

西农萨能羊 *BTN* 基因 RNA 干扰序列的筛选及 重组腺病毒载体的构建与鉴定

赵旺生, 罗 军, 王 伟, 滕炎玲, 王 桢, 林先滋

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**构建西农萨能羊 *BTN* 基因 RNA 干扰的重组腺病毒载体, 为研究 *BTN* 基因的功能和作用机制奠定基础。**【方法】**设计并合成 3 对针对 *BTN* 不同位点的 shRNA 编码序列, 克隆到 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体中, 并与已构建好的表达 *BTN* 的 pDsRed1-C1-*BTN* 载体共转染 HEK 293 细胞, 筛选有效的干扰序列。通过与腺病毒骨架质粒重组, 制备表达干扰 *BTN* 基因的 shRNA 的腺病毒, 经 *Pac* I 线性化后, 在 HEK 293 细胞中包装并扩增病毒, 用 TCID₅₀ 法进行病毒滴度测定, 获得高滴度的病毒上清液。**【结果】**成功构建了西农萨能羊 *BTN* 基因的 RNAi 腺病毒表达载体, 腺病毒经包装和扩增后, 病毒滴度可达到 5×10^9 PFU/mL。**【结论】**获得了有功能的 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 病毒重组子。

[关键词] 嗜乳脂蛋白基因; RNA 干扰; 腺病毒载体

[中图分类号] S826.9⁺4; Q782

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)12-0038-07

Screening of RNA interference sequence and construction and identification of *BTN* recombinant adenovirus of Xinong Saanen Goat

ZHAO Wang-sheng, LUO Jun, WANG Wei, TENG Yan-ling,
WANG Zhen, LIN Xian-zi

(College of Animal Science and Technology of Northwest A&F University,
Shaanxi Provincial Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The aim of this project was to construct RNAi recombinant adenoviral vector specific to *BTN* gene and to establish foundation on function and mechanism of *BTN* gene. **【Method】**The first step was to design and synthesize three pairs of complementary single-strand DNA oligos targeting three various sites of *BTN* mRNA, and then oligos were cloned into pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA, the entry vector, to generate the entry clone to co-transfect HEK 293 cells with pDsRed1-C1-*BTN* expressing *BTN* gene to select effective RNAi sequence. Recombination reaction *in vitro* with the pENTR and pAd/BLOCK-iTTM-DEST, the adenovirus backbone vector, were used to creat the adenovirus plasmid which expressed the interference of *BTN* gene. Then, we transfected the adenovirus plasmid digested with *Pac* I into HEK 293 cells to produce adenovirus, and infected the 293 cells with the crude adenovirus to amply the adenoviral stock. TCID₅₀ assay was used to titer the adenoviral stock and got a high titer. **【Result】**The RNAi adenovirus expression vector targeting to *BTN* gene of Xinong Saanen Goat was constructed suc-

* [收稿日期] 2010-04-21

[基金项目] 转基因生物新品种培育项目(2009ZX08009-162B); 公益性行业(农业)专项科研经费项目(3-45); 陕西省重大科技创新项目(2009ZKC07-01-1)

[作者简介] 赵旺生(1983—), 男, 河南焦作人, 在读博士, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: wangshengzhao01@gmail.com

[通信作者] 罗 军(1965—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术与家畜育种研究。E-mail: luojun1@yahoo.com

cessfully, after being packaged and amplified, the titer of the adenovirus can reach 5×10^9 PFU/mL. 【Conclusion】 We got functional adenoviral recombination of pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA.

