

大鼠 *CXCR4* 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及其在骨髓间质干细胞中的表达

陈东平^{1,2}, 张志坚^{1,2,3}, 吴秀丽², 张彦定⁴

1 福建医科大学附属第一医院 神经内科, 福州 350005

2 福建省神经病学研究所, 福州 350005

3 福建医科大学神经生物学中心, 福州 350004

4 福建师范大学生命科学学院, 福州 350007

摘要: 为深入研究 *CXCR4* 在骨髓间质干细胞(MSCs)体内迁移中的作用, 构建 *CXCR4* 基因 RNA 干扰(RNAi)慢病毒载体并实现其在大鼠 MSCs (rMSCs)中表达。根据大鼠 *CXCR4* mRNA 序列, 设计并合成包含各靶序列的互补 DNA 链, 插入 pSUPER 载体的 H1 RNA 启动子后面, 产生 pRi*CXCR4*, 将其中的 *CXCR4* shRNA 表达结构酶切插入慢病毒载体质粒 pNL-EGFP, 产生 pNL-Ri*CXCR4*-EGFP。在脂质体介导下与包装质粒 pHELPER 和包膜质粒 pVSVG 共转染 293T 细胞, 包装生产慢病毒, 测定慢病毒功能滴度。慢病毒转导 rMSCs 后, 用 Real-time RT-PCR、Western blotting 和流式细胞术检测 RNAi 组(*CXCR4a*、*CXCR4b* 和 *CXCR4c*)、空载体组(Mock)和对照组(Control)中 *CXCR4* 表达情况。结果显示, 酶切和测序证实 pRi*CXCR4* 质粒构建正确, 产生能同时表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和 *CXCR4* shRNA 的慢病毒载体质粒 pNL-Ri*CXCR4*-EGFP, 未浓缩和浓缩慢病毒悬液的功能滴度分别为 6.4×10^4 TU/mL 和 6.9×10^6 TU/mL。慢病毒转导 rMSCs 48 h 后, 与空载体组和空白组相比, 3 个 RNAi 组均不同程度抑制 *CXCR4* 表达, *CXCR4b*-MSC 组在 mRNA 水平抑制了 95.6%, 抑制作用最明显。大鼠 *CXCR4* 基因 RNAi 慢病毒载体构建成功, 为深入研究 *CXCR4* 在 rMSCs 向损伤组织定向迁移的作用奠定了基础。

关键词: 慢病毒, *CXCR4*, RNA 干扰, 骨髓间质干细胞, 大鼠

Construction of rat *CXCR4* gene lentiviral RNA interference vector and its expression in mesenchymal stem cells

Dongping Chen^{1,2}, Zhijian Zhang^{1,2,3}, Xiuli Wu², and Yanding Zhang⁴

1 Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

2 Fujian Research Institute of Neurology, Fuzhou 350005, China

3 Center of Neuroscience, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

4 College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

Abstract: To construct the lentiviral RNA interference (RNAi) vector of rat *CXCR4* gene, three target sequences were selected according to rat *CXCR4* mRNA sequence, the complementary DNA contained both sense and antisense oligonucleotides were

Received: September 9, 2008; **Accepted:** December 8, 2008

Supported by: the United Fujian Provincial Health and Education Project for Tackling the Key Research of Health Department of China (No. WKJ2005-2-011).

Corresponding author: Zhijian Zhang. Tel: +86-591-87982028; Fax: +86-591-87982028; E-mail: zzjzfy@medmail.com.cn

