

膜联蛋白 A2 特异性 siRNA 的设计合成及干扰效率分析*

许耀辉, 李娜[△] (江苏省无锡市妇幼保健院检验科 214000)

【摘要】 目的 设计合成并筛选出高效的膜联蛋白 A2(ANXA2)特异性小干扰 RNA(siRNA) 干扰片段, 以进行后续试验。方法 根据 ANXA2 mRNA 序列, 设计编码 siRNA 的 DNA 序列, 克隆入表达载体 (ANXA2-siRNA1~3), 与过表达载体共转染 293T 细胞, 筛选有效干扰片段。结果 ANXA2-siRNA3 可高效干扰外源性 ANXA2 的表达, 具有较高的干扰效率。结论 成功筛选出 ANXA2 的高效干扰片段, 为下一步研究打下基础。

【关键词】 RNA 干扰; 膜联蛋白 A2; 抗磷脂综合征

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.015 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0186-03

Analysis on design synthesis and interferential efficiency of specific siRNA of ANXA2* XU Yao-hui, LI Na[△] (Department of Clinical Laboratory, Wuxi Municipal Maternal and Child Health Care Service Centre, Wuxi, Jiangsu 214000, China)

【Abstract】 Objective To design, synthesize and screen the highly efficient and specific siRNA interference fragment of annexin A2(ANXA2) for conducting the follow-up experiment. **Methods** The DNA sequence of siRNA was designed and encoded according to ANXA2 mRNA sequence, then cloned into the expression vector (ANXA2-siRNA1-3), which and the over-expression vector were co-transfected to the 293T cells for screening the effectively interferential fragment. **Results** ANXA2-siRNA3 could efficiently interfere in the expression of exogenous ANXA2 with higher interferential efficiency. **Conclusion** The highly efficient interferential fragment of ANXA2 is successfully screened out, which lays the foundation for the further research.

【Key words】 RNA interference; annexin A2; antiphospholipid syndrome

复发性流产是抗磷脂综合征(APS)的主要临床特征之一。APS 患者体内高浓度的抗磷脂抗体 (APL), 如抗 $\beta 2$ 糖蛋白 I ($\beta 2$ GP I)、抗心磷脂抗体 (ACA)、抗核抗体 (ANA) 等自身抗体均可以引起血液高凝状态^[1], 其中 $\beta 2$ GP I 具有重要意义。膜联蛋白 A2 (ANXA2) 为 Ca^{2+} 依赖的膜磷脂结合蛋白, 与 APS 病理过程密切相关^[2]。有研究发现抗 $\beta 2$ GP I / $\beta 2$ GP I 复合物经 ANXA2 介导与内皮细胞结合, 激活内皮细胞, 引发血栓形成^[3-4]。APS 患者发生先兆子痫、死胎、流产等事件与其胎盘滋养层细胞功能受损及胎盘微血栓形成有密切关系^[5]。胎盘滋养层细胞 ANXA2 表达丰富, 为了证明 ANXA2 在 APS 患者中的作用, 作者拟采用 RNA 干扰 (RNAi) 技术阻断 ANXA2 在细胞中的表达。此项研究中 ANXA2 特异性小干扰 RNA (siRNA) 的设计、筛选是关键。本实验采用软件分析 ANXA2 潜在的 RNAi 序列, 将其编码信息设计成小发卡状连接入慢病毒载体 pGCSIL-GFP, 通过酶切鉴定和基因测序验证重组体正确性, 再与 ANXA2 表达质粒 pEGFP-N1-ANXA2 共转染 293T 细胞, 筛选出高效干扰的靶位点, 为下一步实验打下基础。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 293T 细胞由本实验室保存。

1.2 仪器与试剂 pEGFP-N1 载体购买于美国 BD 公司。单克隆鼠抗人 ANXA2 抗体购买于 Diagnostica 公司。慢病毒载体系统 pGCSIL-GFP 载体购买于 Qiagen 公司。反转录试剂盒

