

siRNA 表达载体的构建及其表达

张建林, 邬开朗, 张雪, 朱应, 李雁, 赵伟光**, 吴建国

(武汉大学生命科学院病毒学教育部重点实验室, 湖北武汉 430072)

Construction and Expression of Vectors Expressing siRNA

ZHANG Jian-lin, WU Kai-lang, ZHANG Xue, ZHU Ying, Li Yan, ZHAO Wei-guang**, WU Jian-guo
(College of Life Sciences, Wuhan University/Key Laboratory of the Ministry of Education for Virology, Wuhan 430072, China)

Abstract: The fragment of plasmid pCMV-tag-2B excluding Cytomegalovirus(CMV) promoter sequence was obtained by restriction enzyme digestion. A pair of primers was synthesized to amplify a fragment of the H1 promoter according to reference. The fragment of H1 promoter was amplified and inserted into the fragment of plasmid pCMV-tag-2B excluding CMV promoter sequence and plasmid pGEM-11fz, respectively. The recombinant plasmids were named pCH1 and pGH1. A pair of primers, which included small interfering RNA(siRNA)target site for mRNA of EGFP gene, was synthesized and annealed *in vitro*, and then inserted into the corresponding vectors pCH1 and pGH1. In addition, the plasmid pEGFP-N3 expressing EGFP protein was transfected into liver tumor line Bel-7402 alone, or in combination with the plasmids producing siRNA to degrade mRNA of EGFP gene. The expression level of EGFP protein was viewed under the microscope. The results indicated that the plasmids including siRNA target site for mRNA of EGFP gene produced siRNA molecular and degraded mRNA of EGFP gene. The vector, PCH and pGH, will be used to study prevention of virus in fection.

Key words: siRNA; Expressing vector; Construction; Identification

摘要: 本研究用限制性内切酶消化质粒 pCMV-tag-2B, 除去巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 启动子核苷酸序列, 剩下的核苷酸序列作为构建表达 siRNA (Small interfering RNA, siRNA) 载体的前体。依据文献提供的扩增 H1 RNA 启动子核苷酸序列的引物序列合成一对引物, 以带有 H1 RNA 启动子序列的质粒 DNA 为模板扩增 H1RNA 启动子序列, 插入前体, 构建 siRNA 的表达载体 pCH1。另外将 H1 RNA 启动子插入 pGEM-11fz 相应位点, 构建瞬时表达载体 pGH1。依据 EGFP 的有效 siRNA 抑制位点, 合成两条分别为 64bp 的核苷酸链, 通过体外退火, 形成双链, 然后插入已构建的两个表达载体。将这两个载体分别与表达 EGFP 蛋白的质粒 pEGFP-N3 共转染 Bel-7402 细胞, 观察 siRNA 对 EGFP 的抑制效应。研究结果表明构建的载体有效表达了 siRNA, 这些载体可以用于与 siRNA 相关抗病毒治疗性试验研究。

关键词: siRNA; 表达载体; 构建; 鉴定; 病毒治疗

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0510-04

外源和内源性双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)在细胞内诱导同源序列基因表达受抑制的现象称为 RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)。RNAi 现象在一系列的生物中存在,包括植物、真菌、锥虫、囊虫、果蝇和线虫^[1]。在培养的哺乳动物细胞中也观察到这一现象^[2]。越来越多的研究人员开始采用小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 来抑制特定的哺乳动物细胞基因的表达。RNAi 技

术不仅能提供一种经济、快捷、高效的抑制基因表达的技术手段,而且在基因功能测定,基因治疗等方面开辟一条新思路。目前, RNAi 技术已应用于包括功能基因组学, 药物靶筛选, 细胞信号基因表达等的研究。本研究构建两个表达 siRNA 的载体, 为运用 RNAi 技术研究基因功能, 筛选抗病毒治疗的药物筛选提供技术支持。

收稿日期: 2004-07-14, 修回日期: 2004-07-30

作者简介: 张建林 (1973-), 男, 博士生, 现从事医学分子病毒学研究。

** 通讯作者。 Corresponding author, Tel: 027-87682259, E-mail: wgzhao5@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

本研究中用到宿主菌 DH5 α 和相关的质粒载体均由本室保存。限制性内切酶、修饰酶, 连接酶以及其它分子生物学试剂如 Tag 酶等均购于宝生物公司。有关核苷酸序列测定也由该公司测序部完成。SofastTM 转染试剂购于厦门太阳马公司。凝胶纯化试剂盒购于 MBI 公司。