卫生部科学研究基金-福建省卫生教育联合攻关计划资助项目(No. WKJ2005-2-011)资助。

designed and synthesized. After phosphorylation and annealing, these double-strand DNA were cloned to *Bgl* II and *Hind* III sites of pSUPER. Then the product pRiCXCR4 was confirmed by electrophoresis and sequencing. Next, CXCR4 shRNA was cloned to a transfer vector of lentivirus, pNL-EGFP, and pNL-RiCXCR4-EGFP was produced. It was confirmed by digestion and sequencing that CXCR4 shRNA expression structure was correctly cloned to pSUPER and pNL-EGFP respectively. Three plasmids, pNL-RiCXCR4-EGFP, pHELPER and pVSVG were cotransfected into 293T to package lentivirus particles. The functional titer of obtained virus was determined by flow cytometry after transduction in 293T, the resulting functional titer of unconcentrated virus and concentrated virus were 6.4×10^4 TU/mL and 6.9×10^6 TU/mL respectively. After the rat mesenchymal stem cells (rMSCs) were transduced with the constructed lentiviral vectors, real-time RT-PCR, Western blotting and flow cytometry were used to evaluate the level of CXCR4 expression. Compared with control group, the CXCR4 mRNA expression were obviously suppressed in all three experimental groups (rMSCs-CXCR4a, rMSCs-CXCR4b, rMSCs-CXCR4c), especially the expression rate in rMSCs-CXCR4b group was reduced by 95.6%. The RNAi lentivirus vector of rat *CXCR4* gene has been constructed successfully. This greatly facilitates the further studies such as evaluation the role of CXCR4 in rMSCs recruitment to damaged tissue.

Keywords: lentiviral vector, CXCR4, RNA interference, mesenchymal stem cells, rat

RNA 干扰(RNAi)是指双链 RNA 引发的转录后基因沉默,其通过 21~23nts 的双链 RNA 或短发夹 RNA(shRNA)与特异 mRNA 结合导致靶基因降解,进而引起目的基因产物表达下调,是后基因组时代功能基因组学研究的强有力工具^[1]。近来,在骨髓间质干细胞(MSCs)移植治疗组织损伤的研究中,发现趋化因子受体 CXCR4 与其唯一特异配体 SDF-1 在 MSCs 向损伤组织的定向迁移中起重要作用^[2,3]。为此,本研究构建了能转录产生 CXCR4 shRNA 的质粒,进而构建并包装产生高滴度的慢病毒 RNAi 载体,并实现其在大鼠 MSCs(rMSCs)中表达,使 rMSCs 中 CXCR4 表达下调,为进一步研究 CXCR4 在 rMSCs 移植后向损伤组织定向迁移的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

pSUPER 质粒购自 OligoEngine 公司,慢病毒载体质粒 pNL-EGFP、包装质粒 pHELPER 和包膜质粒 pVSVG 由美国杜兰大学陈一平教授惠赠(质粒图谱见图 1),293T 细胞购自 ATCC,大肠杆菌 DH5 α 由福建医科大学林建银教授惠赠。

主要试剂:限制性内切酶 *Bgl* II、*Hind* III、*Eco*R I、*Ale* I、*Hinc* II、*Xba* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶(NEB),DNA 平端化试剂盒、逆转录及实时荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa),质粒小量抽提试剂盒、核酸胶回收试剂盒(Omega),质粒大量抽提试剂盒(Qiagen),Lipofectamin2000 和 Trizol (Invitrogen),DMEM 和胰

酶(Gibco),胎牛血清(Hyclone)。其它试剂均为进口或国产化学分析纯。

设计的寡核苷酸链、引物由 Invitrogen 公司合成;测序由上海鼎安生物公司完成。

抗体:兔抗 CXCR4 多克隆抗体(Abcam),小鼠抗 β -actin 单克隆抗体、FITC 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记羊抗小鼠 IgG(北京中杉生物公司)。

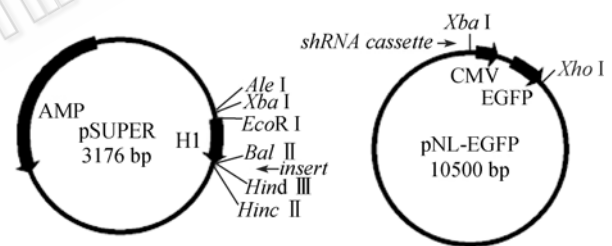


图 1 pSUPER 和 pNL-EGFP 质粒结构示意图

Fig. 1 Plasmid maps of pSUPER and pNL-EGFP.