Key words: *BTN* gene; RNA interference; adenoviral vector

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指双链 mRNA 诱导同源 mRNA 降解导致基因表达抑制的现象,又称基因沉默^[1]。其可以从转录后水平阻断特定基因的表达,已成为目前基因功能研究的重要技术手段。腺病毒是目前转基因效率最高的载体之一,其主要优点有:病毒颗粒稳定,病毒基因组不整合入宿主细胞的基因组,无插入突变的危险;可获得高滴度病毒;对多数组织、细胞均有感染性,宿主范围广,感染性强;可以在哺乳动物细胞发生位点特异性重组,能最大程度地减少病毒整合带来的基因突变效应^[2];腺病毒载体介导的转染效率明显高于质粒 DNA 直接注射^[3],可实现靶基因长时间的沉默。

嗜乳脂蛋白(BTN)作为乳腺特异表达蛋白,是一种带有胞质 C-端尾巴的跨膜糖蛋白,集中分布在乳腺上皮细胞顶层质膜^[4-5]。*BTN* 仅在泌乳期乳腺中特异表达,在牛及小鼠上的研究还发现,受乳腺不同生理阶段的影响,*BTN* 基因表达从妊娠后期开始^[6-7],随着泌乳的终止而停止表达。*BTN* 基因自 1990 年首次从牛的乳腺组织 cDNA 中分离以后^[8],已相继在人、鼠、海豚、山羊等哺乳动物组织中被分离出来^[9-10],其核苷酸序列具有高度保守性。

探讨奶山羊 *BTN* 基因的功能,对阐明羊奶短、中链脂肪酸含量高的分子机理,以及通过遗传或营养学手段调控羊奶中有益脂肪酸含量具有重要的理论及现实意义。本研究采用 Invitrogen 公司的腺病毒 RNA 干扰系统,构建了 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体及表达 *BTN* 基因的 pDsRed1-C1-*BTN* 载体,用二者共转染 HEK 293 细胞并筛选有效的干扰序列,然后与腺病毒骨架质粒重组,制备表达干扰 *BTN* 基因 shRNA 的腺病毒,以期为在山羊乳腺上皮细胞进行 *BTN* 基因的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

美国 Invitrogen 公司的 pENTR/CMV-GFP/U6 及腺病毒骨架载体 pAd/BLOCK-iTTM-DEST 质粒、GT116 菌株,均由美国芝加哥大学苟德明博士惠赠;HEK 293 细胞系,由西北农林科技大学动物科技学院奶山羊研究室保存;pGEM-T Easy Vector、T4 连接酶,购自美国 Promega 公司;含有 *BTN*

基因的质粒,由西北农林科技大学动物科技学院奶山羊研究室保存;B 型小量质粒快速提取试剂盒,购自北京博大泰克公司;大肠杆菌 Top10、Marker III、高纯度质粒小提中量试剂盒、大量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,购自北京天根公司;LA Taq DNA 聚合酶及限制性内切酶 *Sca* I、*Eco*R V、*Xho* I、*Sal* I,购自大连宝生物公司;LipofectamineTM 2000、LR Clonase II、超纯琼脂糖,购自美国 Invitrogen 公司;限制性内切酶 *Pac* I,购自英国 NEB 公司;标准胎牛血清,购自天津灏洋生物制品科技有限公司;DMEM(高糖),购自美国 Gibco 公司;6 孔及 96 孔细胞培养板,购自美国 Costar 公司;25 cm² 细胞培养瓶,购自丹麦 NUNC 公司;PCR 引物由上海捷瑞有限公司合成,shRNA 模板由美国 IDT 公司合成。

1.2 针对 *BTN* 基因的 shRNA 干扰序列的设计与合成

根据 GenBank 公布的西农萨能羊 *BTN* 基因序列,利用在线 siRNA 选择程序(<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>),设计 3 条针对 *BTN* 基因的 siRNA 及 1 条阴性对照序列,3 条 siRNA 分别为:siRNA-366:5'-GCGTCGCTGTGAG GATACA-3',siRNA-400:5'-GAGGCCATCGTGCA TCTGA-3',siRNA-1053:5'-CCGAGAAACCAGAA AGATT-3';阴性对照序列为:siRNA-NC:5'-ACTA CCGTTGTTATAGGTG-3'。在 siRNA 的基础上,将 19 bp 的寡核苷酸以正、反向组合,中间添加 GAG-TACTG(含 *Sca* I 酶切位点,以便载体构建中进行鉴定)的发夹环序列间隔,使寡核苷酸内部形成发夹结构,每对寡核苷酸两端分别带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点,其中正义链的 3'端添加 TTTTTT 终止信号,即得到 shRNA 的正、反义链模板,详见表 1。

