

DOI:CNKI:61-1390/S.20111021.1707.020

网络出版时间:2011-10-21 17:07

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111021.1707.020.html

奶山羊 *LXR α* 基因 shRNA 序列的筛选及腺病毒载体的构建与鉴定

钟 瑜, 罗 军, 王 维, 胡仕良, 李 君, 孙雨婷, 郝 娟, 石恒波

(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】构建针对奶山羊肝脏 X 受体 α (Liver X receptor α , *LXR α*) 基因的干扰腺病毒载体。**【方法】**根据奶山羊 *LXR α* 基因 CDS 区域设计小发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA), 分别构建 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 及 pDsRed1/C1-*LXR α* 载体, 共转染 HEK 293 细胞, 48 h 后观察其荧光蛋白表达量, 筛选出具有明显干扰效应的 shRNA。将具有明显干扰效应的 shRNA 载体与腺病毒骨架载体 pAd/PL-DEST 在 LR ClonaseTM II 重组酶的作用下进行重组, 经氨苄青霉素及氯霉素抗性筛选后获得重组腺病毒载体。将构建好的重组腺病毒载体经 *Pac* I 酶切线性化并回收后, 转染 HEK 293 细胞, 培养 7~10 d 后收集细胞并反复冻融, 收集细胞裂解液, 反复扩增 3 次后, 获得高滴度的重组腺病毒, 测定其病毒滴度。**【结果】**①设计出了 shRNA-490、shRNA-496、shRNA-509 和 shRNA-923 4 条 shRNA 序列; ②得到 shRNA-490 和 shRNA-923 2 条具有明显干扰效应的 shRNA; ③获得 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-490 和 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-923 2 个重组腺病毒载体, *Sca* I 酶切及测序结果均正确, 2 个腺病毒重组载体滴度均为 5×10^8 PFU/mL。**【结论】**奶山羊 *LXR α* 基因重组 shRNA 腺病毒载体构建成功, 为利用 RNA 干扰技术研究 *LXR α* 基因在乳腺上皮细胞中的功能奠定了基础。

【关键词】 肝脏 X 受体 α ; RNA 干扰; 腺病毒载体; 奶山羊

【中图分类号】 Q782

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)11-0041-07

Screening of shRNA sequence and construction and identification of recombinant adenovirus vector of *LXR α* gene of dairy goats

ZHONG Yu, LUO Jun, WANG Wei, HU Shi-liang, LI Jun,
SUN Yu-ting, HAO Juan, SHI Heng-bo

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

Abstract: 【Objective】 The study was to construct the short hairpin RNA (shRNA) recombinant adenovirus vector of dairy goat mammary liver X receptors α (*LXR α*) gene of Xinong Saanen dairy goat. **【Method】** We designed different shRNA targeting the dairy goat *LXR α* gene CDS region, and constructed pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA and pDsRed1/C1-*LXR α* vectors. The vectors were cotransfected into HEK 293 cells, and the interference efficiency was detected after 48 hours by Fluorescence protein observation. The pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA vector and the backbone vector pAd/PL-DEST were recombined under the catalyzation of LR ClonaseTM II, and recombinant vectors were selected by ampicillin & chloramphenicol. The recombinant adenovirus vectors were transfected into HEK 293 cell after linearization with

* [收稿日期] 2011-04-20

[基金项目] 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-162B)

[作者简介] 钟 瑜(1987—), 女, 陕西户县人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

E-mail: christinezhongzhao@gmail.com

[通信作者] 罗 军(1965—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: luojun@nwsuaf.edu.cn

Pac I enzyme. The cells were frozen and thawed 7—10 days after transfection, and cell lysates were harvested. Transfection-culture-harvest was repeated three times to obtain high titer of the recombinant adenovirus and detected the titer of the recombinant adenovirus. 【Result】 ① Four different shRNA sequences shRNA-490, shRNA-496, shRNA-509 and shRNA-923 were designed. ② Two shRNA entry vectors pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-490 and pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-923 showed obvious interference effect. ③ *Sca* I enzyme digestion of recombinant adenovirus vector and sequencing analysis were correct with the titer of 5×10^8 PFU/mL for both vectors. 【Conclusion】 Two shRNA recombinant adenovirus vectors were obtained which would play a vital role for the function analysis of *LXR α* gene in goat primary mammary epithelial cells using RNA interference.