1.2 方法

1.2.1 寡核苷酸的设计与合成

根据大鼠 CXCR4 mRNA 序列(GenBank Accession No. NM_022205),用 Ambion 公司软件选择 3 条含 21 个核苷酸的序列作为 RNAi 靶点。3 个靶序列分别起始于 CXCR4 基因第 93、839 和 1040 位点。分别设计并合成寡核苷酸链(命名为 CXCR4a、CXCR4b、CXCR4c),末端引入 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点。各寡核苷酸链序列(下划线部分为靶序列及反义靶序列)如下:

CXCR4a 正义链:

5'-GATCCCCGATAACTACTCCGAAGAAGT

TTCAAGAGAACTTCTTCGGAGTAGTTATCCTTTT
TA-3';

CXCR4a 反义链:

5'-AGCTTAAAAAGGATAACTACTCCGAAGA
AGTTCTCTTGAAACTTCTTCGGAGTAGTTATCCG
GG-3';

CXCR4b 正义链:

5'-GATCCCCGGATCAGCATCGATTCCCTTCAT
TCAAGAGATGAAGGAATCGATGCTGATCCTTTT
TA-3';

CXCR4b 反义链:

5'-AGCTTAAAAAGGATCAGCATCGATTCCCTT
CATCTCTTGAAATGAAGGAATCGATGCTGATCCG
GG-3';

CXCR4c 正义链:

5'-GATCCCCGCTCAAGATCCTTTCCAAAG
TTCAAGAGACTTTGGAAAGGATCTTGAGGCTTT
TTA-3';

CXCR4c 反义链:

5'-AGCTTAAAAAGCCTCAAGATCCTTTCCA
AAGTCTCTTGAACTTTGGAAAGGATCTTGAGGC
GGG-3'.

1.2.2 pRiCXCR4 的构建和鉴定

将合成的寡核苷酸链 5'端磷酸化, 退火形成具有 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点的双链 DNA, 将其克隆到 pSUPER 载体中, 产生 shRNA 表达载体 pRiCXCR4。靶基因插入后, 用 CaCl_2 转化法将连接产物转入 DH5 α 感受态细菌, 每个质粒皆挑取 4 个克隆, 小量抽提质粒后, 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切初步鉴定: 1) 插入 DNA 片段的阳性克隆可切出 285 bp(>250 bp) 的 DNA 片段; 2) 未插入 DNA 片段的阴性克隆只切出 227 bp(<250 bp) 的 DNA 片段。将阳性克隆进行测序鉴定。

1.2.3 CXCR4 shRNA 慢病毒载体的构建和鉴定

将 pNL-EGFP 用 *Xba* I 酶切, 回收 10.5 kb DNA 片段并进行末端平端化, 与用 *Ale* I、*Hinc* II 从 pRiCXCR4 切下的 346 bp 含有 CXCR4 shRNA 表达结构的片段连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 挑取 4 个克隆, 小量抽提质粒后, 用 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定: 1) 如果插入成功, 应引入新的 *Xba* I 位点, 可被 *Xba* I 切开, 与 *Xho* I 双酶切时可切出一条 DNA 片段。在 shRNA 表达结构中由于 *Xba* I 位点与 DNA 片段两端长短不一(分别为 14 bp 和 332 bp), 所以双酶切后根据切出的 DNA 片段的长短可判断插入序

列的 H1 RNA 启动子的方向: ①若 H1 启动子方向与 pNL-EGFP 上 CMV 启动子方向相同, 即方向正确, 可切出 1707 bp(>1500 bp) DNA 片段; ②若方向相反则切出 1389 bp(<1500 bp) DNA 片段。(2) 如果插入不成功, 自身环化的质粒因平端化失去 *Xba* I 位点, 不能被 *Xba* I 切开, 只能被 *Xho* I 切成线性 DNA。大量抽提方向正确的阳性克隆质粒以备用。

1.2.4 慢病毒的包装和浓缩

将慢病毒三质粒 pNL-RiCXCR4-EGFP 或 pNL-EGFP、pHELPER、pVSVG 以 1.7:1:0.7 的质量比例混合, 利用脂质体 Lipofectamine2000 共转染 293T 细胞。48~72 h 后观察有强绿色荧光及细胞融合现象时收集培养上清, 4500 r/min 离心 15 min, 0.45 μm 滤膜过滤以去除细胞碎片, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、50 000 \times g 离心浓缩病毒 2 h, RNase-free DMEM 悬浮病毒颗粒沉淀, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.5 病毒滴度的测定

