的构建及 RNAi 验证

1.2.1 实验材料与试剂 寡核苷酸片段由上海英骏公司合成,BLOCK-iT Inducible H1 RNAi entry vector kit,T4 连接酶及 Lipofectamine 2000、大肠杆菌株 TOP10 均购自 Invitrogen 公司(美国)。培养基 DMEM 和 Opti-MEM 购自 GIBCO 公司(美国),LB 培养基购自 Invitrogen 公司,Axy-prep Plasmid Miniprep Kit 购自 Axygen 公司,anti-DREAM antibody 购自美国 abcam 公司,Anti-actin 购自美国 Cell Signaling Technology 公司保存。

1.2.2 pENTR/H1/TO-DREAM RNAi 重组质粒的构建 根据 BLOCK-iT Inducible H1 RNAi entry vector kit 的说明书设计合成针对 DREAM 的三对寡核苷酸序列,各包含一条 Top 链与一条 Bottom 链,同时以包含 lacZ 基因 RNAi 序列的 pENTR/H1/TO-lacZ 质粒作为阴性对照。

DREAM-siRNA1 Top 链:

5'-CACCAGCATCAAGTGGCAAAGGCGAGAGCCTTTGCCACTTGATGCT-3'

DREAM-siRNA1 Bottom 链:

5'-AAAAAGCATCAAGTGGCAAAGGCTCTCGCCTTTGCCACTTGATGCTGGTG-3'

DREAM-siRNA2 Top 链:

5'-CACCCAAGGATGGTTGCATCACCGAGA GGTGATGCAACCATCCTTG-3'

DREAM-siRNA2 Bottom 链:

5'-AAAACAAGGATGGTTGCATCACCTCTCGGTGATG-

CAACCATCCTTGGGTG-3'

DREAM-siRNA3 Top 链:

5'-CACCAGCTAAGGTCCCTGTGTCTGAGAAGACACAGGGACCTTAGCT-3'

DREAM-siRNA3 Bottom 链:

5'-AAAAAGCTAAGGTCCCTGTGTCTTCTCAGACACAGGGACCTTAGCTGGTG-3'

将相应的 Top 链和 Bottom 链混合,加温至 95℃ 变性 5 min 后,按照每 5 min 降 5℃,直至降至 20℃ 的方式使 Top 链和 Bottom 链之间退火形成双链。将退火产物与 pENTR/H1/TO 线性载体用 T4 DNA 连接酶进行连接,然后将连接反应混合物转化感受态大肠杆菌株 TOP10,孵育 13 h。

1.2.3 阳性重组克隆的筛选 挑取单克隆于包含 50 µg/ml 卡那霉素的 LB 培养基中培养 12 h,用 Axy-prep Plasmid Miniprep Kit 少量提取 pENTR/H1/TO-DREAM RNAi 重组质粒,利用 M13R 测序引物对插入片段进行测序。

1.2.4 细胞转染 用包含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 NIH3T3 细胞。将生长状态良好的细胞按 1×10⁵ 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板中,当细胞于次日长至 80% 融合的时候进行转染。取 50 µl OPTI-MEM 稀释 0.8 µg 质粒,同时取 50 µl OPTI-MEM 稀释 2 µl Lipofectamine 2000,室温孵育 5 min 后将 DNA 和脂质体混合,室温孵育 20 min。在此期间对细胞更换包含 10% FBS 的新鲜培养基,随后将孵育完毕的 DNA-脂质体混合物加入细胞培养液中并轻柔混匀,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。次日,弃去包含 DNA-脂质体的旧培养基并加入含 10% FBS 的新鲜培养基继续培养细胞。

1.2.5 Western blot 检测 转染 72 h 后,将分别转染 pENTR/H1/TO-lacZ 和 pENTR/H1/TO-DREAM 重组载体的 NIH3T3 细胞用细胞裂解液裂解,提取总蛋白,并用 BCA 法对蛋白定量。各取 60 µg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离,利用半干转移法将蛋白转移至 PVDF 膜。室温封闭 2 h,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,将膜与 DREAM 抗体在 4℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,将膜与 HRP 标记的二抗在室温孵育 1 h,TBST 洗涤三次,每次 5 min,然后加入显影液进行曝光。用 Kodak 2000 图像工作站采集化学发光图像并对蛋白条带进行分析和定量。

