

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)08-0676-03

针对增强型绿色荧光蛋白 RNA 干扰表达载体的构建和鉴定

马龙洋¹, 刘家云², 许彦鸣¹, 贾林涛¹, 王成济¹, 杨安钢^{1, 2}

(第四军医大学基础部:¹生物化学与分子生物学教研室,²免疫学教研室, 陕西 西安 710033)

Construction and identification of RNA interference expression vector targeting EGFP

MA Long-Yang¹, LIU Jia-Yun², XU Yan-Ming¹, JIA Lin-Tao¹, WANG Cheng-Ji¹, YANG An-Gang^{1, 2}

¹Department of Biochemistry & Molecular Biology, ²Department of Immunology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct pSUPER RNA interference expression vector targeting enhanced green fluorescent protein(EGFP) and to test the silencing effect in mammalian COS-7 cell line. METHODS: The designed oligos targeting EGFP were cloned into the pSUPER vector, which was linearized after *Bgl* II and *Hind* III digestion. The recombinant vectors were confirmed by enzyme digestion analysis and DNA sequencing. The recombinant plasmids and pIRES2-EGFP were co-transfected into COS-7 cells using Lipofectamine²⁰⁰⁰. The suppression effect of EGFP was assayed by fluorescence microscope 48 h after transfection. RESULTS: The pSUPER siRNA expression vectors were constructed and confirmed after the enzyme digestion analysis and the DNA sequencing. The over-expression of EGFP was detected in the COS-7 cells which were transfected pIRES2-EGFP or co-transfected pIRES2-EGFP and pSUPER. In comparison with that of the control group, the expression of EGFP in COS-7 cells which were co-transfected pIRES2-EGFP and pSUPER-R237 or pSUPER-R304 or pSUPER-R447 was weaker and the number of cells emitting green fluorescence decreased distinctly. CONCLUSION: pSUPER siRNA expression vectors targeting EGFP are successfully constructed. The expression of EGFP gene is inhibited effectively in mammalian cells which are co-transfected with pIRES2-EGFP and pSUPER-Rs.

收稿日期 2004-12-16; 修回日期 2005-01-24

基金项目 国家 973 基金(2004CB518805), 国家 863 基金(2004AA217071), 国家自然科学基金(30200274)

通讯作者 杨安钢. Tel. (029) 83374528 Email. agyang@fmmu.edu.cn

作者简介: 马龙洋(1978-), 男(汉族), 河南省泌阳县人, 硕士生(导师 杨安钢). Tel. (029) 83374516 Email. malongyang@126.com

【Keywords】 RNA interference, enhanced green fluorescent protein, COS-7 cell line

【摘要】 目的: 构建针对增强型(EGFP)的 pSUPER siRNA (small interfering RNA) 表达载体, 并在哺乳动物细胞 COS-7 细胞中观察其干扰效果。方法: 设计针对 EGFP 编码区的寡核苷酸链, 体外退火后克隆入经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切线性化的干扰载体 pSUPER 中, 对重组质粒进行酶切分析和 DNA 序列测定。通过脂质体介导, 将重组干扰质粒与 pIRES2-EGFP 瞬时共转染 COS-7 细胞, 48 h 后荧光显微镜下观察干扰效果。结果: 经酶切鉴定及 DNA 序列测定证实, 重组质粒中已插入了目的基因片段。瞬时共转染后荧光显微镜观察结果显示: 只转染 pIRES2-EGFP 及共转染 pIRES2-EGFP 和空载体 pSUPER 的 COS-7 细胞中有大量的 EGFP 表达。而共转染 pIRES2-EGFP 和 pSUPER-R237、pSUPER-R304、pSUPER-R447 的 COS-7 细胞中发出荧光的细胞数量明显减少, 荧光强度也明显降低。结论: 成功构建了针对 EGFP 的 RNA 干扰表达载体 pSUPER-R237、pSUPER-R304 和 pSUPER-R447, 并与 pIRES2-EGFP 瞬时共转染 COS-7 细胞, 有效地抑制了 EGFP 在哺乳动物细胞中的表达。

