维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)06-0681-04

shRNA 抑制外源绿色荧光蛋白在肝癌细胞株中的表达

闫 歌,黄爱龙,唐 霓,张秉强,向明确,蒲 丹

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:构建绿色荧光蛋白(GFP)的短发夹状 RNA(shRNA),观察其在哺乳动物细胞中抑制外源 GFP 的表达。方法:设计、合成含 GFP 编码基因片段,中间被 4 个 bp 间隔的反向重复序列,与转录载体 pTZU6+1 连接,构建 pshRNA—GFP 重组质粒,与 pEGFP-C1 共转染肝癌细胞株 HepG2 和 SMMC-7721,检测其对 GFP 表达的影响。结果:pshRNA—GFP 对共转染的 pEGFP-C1 中的绿色荧光蛋白有明显的抑制作用,抑制率达 70%~85%。结论:构建的 pshRNA—GFP 重组质粒能有效地抑制 GFP 在哺乳动物细胞中的表达。

【关键词】RNA 干扰;绿色荧光蛋白;短发夹状 RNA

【中国图书分类法分类号】Q78 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-04-21

Inhibition of GFP expression in hepatocellular carcinoma cells by shRNA

YAN Ge, et al

(*Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To construct the plasmid containing short hairpin RNA(shRNA) of green fluorescent protein(GFP) to suppress the expression of GFP. *Methods*: A 20bp reverse repeated motif of GFP target sequence with 4bp spacer were synthesized, and inserted into pTZU6+1 to generate the pshRNA—GFP plasmid; pshRNA—GFP and pEGFP-C1 or pTZU6+1 and pEGFP-C1 were cotransfected into mammalian cells to detect effect of GFP expression separately. *Results*: pshRNA—GFP suppressed the GFP expression by 70%~85% in mammalian cells. *Conclusion*: The result shows that the short hairpin RNA of GFP can efficiently suppress its expression in HepG2 and SMMC-7721.

【Key words】 RNA interfering; Green fluorescent protein; Short hairpin RNA

RNA 干扰(RNA interfering,RNAi)技术是近年来发展起来的新技术,它主要利用双链 RNA(dsRNA)在细胞内 Dicer 内切酶的识别、结合、酶切下,产生有活性的长度为 21~23nt 干扰性 RNA(short interfering RNA,siRNA),与互补的目的基因的 mRNA 结合并使之降解,从而抑制目的基因的表达,RNAi 的发现为基因功能学和基因治疗学等提供了更为有效的方法[1],已被《科学》杂志评为 2002 年最重要科技发现之一,成为近年来分子生物学领域研究的热点[2]。

本实验利用转录载体 pTZU6+1 构建绿色荧光蛋白(GFP)的短发夹状 RNA(small hairpin RNA,shRNA),研究其在哺乳动物细胞中对外源 GFP 基因的抑制作用。

基金项目:国家杰出青年基金(B 类)资助(30228026),国家自然科学基金(30371599)

作者介绍:闫 歌(1965-),男,副研究员,博士,主要研究方向:肿瘤的基因治疗。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

质粒 pTZU6+1 由美国 University of Michigan 的 David Engelke 博士惠赠,pEGFP-C1 由美国 University of Chicago Medical Center 的 Tong-Chuan He 博士惠赠,哺乳动物细胞株选用肝癌细胞株 HepG2 和 SMMC-7721 以及大肠杆菌 JM109,由本研究所保存;质粒提取试剂盒为 Promega 产品,内切酶 Sal Ⅰ和 Xbal Ⅰ为 Roche 产品,T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 invitrogen 公司,DNA 片段由上海生工生物工程公司合成。

1.2 细胞培养

HepG2 和 SMMC-7721 常规培养于含 10%的新生牛血清,100u/ml 青霉素,100u/ml 的链霉素的 RPMI-1640 培养液中,培养条件为 37℃,CO_2 浓度为 5%,定期观察细胞生长

维普资讯 http://www.cqvip.com

情况，每 2～3 天用 0.25% 的胰酶消化，进行转代培养

1.3 shRNA 的设计和构建

根据 shRNA 的设计原则[3] 和 GenBank 中 GFP 的编码序列，设计 GFP sense：5′－GCTGACCCTGAAGTTCATC－3′ 和 GFP antisense：5′－GATGAACTTCAGGGTCAGC－3′，并加入 4 个与 GFP 不互补的非同源碱基和末端终止子 TTTTT，在合成 DNA 的末端设计 Xho Ⅰ 和 Xba Ⅰ 酶切位点，用 BLAST 检索所设计的 DNA 序列的特异性

