

• 论 著 •

C1009del 突变质粒载体的构建及 MYOC 基因的有效干扰*

匡多秀¹, 李 萍¹, 周 新², 曲喜英², 朱昕力², 谢小兵^{1△}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 武汉大学中南医院, 湖北武汉 430071)

摘 要:目的 在前续课题基础上构建针对 MYOC 基因的 RNAi 慢病毒载体及 C1009del 突变质粒载体, 并筛选出小梁网细胞作为后续转染阳性质粒合适的药物 G418 浓度, 为下一步将突变质粒载体导入小梁网细胞使其表达突变蛋白, 研究突变蛋白的功能、分泌特点等, 进而研究原发性开角型青光眼的致病机制提供技术支持。方法 采用基因定向克隆方法构建目的基因过表达载体及 4 种 RNAi 慢病毒载体、凝胶电泳及基因测序验证; 采用 Western blot 及基因测序方法筛选有效的 RNA 干扰靶点; 应用基因定点突变技术合成 C1009del 突变序列, 构建突变质粒载体; 培养小梁网细胞并用 G418 筛选。结果 经酶切和基因测序证实 MYOC 基因过表达载体、RNAi 慢病毒载体及 C1009del 突变质粒载体构建成功, 并筛选出 PSC413 为最有效的 RNA 干扰靶点; G418 终浓度为 400 μ L/mL 及更高浓度的孔细胞凋亡。结论 本实验构建的 RNAi 慢病毒载体能成功将正常 MYOC 基因干扰掉, 并将 G418 为 400 μ L/mL 作为后续小梁网细胞转染成功的最适筛选浓度, 为本课题下一步将突变基因导入小梁网细胞进行突变蛋白的功能研究奠定基础。

关键词: 开角型; 青光眼; 基因; 突变

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 05. 001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0529-02

Construction of C1009del mutation plasmid vector and intervention of gene MYOC

Kuang Duo-xiu¹, Li Ping¹, Zhou Xin², Qu Xiying², Zhu Xinli², Xie Xiaobing^{1△}

(1. The first Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Traditional Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: **Objective** To study the functions and the secreting features of mtein by constructing RNAi lentivirus vector aimed at gene MYOC and C1009del mutation plasmid vector, screening suitable G418 concentration of rabecular reticulum cells for following successful positive plasmid transfection, which provided technical support for investigating pathogenesis of primary open-angle glaucoma. **Methods** Constructing hyper-expression vector of objective gene and four sorts of lentivirus vectors by applying technique of gene directional cloning; Verificating vectors above-mentioned by using agarose gel electrophoresis and gene sequencing; Screening an effective RNA interference target by using Western blot and gene sequencing; Synthesising C1009del mutation sequence by using site-specific mutagenesis technique and constructing mutation plasmid vector; Cultivating rabecular reticulum cells and screening the cells by using G418. **Results** It certificated by using techniques of enzyme cutting and gene sequencing that hyper-expression vector of MYOC gene, RNAi lentivirus vector and C1009del mutation plasmid vector were constructed correctly, and PSC413 was the most effective target. Cells at G418 400 μ L/ml or higher final concentration apoptosised. **Conclusion** The normal gene was interfered successfully by RNAi lentivirus vector, and G418 final concentration 400 μ L/ml was conduced as screening positive transfection of rabecular reticulum cells, which provided technical supports for investigating the functions of mtein by importing mutation gene into rabecular reticulum cells.

Key words: open angle; Glaucoma; gene; mutation

原发性开角型青光眼 (primary open-angle glaucoma, POAG) 是青光眼中最常见的一种类型, 约占青光眼的 60% ~ 70%。目前至少发现 7 条染色体与 POAG 相关^[1], 已被确认的致病基因有 3 个^[2,3], 位于 1 号染色体上的 MYOC 基因是最先被确定与 POAG 相关的基因^[4]。MYOC 基因所表达的 MYOC 蛋白存在于小梁网细胞与睫状肌上, 在房水的产生和循环调节中具有重要作用。