将 3×10^5 293T 细胞接种于 12 孔板, 24 h 后用未浓缩病毒上清和系列稀释的浓缩病毒(1:1、1:10、1:100、1:1000) 50 μL 转导细胞, 每浓度设 3 个复孔, 转导液为终体积 1 mL 的含 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene 的 DMEM。转导 48 h 后收集细胞, 流式细胞术检测 EGFP 阳性率。病毒功能滴度计算公式: $\text{TU}/\text{mL} = (\text{F} \times \text{Ci}/\text{V}) \times \text{D}$ 。TU 为转导单位, F 为 EGFP 阳性细胞率, Ci 为转导时细胞总数, V 为接种病毒的体积, D 为稀释倍数。为避免误差, 只选择阳性率为 1%~30% 的孔计算滴度的平均值。

1.2.6 慢病毒转导 rMSCs

冻存的 rMSCs 由本研究所提供, 在含 15% 胎牛血清的低糖 DMEM 中复苏、培养、传代。rMSCs 已经流式细胞术鉴定 CD34、CD45 表达阴性, CD29、CD90 表达阳性^[4]。本实验所用 rMSCs 均为第 3 或 4 代细胞。取 5 MOI 慢病毒, 与之前同样的方法转导 rMSCs, 48 h 后收集细胞。实验分组如下: RNAi 组为 3 种 CXCR4 RNAi 慢病毒载体转导的 rMSCs (CXCR4a、CXCR4b、CXCR4c), 空载体组为未携带目的基因的慢病毒转导的 rMSCs(Mock), 对照组为未经转导的 rMSCs(Control)。

1.2.7 定量 PCR 检测 CXCR4 mRNA 表达

用 Trizol 提取各组细胞总 RNA, 电泳检测质量, 紫外分光光度计定量。以等量 RNA 为起始模板, 逆

转录合成 cDNA。用 SYBR Green I 染料法在定量 PCR 仪 ABI 7000 上进行 PCR, 反应条件为 95°C 预变性 10 s, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火及延伸 31s, 共 40 个循环。为检测 PCR 产物的特异性, PCR 结束后进行解链分析, 反应条件为 95°C 15 s, 60°C 20 s, 95°C 15 s。最后用 SDS 软件分析结果, 按公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组 CXCR4 mRNA 相对表达量^[5]。PCR 引物序列如下:

CXCR4 正义链:

5'-AGCAGGTAGCAGTGACCCTCTGA-3';

CXCR4 反义链:

5'-GAAGCAGGGTTCCTTGTTGGAGT-3';

β -actin 正义链:

5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3';

β -actin 反义链:

5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3'。

1.2.8 流式细胞术检测细胞表面 CXCR4 表达率

取各组细胞, 胰酶消化, PBS 洗 1 次, 将细胞分成 2 管, 作为对照组和实验组, 先分别在抗 CXCR4 抗体(1:100)和 PBS 中 4°C 孵育 1 h, 后均在 FITC 标记的二抗(1:500)中 4°C 避光孵育 1 h。每管用 PBS 洗 2 次, 最终用 500 μ L PBS 重悬细胞, 上流式细胞仪检测。而 RNAi 对 CXCR4 表达的抑制率=对照组 CXCR4 表达率-RNAi 组 CXCR4 表达率。

1.2.9 Western blotting 检测 CXCR4 蛋白表达

取各组细胞, 用蛋白裂解液充分裂解, 测定蛋白浓度, 取等量蛋白液, 热变性后进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白转印到硝酸纤维素膜上, 封闭后先用抗 CXCR4 抗体(1:500)4°C 孵育过夜, 再用相应 HRP 标记的二抗(1:1000)室温孵育 2 h, 后化学发光、胶片曝光、显影和定影。解析硝酸纤维素膜, 封闭后同样进行抗 β -actin 抗体(1:500)和相应 HRP 标记二抗(1:1000)的孵育及随后的处理。