购买于 Toyobo 公司。限制性核酸内切酶购买于 New England Biolabs 公司。聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒及 Sybergreen 购自日本 Takara Biotec 公司。DNA 分子质量标准参照物购自 Fermentas 公司。

1.3 方 法

1.3.1 设计编码 siRNA 的 DNA 序列 查询并根据美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 基因库 ANXA2 mRNA 序列 (NM-004039), 设计编码 siRNA 的 DNA 序列 (包括 AgeI 和 EcoRI 酶切位点、终止信号、loop 结构、反向互补的 19nt ANXA2 特异性序列)。见表 1。将合成后的 DNA 稀释到 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 退火形成寡核苷酸双链, 退火体系为: DNA 单链各 $1 \mu\text{L}$, $20 \times \text{SSC}$ $1 \mu\text{L}$, ddH₂O 补足至 $20 \mu\text{L}$, 混匀, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 10 min, 后室温放置 1 h, 稀释至终浓度 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

1.3.2 ANXA2 siRNA 表达载体的构建 AgeI 和 EcoRI 双酶切载体 pGCSIL-GFP ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h), 酶切体系为: 核酸内切酶 AgeI, EcoRI 各 $1 \mu\text{L}$, 质粒 DNA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) $2 \mu\text{L}$, $10 \times \text{buffer}$ $5 \mu\text{L}$, ddH₂O 补足至 $50 \mu\text{L}$ 。酶切回收的 pGCSIL-GFP 载体片段与退火产物 1 : 1 的混合, T4DNA 连接酶 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 12 h 连接。次日将 $2 \mu\text{L}$ 连接产物转化感受态 E. coli DH5a 菌, 转化产物涂于 LB 平板 (含 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄霉素), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养过夜。挑取氨苄霉素抗性克隆, 溶于 $10 \mu\text{L}$ LB, 混匀取 $1 \mu\text{L}$ 作为模板, 分别命名为 ANXA2-siRNA1~3, 使用载体多克隆位点两端引物进行 PCR, 引物序列为 F: 5'-CCTA TTT CCC ATG ATT

* 基金项目: 2014 年江苏省无锡市科技局指导项目。

作者简介: 许耀辉, 男, 在读硕士, 主管检验师, 主要研究方向为自身免疫病的分子机制。 [△] 通讯作者, E-mail: 363379732@qq.com。

CCT TCA TA-3'; R:5'-GTA ATA CGG TTA TCC ACG CG-3'。反应体系为:10×PCR 缓冲液 2.5 μL,模板 0.5 μL,dNTPs (25 mmol/L)2.0 μL,MgCl₂ (25 mmol/L)2.0 μL,上下游引物各 0.5 μL,rTaq 聚合酶 0.2 μL(5 U/μL),用灭菌 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件:94 °C 5 min,后 30 循环每一循环 94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,最后 72 °C 10 min 结束反应。其中阳性克隆 PCR 片段大小为 343 bp,阴性克隆 PCR 片段大小为 306 bp。阳性克隆送上海美季公司测序。

表 1 编码 siRNA 的 DNA 序列

RNA 类别	DNA 序列
siRNA-1	F:5'-CCG GAA GCA TCA GGA AAG AGG TTA ATT CAA GAG ATT AAC CTC TTT CCT GAT GCT TTT TTT-3'
	R:5'-AAT TCA AAA AAA GCA TCA GGA AAG AGG TTA ATC TCT TGA ATT AAC CTC TTT CCT GAT GCT T-3'
siRNA-2	F:5'-CCG GGA CTC TCT CAT TGA GAT CAT CTT CAA GAG AGA TGA TCT CAA TGA GAG AGT CTT TTT G-3'
	R:5'-AAT TCA AAA AGA CTC TCT CAT TGA GAT CAT CTC TCT TGA AGA TGA TCT CAA TGA GAG AGT C-3'
siRNA-3	F:5'-CCG GCA GAG TCT ACA AGG AAA TGT ATT CAA GAG ATA CAT TTC CTT GTA GAC TCT GTT TTT G-3'
	R:5'-AAT TCA AAA ACA GAG TCT ACA AGG AAA TGT ATC TCT TGA ATA CAT TTC CTT GTA GAC TCT G-3'

