论著

文章编号:1000-5404(2005)03-0200-03

# 小干扰RNA表达载体介导的EOLA1基因表达抑制研究

苏踊跃,梁光萍,罗向东,刘月明,陈 渝,陈 建,杨宗城 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

**提 要:目的** 设计和构建EOLA1基因特异性的小干扰RNA质粒,并初步验证其对靶基因的抑制作用。**方法** 将靶点特异性的寡核苷酸连接到经 *Apa* Ⅰ-*Eco*RⅠ酶切线性化的pBS/U6质粒,测序验证,阳性重组质粒转染ECV304细胞,半定量RT-PCR方法检测靶基因的表达,阳性重组质粒与pEGFP-EOLA1共转染,观察外源报告基因绿色荧光蛋白的表达。**结果** 构建的阳性重组质粒转染能够抑制靶基因EOLA1 mRNA的表达,并能够显著抑制EOLA1-EGFP融合蛋白的表达。**结论** 成功构建了针对EOLA1基因的siRNA质粒,为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

**关键词**:RNA干扰;ECV304;EOLA1;增强绿色荧光蛋白

**中图法分类号**:R322.12;R394-33 **文献标识码**:A

# Plasmid-based siRNA suppressed target gene EOLA1 expression

SU Yong-yue, LIANG Guang-ping, LUO Xiang-dong, LIU Yue-ming, CHEN Yu, CHEN Jian, YANG Zong-cheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To design and construct U6 promoter-based small interfering RNA (siRNA) expression plasmids and explore their effects on the expression of endothelium overexpression lipopolysaccharide associated factor 1 (EOLA1). **Methods** DNA oligonucleotides targeting EOLA1 at different locations were synthesized and inserted into *Apa* Ⅰ-*Eco*RⅠ linearized pBS/U6 plasmid. The inserted sequences were verified by DNA sequencing. ECV304 cells were transfected by positive reconstructs and the expression of EOLA1 mRNA was detected by semi-quantitive RT-PCR. The expression of EGFP-EOLA1 fusion protein was observed after cells were co-transfected by pEGFP-EOLA1 and siRNA reconstructs. **Results** The plasmid-based RNAi approach could specially knock down EOLA1 gene expression. **Conclusion** Small interference RNA expression plasmids have been constructed successfully, which paves the way for future studies of EOLA1 gene.

**Key words**: RNA interference; ECV304; EOLA1; enhanced green fluorescent protein

严重烧伤后常并发革兰阴性细菌感染,易引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)及脓毒症(sepsis),是目前导致烧伤病人死亡的主要原因之一[1]。LPS是革兰阴性细菌感染的主要致病因子,能激活血管内皮细胞,促进各种炎症细胞因子的释放,过度的活化可能引起失控性炎症反应甚至脓毒症。本实验室研究了LPS刺激血管内皮细胞后基因表达谱的改变,并获得了一些差异性表达的基因片断,其中一个基因已经获得了全长cDNA,命名为内皮细胞高表达LPS相关因子1(endothelium overexpression LPS-associated factor 1, EOLA1)[2]。生物信息学分析显示该基因定位于人类染色体Xq27.3,其所编码的蛋白质的功能尚不清楚。

RNA干扰是一种序列特异性的转录后基因沉默现象,它由与靶基因序列同源的双链RNA所诱导[3]。RNA干扰为生物学家提供了功能基因研究的快速和简便的方法。载体介导的RNA干扰方法是新近发展起来的在哺乳动物细胞中特异性抑制靶基因靶基因表达的技术[4]。本研究针对EOLA1靶基因,选择了两段靶序列,构建到pBS/U6质粒中,并初步研究了重组质粒转染ECV304细胞对EOLA1 mRNA表达的影响,为进一步对该基因功能的研究奠定了基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270672),国家自然科学基金资助重点项目(10332060)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270672), Supported the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (10332060)

作者简介:苏踊跃(1971-),男,辽宁省锦州市人,博士,主治医师,主要从事烧伤脏器功能损伤机制方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754148-8082