1.3 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体的构建

将合成的 4 对 shRNA 单链模板用退火缓冲液溶解后,将正、反义链退火形成双链寡核苷酸。退火缓冲液配方为:10 mmol/L Trisbase,50 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,pH 值调至 7.6。反应体系 20 μ L:200 μ mol/L 正、反义链各 5 μ L,退火缓冲液 2 μ L,灭菌双蒸水 8 μ L。退火条件为 95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,水温自然冷却至室温后,取出样品于 -20 $^{\circ}$ C 冷

冻保存备用。用 *Bam*H I 及 *Xho* I 双酶切 pENTR/CMV-GFP/U6 载体并切胶回收,然后将退火产物与 pENTR/CMV-GFP/U6 载体酶切回收产物连接,连接体系 10 μ L:pENTR/CMV-GFP/U6 载体酶切回收产物 2 μ L,退火产物 4 μ L,T4 DNA 连接酶 1 μ L,10 $\times$ Ligase Buffer 2 μ L,灭菌双蒸水补

至 10 μ L;4 $^{\circ}$ C 连接过夜。取连接产物,采用热激法转化 GT116 大肠杆菌,在含卡那霉素(50 ng/ μ L)抗性的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h,挑取单克隆菌落接种于 4 mL 含卡那霉素抗性的液体 LB 培养基上,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h 后,抽提质粒进行 *Sca* I 及 *Eco*RV 双酶切鉴定及 DNA 测序鉴定。

表 1 *BTN* 特异的编码 shRNA 的寡核苷酸序列

Table 1 Differential coding sequence of oligonucleotides of shRNA for *BTN*

名称 Name	序列 Sequence
shRNA-366-sense	5'-GATCCGCGTCGCTGTGAGGATACagagtactgTGTATCCTCACAGCGACGCTTTTTTC-3'
shRNA-366-antisense	5'-TCGAGAAAAAAGCGTCGCTGTGAGGATACacagtactcTGTATCCTCACAGCGACGCG-3'
shRNA-400-sense	5'-GATCCGAGGCCATCGTGCATCTGAgagtactgTCAGATGCACGATGGCCTCTTTTTTC-3'
shRNA-400-antisense	5'-TCGAGAAAAAAGAGGCCATCGTGCATCTGAcagtactcTCAGATGCACGATGGCCTCG-3'
shRNA-1053-sense	5'-GATCCCCGAGAAACCAGAAAGATTgagtactgAATCTTTCTGGTTTCTCGGTTTTTTC-3'
shRNA-1053-antisense	5'-TCGAGAAAAAACCGAGAAACCAGAAAGATTcagtactcAATCTTTCTGGTTTCTCGGG-3'
shRNA-NC-sense	5'-GATCCACTACCGTTGTTATAGGTGgagtactgCACCTATAACAACGGTAGTTTTTTTC-3'
shRNA-NC-antisense	5'-TCGAGAAAAAACTACCGTTGTTATAGGTGcagtactcCACCTATAACAACGGTAGTG-3'

注:表中小写字母部分为 *Sca* I 酶切位点。
Note:Lowercase in the table for restriction site of *Sca* I.

1.4 pDsRed1-C1-BTN 载体的构建

根据克隆到的 *BTN* 基因序列设计引物,上游引物:5'-CTCGAGCTATGGCAGTCTTTCCAAAT-3',下游引物:5'-GTCGACTTAAGGCACCCCTTGGCTGG-3',其中上游引物的 5'端增加 *Sal* I 酶切位点序列,下游引物 5'端添加 *Xho* I 酶切位点序列。从 pGEM-T-BTN 质粒中扩增 *BTN* 基因片段,将其产物连接到 pGEM-T Easy 载体上,构建 pGEM-T-*BTN* 质粒,利用 *Sal* I、*Xho* I 进行双酶切,回收目的片段并将其与 pDsRed1-C1 载体连接,构建 pDsRed1-C1-BTN 质粒,转化感受态大肠杆菌,提取质粒进行酶切及测序鉴定。