2 结果

2.1 pRiCXCR4 的鉴定

根据大鼠 CXCR4 mRNA 序列, 设计并合成包含各正反义靶序列的互补 DNA 链, 退火后插入 pSUPER 载体的 H1 RNA 启动子后面, 产生 pRiCXCR4。其经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后可见 4 个阳性质粒, 均可切出大于 250 bp 的 DNA 片段; 其

余为阴性质粒, 其切出的 DNA 片段小于 250 bp(图 2)。阳性质粒经进一步测序鉴定插入序列完全正确(结果未显示)。

2.2 pNL-RiCXCR4-EGFP 的鉴定

取鉴定正确的 pRiCXCR4, 将其中 CXCR4 shRNA 表达结构酶切插入慢病毒载体质粒 pNL-EGFP, 产生 pNL-RiCXCR4-EGFP。其经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切后可见 9 个阳性克隆, 其中 A2、A4、B2、B3、C3、C4 可切出一条大于 1500 bp 的 DNA 片段, 其 H1 启动子方向与 CMV 启动子方向相同, 为方向正确阳性克隆, 而 A1、B1、C1 切出的 DNA 片段小于 1500 bp, 为方向相反的阳性克隆; 其余的为未插入序列的阴性克隆, 只能被切成线性 DNA 片段(图 3)。

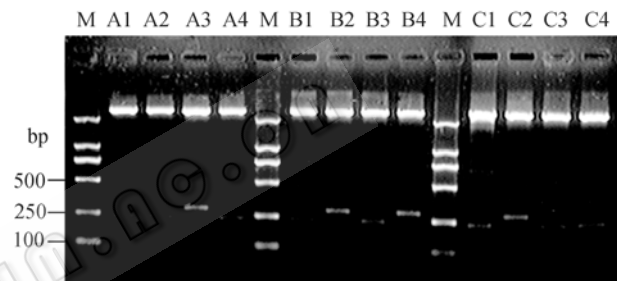


图 2 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定 pRiCXCR4

Fig. 2 Electrophoresis of pRiCXCR4 digested with *EcoR* I and *Hind* III. M: marker. Plasmids A3, B2, B4 and C2 were positive and others were negative.

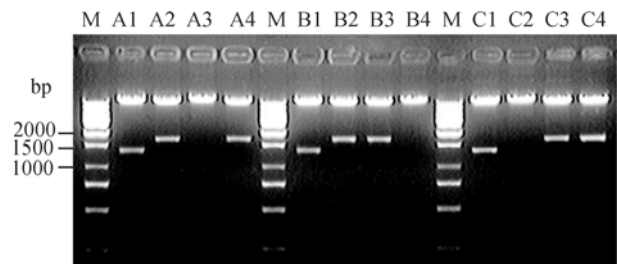


图 3 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定 pNL-RiCXCR4-EGFP

Fig. 3 Electrophoresis of pNL-RiCXCR4-EGFP digested with *EcoR* I and *Hind* III. M: marker. A2, A4, B2, B3, C3 and C4 were right positive plasmids; A1, B1 and C1 were wrong positive plasmids; A3, B4 and C2 were negative plasmids.

2.3 慢病毒包装和浓缩的结果

慢病毒三质粒系统共转染 293T 细胞后 48~72 h 在荧光显微镜下可见大量绿色荧光(图 4)。未浓缩及浓缩慢病毒悬液的功能滴度为 6.4×10^4 TU/mL 和 6.9×10^6 TU/mL。

2.4 慢病毒转导 rMSCs 的结果

慢病毒转导 rMSCs 48 h 后各组 rMSCs 在荧光显微镜下均可见大量绿色荧光(图 5), 荧光随着细胞传代可持续, 而空白组未见特异绿色荧光(结果未显示)。

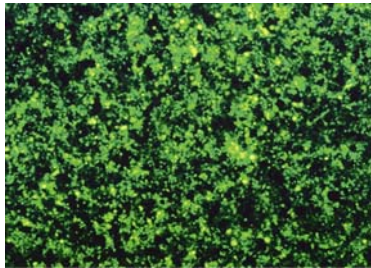


图 4 慢病毒三质粒系统共转染 293T 细胞后在荧光显微镜下见大量绿色荧光(×40)

Fig. 4 EGFP expression in the lentiviral 3 plasmids cotransfected 293T cells under fluorescence microscope (×40).