Key words: liver X receptor α ; RNA interference; adenovirus vector; dairy goat

小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 是人工设计的可形成发夹结构的双链 RNA, 包括 2 个短的反向重复序列, 中间由一茎环 (Loop) 序列分开。shRNA 转入细胞后会在 Dicer 酶的切割下形成小干扰 RNA (Small interference RNA, siRNA), 其长度约 21~25 bp, 可与其他蛋白质结合形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC 能识别并切割靶 mRNA 序列, 具有高度特异性, 有时 siRNA 1 个碱基发生改变就会大大降低 RISC 封闭靶基因的效果^[1]。腺病毒属复制缺陷型病毒 (E1 区缺陷), 其安全性较其他病毒载体高, 在普通细胞中无自我复制能力, 本身无致癌性, 携带的外源基因不整合到宿主基因组中, 无引起插入突变的危险; 此外, 腺病毒颗粒稳定, 具有很高的感染性。因此, 利用腺病毒构建干扰载体会显著提高干扰效率。

肝脏 X 受体 (Liver X receptors, LXRs) 是核受体超家族的成员, 受配体调控, 具有 2 种亚型: *LXR α* (NR1H3) 和 *LXR β* (NR1H2), *LXR α* 为组织特异性表达蛋白, 主要在脂肪组织、巨噬细胞、肝脏、骨骼肌等脂质代谢旺盛的组织中表达, *LXR β* 蛋白可在全身各组织中表达, 但表达量较低^[2]。*LXR α* 基因在脂肪酸和胆汁酸合成、葡萄糖代谢及胆固醇流出等方面具有重要的调控作用^[3]。*LXR α* 与维甲酸类受体 (RXR) 形成异质二聚体 (*LXR/RXR*) 而发挥作用, *LXR/RXR* 通常在靶基因的启动区域结合肝脏 X 受体应答元件 (LXRE)^[4], 标准的 LXRE 是一种被 4 个核苷酸分隔的六核苷酸直接重复序列 (DR4), 其半数核苷酸保守, 另一半核苷酸变化显著^[5]。研究表明, *LXR α* 通过上调许多脂质代谢途径中的酶而促进脂质合成, *LXR α* 激动剂可直接促进 LXRs 结合到固醇应答元件 (SRE) 的结合蛋白-1c (SREBP-1c) 启动子区域, 增强脂质生成相关基因

的表达^[6]。而 *LXR α* 基因敲除小鼠不仅存在胆固醇代谢缺陷, 并且固醇调节元件结合蛋白 (SREBP-1c)、脂肪酸合酶 (FASN)、酯酰辅酶 A 去饱和酶 (SCD-1) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 的表达也有所下降^[7]。*LXR α* 可以经脂肪酸诱导产生 (不饱和脂肪酸比饱和脂肪酸更有效)^[8]。因此, 阐明 *LXR α* 基因的功能对研究脂肪酸代谢及脂质生成过程具有重要意义。

本研究利用 pENTR/CMV-GFP/U6 和 pAd/PL-DEST 腺病毒系统介导的 RNA 干扰, 构建针对奶山羊 *LXR α* 基因的高效干扰腺病毒载体, 以期在细胞水平上利用 RNA 干扰技术研究 *LXR α* 基因功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含奶山羊 *LXR α* 基因 CDS 序列的质粒^[9]、pDsRed1/C1 载体、HEK293 细胞系由陕西省农业分子生物学重点实验室保存, *LA Taq* DNA 聚合酶、*Kpn* I、*Bam* H I、*Sca* I、*Xho* I 购自大连 TaKaRa 公司, 腺病毒入门载体 pENTR/CMV-GFP/U6 及骨架载体 pAd/PL-DEST、Gateway LR Clonase™ II Enzyme Mix、shRNA 模板购自美国 Invitrogen 公司, 高纯度质粒小提中量试剂盒、TOP10 感受态细胞、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司, B 型微量质粒快速提取试剂盒购自北京博大泰克公司, *Pac* I 酶购自 NEB 公司, FuGENE HD 转染试剂购自 Roche 公司。PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *LXR α* 基因 shRNA 序列的设计 根据前期试验克隆的 *LXR α* 基因 CDS 序列, 通过 siRNA 在线设计软件 (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siR->

NAext/home. php)筛选出 4 条针对 *LXRα* 基因的 siRNA 序列,在其基础上增加 Loop 区(含 *Sca* I 酶切位点)、终止序列(连续的 6 个 T)和连接所用的粘