【关键词】 RNA 干扰, 增强型绿色荧光蛋白, COS-7 细胞系
【中图分类号】 R329.28 **【文献标识码】** A

0 引言

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是双链 RNA 介导的, 序列特异的转录后的基因沉默效应, 是通过双链 RNA 介导的靶序列特异性的降解从而抑制(knock down)相应基因的表达。绿色荧光蛋白(EGFP)是一种被广泛应用的报告基因, 单独或融合表达后可作为外源基因表达的标志。为进一步研究 RNAi 在哺乳动物细胞内的作用机制, 我们构建了针对 EGFP 的 pSUPER siRNA 表达载体, 观察其在哺乳动物细胞中对 EGFP 表达的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pSUPER 由美国陈思毅教授惠赠, COS-7 细胞、大肠杆菌 DH5 α 及 EGFP 表达载体 pIRES2-EGFP 由本室保存。EcoRI, *Bgl* II, *Hind* III, T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司。转染试剂 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 为 Invitrogen 公司产品。DMEM 购自 Gibco 公司, 小牛

血清为四季青公司产品。

1.2 方法

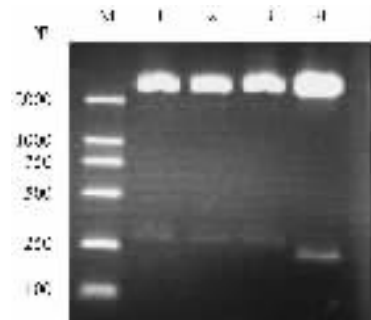
1.2.1 siRNA 表达载体的构建和鉴定 根据 Oligo 插入片段的设计原则和 pIRES2-EGFP 中 EGFP 的编码序列, 针对 EGFP 编码区 3 个位点设计了 6 条寡核苷酸链, 由北京赛百盛公司合成, 序列如下: EGFP237F5'-gatccccgcagcagcagcttctcaagtcaaga gactgaaga agtctgtctgcttttggaaa-3', EGFP237R 5'-agctttccaaaaagc agcagcagcttctc aagtctctgaacttgaagaagtctgtctgctggg-3', EGFP304F5'-gatccccgcagcagcgcaactacaagt tcaagagactgtagt-gtccgtctgcttttggaaa-3', EGFP304R 5'-agctttccaaaa ggacgacggcaac tacaagtctctgaactttagttgctgctgctggg-3'; EGFP447F5'-gatccccgtctatcatgcccagcttc agagagtcggc-catgatatagacttttggaaa-3', EGFP447R 5'-agctttccaaaaac gtctatcatg gccgactctctgaagtcggccatgatatagacggg-3'。寡核苷酸链在退火缓冲液中退火后, 与经 *Hind* III 和 *Bgl* II 双酶切的线性化 pSUPER 载体连接, 连接产物转化感受态细菌 DH5 α , 挑选单菌落, 筛选重组体, 重组体命名为: pSUPER-Rs(pSUPER-R237, pSUPER-R304 和 pSUPER-R447)。重组克隆后 *Bgl* II 酶切位点被破坏, 重组体质粒用 *Eco*RI 和 *Hind* III 进行双酶切, 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳后, 紫外成像分析仪观察阳性克隆可以出现 291 bp 的条带, 阴性克隆则出现 241 bp 的条带。阳性克隆送上海鼎安公司 DNA 测序进一步证实。构建的 3 个干扰载体分别命名为 pSUPER-R237, pSUPER-R304 和 pSUPER-R447。

1.2.2 转染细胞 COS-7 细胞和荧光显微镜观察 采用含 100 g/L 小牛血清的 DMEM 培养基进行培养。取处于对数生长期的 COS-7 细胞, 2.5 g/L 胰酶消化后, 按一定的密度接种于 12 孔培养板中, 24 h 后应用 Invitrogen 公司的转染试剂 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 进行转染。将培养在 12 孔板的培养细胞用无血清无抗生素的 DMEM 培养液清洗 2 遍, 加入转染液, 将表达绿色荧光蛋白的质粒 pIRES2-EGFP 1.5 μ g 和干扰质粒 pSUPER-Rs(或对照空载体 pSUPER) 1.5 μ g 溶于 100 μ L 不含血清无抗生素的培养液 DMEM 中, 两种质粒的分子质量之比为 1.7:1。将 3 μ L Lipofectamine²⁰⁰⁰ 溶于 100 μ L 不含血清无抗生素的培养液 DMEM 中。将 2 种稀释液混合, 轻轻晃动, 室温孵育 20 min, 待其形成 DNA-Lipofectamine²⁰⁰⁰ 复合物后, 轻轻加入清洗过的细胞。于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 条件下培养 6 h。吸弃培养液, 加入 1 mL 含 200 g/L 小牛血清的 DMEM 培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 条件下继续培养。转染 48 h 后在倒置荧光显微镜下观察细胞中 EGFP 的表达情况, 同时在物镜倍数为 $\times 200$