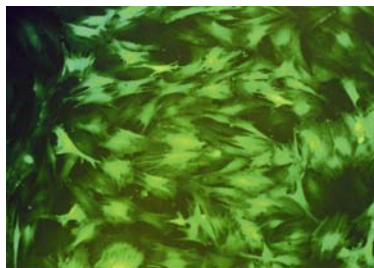


图 5 慢病毒转导 rMSCs 后在荧光显微镜下可见大量绿色荧光(×200)

Fig. 5 EGFP expression in rMSCs after transduction under fluorescence microscope (×200).

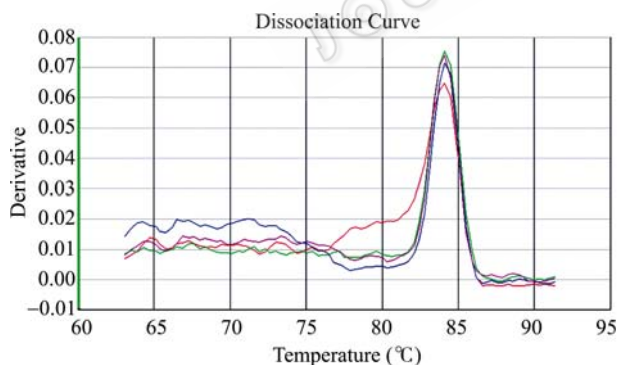


图 6 CXCR4 的融解曲线

Fig. 6 The dissociation curve of CXCR4.

2.5 慢病毒转导 rMSCs 后对 CXCR4 基因表达的影响

为明确慢病毒转导 rMSCs 后各组 CXCR4 基因表达情况, 分别用实时荧光定量 PCR、Western blotting 和流式细胞术检测 CXCR4 在 mRNA、蛋白质和细胞表面水平的表达。实时荧光定量 PCR 结果

显示, CXCR4(图 6)和β-actin(图 7)的融解曲线均为单峰, 说明 PCR 产物为特异扩增产物, 用其定量准确可信。与对照组相比, 3 个 RNAi 组的 CXCR4 mRNA 表达水平(图 8)、细胞表面表达率(图 9)和蛋白表达水平(图 10)均不同程度降低, 其中 CXCR4b 组在 mRNA 表达水平抑制了 95.6%, 细胞表面表达率抑制了 92.9%, 抑制作用最明显。而对照组与空载体组在 mRNA 表达水平、细胞表面表达率和蛋白表达水平方面均无明显差别。

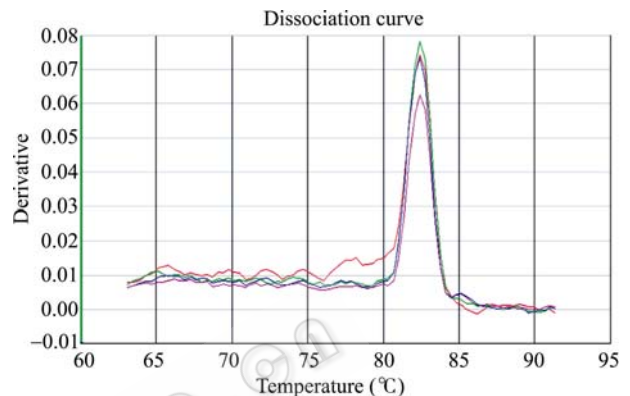


图 7 β-actin 的融解曲线

Fig. 7 The dissociation curve of β-actin.

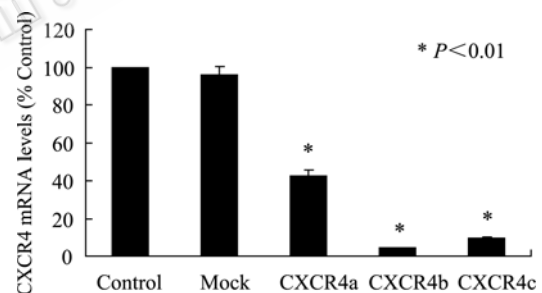


图 8 实时定量 RT-PCR 检测各组 rMSCs 中 CXCR4 mRNA 表达水平下调

Fig. 8 Downregulation of CXCR4 mRNA of rMSCs detected with real-time RT-PCR.