性末端(*Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点)得到 shRNA 正义链和反义链(表 1)。

表 1 *LXRα* 基因 shRNA 序列
Table 1 shRNA sequence of *LXRα* gene

名称 Name	正义链 Sense	反义链 Anti sense
shRNA-490	5'-GATCCGGAGGAGTGTGTCTTATCagag-tactgTGATAAGACACACCTCCTTTTTC-3'	5'-TCGAGAAAAAAGGAGGAGTGTGTCTTATCAcagtactcTGATAAGACACACTCCTCCG-3'
shRNA-496	5'-GATCCGTGTGTCTTATCAGAAGAAgag-tactgTTCTTCTGATAAGACACACTTTTTC-3'	5'-TCGAGAAAAAAGTGTGTCTTATCAGAAGAAcagtactcTTCTTCTGATAAGACACACG-3'
shRNA-509	5'-GATCCGAAGAACAGATCCGTCTGagag-tactgTCAGACGGATCTGTTCTTCTTTTTC-3'	5'-TCGAGAAAAAAGTGTGTCTTATCAGAAGAAcagtactcTTCTTCTGATAAGACACACG-3'
shRNA-923	5'-GATCCGGAAGTGAGAGTATCACCTgag-tactgAGGTGATACTCTCACTTCCTTTTTC-3'	5'-TCGAGAAAAAAGGAAGTGAGAGTATCACCTcagtactcAGGTGATACTCTCACTTCCG-3'

注:正义链和反义链小写部分为 Loop 区
Note:The lowercase of sense and anti sense shRNA is the Loop region.

1. 2. 2 pDsRed1/C1-LXRα 真核表达载体的构建

根据前期试验已克隆得到的奶山羊 *LXRα* 基因 CDS 序列,设计带有 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点的引物,引物序列分别为:上游 5'-CGGG GTACCAT GTCTTTGTGGCTGGAGGC-3',下游 5'-CGCGGA TCCTTCGTGCACGTCCCAGAT-3'。以本实验室保存的含 *LXRα* 基因 CDS 区的质粒 pGEM-Teasy-LXRα 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为:pGEM-Teasy-LXRα 质粒模板 0.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 2.5 μL,LA *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL,10× buffer 2 μL,双蒸灭菌水 12.8 μL。PCR 反应程序为:95 ℃预变性 4 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。取 PCR 产物和 pDsRed1/C1 质粒,分别进行 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后回收目的片段,连接后转化 TOP10 大肠杆菌感受态细胞,经卡那霉素抗性筛选后挑取单克隆菌落,提取其质粒进行 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定,并送南京金斯瑞公司测序。

1. 2. 3 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体的构建 将合成的单链 shRNA 95 ℃水浴 10 min,自然冷却至室温形成双链 shRNA,退火体系为 20 μL,其中 200 μmol/L 正、反义链各 5 μL,退火缓冲液 2 μL,灭菌双蒸水 8 μL。退火缓冲液由 10 mmol/L Trisbase,50 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA 组成,pH 为 7.6。用 *Bam*H I 及 *Xho* I 双酶切 pENTR/CMV-GFP/U6 载体并与退火产物连接,转化 TOP10 感受态细胞,经卡那霉素抗性筛选后挑取单克隆,37 ℃过夜培养,抽提质粒,进行 *Sca* I 单酶切鉴定,将阳性质粒分别命名为 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-490、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-

496、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-509 和 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-923,并送南京金斯瑞公司测序。

1. 2. 4 有效 shRNA 的筛选 利用高纯度质粒小提中量试剂盒分别抽提构建成功的 shRNA 载体及 pDsRed1/C1-LXRα 真核表达载体,并测定其浓度。使用 DMEM 高糖培养基培养 HEK 293 细胞,铺于 24 孔板中,选取生长状况良好、融合度约 90%的 HEK 293 细胞用于细胞转染。分别将构建好的 4 个 shRNA 载体 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-490、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-496、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-509、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-923 与 pDsRed1/C1-LXRα 共转染 HEK 293 细胞,以单独转染 pDsRed1/C1-LXRα 为对照,每组设 3 个重复,筛选 2 次。转染时 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体与 pDsRed1/C1-LXRα 的物质的量比为 1:1,利用 FuGENE HD 转染试剂转染,具体转染过程参照试剂说明书进行。48 h 后,在荧光显微镜下观测荧光蛋白表达情况,其表达量少的 shRNA 为具有明显干扰效应的 shRNA。