注:划线部分为 ANXA2 特异性序列。

1.3.3 有效靶点的筛选 共转染 pEGFP-N1-ANXA2 与不同 RNAi 靶点质粒(ANXA2-siRNA1~3)筛选有效靶点,同时调整加入的 RNAi 靶点质粒浓度观察干扰效率的变化,共转染 pEGFP-N1-ANXA2 与 pGCSIL-GFP 作为阴性对照,转染操作同前,其中每孔过表达载体 pEGFP-N1-ANXA2 的量均为 0.50 μg,每孔 lipofectamine™ 2000 体积均为 1 μL。共转染实验组别及剂量设计,见表 2。I 组加入的干扰质粒量为 0.25 μg;II 组加入的干扰质粒量为 0.50 μg。转染 48 h 后收集上述细胞裂解液,Western blot 分析杂交条带。一抗为单克隆鼠抗人 ANXA2(1:1 000)抗体或单克隆鼠抗人 β-actin(1:1 000)抗体,二抗为 HRP-羊抗鼠 IgG 抗体(1:5 000)。以 β-actin 为内参,判断干扰效率。

表 2 共转染实验设计(μg)

组别	阴性对照	siRNA1	siRNA2	siRNA3
I 组	0.25	0.25	0.25	0.25
II 组	0.50	0.50	0.50	0.50

注:siRNA 表示不同干扰靶点的表达载体 ANXA2-siRNA1~3。

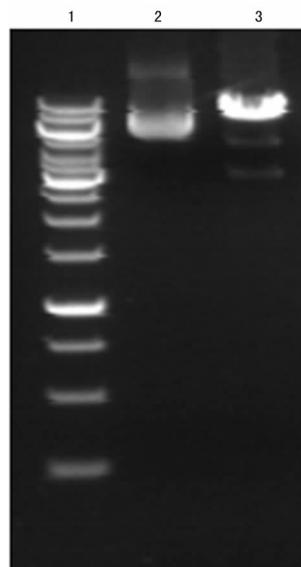
1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 质粒 pGCSIL-GFP 酶切结果 AgeI,EcoRI 双酶切质粒 pGCSIL-GFP,电泳可见线性化质粒条带,见图 1。

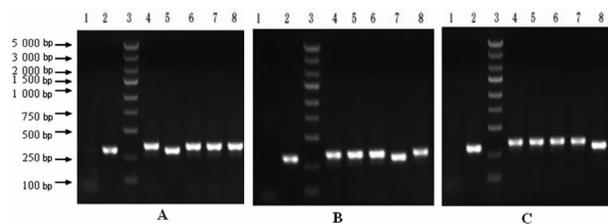
2.2 ANXA2 siRNA 表达质粒的鉴定 挑选氨苄霉素抗性克隆行 PCR 鉴定,判断是否连接成功。除 ANXA2-siRNA1 的 5 号、ANXA2-siRNA2 的 7 号、ANXA2-siRNA3 的 8 号克隆外,

其他克隆均连接成功,见图 2。



注:1 为标记物;2 为未酶切的 pGCSIL-GFP;3 为 Age I、EcoR I 双酶切后的 pGCSIL-GFP。

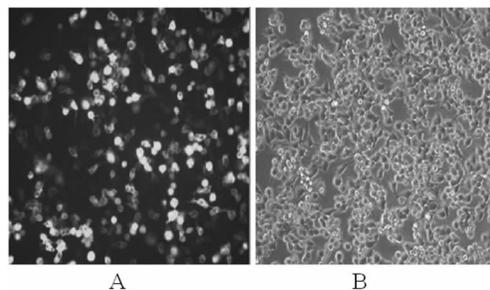
图 1 质粒 pGCSIL-GFP 酶切结果



注:A、B、C 分别为 ANXA2-siRNA1~3;1 为 ddH₂O;2 为 pGCSIL-GFP 载体;3 为 DNA 标记物;4~8 为氨苄西林抗性克隆。