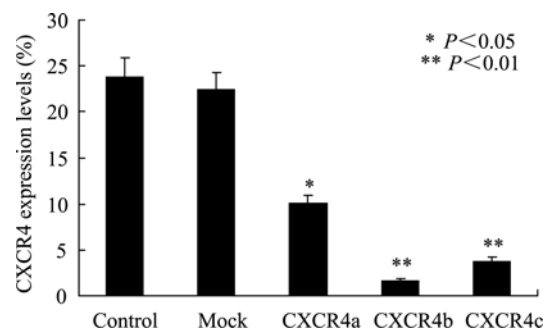


图 9 流式细胞术检测各组 rMSCs 中 CXCR4 细胞表面表达水平下调

Fig. 9 Downregulation of CXCR4 expression of rMSCs detected with flow cytometry.

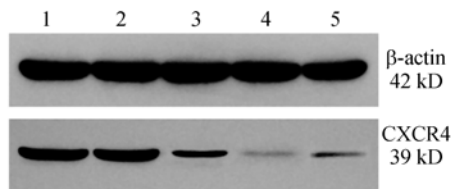


图 10 Western blotting 检测各组 rMSCs 中 CXCR4 蛋白表达水平下调

Fig. 10 Downregulation of CXCR4 protein of rMSCs detected with Western blotting. 1: control; 2: mock; 3: CXCR4a; 4: CXCR4b; 5: CXCR4c.

3 讨论

趋化因子受体是一类表达于细胞表面的能与趋化因子结合的 7 次跨膜 G 蛋白耦联受体,其在白细胞向炎症、感染或损伤区的靶向运动中起重要作用^[6]。最近许多研究发现,体外培养的 MSCs 在全身或局部移植时能定向迁移到损伤区^[7]。于是人们推测,表达于 MSCs 表面的趋化因子受体在 MSCs 向损伤组织的定向迁移中可能起与在白细胞中相似的作用。Ji 等^[2]研究发现,舌下神经损伤后表达于 rMSCs 表面的 CXCR4 与其唯一配体 SDF-1 在 rMSCs 向脑损伤神经核的定向迁移中起主要作用。进而,Chen 等将 rMSCs 进行转基因修饰使其过表达 CXCR4, rMSCs 向缺血心肌迁移的细胞数量明显增加并促进了心脏功能的改善^[8]。为进一步研究 CXCR4 在 rMSCs 向损伤区定向迁移的重要性,本研究采用 RNAi 技术阻断 CXCR4 基因在 rMSCs 的表达以便于深入研究。

RNAi 是当今生命科学界的研究热点,是一种转录后水平的基因沉默,是抑制基因表达的有力工具,对于在生物体中特异降低某基因的表达进而研究该基因功能非常有用。直接转染合成的 siRNA 能特异抑制哺乳动物细胞内同源基因的表达,但细胞内 siRNA 很容易被降解^[9],因此这种方法不能实现稳定的 RNAi。相比之下,质粒或病毒载体能在细胞内长时间、稳定生成 siRNA^[10-12]。但是质粒介导 RNAi 有一定局限性,其转染哺乳动物细胞的效率不如病毒载体,尤其无法转染非分裂相细胞,在不同的宿主细胞质粒的转染效率差别很大,抑制基因表达的作用较弱,持续时间短,不适合体内试验^[13]。用病毒载体介导 RNAi,虽然已有腺病毒、腺相关病毒和逆转录病毒载体的成功报道,但慢病毒载体与