取等量 100mmol/L 的 DNA 合成片段，在退火缓冲液 (100mmol/L NaCl) 中加热到 95℃ 5min，然后缓慢降至室温。用 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA 片段，与 Sal Ⅰ 和 Xba Ⅰ 酶切的转录载体 pTZU6＋1 连接，转化 JM109，Amp 抗性筛选，1% 琼脂糖电泳鉴定，构建的重组质粒命名为 pshRNA－GFP。

1.4 序列分析

将 pshRNA－GFP 重组质粒送上海申友生物技术有限公司进行序列分析，以证实目的 DNA 片段克隆入 pTZU6＋1 载体。

1.5 转染细胞

应用 Invitrogen 公司转染试剂，将正常培养的 HepG2 和 SMMC－7721 细胞用胰酶消化，800r/min 离心，RPMI－1640 培养液重悬，每孔加等量的细胞数到 24 孔板中，置 37℃ 培养。待细胞生长到占培养瓶底约 80%～90% 时，培养液换为无抗菌素含血清的 RPMI－1640，培养过夜。于次日，加入按 1∶20、1∶1、10∶1 比例混匀的 pEGFP－C1 和 pshRNA－GFP 进行转染，具体操作详见 Invitrogen 转染试剂盒说明书，同时设 pEGFP－C1、pEGFP－C1 和 pTZU6＋1 为实验对照组。置 37℃ 培养，4～6h 后加入含血清和抗菌素的 RPMI—1640 培养液。

1.6 GFP 的表达变化

转染细胞 24h～48h，根据 GFP 表达后能发绿色荧光的特点，在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况，并照相。

2 结 果

2.1 pshRNA－GFP 重组质粒的构建和鉴定

pshRNA－GFP 重组质粒的构建及体内转录生成 siRNA 的过程如图 1 所示。将设计的 GFP DNA 片段用 BLAST 进行检索，证实有明显的特异性，可用于 shRNA 的构建。

重组克隆 Sal Ⅰ 酶切位点丢失，以及用 EcoR Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切，阳性克隆可产生 400bp 左右的片段，而空载体 pTZU6＋1 却切出 350bp 左右的片段。从电泳图 2 中可证实筛选的克隆 (6 号) 为阳性克隆，已将合成的 DNA 片段成功插入载体 pTZU6＋1 中。并从序列结果可看到和设计 DNA 片段完全一致的序列，进一步表明已成功建立了含目的 DNA 片段的重组载体 pshRNA－GFP。

2.2 pshRNA－GFP 对外源 GFP 的抑制作用

2.2.1 不同浓度的 pshRNA－GFP 对肝癌细胞中外源 GFP 表达的抑制作用

采用 pEGFP－C1 和 pTZU6＋1 共转染肝癌细胞株 HepG2 和 SMMC－7721，于转染 24h、48h 后，观察两种细胞 GFP 的表达。结果显示转染后 24h，肝癌细胞中就有 GFP 绿色荧光蛋白的大量表达，荧光表达较强，至 48h 表达更强 (如图 3 中 A1、B1 所示)，两者 GFP 的表达无明显差异，证明 GFP 荧光蛋白在肝癌细胞 HepG2 和 SMMC－7721 中均有较高的表达；共转染 pEGFP－C1 和 pshRNA－GFP 的细胞，绿色荧光表达显著减少，表明 GFP 的表达受到明显抑制。转染 pshRNA－GFP 的细胞的绿色荧光表达有明显剂量依赖性，随剂量的增加，抑制 GFP 的表达的效果越强，特别是在 shRNA 与目的基因的比例为 20∶1 时，抑制效果更强，抑制率达 85%，而在 pshRNA－GFP 较低浓度 (70ng) 下，仍有一定的抑制作用，达 70%。(如图 3 中 A2、B2 所示，仅列出比例为 20∶1 的作用图。)