笔者对重庆地区某一 POAG 家系进行了初步研究, 已对该家系所有成员进行 MYOC 基因突变筛查, 发现 3 个突变, 分别为 227G→A、C1009del 和 38C→T 突变, 其中后两突变为首次发现, 发表的 Genbank 号分别为 FJ237047 和 FJ237046。C1009del 突变存在于该家系 11 例患者中和 1 例表型正常的子代中。通过对突变基因表达的蛋白进行生物信息学分析^[5-7],

发现该突变导致终止密码子提前出现, 突变蛋白的二级结构和理化性质都发生了较大变化, 且此突变与 POAG 的发病有高度相关性。但这种突变基因表达的蛋白在该家系 POAG 的发生、发展过程中的作用以及调控机制还不清楚。鉴于此, 笔者在前期研究工作的基础上, 体外合成 C1009del 突变基因, 以期将此突变基因导入小梁网细胞来研究其突变蛋白的功能。本课题利用 RNAi 技术将正常 MYOC 基因敲除, 导入突变基因。但鉴于小梁网细胞中 MYOC 基因表达量过少的特殊性, 为确保 RNAi 效果的可靠性, 先构建 MYOC 基因慢病毒过表达载体, 使 MYOC 基因高度表达, 然后再用 RNAi 慢病毒技术进行基因敲除。在此基础上, 采用人工定点突变技术构建 C1009del 突变基因, 为进一步研究突变基因的功能做准备。限于篇幅, 突变蛋白的功能研究将另文报道。

* 基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (07JJ6047); 湖南省科技厅科技计划资助项目 (2007SK3096)。△ 通讯作者, E-mail: xxiaobing888@163.com

1 材料与方法

1.1 MYOC 基因信息 详见 Genbank 数据库, 收录号 AB006688。

1.2 主要试剂 载体: 真核过表达载体 (PGC-FU-h MYOC)、RNAi 慢病毒载体 (pGCL-GFP)、质粒表达载体 (pEGFP-N1-3FLAG)。酶: Hind III 内切酶、BamH I 内切酶。小梁网细胞 (本实验室保种)。

1.3 方法

1.3.1 目的基因过表达载体的构建——确保细胞内正常 MYOC 基因高度表达。

1.3.1.1 载体选择 使用 AgeI 内切酶对真核表达载体 (pGC-FU) 进行酶切消化。

1.3.1.2 引物设计及合成 设计两对引物, 其中一对用于 PCR 钓取目的基因, 另一对用于鉴定目的基因定向连接的阳性克隆菌落以及测序。

1.3.1.3 PCR 获得目的基因。

1.3.1.4 重组克隆制备及鉴定 上述 PCR 产物连接入酶切后的真核表达载体, 进行电泳与序列分析比对鉴定。

1.3.2 目的基因 RNAi 慢病毒载体制备 将细胞内正常 MYOC 基因敲除, 使其成为“空细胞”。根据 NCBI 中 MYOC 的基因信息设计 siRNA 序列, 载体酶切、重组步骤见 1.3.1。

1.3.3 Western blot 筛选 RNA 干扰有效靶点 上述实验设计了针对目的基因的 4 个不同干扰靶点的 RNAi 慢病毒质粒载体, 分别与目的基因过表达载体共转染培养好的工具细胞, 转染 24 h 观测转染效果, Western blot 检测目的蛋白表达情况。

1.3.4 MYOC 基因 C1009del 突变质粒载体的构建 (步骤同 1.3.1)。

1.3.4.1 PCR 定点诱导 MYOC 基因 C1009del 突变的引物设计 Hind III-F: CCC AAG CTT ATG AGG TTC TTC TGT GC。

1.3.5 小梁网细胞的培养及 G418 筛选 设置 7 个 G418 浓度梯度, 使对应孔的 G418 的终浓度分别为 300、400、500、600、700、800、900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

2 结果

2.1 目的基因过表达载体、RNAi 慢病毒载体构建后经凝胶电泳及测序分析构建完全正确。

2.2 Western blot 筛选 RNA 干扰有效靶点 Western blot 结果显示, 1#、2# 和 3# 对 MYOC 有敲除作用, 综合考虑选择 3# 干扰靶点 (PSC 413) 作为本研究的敲除质粒。

2.3 MYOC 基因 C1009del 突变质粒载体的构建 测序结果显示, 第 1009 位的 C 碱基缺失, 证明成功完成了 MYOC 基因 C1009del 的定点突变, 成功构建了 C1009del 突变质粒载体。

2.4 小梁网细胞的培养及筛选 G418 终浓度为 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 及其更高浓度的孔中小梁网细胞全部凋亡, 而 G418 终浓度为 300 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的孔中尚有贴壁存活的细胞, 故决定 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的 G418 浓度作为后续筛选导入突变基因的小梁网细胞的最适浓度。