1. 2. 5 重组 shRNA 腺病毒载体的构建 根据 Invitrogen 公司的 Gateway LR Clonase™ II Enzyme Mix 系统,在 LR Clonase™ II 的作用下,将筛选出的具有明显干扰效应的 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 干扰载体与腺病毒骨架载体 pAd/PL-DEST 进行重组,构建 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 腺病毒载体。重组体系为:pAd/PL-DEST 质粒 150 ng, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体 150 ng,补加 TE buffer 至总体积 8 μL,混匀,加入 LR Clonase™ II 酶 2 μL;重组反应条件为 25 ℃水浴孵育过夜,加 1 μL 蛋白酶 K,37 ℃作用

10 min 终止反应。将反应产物转化 TOP10 大肠杆菌感受态细胞,进行氨苄青霉素抗性筛选。挑取单克隆在含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中培养 12 h,取少量菌液接种于氯霉素抗性 LB 培养基进行复筛,如果不能在氯霉素抗性培养基中生长,则重组成功。抽提重组成功的质粒,进行 *Sca* I 酶切鉴定,并送大连宝生物公司测序。

1.2.6 重组 shRNA 腺病毒载体的线性化、包装及扩增 用 *Pac* I 线性化酶切重组好的腺病毒载体,乙醇沉淀法对酶切产物进行回收,具体操作如下:在酶切产物中先加入 1/10 体积 3 mol/L 的 NaAc 溶液,再加入 2~5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA,−80 ℃放置 3 h,−20 ℃过夜;4 ℃ 15 000 *g* 离心 30 min,弃去上清,再次 4 ℃ 15 000 *g* 离心 30 min,弃去多余上清;加入 200 μL 预冷的体积分数 70%乙醇,4 ℃15 000 *g* 离心 5 min,重复此步操作 1 次;弃上清,除去多余乙醇;用超纯水溶解 DNA 并测定其浓度。

将回收的线性化产物转染生长状态良好、融合度约 70% 的 HEK 293 细胞,转染操作参照 Fu-GENE HD 转染试剂说明书进行。转染后第 3 天在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况,当细胞病变达 80% 左右(需培养 7~10 d)时,收集细胞悬液,反复冻融 3 次,3 000 r/min 离心 5 min,收取上清毒液,此即为第 1 代病毒液。取第 1 代病毒液 500~1 000 μL 重新接种于生长状态良好的 HEK 293 细胞中,按上述方法重复包装扩增并收取第 2

代毒液,如此重复多次感染 HEK 293 细胞至第 4 代,即可得到高滴度的病毒液。

1.2.7 重组腺病毒滴度的测定 取第 4 代重组腺病毒原液 10 μL,用高糖培养基进行 10 倍递增梯度稀释,获得不同浓度梯度的病毒液,备用。挑选生长状态良好的 HEK 293 细胞铺于 96 孔板中,用不同浓度梯度的病毒液感染细胞,每孔加 200 μL 病毒液,每个稀释度重复 3 孔,在 18~24 h 之内,以病毒浓度自高到低的方向观测有绿色荧光的细胞数量,如前一孔有绿色荧光细胞数量大于等于 5 个,而此孔有绿色荧光细胞数量小于 5 个或没有,且此孔后荧光表达消失,则该孔为计量孔,计为 1 U。病毒滴度(PFU/mL)=(1 U×计量孔相对于第 1 孔的稀释倍数)/第 1 孔加入病毒的体积^[10]。

2 结果与分析

2.1 pDsRed1/C1-LXRα 真核表达载体的鉴定 PCR 扩增产物经 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后,获得长度为 1 344 bp 的片段(图 1A),与 LXRα 基因 CDS 长度吻合;pDsRed1-C1 同样经 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后,获得片段的长度约为 4 700 bp (图 1B),与 pDsRed1/C1 质粒长度吻合;pDsRed1/C1-LXRα 真核表达载体经 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后,获得了约 4 700 和 1 344 bp 的片段(图 1C),与预期结果一致,表明 pDsRed1/C1-LXRα 真核表达载体构建成功。测序结果也表明 pDsRed1/C1-LXRα 载体构建成功。