2.2.2 pshRNA－GFP 对不同肝癌细胞中外源 GFP 表达的抑制作用

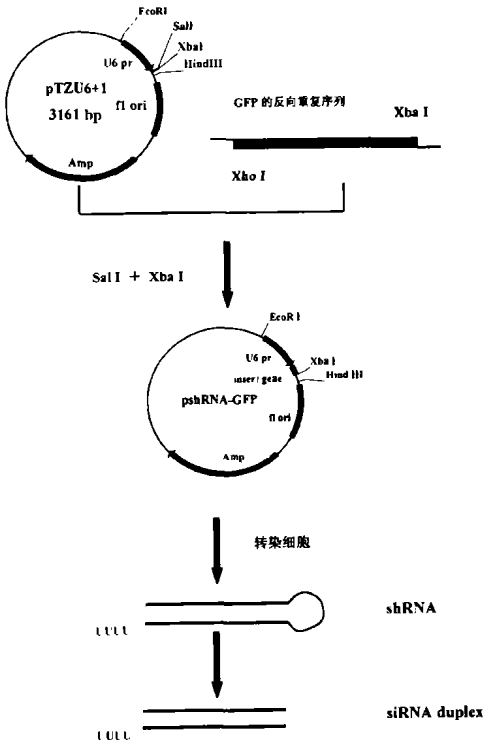


图 1 体内由 DNA 模板产生 siRNA 的策略

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究选用两种肿瘤细胞株 HepG2 和 SMMC-7721 转染 pEGFP-C1，转染效率均较高，且 GFP 均有较强的表达，两者无明显的差别；pshRNA-GFP 作用后，对 GFP 均有明显的抑制作用，在观察的浓度下无差别，说明本实验设计的 shRNA 对多种细胞中目的基因均有抑制作用。（本实验也曾对 HeLa 细胞进行同样实验，结果相似未列出。）