通讯作者:罗向东,电话:(023)65461987,E-mail:luoxd@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-15

## 1　材料和方法

### 1.1　细胞培养

人脐静脉内皮细胞株 ECV304(ATCC)培养于含 10%新生小牛血清 M199 培养基中。细胞转染时应用无抗、无血清 M199 培养基。

### 1.2　重组质粒的构建

pBS/U6 质粒由美国哈佛医学院 Yang Shi 博士惠赠，靶点的选择原则参考文献[4～6]：

靶序列 1：下划线部分为 EOLA1 基因编码区第 815～833 位，正义链反义链均 19 bp。

5′-ACTTTGCAATGCCCCGAAGTTCAAGAGACTTCGGGGCATTGCAAAGTTTTTTT-3′；

5′-AATTAAAAAA ACTTTGCAATGCCCCGAAGTCTCTTGAACTTCGGGGCATTGCAAAGTGGCC-3′；

靶序列 2：下划线部分为 EOLA1 基因编码区第 951～969 位，正义链反义链均 19 bp。

5′-AGGAGGCAAGGATGTATTC TTCAAGAGAGAATACATCCTTGCCTCCT TTTTTT-3′；

5′-AATTAAAAAA AGGAGGCAAGGATGTATTC TCTCTTGAAGAATACATCCTTGCCTCCTGGCC-3′。

核苷酸由上海博亚生物科技公司合成。对应的两段寡核苷酸分别以去离子水溶解(浓度为 1 μg/μl)，各取 5 μl 加入 90 μl 去离子水，煮沸 5 min，自然冷却，寡核苷酸退火。用 *Eco*R Ⅰ和 *Apa* Ⅰ双酶切 pBS/U6 质粒 1.0 μg，37 ℃，1 h。对酶切产物进行琼脂糖电泳，紫外灯下切下线性化的条带，应用琼脂糖 DNA 回收试剂盒(Roche 公司)回收线性化载体。采用 DNA 连接试剂盒(TaKaRa 公司 )进行连接反应，体系如下：退火的寡核苷酸 1 μl，双酶切的 pBS/U6 5 μl，去离子水 4 μl，Solution Ⅰ 10 μl，16 ℃，1 h。连接产物转化感受态 DH5α 大肠杆菌，涂氨苄青霉素(50 μg/ml)抗性 LB 平板。待单个细菌克隆形成后，挑取 2～3 个细菌克隆，摇菌扩增，抽提质粒。质粒进行 *Hin*dⅢ酶切鉴定，及测序验证。

### 1.3　半定量 RT-PCR

应用 Tripue(Roche 公司)试剂提取细胞总 RNA，应用 Takara 公司 RNA PCR 试剂盒进行反转录，EOLA1 引物为：上游 5′-CTCTGGCCGTAAAGCAGCTG-3′，下游 5′-GGAGCCCACACTTGTCACAC-3′，产物长度 709 bp。GAPDH 作为看家基因内参照[7]。EOLA1 与 GAPDH 基因条带的相对密度分析采用 Quantity One 软件。PCR 参数：94 ℃ 10 min 变性；94 ℃ 1 min，59 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃延伸 5 min。PCR 产物以 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

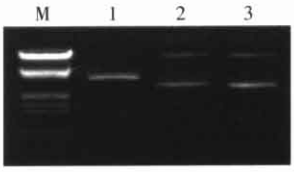
### 1.4　细胞转染

ECV304 细胞株于 6 孔板，$1.5\times10^5$/孔，融合约 60%时采用 FuGENE6 试剂(Roche 公司)进行转染。转染方法参照说明书。转染后 48 h 荧光显微镜下观察绿色荧光的阳性率。其中 pEGFP-EOLA1 重组载体由本室构建并保存(以 pEGFP-N2 为载体，插入 EOLA 的开放读框)。转染分 3 组，质粒 DNA 用量如下：①pEGFP-EOLA1 1.0 μg；②pEGFP-EOLA1 1.0 μg/siEOLA1-1 1.0 μg；③pEGFP-EOLA1 1.0 μg/pBS/U6 1.0 μg。