的荧光显微镜下, 随机选择 3 个视野, 计数发出绿色荧光的细胞数并计算其占总细胞数的百分比。

2 结果

2.1 pSUPER-Rs 干扰载体的构建和鉴定 重组质粒用 *Eco*RI 和 *Hind* III 进行双酶切后, 电泳结果显示可产生 291 bp 的片段, 而空载体则切出 241 bp 的片段, 说明重组质粒中已插入了目的基因片段, 成功构建了针对 EGFP 的 pSUPER siRNA 表达载体 pSUPER-Rs (Fig 1)。经 DNA 序列测定证实与所设计的序列完全一致。我们把针对 EGFP 编码区 3 个不同位点的 siRNA 表达载体分别命名为 pSUPER-R237, pSUPER-R304 和 pSUPER-R447 (Fig 2)。



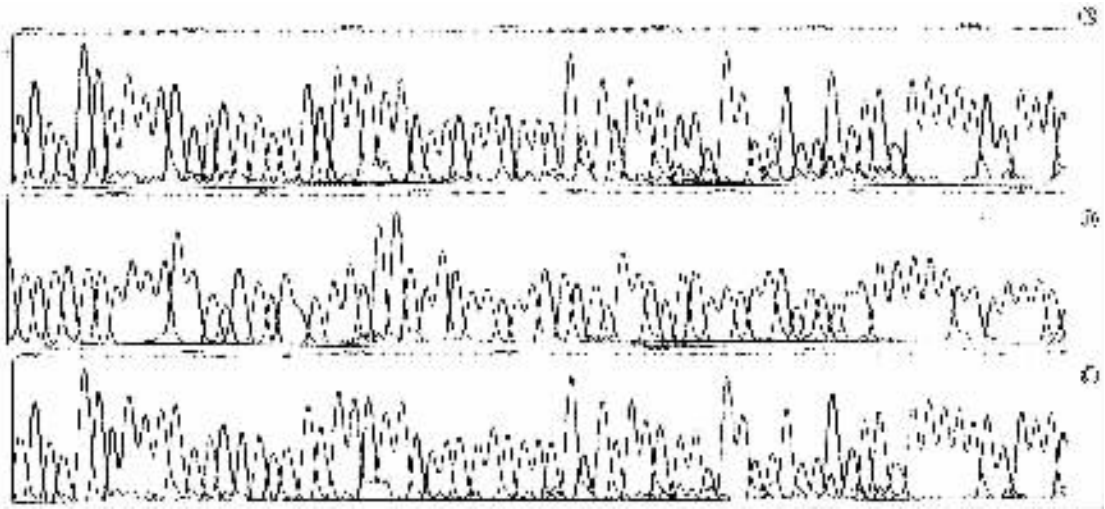
M: DL2000 marker; 1, 2, 3: pSUPER-R237; R304; & R447; 4: pSUPER.

Fig 1 Identification of pSUPER siRNA expression vector with *Eco*RI and *Hind* III digestion