1.2 H1 启动子片段的扩增及其纯化

依据参考文献^[3]提供的 H1 启动子片段扩增引物序列合成一对引物, 序列为 P1: 5'-CCATGGAATTCGAACGCTGACGTC-3' 和 P2: 5'-GCAAGCTTAGATCTGTGGTCTCATACAGAACTTATAAGATCCC-3', 在 P1、P2 中分别含有限制性内切酶位点 *EcoR* I, *Hind* III 和 *Bgl* II。以 pBM101 为模板采用 pfu 聚合酶扩增 H1 启动子片段。采用 MBI 公司生产的凝胶纯化试剂盒说明书提供的操作程序纯化 PCR 产物。将纯化好的 PCR 产物保存备用。

1.3 瞬时转染 siRNA 载体的构建

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 消化得到的 H1 启动子片段和质粒 pGEM-11fz, 凝胶纯化消化产物。然后, 连接处理好的 H1 启动子片段和质粒 pGEM-11fz, 转化感受态细胞 DH5 α , 按照标准的碱裂解法从细菌中提取质粒, 最后用扩增 H1 启动子片段的引物 P1 和 P2 对提取的质粒进行 PCR 鉴定。重组质粒命名为 pGH1。

1.4 持续转染 siRNA 载体的构建

用限制性内切酶 *Pshb* I 消化质粒 pCMV-tag-2B, 用凝胶纯化试剂盒纯化消化得到的 3.5kb DNA 片段。用 T4 DNA 多聚酶处理用 *Pshb* I 消化得到的 3.5kb DNA 片段, 补平末端, 然后用小牛碱性磷酸酶 (CIAP) 处理补平的 3.5kb DNA 片段, 末端去除磷酸基团。用 T4 DNA 多核苷酸激酶处理扩增得到的 H1 启动子片段, 末端添加磷酸基团。采用凝胶纯化试剂盒说明书提供的操作程序纯化处理好的 3.5kb DNA 片段和 H1 启动子片段。最后将它们连接后转化感受态细胞 DH5 α , 按照标准的碱裂解法从细菌中提取质粒, 最后用扩增 H1 启动子片段的引物 P1 和 P2 对提取的质粒进行 PCR 鉴定。重组质粒命名为 pCH1。

1.5 转录抑制 EGFP 基因表达的 siRNA 表达载体的构建

依据已发表可以抑制 EGFP 基因表达 siRNA 位点合成两条分别为 64bp 的短核苷酸链, 序列为

5'-GATCCCCCAAGCTGACCCTGAAGTTCTTCAAGAGAGAACTTCAGGGTCAGCTTGTTTTTGGA AA-3' 和 5'-AGCTTTTCCAAAAACAAGCTGACCCTGAAGTTCTCTCTTGAAGAACTTCAGGGTCAGCTTGGG G-3'。合成完后分别用 TE 稀释成 1 μ g/ μ L, 各取 50 μ L 混合在一起复性, 复性条件为 95 $^{\circ}$ C, 5min; 90 $^{\circ}$ C, 5min; 85 $^{\circ}$ C, 5min; 80 $^{\circ}$ C, 5min; 75 $^{\circ}$ C, 5min; 70 $^{\circ}$ C, 5min; 65 $^{\circ}$ C, 5min; 60 $^{\circ}$ C, 5min; 55 $^{\circ}$ C, 5min; 50 $^{\circ}$ C, 5min; 45 $^{\circ}$ C, 5min。

用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Hind* III 消化质粒 pCH1 和 pGH1, 消化完成之后依据凝胶纯化试剂盒说明书提供的操作程序纯化消化得到的 DNA 片段。将纯化的 DNA 片段和以上所得的复性产物连接, 转化感受态细胞 DH5 α , 按照标准的碱裂解法从细菌中提取质粒。用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *EcoR* I 以及 *Hind* III 和 *EcoR* I 进行限制性内切酶分析, 重组质粒依次命名为 pCH1GFP 和 pGH1GFP。

1.6 细胞的培养及其转染

本研究中用到的细胞 Bel 7402 由武汉大学保藏中心提供。用含 10% 胎牛血清, 100UI/mL 青霉素和硫酸链霉素的 DMEM 培养基培养细胞, 待长满细胞瓶以后按 1:1.5~1:2.5 转接到 24 孔培养皿等待转染。每一孔转染细胞按以下程序进行转染: 将 0.6 μ g 质粒 DNA 和 1.8 μ L Sofast 转染试剂分别稀释在 30 μ L 无血清无抗生素的 DMEM, 然后将后者逐滴添加到前者中, 边加边摇匀。室温下作用 30min, 将配制好的转染液逐滴添加到细胞培养基, 将细胞放回 CO₂ 培养箱内继续培养。从转染到检测的过程中不需要换培养基。