## 2　结果

### 2.1　重组阳性质粒的酶切鉴定

在重组载体构建过程中，pBS/U6 质粒经双酶切，失去了 *Hin*dⅢ单酶切位点，这样重组质粒不能被 *Hin*dⅢ切成线性化，阳性重组质粒得以初步鉴定(图 1)。我们构建的两个重组质粒，经 *Hin*dⅢ酶切，不能切开，我们将针对两个靶点的重组阳性质粒命名为 siEOLA1-1 和 siEOLA1-2。




M：λ DNA/*Hin*dⅢ-*Eco*RⅠ；1：pBS/U6；2：siEOLA1-1；3：siEOLA1-2

**图 1　重组质粒的 *Hin*dⅢ酶切鉴定**

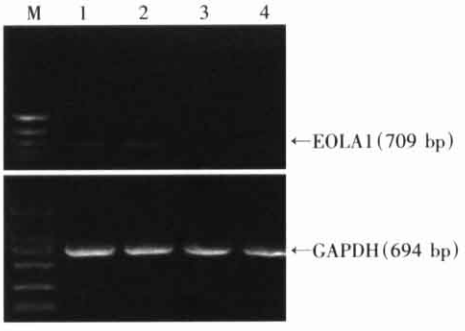
**Fig 1　Identification of reconstructs by *Hin*dⅢ digestion**

### 2.2　重组阳性质粒的测序验证

经酶切验证的重组质粒，转化感受态大肠杆菌 DH5α，菌株送上海基康公司测序，测序结果经比对，插入寡核苷酸序列与设计的靶点序列完全吻合，说明重组载体构建成功。

### 2.3　重组阳性质粒转染对 EOLA mRNA 表达的抑制作用

siEOLA1-1 和 siEOLA1-2 转染 ECV304 细胞，48 h 后，提取细胞总 RNA 行 RT-PCR 检测，对 EOLA1mRNA 与 GAPDH mRNA 的相对密度进行分析，结果显示，siEOLA1-1 和 siEOLA1-2 转染组 EOLA1 mRNA 的表达得到明显抑制，siEOLA1-1 和 siEOLA1-2 两个靶点序列的 siRNA 质粒具有不同的抑制效率，前者更高，达到 83%(图 2)。




M：DL2000 DNA marker；1：NT (non-transfection)；2：pBS/U6 transfected；3：siEOLA1-1 transfected；4：siEOLA1-2 transfected

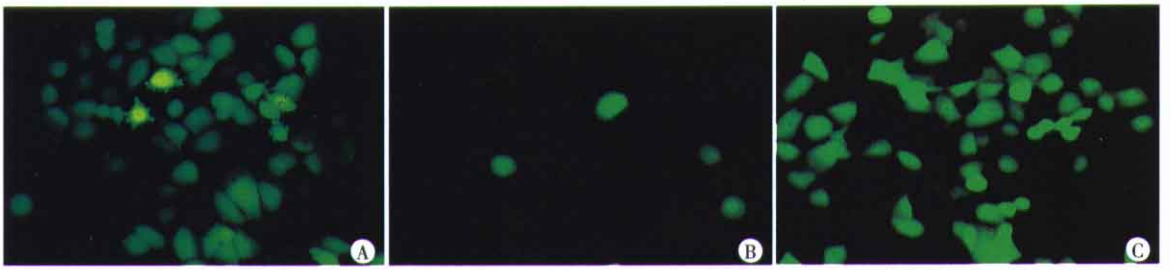
**图 2　siRNA 表达质粒对 EOLA1 mRNA 表达的影响**

**Fig 2　Effects of siRNA plasmids on EOLA1 mRNA expression**

### 2.4　siEOLA1 质粒转染抑制 EGFP-EOLA1 融合蛋白的表达

应用自行构建的 siRNA 表达质粒，与 pEGFP-EOLA1 质粒共

转染，观察绿色荧光蛋白的表达情况，结果见图3，siEOLA1-1转染能够明显抑制 EOLA1-EGFP 融合蛋白的表达，表现为 siEOLA1-1 转染组（图 3B）绿色荧光蛋白的阳性率远远低于 pBS/U6 共转染组（图 3C），以及 pEGFP-EOLA1 单独转染组（图 3A）。