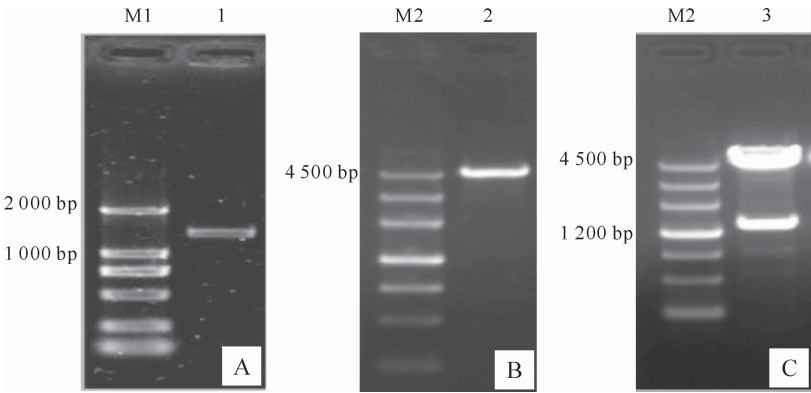


图 1 pDsRed1/C1-LXRα 真核表达载体的鉴定

A. *LXRα* 基因 PCR 产物双酶切结果;B. pDsRed1-C1 双酶切结果;C. pDsRed1/C1-LXRα 双酶切结果;M1. DNA Marker DL2000; M2. DNA Marker III;1~3. 分别为 *LXRα* 基因、pDsRed1/C1 和 pDsRed1/C1-LXRα 的 *Kpn* I、*Bam*H I 双酶切产物

Fig. 1 Identification of pDsRed1/C1-LXRα vector

A. Double enzyme digestion of *LXRα* PCR product;B. Double enzyme digestion of pDsRed1/C1 vector;

C. Double enzyme digestion of pDsRed1/C1-LXRα vector;M1. DNA Marker DL2000;M2. DNA Marker III;

1-3. *Kpn* I & *Bam*H I enzyme digestion of *LXRα* PCR product, pDsRed1/C1 vector and pDsRed1/C1-LXRα vector respectively

2.2 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体的鉴定

构建成功的 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体含 *Sca* I 酶切位点,而空载 pENTR/CMV-GFP/U6(4 639 bp)不含 *Sca* I 酶切位点,因此空载体不会被 *Sca* I 酶切,不能形成单一条带,而成功与 shRNA 连接的载体则会被 *Sca* I 酶切形成单一条带。由图 2 可知,4 个 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 经 *Sca* I 酶切后均获得了约 4 700 bp 的单一条带,与预期结果相符。测序结果显示,pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 构建成功。

2.3 有效 shRNA 载体的筛选

pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA、pDsRed1/C1-LXR α 共转染 HEK 293 细胞 48 h 后,pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-490 和 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-923 载体红色荧光蛋白表达量较低(图 3),表明其对奶山羊 *LXR α* 基因具有明显的干扰效果。

2.4 重组 shRNA 腺病毒载体的鉴定

pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-490 和 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-923 重组腺病毒载体经 *Sca* I 酶切鉴定后,结果与对照组 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6 载体 *Sca* I 酶切结果显示不同数量的条带,比对照组少 1 条条带(图

4),与预期结果相符。测序结果也显示,shRNA 腺病毒载体重组成功。

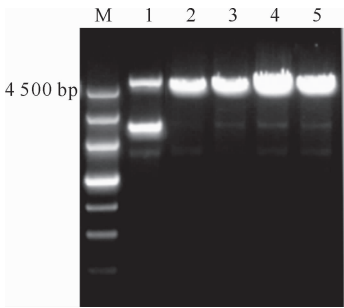


图 2 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体的 *Sca* I 酶切鉴定

M. DNA Marker III;1. 空载体 pENTR/CMV-GFP/U6 *Sca* I 酶切产物;2~5. 分别为 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-490、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-496、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-509、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-923 质粒 *Sca* I 酶切产物

Fig. 2 *Sca* I enzyme digestion identification of pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA vectors
M. DNA Marker III;1. Product of *Sca* I enzyme digestion of pENTR/CMV-GFP/U6;2-5. Product of *Sca* I enzyme digestion of pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-490, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-496, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-509, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-923