1.7 EGFP 蛋白表达水平的测定

将表达 EGFP 蛋白的质粒 pEGFP-N3 分别和转录抑制 EGFP 基因表达的 siRNA 载体 pCH1GFP 和 pGH1GFP 共转染细胞 Bel 7402, 同时仅转染表达 EGFP 蛋白的质粒 pEGFP-N3 作为对照。转染 30h 后, 在荧光显微镜的蓝光下观察 EGFP 蛋白的表达水平, 并比较共转染和单独转染的表达水平差异。

2 结果

2.1 H1 启动子片段的扩增

PCR 扩增完成以后, 从琼脂糖凝胶电泳分析图谱上看到清晰的 0.2kb 条带, 说明扩增到了预期的核苷酸片段。

2.2 瞬时和持续转染 siRNA 载体的构建

用限制性内切酶 *Pshb* I 消化质粒 pCMV-tag-2B, 得到了预期的 3.6kb 和 0.7kb 的条带; 用限制

性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 消化质粒 pGEM-11fz, 得到了预期的 3.0kb 的条带 (图 1)。

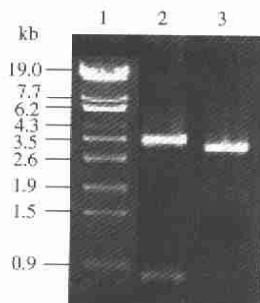


图 1 pCMV-tag-2B 和 pGEM-11fz 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of plasmid pGEM-11fz and pCMV-tag-2B by restriction analysis

1. Marker λ -EcoT14 I; 2. pCMV-tag-2B digested by *Psh*I; 3. pGEM-11fz digested by *Hind* III+*Eco*R I.

用 PCR 方法鉴定重组质粒 pGH1 和 pCH1, 以质粒 pBM101 作为阳性对照。经琼脂糖凝胶电泳分析显示以重组质粒 pGH1、pCH1 和阳性对照质粒 pBM101 为模板的 PCR 均可以扩增到预期的 0.2kb 条带。

2.3 转录抑制 EGFP 基因表达的 siRNA 表达载体的构建

用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Eco*R I 以及 *Hind* III 和 *Eco*R I 对重组质粒进行限制性内切酶分析, 凝胶

分析结果如图 2 所示, 得到了预期的结果: 限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Eco*R I 仅能得到单一一条带, 而限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*R I 可以消化出两条带。

2.4 抑制 GFP 蛋白表达的 siRNA 分子的表达

转染 30h 后, 在荧光显微镜的蓝光下观察 EGFP 蛋白的表达水平, 并比较共转染和单独转染的表达水平差异如图 3 所示。从图中可以看到转染了抑制 EGFP 基因表达的 siRNA 载体的培养物内绿色荧光细胞明显减少, 而且荧光强度减弱, 说明重组质粒 pCH1GFP 和 pGH1GFP 均可以产生 siRNA 分子, 抑制 EGFP 基因的表达。

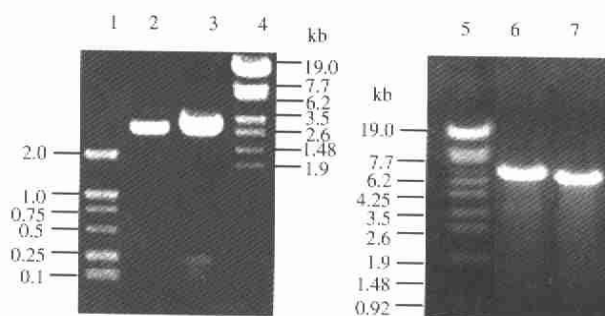


图 2 重组质粒 pGH1GFP 和 pCH1GFP 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids pGH1GFP and pCH1GFP

1. DL2000 Marker; 2. pGH1GFP digested by *Bgl* II+*Hind* III; 3. pGH1GFP digested by *Eco*R I+*Hind* III; 4/5. Marker λ -EcoT14 I; 6. pCH1GFP digested by *Bgl* II+*Hind* III; 7. pCH1GFP digested by *Eco*R I+*Hind* III.