之相比更具优势^[11,12]: 1)可感染分裂和非分裂期细胞; 2)转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应,可对同一细胞反复感染等优点; 3)表达水疱性口炎病毒糖蛋白 G(VSVG)外壳扩大了慢病毒感染细胞的范围,使载体病毒颗粒具有更强的稳定性,可通过超速离心浓缩获得高滴度的病毒。在体内和培养细胞中应用表达 siRNA 的慢病毒载体,能长时间整合到基因组中并“敲低”内源性基因^[11,12]。为此,本研究采用慢病毒载体进行 RNAi 研究,可望得到更为确切的观察结果。

为构建大鼠 CXCR4 RNAi 慢病毒载体,本研究根据 siRNA 设计原则设计 3 个针对 CXCR4 基因的 siRNA 是为确保有较高概率至少存在一个 siRNA 的抑制效率在 75%以上。利用 H1 RNA 启动子可在细胞内转录产生 shRNA,再经体内 Dicer 酶酶切获得 siRNA。将 CXCR4 shRNA 表达结构克隆到 pNL-EGFP 质粒后,利用慢病毒载体可向 rMSCs 高效转移目的基因,同时可使目的基因整合到 rMSCs 基因组中进行长期稳定表达进而长期发挥 RNAi 作用;另外慢病毒载体选用 EGFP 作为报告基因,EGFP 荧光极其稳定,在荧光显微镜强光照射下,其抗光漂白能力比荧光素强,可进行活细胞定时及定位观察,这样可很好观察质粒转染 293T 细胞和病毒转导细胞的效率,使实验进行得更加直观,问题能及时发现并解决。为验证所构建载体对 rMSCs 中 CXCR4 表达的下调作用,用实时定量 PCR、流式细胞术和免疫印迹 3 种方法一致证实了 pNL-RiCXCR4b-EGFP 的抑制作用最强, CXCR4 mRNA 抑制率达 95.6%,对应的 rMSCs 将作为 CXCR4“基因敲低”细胞进行下一步功能研究。

总之,本研究成功构建带有 EGFP 报告基因的大鼠 CXCR4 RNAi 慢病毒载体,为进一步的研究工作奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Downward J. RNA interference. *BMJ*, 2004, **328**(7450): 1245-1248.
- [2] Ji JF, He BP, Dheen ST, *et al.* Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells*, 2004, **22**(3): 415-427.

- [3] Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res*, 2008, **1195**: 104–12.
- [4] Wang W, Zhang ZJ, Lin JH, *et al.* Surface antigen markers of cultured rats bone marrow mesenchymal stem cells. *J Fujian Med Univ*, 2005, **39**(1): 5–8.
王伟, 张志坚, 林建华, 等. 大鼠骨髓间质干细胞培养扩增及表面标志. *福建医科大学学报*, 2005, **39**(1): 5–8.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods*, 2001, **25**(4): 402–408.
- [6] Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol*, 2004, **4**(5): 360–370.
- [7] Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, *et al.* Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*, 2007, **137**(6): 491–502.
- [8] Cheng Z, Ou L, Zhou X, *et al.* Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Mol Ther*, 2008, **16**(3): 571–579.
- [9] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411**(6836): 494–498.
- [10] Sui G, Soohoo C, Affar el B, *et al.* A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(8): 5515–5520.
- [11] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, *et al.* Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, 2003, **9**(4): 493–501.
- [12] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, 2003, **33**(3): 401–406.
- [13] Scherr M, Morgan MA, Eder M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem*, 2003, **10**(3): 245–256.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

植物生理学实验模块实验指导

李玲 主编 李娘辉 蒋素梅 冷佳奕 王小菁 副主编

978-7-03-023053-9 ¥28.00 2008年12月出版

本书以专题形式安排14个综合性模块实验,编入实验项目64项,覆盖植物生理学的主要基础方法。通过流程图与文字讲述每个模块实验的基本过程,达到操作过程直观、重点提示清晰的效果。同时介绍了实验材料的选择、实验数据的统计分析以及撰写实验论文的方法,列举了17个反映植物生理学研究主题、适合培养设计能力的模块实验题目,使大学生在加深植物生理学基本理论的同时,强化植物生理学实验技能训练,培养科学素养和增强解决问题的能力。

本书适合师范院校、农林院校和综合性大学植物生理学实验教学使用,同时可供相关专业学生毕业论文实践及有关教师和科研工作者参考用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>