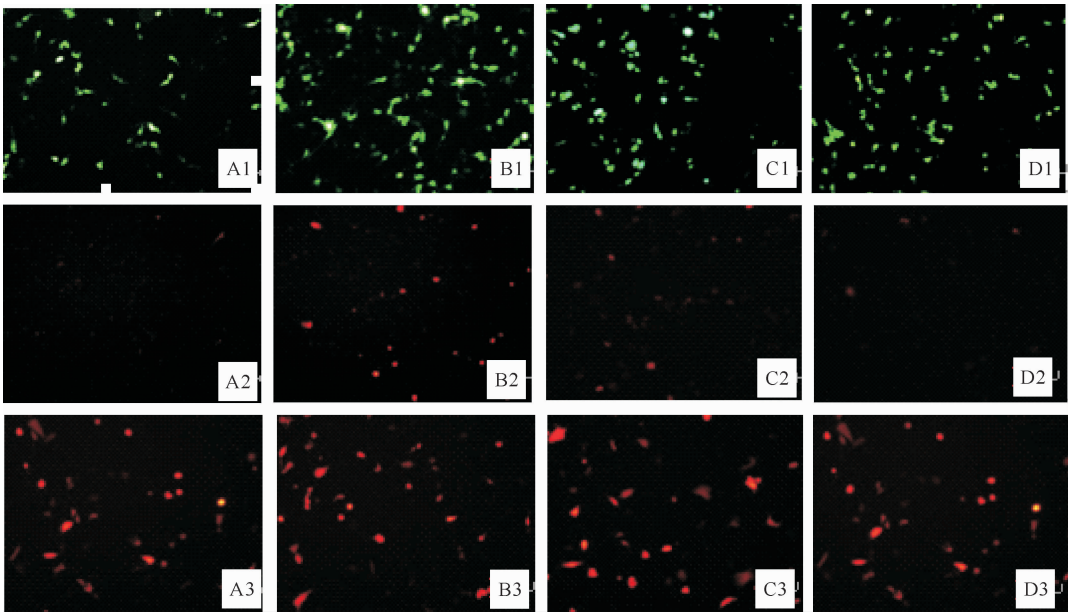


图 3 有效 shRNA 的筛选($\times 100$)

A1 和 A2,B1 和 B2,C1 和 C2,D1 和 D2 分别为 shRNA-490、shRNA-496、shRNA-509、shRNA-923 与 pDsRed1/C1-LXR α 载体共转染 HEK 293 细胞 48 h 后绿色荧光及红色荧光表达情况;A3、B3、C3、D3 为对照组 pDsRed1/C1-LXR α 转染 HEK 293 细胞 48 h 后红色荧光表达情况

Fig. 3 Screening of effective shRNA ($\times 100$)

A1&A2,B1&B2,C1&C2,D1&D2 were the expression of Green and Red Fluorescence after 48 h that shRNA-490, shRNA-496,shRNA-509,shRNA-923 vectors cotransfected with pDsRed1/C1-LXR α vector respectively into HEK 293 cell line; A3,B3,C3,D3. Control, the expression of Red Fluorescence after 48 h that pDsRed1/C1-LXR α vector was transfected into HEK 293 cell line

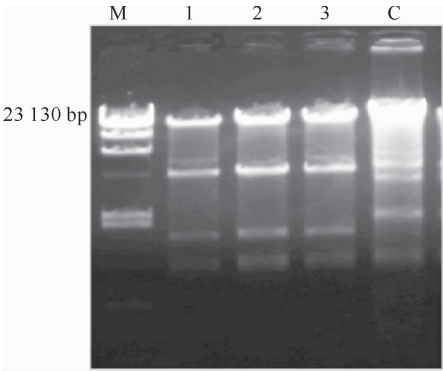


图 4 重组腺病毒载体的 *Sca* I 酶切鉴定

M. λ DNA/*Hind* III Marker;1,2. pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-490 *Sca* I 单酶切产物;3. pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-923 *Sca* I 单酶切产物;C. 对照, pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6 *Sca* I 单酶切产物

Fig. 4 *Sca* I enzyme digestion analysis of recombinant adenovirus

M. λ DNA/*Hind* III Marker;1 & 2. *Sca* I enzyme digestion of pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-490; 3. *Sca* I enzyme digestion of pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-923;C. Control, *Sca* I enzyme digestion of pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6

2.5 重组 shRNA 腺病毒载体的构建及滴度测定

pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-490 和 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-923 的重

组腺病毒载体经 *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细胞有绿色荧光;5 d 可观察到噬菌斑,说明细胞出现病变;8 d 后 80% 的细胞脱落(图 5),此时收集病毒即为第 1 代病毒,反复感染 4 代后得到高滴度病毒。2 个重组腺病毒的滴度均为 5×10^8 PFU/mL。