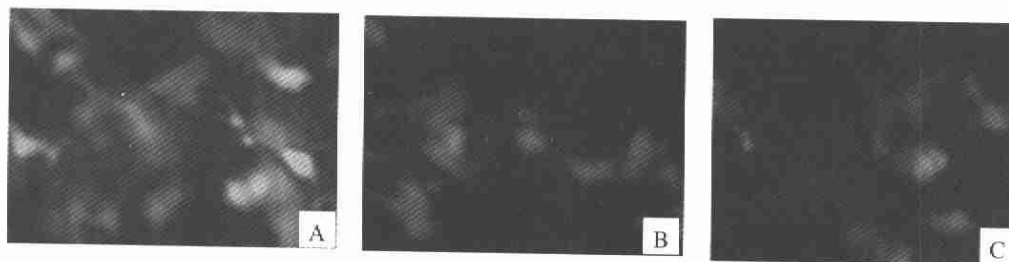


图 3 重组质粒产生的 siRNA 分子抑制 EGFP 的表达

Fig. 3 Inhibition of EGFP expression by siRNA generated by pGH1GFP and pCH1GFP

A. Cells transfected with plasmid pEGFP-N3; B. Cells co-transfected with plasmids pEGFP-N3 and pGH1GFP; C. Cells co-transfected with plasmids pEGFP-N3 and pCH1GFP

3 讨论

自 20 世纪 90 年代 Napol 等^[4]和 Guo 等^[5]对矮脚牵牛和线虫基因表达调控研究中相继发现 RNAi 现象, 到 1998 年 Fire 等^[6]和 Tabara 等^[7]首次成功运用 siRNA 技术阻断同源基因的表达以来, siRNA 技术已发展成一种经济、快捷、高效的抑制基因表达的有利工具, 已经广泛用于果蝇、线虫、原生动物和一系列植物的功能基因组研究^[8]。由于已知通过转

染 siRNA 可以在哺乳动物细胞中诱发 RNAi 现象, 所以更多的研究人员将 siRNA 技术用于人类、小鼠和其他哺乳动物基因功能的研究。另外, 在哺乳动物细胞中用 RNAi 分子能高效阻断某个特定基因的表达, 因此将 siRNA 技术也用于疾病控制, 如: 特异性的 siRNA 分子可以干扰丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)、I 型人体免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) RNA 的复制^[9,10]。

然而试验研究中从制备 RNAi 分子, 到获得试

验结果的过程基本有两种方式, 一种是通过化学合成、体外转录、长片断 dsRNAs 经 RNase III 类降解等方法得到 siRNA 分子, 然后转入细胞内或者动物体内发挥作用。这种方式在制备方法上简便, 但是费用昂贵, 作用时间比较短, 受转染试剂的影响较大。另一种则通过不同途径获得 siRNA 表达框 DNA, 将表达框 DNA 转染到细胞内表达出 siRNAs 分子而发挥作用, 这些途径包括 PCR 扩增、构建 SiRNA 表达载体、构建病毒表达载体等。优势是易于获得大量的 siRNA 分子, 作用稳定, 尤其是在 siRNA 表达载体带有真核细胞筛选标记时可以用于长期研究。难转染的细胞往往由于转染效率低而影响实验研究, 如果转染了带有真核细胞筛选标记的质粒就可以在选压力下富集带有质粒的细胞, 产生足够的 siRNA 分子, 避免这些实验研究受转染试剂的影响。在这种情况下采用 siRNA 表达载体的方法进行实验操作, 优势就更为突出。本研究中构建一个带有真核细胞筛选标记的载体 pCH1, 以满足建立稳定细胞系, 进行长时间研究的需要; 而另外一个没有真核细胞筛选标记的载体 pGH1, 可以满足短时间研究的需要。这两个载体均可以用于抗病毒感染的治疗相关性研究。

参考文献

- [1] Gonczy P, Echeverri G, Oegema K, *et al.* Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III [J]. *Nature*, 2000, 408:331-336
- [2] Elbashir S M, Harbaot H, Lendackel, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNA mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2000, 411: 494-498
- [3] 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
- [4] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes intrans [J]. *Plant Cell*, 1990, 2:279-289.
- [5] Guo S, Kempheus K J. Par 1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distribute [J]. *Cell*, 1995, 81:611-620.
- [6] Fire A, Xu A Q, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391:8.6-811.
- [7] Tabara H, Grishhok A, Mello C C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genomes sequence [J]. *Science*, 1998, 282:430-431.
- [8] Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, *et al.* Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance [J]. *Cell*, 2000, 101:533-542.
- [9] Glen A C, Bryan R C. Potent and Specific Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by RNA Interference[J]. *J Virol*, 2002, 76(18): 9225-9231.
- [10] Sharookh B K, Amy B-A, Francis V C. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 2014-2018.