1.5 shRNA 序列的筛选

用含体积分数 10%胎牛血清、抗生素(青链霉素,含量为 100 个单位)的 DMEM 高糖培养基,在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 HEK 293 细胞。转染前 1 d,将生长良好的 HEK 293 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,每孔接种约 5 $\times$ 10⁵ 个细胞。次日,待细胞生长至 90%融合度时,将构建好的 5 个 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 干扰载体,分别与含目标基因的 pDsRed1-C1-*BTN* 质粒共转染 HEK 293 细胞,同时设空白对照、单独转染仅含目标基因质粒的对照,整个筛选重复 3 次。转染过程中质粒的提取参照北京天根公司的高纯度质粒小提中量试剂盒说明书进行;转染体系为:pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 质粒 3 μ g,pDsRed1-C1-BTN 质粒 1 μ g;转染过程参照 Invitrogen 公司的 LipofectamineTM 2000 试剂使

用说明书进行。转染 48 h 后,在荧光显微镜下观察蛋白的表达情况。

1.6 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 重组腺病毒载体的构建与鉴定

利用 Invitrogen 公司的 ViraPowerTM 腺病毒系统,在 LR ClonaseTM-II 酶的作用下,使 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 质粒和腺病毒骨架质粒 pAd/PL-DEST 发生重组,反应体系为 10 μ L:pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA (150 ng/ μ L) 1 μ L,pAd/PL-DEST(150 ng/ μ L)1 μ L,LR ClonaseTM-II 2 μ L,灭菌双蒸水补至 10 μ L。25 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加 1 μ L 蛋白酶 K 终止反应。取反应产物 2~5 μ L 转化 Top10 大肠杆菌,在含氨苄青霉素(100 ng/ μ L)的 LB 平板上于 37 $^{\circ}$ C 培养 14 h,挑取单克隆菌落接种于 2 mL 含卡那霉素抗性(50 ng/ μ L)的液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h 后,用牙签接种菌液于含氯霉素抗性(30 ng/ μ L)的 LB 平板上,不能在有氯霉素抗性的 LB 平板上生长的克隆初步定为阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒,进行 *Sca* I 酶切鉴定,同时将菌液进行 DNA 测序鉴定。

1.7 腺病毒的包装、扩增及滴度测定

1.7.1 包装 将上述构建好的重组腺病毒载体在 Top10 菌株中扩增,抽提质粒,取 5 μ g 重组质粒用 *Pac* I 酶切,将大片段经凝胶纯化回收后,转染至在 25 cm² 细胞培养瓶中生长、融合度为 80%~90%的 HEK 293 细胞,以包装重组腺病毒。HEK 293 细胞的转染参照 Invitrogen 公司的 Lipo-

fectamine™ 2000 试剂使用说明书进行。转染后第 3 天,在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况,以跟踪腺病毒的包装与增殖过程。转染 7~12 d 后,当细胞出现明显的病变反应(细胞变圆,呈葡萄状,且有 50% 的细胞从培养瓶底部脱落)时,收集全部培养液及细胞至离心管中,3 000 r/min 离心 5 min,弃去大部分上清液(收集并于 -20 ℃ 保存备用),仅留 2 mL 于离心管内,将细胞重悬后经 -80 ℃/37 ℃ 反复冻融 3 次,将冻融液 3 000 r/min 离心 5 min,收集含病毒的上清液,即为第 1 代病毒原液。

1.7.2 扩 增 取上述第 1 代病毒原液 0.5~1 mL,重新接种 HEK 293 细胞(生长融合度为 70%~80%),待细胞完全病变(接种后 3~4 d)时,按前述方法反复冻融细胞 3 次,离心收集病毒上清液,即为第 2 代病毒悬液。用第 2 代病毒悬液多次感染 HEK 293 细胞,重复“感染-冻融-收集”,大量扩增重组腺病毒。