3 讨 论

RNA 干扰(RNAi)是指内源性或外源性双链 RNA(dsRNA)介导细胞内 mRNA 发生特异性降解,导致靶基因表达沉默,产生相应的功能表型缺失,其属于转录后的基因沉默现象(Posttranscriptional gene silencing,PTGS)^[11]。在哺乳动物细胞中,RNAi 机制主要通过 Dicer 酶剪切内源性或外源性的双链 RNA(dsRNA)为 siRNA 而发挥作用^[12]。人工合成的 siRNA 转染至细胞内其表达为瞬时表达,不能长期稳定地发挥作用,效果不太稳定,而且在体外也易被 Rnase 降解^[13],因此本研究通过构建 shRNA 载体达到干扰 *LXR α* 基因的目的。腺病毒载体中的 U6 启动子能确保 shRNA 在细胞内稳定表达,同时腺病毒载体的高感染效率可确保 shRNA 高效表达,转染进靶细胞中的 shRNA 会被 Dicer 酶剪切而发挥干扰作用。

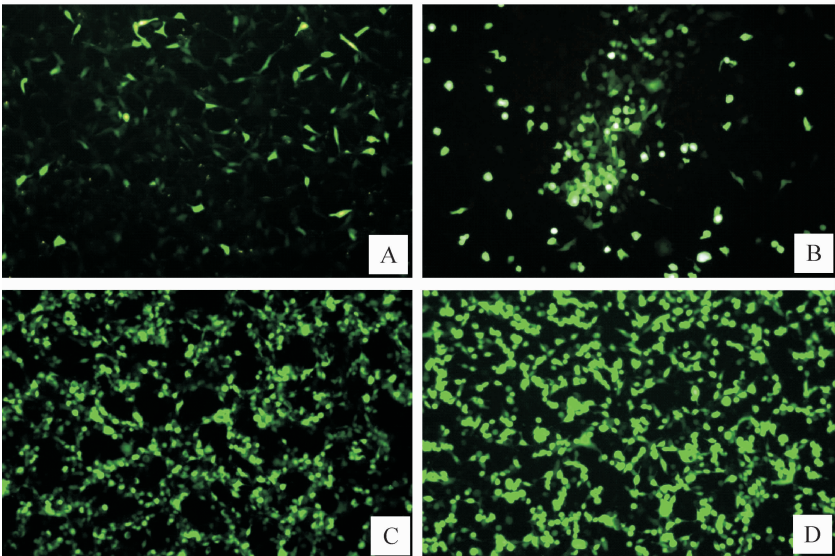


图 5 重组 shRNA(shRNA-490)腺病毒载体的包装($\times 100$)

A. 重组腺病毒转染 HEK 293 细胞 3 d 时的绿色荧光表达情况;B. 转染 5 d 时的绿色荧光表达情况;C. 转染 8 d 时的绿色荧光表达情况;D. 第 4 代的腺病毒感染 HEK 293 细胞 24 h 后绿色荧光表达情况

Fig. 5 Packaging of recombinant shRNA (shRNA-490) adenovirus ($\times 100$)

A. Recombinant adenovirus fluorescence microscopic image of HEK 293 cell 3 days after transfection; B. Fluorescence microscopic image of HEK 293 cell 6 days after transfection;C. Fluorescence microscopic image of HEK 293 Cell 8 days after transfection;D. The fourth generation of recombinant adenovirus fluorescence microscopic image of HEK 293 cell 24 hours after infection

设计 shRNA 时在正义链和反义链序列上不能出现连续 3 个或 3 个以上的 T,否则有可能导致 shRNA 转录提前终止,不能达到对某个特定基因的干扰。由于设计的 shRNA 序列一般较短(本研究 shRNA 只有 58 bp),所以在构建 shRNA 载体时阳性率可能偏低,笔者通过验证试验发现,增加连接体系中 shRNA 的模板量可以提高阳性率。此外,由于 shRNA 序列较短,不易检测,因此本研究在设计 shRNA 序列 Loop 区内加入一个腺病毒载体上没有的 *Sca* I 酶切位点,只需单酶切即可方便地检测载体是否构建成功。一般通过网站筛选设计出的 shRNA 都会有 3 条以上,如果全部构建腺病毒载体则会造成资源浪费,因此在构建重组腺病毒载体前应先进行 shRNA 筛选试验,通过红色荧光和绿色荧光的表达量对比筛选出干扰效率较高的 shRNA。本研究中,与 pDsRed1/C1 载体形成的融合蛋白在荧光显微镜下其红色荧光亮度与空载体亮度相差很多,这可能是因为融合蛋白对红色荧光蛋白的折叠表达会产生一定的影响,因此在设计对照试验要以融合蛋白作为对照进行筛选。值得注意的是,一些本身对细胞生长或凋亡有影响的基因在进行筛选时红色荧光蛋白的干扰效率可能不太明显,这种情况下可以考虑通过实时定量来检测其干扰效率。