3 讨论

本研究成功构建了 MYOC 基因过表达载体和 RNAi 慢病毒载体, 并筛选出合适的 RNA 干扰靶点: PSC 413, 以此作为后续正常基因敲除以导入突变基因的实验基础。

目前我国已发现多种突变, 如 Pro370Leu, T455KmMYOC 基因等^[8-9]。有研究证实 MYOC 基因突变所导致翻译异常蛋

白与 POAG 的发病有直接关系^[10-11], 但具体机制不明。在该家系筛查到的 C1009del 突变经实验证实其与 POAG 的发生、发展有着紧密的联系。当然本实验所用的生物信息学软件只是一个模拟分析软件, 真正要弄清楚该基因的功能, 还需要通过进一步的实验技术和方法来验证。体外诱导构建 C1009del 突变的细胞模型使其表达突变蛋白成为研究该家系 POAG 致病机制的重要手段。

本实验选择人小梁网细胞作为转染细胞, 使其最大程度的接近活体细胞功能。若能将上述转染成功的小梁网细胞成功种接到动物小梁网细胞组织中或通过各种非病毒载体的活体基因导入法将突变基因导入动物小梁网细胞组织中, 使其表达突变蛋白, 更直观地进行 POAG 致病机制的研究。不可忽视的问题是体外经过数次传代培养的小梁网细胞与活体组织细胞的生物功能包括胞内信号传导, 细胞因子与酶类的分泌是否完全一样, 还有待深入研究。动物模型的构建也需要极高的要求, 需能特异地、可靠地反映某种疾病或某种机能、代谢、结构的变化, 这也是下一步试验需要克服的难点。目前突变基因导入小梁网细胞后的功能研究正在进行中。希望通过后续的功能研究能从基因水平上阐明 POAG 的致病机制, 为最终实现 POAG 的早期防治提供理论依据。

参考文献

- [1] Fuse N. Genetic bases for glaucoma[J]. Tohoku J Exp Med, 2010, 221(1): 1-10.
- [2] 石珂, 汪昌运, 彭爱民. 原发性开角型青光眼家系的遗传学特征分析[J]. 山东医药, 2010, 50(18): 99-100.
- [3] Wirtz MK, Xu H, Rust K, et al. Insulin-like growth factor binding protein-5 expression by human trabecular meshwork [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(1): 45-53.
- [4] Wirtz MK, Samples JR, Toumanidou V, et al. Association of POAG risk factors and the Thr377Met MYOC mutation in an isolated Greek population[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(6): 3055-3060.
- [5] Xiaobing Xie, Xin Zhou, Xiyang Qu. Two novel myocilin mutations in a Chinese family with primary open-angle glaucoma[J]. Molecular Vision, 2008, 14(8): 1666-1672.
- [6] 谢小兵, 周新, 田艳丽, 等. 原发性开角型青光眼家系中一个新的 MYOC 基因突变[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(14): 2074-2077.
- [7] 谢小兵, 周新, 曲喜英, 等. 原发性开角型青光眼家系的 MYOC 基因突变研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(2): 157-161.
- [8] 魏雁涛, 段山, 葛坚, 等. 广州开角型青光眼家系致病基因定位与功能初步研究[J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(12): 1068-1074.
- [9] 田强, 李富华, 赵堪兴, 等. 原发性开角型青光眼家系一新的 myocilin 基因突变[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(6): 629-634.
- [10] Gould DB, Miceli-Libby L, Savinova OV, et al. Genetically Increasing MYOC Expression Supports a Necessary Pathologic Role of Abnormal Proteins in Glaucoma[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(3): 9019-9025.
- [11] Joe MK, Sohn S, Hur W, et al. Accumulation of mutant myocilins in ER leads to ER stress and potential cytotoxicity in human trabecular meshwork cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(6): 592-600.

(收稿日期: 2010-09-10)