1.7.3 滴度测定 将最终获得的腺病毒在接种靶细胞前,用 TCID₅₀ 法(50% 组织培养感染剂量法)测定腺病毒滴度。将 HEK 293 细胞以 1×10⁴/孔接种于 96 孔板,待细胞生长至 80% 融合时,取病毒液分别以不同的稀释度(10⁻³~10⁻¹⁰)感染细胞,每个稀释度的病毒液以 100 μL/孔感染 10 孔细胞(同一排),同时设 2 孔阴性对照(不加病毒)。10 d 后观察每个稀释度出现细胞病变效应(Cytopathic effect,CPE)的孔数,并计算 CPE 阳性比率之和(稀释度为 10⁻¹ 与 10⁻² 的阳性比率也计算在内,其值均为 1)。用 Karbers 统计法计算出病毒滴度 T : $T(\text{TCID}_{50}/\text{mL})=10^{1+d(s-0.5)}$,其中 $d=1/\text{g}$ 稀释度=1 (对于 10 倍的稀释度而言), s =阳性比率之和(从第 1 个 10 倍比稀释度算起)。并根据以下公式,将病毒滴度的单位换算为“PFU/mL”:

$$T=1\times10^X \text{ TCID}_{50}/\text{mL}=1\times10^{X-0.7} \text{ PFU/mL}。$$

2 结果与分析

2.1 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体的构建

将退火后得到的 shRNA-366、shRNA-400、shRNA-1053 及 shRNA-NC 双链寡核苷酸,与 pENTR/CMV-GFP/U6 载体进行连接、转化、涂平板、挑单克隆、抽提质粒后,用 *Sca* I 及 *Eco*RV 双酶切,结果出现长度为 3 200 和 1 800 bp 的 2 条片段(图 1),与预期结果相吻合。测序结果表明,pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-366、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-400、pENTR/CMV-GFP/U6-shRA-1053、

pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 载体中插入的序列,与所设计的序列完全一致,说明载体构建成功。

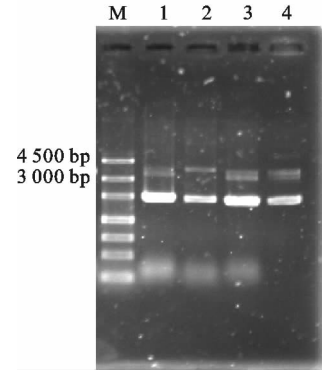


图 1 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 的酶切鉴定
M, DNA 标记 III;1~4. sh366、sh400、sh1053、shNC 的
Sca I 和 *Eco*RV 双酶切产物

Fig. 1 Double digestion identification of
pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA

M, DNA Marker III;1~4. sh366, sh400, sh1053 and shNC
digested by *Sca* I and *Eco*RV

2.2 pDsRed1-C1-BTN 载体的构建

利用含有 *BTN* 基因的菌液,及 1.4 中设计的引物进行菌液 PCR 扩增,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,出现了 1 581 bp 的目的基因片段;利用 *Sal* I 和 *Xho* I 内切酶对 pGEM-T-BTN 进行双酶切分析,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,获得了 1 581 bp 的目的基因片段(图 2)。将连接至 pDsRed1-C1 载体上的 *BTN* 基因,进行菌落 PCR 扩增后,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,出现 1 581 bp 的目的基因片段;提取质粒后进行双酶切分析,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,获得了 1 581 bp 的目的基因片段(图 3),表明 pDsRed1-C1-BTN 载体构建成功。

2.3 shRNA 序列的筛选

将表达干扰序列的 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体,分别与含相应嗜乳脂蛋白基因片段的载体(pDsRed1-C1-BTN)共转染 HEK 293 细胞,48 h 后在荧光显微镜下观察,结果(图 4)发现,各组中绿色荧光蛋白表达量基本相同,但与阴性对照相比,pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-366、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-1053 转染组红色荧光蛋白表达量均降低,pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-400 转染组降低最明显;pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 组与不转染干扰载体的对照组基本相同。试验中,红色荧光蛋白与嗜乳脂蛋白基因部分功能域形成融合蛋白,因此红色荧光蛋白表达量降低,说明设