本研究之所以选用腺病毒系统来构建重组 shRNA 载体,是因为腺病毒既可感染分裂期细胞也可感染非分裂期细胞,具有很高的感染效率,能持续稳定地在细胞内表达,目前常用的第 3 代腺病毒载体能容纳更大的外源基因片段,并且还降低了细胞毒性,减少了病毒蛋白表达引起的细胞免疫作用,相对于慢病毒其安全性能更高,是非常理想的媒介^[14]。包装第 1 代腺病毒载体时,所选取的细胞状态一定要好,要选取处于对数生长期的细胞进行包装;因为第 1 代腺病毒包装所需的时间较长(7~10 d),因此包装时的细胞密度不宜过高,一般选取融合度为 60%~70%细胞即可。腺病毒包装完后,一般需要测定其滴度,以为其感染细胞时用量的确定提供依据,因为本研究采用的腺病毒载体带有绿色荧光蛋白报告基因,所以可根据绿色荧光蛋白来测定其滴度,这种方法与 TCID₅₀ 法相比更加简单快捷。测定重组腺病毒滴度时一定要在感染后 18~24 h 进行,腺病毒感染的细胞在 24 h 之内一般不会分裂,超过 24 h 腺病毒可能会造成细胞分裂而使荧光增强,进而影响滴度测定结果的准确性。本研究成功构建了 2 个针对山羊 *LXR α* 基因的重组腺病毒干

扰载体,*LXR α* 基因是研究脂肪酸代谢的重要靶基因之一,*LXR α* 可通过上调胆固醇 7 α 羟化酶(CYP7 α)、ATP 结合盒转运蛋白的表达而促进胆固醇流出,降低细胞内低密度脂蛋白的含量,同时可诱导胰岛 B 细胞的分化和胰岛素的分泌,调节血糖平衡,从而调节脂质代谢及糖类代谢的平衡^[15]。因此,干扰 *LXR α* 基因对研究细胞内脂质代谢平衡具有重要意义,重组腺病毒干扰载体构建为进一步研究 *LXR α* 基因在乳腺上皮细胞脂质代谢中的功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Bass B L. Double-stranded RNA as a template for gene silencing [J]. *Cell*,2000,101(3):235-238.
- [2] Willy P J, Umesono K, Ong E S, et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway [J]. *Genes Dev*,1995,9(9):1033-1045.
- [3] Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf D J, et al. The role of liver X receptor alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression [J]. *Biol Chem*,2003,278(42):40736-40743.
- [4] Laffitte B A, Chao L C, Li J, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100(9):5419-5424.
- [5] Zhang Y, Repa J J, Gauthier K, et al. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXR α and LXR β [J]. *Biol Chem*,2001,276(46):43018-43024.
- [6] Schultz J R, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis [J]. *Genes Dev*,2000,14(22):2831-2838.
- [7] Repa J J, Liang G, Ou J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR alpha and LXR beta [J]. *Genes Dev*,2000,14(22):2819-2830.
- [8] Tobin K A, Steiner H H, Alberti S, et al. Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha [J]. *Mol Endocrinol*,2000,14(5):741-752.
- [9] 王 维, 罗 军, 钟 瑜, 等. 西农萨能奶山羊 *LXR α* 基因的克隆、序列分析及组织表达 [J]. *西北农业学报*,2011,20(3):8-14.
Wang W, Luo J, Zhong Y, et al. Cloning, sequence analysis and tissues expression research of *LXR α* gene on Xinong Saanen dairy goats [J]. *Acta Agriculture Boreali-occidentalis Sinica*,2011,20(3):8-14. (in Chinese)
- [10] 江千里, 王健民, 温丽敏, 等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度 [J]. *第二军医大学学报*,2002,23(9):1304-1305.
Jiang Q L, Wang J M, Wen L M, et al. Establishing a realtime large-scale recombinant virus titrating method taking GFP as marker gene [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*,2002,23(9):1304-1305. (in Chinese)