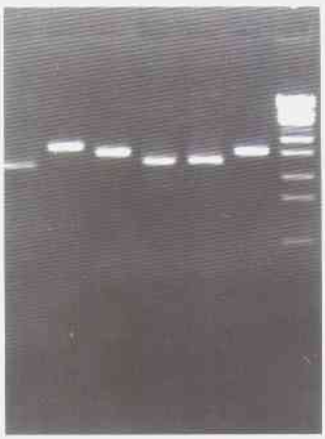


图 2



图 3 A1

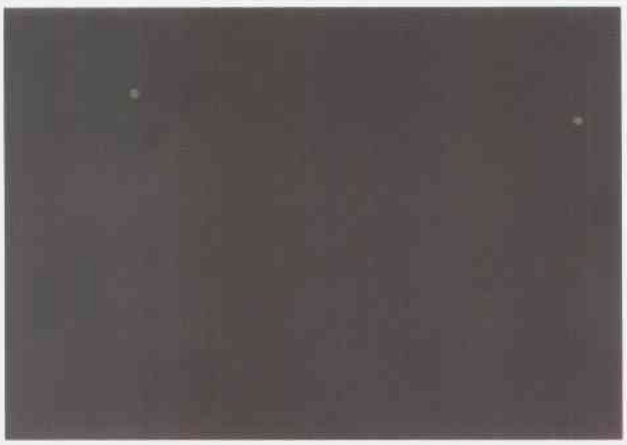


图 3 A2

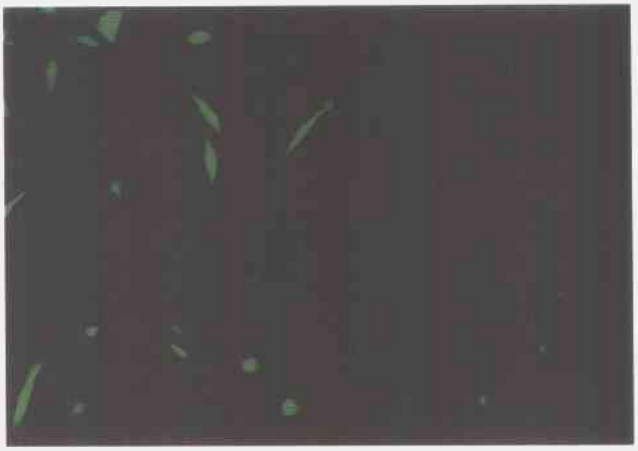


图 3 B1

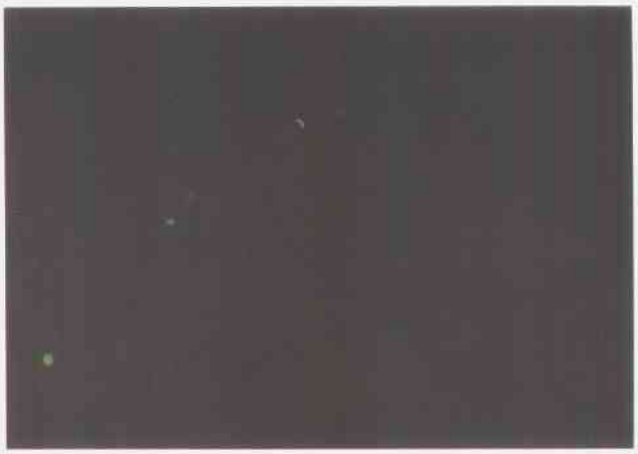


图 3 B2

3 讨 论

RNAi 是 Andrew 和 Craig 等[4]在 1998 年研究 Caenorhabditis elegans 基因组计划时，发现并命名的新技术，随后此技术在全球得以广泛的开展和应用，特别是 Elbashir 等[5]在《自然》上发表文章证实在哺乳动物细胞中可以应用 RNAi 技术，揭开了 RNAi 应用于哺乳细胞研究的新篇章。目前 RNAi 不仅在研究基因功能方面，而且在抗病毒治疗等方面均有了长足的发展。

RNA 干扰(RNAi)是多种真核生物中进化上保守的基因组水平的免疫监控机制，涉及通过 RNase III 内切酶 Dicer 的作用产生有活性的小的 21-23nt 干扰性 RNA(short interfering RNA, siRNA)，介导其互补同源 mRNA 的特异性降解，从而阻断目的基因的表达。研究表明哺乳动物细胞对 dsRNAs 的反应可以活化两条途径，超过 30bp 的 dsRNSs 引起广泛的非特异性 mRNA 的降解和翻译的关闭；体外合成的短的 19-23bp 的 dsRNAs 分子模拟 RNAi 途

维普资讯 http://www.cqvip.com

径中间体,能在哺乳动物中引起序列特异性的基因表达抑制。

RNAi 技术的应用起初主要在欧,美等发达国家,原因主要是 RNA 的合成成本高,花费大。近年来已有许多科学家成功构建了应用 DNA 片段进行体内转录的载体。利用合成的 19～21nt 反向重复序列,中间碱基与目的基因不互补,退火后和转录载体相连,建立含与目的基因 mRNA 互补的载体,转染宿主后,在 U6 或 H1 等转录启动子的作用下,转录成 mRNA 而自身形成茎环结构,与宿主内的 Dicer 结合,发挥抑制目的 mRNA 翻译的作用[6,7]。

本研究利用转录载体 pTZU6 + 1 构建了能在哺乳动物细胞中产生针对绿色荧光蛋白(GFP)的 shRNA 重组质粒 pshRNA - GFP,并对其抑制 GFP 表达进行了研究。结果表明在肿瘤细胞 HepG2 和 SMMC - 7721 中 pshRNA - GFP 能明显抑制外源 GFP 的表达,抑制率达 70% ～85%,并呈剂量依赖性。研究还发现本实验构建的 shRNA 适用于多种细胞,证实了 RNAi 现象普遍存在于哺乳动物细胞中。

由于本实验是利用 DNA 载体在细胞内转录 mRNA 而发挥作用,其抑制目的 mRNA 表达的效果与合成的 RNA 相似,克服了合成 RNA 成本高、费用大的缺点,更利于 RNAi 技术的推广应用。其它研究表明 RNAi 不仅对外源基因,而且对内源基因同样有明显得抑制作用,因此将为今后 RNAi 在基因治疗学、基因功能学等的研究提供更为广阔的、有效的应用空间。

参 考 文 献

[1] Hannon GJ. RNA interference[J]. Nature, 2002; 418: 244 - 251.

[2] Donald K. Breakthrough of the Year[J]. Science, 2002; 298: 2283.

[3] Tuschl T. Expanding small RNA interference[J]. Nature Biotechnology, 2002; 20: 446 - 448.

[4] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double - stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998; 391: 806 - 811.

[5] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T, et al. Duplexes of 21 - nucleotide RNAs mediate RNA interference in culture mammalian cells[J]. Nature, 2001; 411: 494 - 498.

[6] Sui G, Soohoo C, Affar EIB, et al. A DNA vector based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Nati Acad Sci, 2002; 99: 5515 - 5520.

[7] Paul CP, Good PD, Wine I, et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2002; 20: 505 - 508.