计的干扰序列对嗜乳脂蛋白基因具有干扰效果。

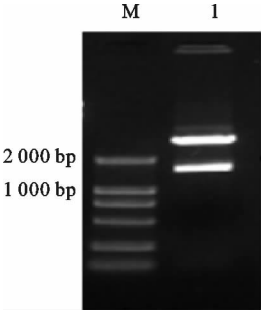


图 2 pGEM-T-BTN 质粒的双酶切鉴定
M, DNA 标记 2000;1, pGEM-T-BTN 的 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切产物

Fig. 2 Double digestion identification of pGEM-T-BTN
M, DNA Marker DL2000;1, pGEM-T-BTN digested by *Sal* I and *Xho* I

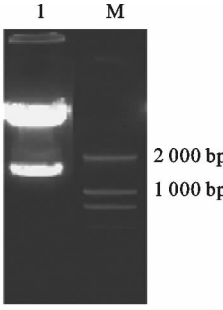


图 3 pDsRed1-C1-BTN 质粒的双酶切鉴定
M, DNA Marker DL2000;1, pDsRed1-C1-BTN 的 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切产物

Fig. 3 Double digestion identification of pDsRed1-C1-BTN
M, DNA Marker DL2000;1, pDsRed1-C1-BTN digested by *Sal* I and *Xho* I

图 4 shRNA 干扰序列的筛选(200×)

A,B,C,D. 分别为 shRNA-NC、shRNA-366、shRNA-1053、shRNA-400 序列的干扰效果；
1(A1,B1,C1,D1)、2(A2,B2,C2,D2). 分别为 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 干扰载体与 pDsRed1-C1-BTN 靶基因表达载体共转染 HEK 293 细胞 48 h 后，荧光显微镜下绿色荧光及红色荧光的表达情况；
3(A3,B3,C3,D3). 为对照组，即单独转染 pDsRed1-C1-BTN 靶基因表达载体 48 h 后荧光显微镜下红色荧光的表达情况

Fig. 4 Screening of shRNA sequence for RNA interference

A,B,C,D. Generation and testing of expressed shRNA (shRNA-NC, shRNA-366, shRNA-1053, shRNA-400)；
1 (A1,B1,C1,D1), 2(A2,B2,C2,D2). Expression of green and red fluorescence of HEK 293 cell 48 h post cotransfection of pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA and pDsRed1-C1-BTN vectors; 3. Control, expression of red fluorescence of HEK 293 cell 48 h post transfection of pDsRed1-C1- BTN vector

2. 4 重组腺病毒载体的构建及鉴定

经过氨苄青霉素及氯霉素双重筛选后，提取质

粒进行 *Sca* I 单酶切鉴定，酶切产物经过 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳后，出现了不同条带(图 5)，表明

pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体质粒与 pAd/PL-DEST 腺病毒骨架质粒重组成功。测序结果显示,重组序列与 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 中的原序列完全一致,证明重组腺病毒载体构建成功。

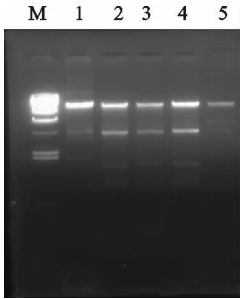


图 5 重组 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 质粒的 *Sca* I 单酶切鉴定
M. DNA 标记 λ -*Hind* III;1,2. pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-sh366 的 *Sca* I 单酶切产物;3,4. 重组 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-sh400 的 *Sca* I 单酶切产物;5. 重组 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shNC 的 *Sca* I 单酶切产物

Fig. 5 Enzyme-digested products of recombinant pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA
M. λ -*Hind* III digest DNA Marker;1,2. *Sca* I digested products of recombinant pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-sh366;
3,4. *Sca* I digested products of recombinant pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-sh400;5. *Sca* I digested products of recombinant pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shNC

2.5 腺病毒的包装、扩增及滴度测定

pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 重组质粒经 *Pac* I 线性化后,转染 HEK 293 细胞,3 d 后在荧光显微镜下可观察到部分细胞有 GFP 蛋白表达;7 d 后大量细胞表达 GFP,同时细胞出现病变反应;12 d 后 50% 的细胞从培养瓶底部脱落(图 6)。用病毒上清液反复感染 HEK 293 细胞 3 次后,获得高滴度的腺病毒,经 TCID₅₀ 法计算可知其滴度为 5×10^9 PFU/mL。