2 结果与讨论

2.1 生物信息学方法分析 DREAM 基因 siRNA 潜在靶序列

DREAM 基因具有多个不同的剪接位点,可以利用 siRNA 沉默特异的外显子而不影响其他的外显子。经检索上述 DREAM 基因存在 9 个外显子,分别位于 1~133、134~299、300~424、425~494、495~565、566~673、674~778、779~841、842~2732 区间序列中。该 DREAM 基因序列中含有 32 个 "ATG" 碱基,有关该基因中外显子序列中包含的 ATG 数、ATG 后的 AA 碱基数、TTT 和 GGG 碱基数以及相应的潜在 siRNA 靶序列数见表 1。

表 1 DREAM 基因序列中外显子及相应的潜在 siRNA 靶点数

Table 1 Exons and the number of target points of potential siRNA in the gene sequence of DREAM

Exons	Number of ATG	Number of AA after ATG	Number of TTT and GGG after ATG	Number of expected siRNA target sequence
1	1	4	4	1
2	2	10	3	8
3	1	0	0	0
4	1	3	1	0
5	4	2	2	0
6	1	1	0	3
7	3	1	3	1
8	3	3	1	4
9	16	87	64	49

依据 siRNA 表达载体的要求，从 AUG 起始密码开始，寻找 "AA" 二连序列，并记下其 3' 端的 19 个碱基序列(但不能含 TTT 和 GGG 三连序列)，作为候选 siRNA 靶位点。有关表达 DREAM 基因 siRNA 的潜在靶序列(附前 30 个)见表 2。

表 2 DREAM 基因潜在 siRNA 靶序列

Table 2 Target sequence of potential siRNA in the gene of DREAM

Exons	Expected target sequence of DREAM siRNA (5'-3')	5'-Terminal position
1	ggaagccgtgaaggcatca	133
2	gccgtgaaggcatcagatg	137
2	ggcatcagatggcaacctc	145
2	agcatcaagtggcaaaggc	203
2	gcatcaagtggcaaaggcc	204
2	aggccacgggtcaccgcc	218
2	ggccacgggtcaccgccca	219
2	tcaagtggatcctgtccag	261
2	gtggatcctgtccagtgt	265
6	tctctatgacattaacaagg	634
6	caaggatggttgcatacc	649
6	ggaggagatgctggccatc	670
7	gtccatctacgacatgatg	694
8	aatggacaggaaccaggat	781
8	tggacaggaaccaggatgg	783
8	ccaggatggagtgtgacc	793
8	ggatgagaacatcatgaac	841
9	catcatgaactccatgcag	850
9	cgtcatctaggacatgtgg	870
9	cccagagaagcctcaatcc	929
9	gcctcaatcctgacaggag	938
9	gacacagccaccatcacac	1017
9	ggaagtggcagccagaagg	1115
9	gtggcagccagaaggcacc	1120
9	ggcacccccgcctattcct	1143
9	taaaaaaggctgcctctgg	1168
9	ggaactcagagatcgagag	1220
9	ctcagagatcgagaggacc	1224
9	agctaaggtccctgtgtct	1253
9	gctaaggtccctgtgtctt	1254

2.2 潜在靶序列的 G+C 含量分析及 Genbank BLAST 分析

利用在线 Oligo calculator 软件分析 DREAM 基因潜在 siRNA 靶序列的 GC 含量，对符合 G+C 含量接近 50%的片段进一步在 Genbank 中 BLAST 分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)，分析结果后我们选择了以下三条靶序列作为进一步的候选 siRNA 靶序列进行验证：DREAM siRNA1 AG-CATCAAGTGGCAAAGGC；DREAM siRNA2 CAAGGATG-GTTGCA TCACC；DREAM siRNA3 AGCTAAGG TCCCTGT-GTCT。

2.3 pENTR/H1/TO-DREAM RNAi 重组质粒的鉴定及 RNAi 的 Western Blot 鉴定

构建的 pENTR/H1/TO-DREAM RNAi 重组质粒经 DNA 测序鉴定，结果显示，质粒构建正确，将构建正确的质粒转染 NIH-3T3 细胞，72h 后提取总蛋白进行 Western Blot 检测，结果如图 1，与正常组和 DREAM siRNA1、DREAM siRNA2 相比，DREAM siRNA3 组 DREAM 蛋白表达水平明显下降 ($P<0.01$)，其基本可以抑制 80%的 DREAM 的蛋白表达水平。