图 2 ANXA2-siRNA PCR 产物电泳图

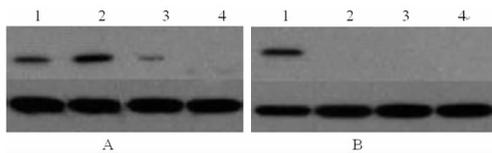
2.3 ANXA2-siRNA 与质粒 pEGFP-N1-ANXA2 共转染 293T 细胞转染效率 按实验设计将 ANXA2-siRNA1~3 分别与质粒 pEGFP-N1-ANXA2 共转染 293T 细胞。转染 24 h 后,转染效率达 80%,细胞状态较好,见图 3。



注:A 为荧光显微镜下细胞状态 B 为同视野下普通显微镜下细胞状态。

图 3 共转染后 293T 细胞 EGFP 蛋白的表达(×100)

2.4 各靶点干扰效率检测 转染 48 h 后,Western blotting 对比分析各靶点的干扰效率。pGCSIL-GFP 对目的蛋白表达无影响(图中阴性对照)。质粒 pEGFP-N1-ANXA2 与 ANXA2-siRNA 共转染后,ANXA2 蛋白表达降低。当加入干扰质粒 0.25 μg 时,ANXA2-siRNA1~2 干扰效率不高;加入 0.50 μg 时,三者均能干扰 ANXA2 蛋白表达,ANXA2-siRNA3 在 0.25、0.50 μg 时均能高效干扰外源性 ANXA2 的表达。见图 4。



注: A 为 ANXA2-siRNA 0.25 μg; B 为 ANXA2-siRNA 0.50 μg; 1 为阴性对照; 2~4 为 ANXA2-siRNA1~3。

图 4 各靶点对 ANXA2 表达的干扰效率

3 讨 论

RNAi 是由双链 RNA 介导的、转录后水平特异沉默同源靶基因的现象,是一种新兴的基因阻断技术,在细胞与组织模型的研究中均取得了满意的效果^[6]。早期 RNAi 片段大多为化学合成,其效应短暂,现多将 RNAi 序列设计成小发卡结构,克隆入质粒或病毒载体,转染靶细胞,达到长期、稳定表达 siRNA 的目的。慢病毒表达载体携带信息量大,可整合到宿主基因组内稳定表达,是介导 RNAi 的理想载体。本实验设计采用慢病毒载体携带不同 RNAi 的靶点质粒 (ANXA2-siRNA1~3),取得了较好的干扰效率。

RNAi 现象是 1995 年人们在线虫体内首先发现的,其作用机制可概括为外源性或内源性 dsRNA 在 Dicer 酶切割下形成 siRNA,后者与特异性酶结合生成 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC),介导同源 mRNA 的降解。Dicer 酶在 RNAi 的调控中起着非常重要的作用,它属于 RNA 酶家族,进化上非常保守,能识别 dsRNA 并将其降解为 siRNA^[7-8]。外源 dsRNA 进入细胞与 Dicer 结合形成 Dicer-dsRNA 复合物,Dicer 酶发挥 RNase 活性作用将 dsRNA 切割为 siRNA,后者与 RNAi 特异性酶如 Ago-2 等结合,形成 RNA 诱导沉默复合物 (RISC),RISC 经 ATP 酶激活后,解开与之结合的 siRNA 双链,并通过碱基配对,在 siRNA 指导下序列特异性降解同源 mRNA,达到阻止靶基因表达,使基因沉默的目的^[9]。不同靶位点的 RNA 作用效果差别很大,故需要根据同一条 mRNA 的不同靶位点设计多个 siRNA。Holen 等^[10]研究发现一般转录起始位点、编码区 3' 末端干扰效率较差。