3 讨论

RNA 干扰技术是研究基因功能的一个重要手段, RNAi 表达载体有质粒载体和病毒载体,由于病毒载体克服了质粒转染细胞效率低的缺点,可实现靶基因较长时间的沉默,因此具有更广泛的临床应用前景。腺相关病毒(AAV)^[2] 已成功用于 siRNA 的运送,而且 AAV 可以在哺乳动物细胞发生位点特异重组,能最大程度地减少病毒整合导致的基因突变效应。Devroe 等^[11] 开发研制了 RNAi 的逆转录病毒载体,并在 Hela 细胞中实现了对 p75 基因的长期稳定敲除;Schomber 等^[12] 证实,慢病毒载体

可以在哺乳动物细胞中高效表达 siRNA,并且不受细胞分裂状态的影响;Uprichard 等^[13] 用腺病毒 siRNA 载体,设计了针对乙肝病毒 RNA 的 siRNA,在体外成功清除了 HBVRNA,并可长达数天抑制乙肝病毒的复制。

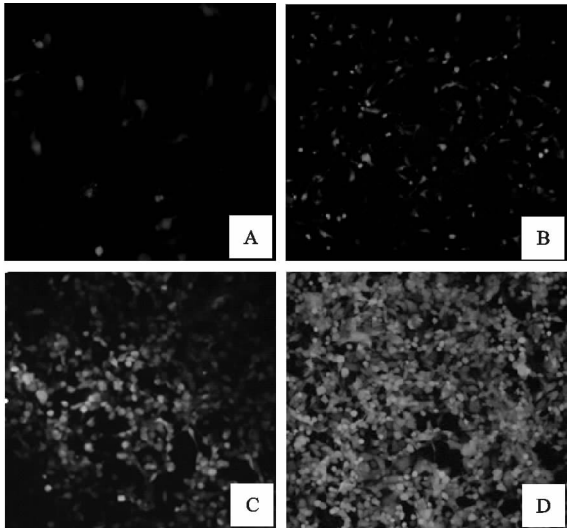


图 6 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 转染 HEK 293 细胞的荧光显微观测(100 $\times$)
A—D. 分别为 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 转染 HEK 293 细胞 3,5,8 和 12 d
Fig. 6 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA transfected HEK 293 cell(100 $\times$)
A—D. pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA transfected HEK 293 cell 3,5,8,12 d

应用 RNA 干扰技术的另一关键在于 shRNA 的设计。shRNA 表达载体的设计多选用 Pol III 启动子 U6^[14] 或 H1^[15], 因为 Pol III 启动子有严格保守的转录起始和终止位点,而且在大部分哺乳动物细胞中均有活性,从而可以实现 shRNA 的有效转录。细胞内 shRNA 实现 RNAi 的过程,与内源性 miRNA 的机制^[16] 相似,在核内由 Pol III 启动转录形成发夹样结构的 shRNA,被 Drosha 酶识别处理后输出核外,于胞质内在 RNA 酶 Dicer 的作用下生成 siRNA,进入 RNAi 途径。因此,shRNA 编码序列(即 ds oligos)的设计,对 RNAi 的实验效果具有重要影响。本试验针对 *BTN* mRNA 序列,选择编码区起始密码子下游不同距离的 3 个 19 nt 序列作为干扰靶点,以避免有位点不能产生基因沉默效应。同时,shRNA 编码序列的设计,遵循了先前研究者的建议:GC 含量在 35%~55%,干扰靶点避开 5' 和 3' 端的非编码区^[17];编码发夹结构的模板为正义链一环一反义链的顺序^[18],环的结构为 4 个碱基长

度,正义链与反义链是反向互补序列,转录后形成发夹结构的柄;避免了编码序列中出现 3 个以上连续 T 碱基,5'端起始碱基为 G 或 A^[19];用 BLAST 软件在基因库中排除了与靶基因以外基因的同源性。关于发夹结构环的长度,据研究报道,从 3 nt 到 19 nt 均可以获得满意的基因沉默效应,也有人认为 9~19 nt 的长度最佳^[14]。本试验选择了“GAGTACTG”8 nt 环结构,并通过后面的序列筛选,最终成功实现了靶基因的表达抑制。