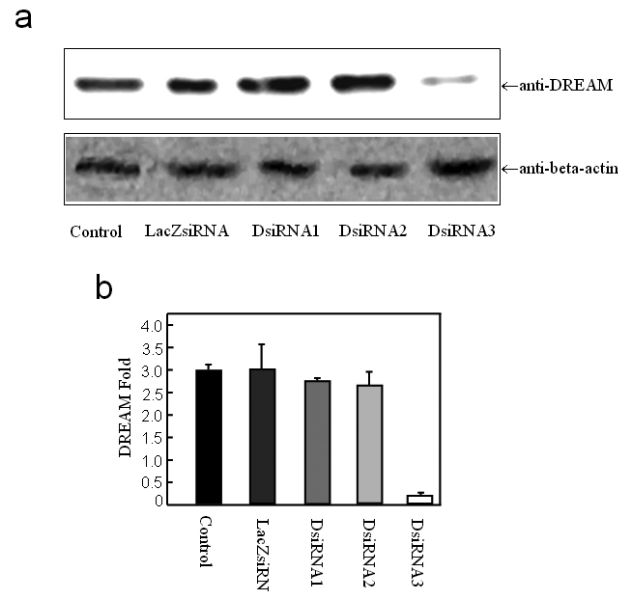


图 1 NIH-3T3 细胞中转染 pENTR/H1/TO DREAM RNAi 重组质粒后 DREAM 蛋白表达水平

Fig. 1 The expression of DREAM protein after transfected with the recombinant plasmid pENTR/H1/TO DREAM RNAi in NIH-3T3 cell line

3 结论

本研究成功地构建了 DREAM 基因 RNAi 的表达载体，为进一步研究 DREAM 基因功能奠定了基础，并为慢性疼痛的基因治疗提供了新的思路和可能的药物靶点。

参考文献(Reference)

[1] Reisch N, Engler A, Aeschlimann A, et al. DREAM is reduced in synovial fibroblasts of patients with chronic arthritic pain: is it a suitable target for peripheral pain management [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(3): R60

[2] 项红兵, 田玉科. 阿片肽转基因镇痛的研究进展 [J]. 国外医学麻醉学与复苏分册, 2004, 25(2): 83-86

Xiang Hong-bing, Tian Yu-ke. The progress of trans-opioid peptides gene on pain therapy [J]. F Med Sci Anesth Resus 2004, 25(2): 83-86

[3] 项红兵, 肖建斌, 招伟贤, 等. 表达前强啡肽基因的 Ad5 型腺病毒载体的构建及鉴定 [J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(9): 1201-1203

Xiang Hong-bing, Xiao Jian-bin, Zhao Wei-xian, et al. Construction and identification of recombinant adenovirus serotype 5 vector with prodynorphin gene [J]. Chin J Exp Surg, 2008, 25(9): 1201-1203

[4] 肖建斌, 程颢, 项红兵, 等. 携带前强啡肽基因重组质粒的构建及鉴定 [J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(2): 142

Xiao Jian-bin, Cheng Biao, Xiang Hong-bing, et al. Construction and identification of carrying prodynorphin gene recombinant plasmid [J]. Chin J Exp Surg, 2008, 25(2): 142

[5] Lusin JD, Vanarotti M, Li C, et al. NMR structure of DREAM: Implications for Ca^{2+} -dependent DNA binding and protein dimerization [J]. Biochemistry, 2008, 47(8): 2252-2264

[6] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature. 2002, 418 (6894):244-251

[7] Downward J. Science, medicine, and the future. RNA interference. BMJ. 2004, 328(7450): 1245-1248

[8] Osawa M, Dace A, Tong KI, et al. Mg^{2+} and Ca^{2+} differentially regulate DNA binding and dimerization of DREAM [J]. J Biol Chem, 2005, 280(18): 18008-18014

[9] Osawa M, Tong KI, Lilliehook C, et al. Calcium-regulated DNA-binding and oligomerization of the neuronal calcium sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3 [J]. J Biol Chem. 2001, 276 (44): 41005-41013

[10] Jacobson DA, Cho J, Landa LR Jr, et al. Downstream regulatory element antagonistic modulator regulates islet prodynorphin expression [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 291(3): E587- E595