A: pEGFP-EOLA1 transfection; B: pEGFP-EOLA1 and siEOLA1-1 cotransfection; C: pEGFP-EOLA1 and pBS/U6 cotransfection

**图3 siEOLA1-1 转染对 EOLA1-EGFP 融合蛋白表达的影响** （荧光显微镜 ×200）

**Fig 3 Effects of siEOLA1-1 transfection on EOLA1-EGFP fusion protein expression** (Fluorescent microscope ×200)

## 3 讨论

内毒素是 $G^-$ 细菌的主要毒力成分，在烧（创）伤导致的炎症反应以及器官功能障碍中有重要作用。本室长期致力于 LPS 对血管内皮细胞损伤机制的研究，此前本室应用抑制性消减杂交方法发现了一个脐静脉内皮细胞上与 LPS 刺激相关的新基因 EOLA1，其全长 cDNA 被 GenBank 接受（登录号：AY074889），但是目前该基因的功能尚不清楚。对于这个可能与 LPS 病理生理作用相关的基因功能的研究具有重要的意义。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是新近发展起来的一项反向遗传学技术，其基本原理是一种 mRNA 水平的酶解反应，属于转录后基因沉默，与传统的反义技术相比，RNAi 技术对基因表达的阻断效率更高，特异性更强；与基因敲除或突变相比，RNAi 技术则有操作简便、成本低廉、实验周期短等优势。2001 年 Elbashir 等[5] 率先直接应用 21 ~ 23 nt 的小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）转染哺乳动物细胞，取得了明显的靶基因的沉默效应，RNA 干扰技术在哺乳动物细胞中成功的应用，极大拓展了 RNAi 的应用空间。本实验采用的 pBS/U6 质粒系统是 Yang Shi 博士研究小组开发的，由小鼠 U6 启动子控制的 siRNA 表达质粒，模板为含有靶点序列回文结构，这样细胞内合成的 RNA 为发夹样双链结构，发挥 siRNA 的效应，达到特异性抑制靶基因表达的目的。这种 RNA 干扰策略成本低、可操作性强，我们应用这种方法，设计和构建了针对靶基因 EOLA1 的两个 siRNA 表达质粒 siEOLA1-1 和 siEOLA1-2，并转染 ECV304 细胞，检测靶基因 mRNA 表达的改变。结果表明，siEOLA1-1 和 siEOLA1-2 质粒转染 ECV304 细胞能够不同程度的下调 EOLA1 mRNA 的表达。同时，siRNA 表达质粒能够抑制共转染的 pEGFP-EOLA1 诱导的 EOLA1-EGFP 融合蛋白表达。本实验从 mRNA 和蛋白质水平，证明 U6 启动子介导的细胞内合成 siRNA 策略，能够成功的在 ECV304 细胞中应用，本实验筛选出了一个针对 EOLA1 基因抑制效率很高的 siRNA 表达质粒，为 EOLA1 基因功能的进一步研究奠定了基础。

## 参考文献：

[1] Nakae H, Endo S, Yamada Y, *et al*. Bound and soluble adhesion molecule and cytokine levels in patients with severe burns[J]. Burns, 2000, 26(2): 139 - 144.

[2] 梁自文，杨宗城，罗向东. 人类新基因 eola1 全长 cDNA 序列的克隆[J]. 第三军医大学学报，2002，24(3)：封2.

[3] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorchabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806 - 811.

[4] Sui G, Soohoo C, Affa el B, *et al*. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8): 5515 - 5120.

[5] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Natue, 2001, 411(6836): 494 - 498.

[6] Wang L, Mu F Y. A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette[J]. Bioinformatics, 2004, 20(11): 1818 - 1820.

[7] Nosaka K, Maeda M, Tamiya T, *et al*. Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 1043 - 1048.

（编辑 刘洪娥）