本试验选择的载体系统,根据 λ 噬菌体可以进行位点特异重组的特性,使 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体可以插入到腺病毒载体的重组位点 attR1 与 attR2 之间,同时腺病毒载体的重组位点 attR1 与 attR2 之间有 ccdB 基因和氯霉素抗性基因,它们在重组后丢失,从而可用于对重组子转化时进行负性筛选以及阳性重组克隆的抗性鉴定。同时,本试验选择的腺病毒载体为 E1 和 E3 区缺失的复制缺陷病毒,在哺乳动物细胞中不能进行复制。HEK 293 细胞系能提供病毒的 E1、E3 组分,可以实现病毒的包装;同时,用收获的初始包装病毒感染 HEK 293 细胞,进行病毒扩增,可获得大量高滴度的病毒液。这为后续转染乳腺上皮细胞、研究嗜乳脂蛋白基因(BTN)的功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] Machida Y, Okada T, Kurosawa M, et al. rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(1): 190-197.
- [3] Yinbin W, Shuang H. Adenovirus technology for gene manipulation and function studies [J]. Drug Discovery Today, 2000, 5: 10-16.
- [4] Lan H M, Lucinda J, Jacks W. A review of the molecular and cellular biology of butyrophilin, the major protein of bovine milk fat globule membrane [J]. J Dairy Sci, 1993, 76: 3832-3850.
- [5] Ogg S L, Weldon A K, Dobbie L, et al. Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets [J]. PNAS, 2004, 101: 10084-10089.
- [6] Banghart L R, Chamberlain C W, Velarde J, et al. Butyrophilin is expressed in mammary epithelial cells from a single-sized messenger RNA as a type I membrane glycoprotein [J]. J Biol Chem, 1998, 273(7): 4171-4179.
- [7] Ogg S L, Komaragiri M, Mather I. Structural organization and mammary-specific expression of the butyrophilin gene [J]. Mammalian Genome, 1996, 7: 900-905.
- [8] Jack L J, Mather I H. Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation [J]. J Biol Chem, 1990, 265(24): 14481-14486.
- [9] Hare M P, Cipriano F, Palumbi S R. Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species [J]. Evolution Int J Org Evolution, 2002, 56(4): 804-816.
- [10] 张丽娟, 罗 军, 武会娟, 等. 西农萨能奶山羊 gBTN1A1 基因的筛选、克隆及序列分析 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 772-777.
Zhang L J, Luo J, Wu H J, et al. Screening, cloning and sequence analysis of gBTN1A1 gene in Xinong Saanen dairy goat [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 15(5): 772-777. (in Chinese)
- [11] Devroe E, Silver P A. Retrovirus-delivered siRNA [J]. BMC Biotechnol, 2002, 28: 2-15.
- [12] Schomber T, Kalberer P C, Wodnar-Filipowicz A, et al. Gene silencing by lentivirus-mediated delivery of siRNA in human CD34⁺ cells [J]. Blood, 2004, 103(12): 4511-4513.
- [13] Uprichard S L, Boyd B, Althage A, et al. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(3): 773-778.
- [14] Sui G C, Soohoo C, Affar E, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(8): 5515-5520.
- [15] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296: 550-553.
- [16] Lee Y, Jeon K, Lee J T, et al. MicroRNA maturation: step-wise processing and subcellular localization [J]. EMBO J, 2002, 21(17): 4663-4670.
- [17] Elbashir S M, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. EMBO J, 2001, 20(23): 6877-6888.
- [18] Yu J Y, Taylor J, Deruiter S L, et al. Stimutaneous inhibition of GSK3 and GSK3 using hairpin siRNA expression vectors [J]. Molecular Therapy, 2003, 7: 228-236.
- [19] Vladimir P. Design of shRNAs for RNAi-A lesson from pre-miRNA processing: Possible clinical applications [J]. Brain Research Bulletin, 2005, 68: 115-120.