本实验根据上述原理,在 ANXA2 mRNA 序列中筛选出 3 个靶位点并把此编码 DNA 接入慢病毒载体 pGCSIL-GFP。重组后的载体 ANXA2-siRNA 与 ANXA2 过表达载体 pEGFP-N1-ANXA2 共转染 293T 细胞以检测干扰效率。经 Western blotting 检测,三者对 ANXA2 的表达均有一定的干扰作用,当加入干扰质粒浓度提高到 0.50 μg 时,三者均能有效干扰 ANXA2 蛋白表达,其中 ANXA2-siRNA3 在加入的干扰质粒浓度为 0.25 μg 及 0.50 μg 时均能高效干扰外源性 ANXA2 的表达,完全满足后续实验的要求。ANXA2-siRNA3 干扰效率高、干扰效果稳定,故选择 ANXA2-siRNA3 进行后续试验。

实验发现细胞密度和细胞状态对转染效率也有影响,如果转染时细胞密度过低或细胞处于非最佳生长状态,细胞转染效率也会降低,转染前 24 h 更换新鲜培养基可提高转染率。

参考文献

- [1] Fabrizio M, Francesca RS, Cristiano A, et al. Subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome; focus on β2GPI-specific T cell response[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34 (3):661-668.
- [2] Kwon M, Yoon CS, Jeong W, et al. ANXA2-S100A10 heterotetramer, a novel substrate of thioredoxin[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(25):23584-23592.
- [3] Zhang JL, McCrae KR. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2-glycoprotein I antibodies[J]. *Blood*, 2005, 105(5):1964-1969.
- [4] Anna B, Jonathan NT, Chaim P. High antiphospholipid antibody levels are associated with statin use and may reflect chronic endothelial damage in non-autoimmune thrombosis; cross-sectional study[J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(6):551-556.
- [5] Tong M, Viall CA, Chamley LW. Antiphospholipid antibodies and the placenta; a systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment[J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(1):97-118.
- [6] Siqing S, Yong L, Peilin H, et al. Inhibition of B7-H4 gene expression by RNA interference (RNAi) in lung cancer A549 cell line[J]. *Eur Respir J*, 2011, 38(55):1489.
- [7] Johanson TM, Lew AM, Chong MM. MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Drosha and Dicer [J]. *Open Biol*, 2013, 3(10):130-144.
- [8] Scherer L, Rossi JJ. Recent applications of RNAi in mammalian systems [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, 5(3):355-360.
- [9] 李铁军, 康楷, 宋建宁, 等. RNA 干扰抑制结肠癌细胞血管内皮生长因子表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27 (8):14-18.
- [10] Holen T, Amarzguioui M, Babaie E, et al. Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(9):2401-2407.

(收稿日期:2015-05-11 修回日期:2015-10-03)

(上接第 185 页)

21(4):231-233.

- [5] 李筱梅, 付秋英, 程志忠, 等. 2 种网织红细胞计数方法的比较[J]. *临床检验杂志*, 2005, 23(2):134.
- [6] 尚红, 陈文祥, 潘柏申, 等. 建立基于中国人群的临床常用检验项目参考区间[J]. *中国卫生管理标准*, 2013, 4(1):17-21.
- [7] Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, et al. Reference intervals for a complete blood count determined on differ-

ent automated haematology analysers; Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40(1):69-73.

- [8] 王佳, 汪小蓉, 符布清. 血细胞生物参考区间适用性验证探讨[J]. *检验医学与临床*, 2008, 5(22):1369-1370.

(收稿日期:2015-07-09 修回日期:2015-09-03)