图 1 pSUPER siRNA 表达载体的酶切鉴定

2.2 pSUPER-Rs 对外源 EGFP 表达的抑制作用

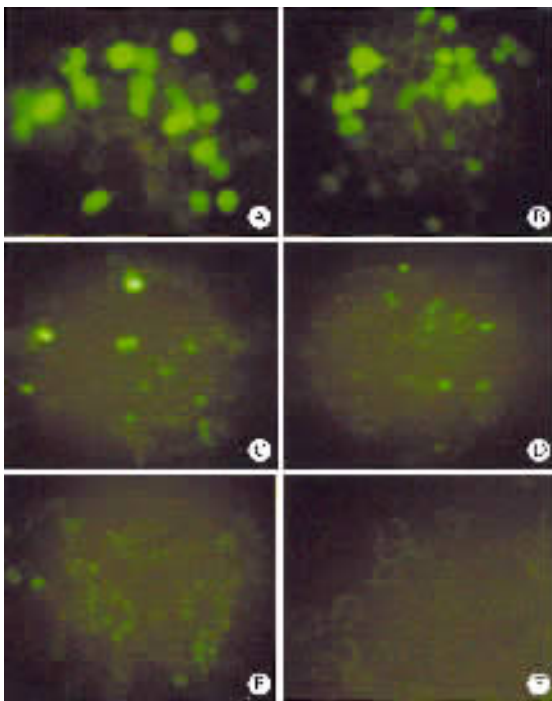
采用 pIRES2-EGFP 与 pSUPER-Rs 共转染 COS-7 细胞, 于转染后 48 h 在荧光倒置显微镜下观察 EGFP 的表达情况。结果显示 48 h 后转染 pIRES2-EGFP 的 COS-7 细胞中有大量的 EGFP 表达, 共转染空载体 pSUPER 与 pIRES2-EGFP 的 COS-7 细胞中 EGFP 的表达不受影响; 而共转染干扰载体 pSUPER-Rs 与 pIRES2-EGFP 的 COS-7 细胞中 EGFP 的表达受到了明显的抑制, 发出荧光的细胞数量明显减少, 荧光强度也明显降低 (Fig 3)。计数发出绿色荧光的细胞数占总细胞数的百分比结果显示, 构建的 3 个干扰载体都能显著抑制 COS-7 细胞中 EGFP 的表达。转染干扰载体 pSUPER-R237, pSUPER-R304 和 pSUPER-R447 后发出绿色荧光的细胞数分别下降了 51.2%, 51.4% 和 47.9%, 干扰效果相似。干扰质粒 pSUPER-Rs 能够显著抑制 COS-7 细胞中 EGFP 的表达。



A : pSUPER-R237 ; B : pSUPER-R304 ; C : pSUPER-R447.

Fig 2 DNA sequencing of pSUPER siRNA expression vectors

图 2 pSUPER siRNA 表达载体的 DNA 序列测定



A : Control transfected with pIRES2-EGFP ; B : Control co-transfected with pIRES2-EGFP and pSUPER ; C , D , E : COS-7 cells co-transfected with pIRES2-EGFP and pSUPER-R237 ; pIRES2-EGFP and pSUPER-R304 ; pIRES2-EGFP and pSUPER-R447 ; F : Non-transfected.

Fig 3 RNA interference effect of pSUPER-Rs on EGFP $\times 200$

图 3 pSUPER-Rs 对 EGFP 的 RNA 干扰效果

3 讨论

线虫中发现的一种移行 RNA(transitive RNAi)

现象为基因沉默信号的传递与放大机制提供了线索^[1]. 在哺乳动物细胞中双链 RNA(dsRNA)可以被加工成 21 ~ 23 nt 的小干扰 RNA(siRNA)^[2]. Elbashir 等^[3]证实在哺乳动物细胞中可以应用 RNAi 技术,为了能在哺乳动物细胞中应用 RNAi 技术,有必要对哺乳动物细胞中 RNAi 的机制作进一步研究. 构建针对 EGFP 的 siRNA 表达载体,不仅可以抑制 EGFP 的表达,还可以抑制与 EGFP 融合基因的表达,可作为报告系统用于研究哺乳动物细胞中 RNA 干扰机制及影响因素. 我们利用干扰表达载体 pSUPER 构建了 3 个针对 EGFP 的重组干扰质粒 pSUPER-Rs, 3 个干扰载体都有明显的干扰效果,它们的干扰效果之间无显著差别. 为今后研究哺乳动物细胞中 RNA 干扰机制奠定了实验基础.

【参考文献】

- [1] Sijen T, Fleenor J, Simmer F *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA- triggered gene silencing [J]. *Cell*, 2001 ; 107 : 465 - 476.
- [2] Billy E, Brondani V, Zhang H *et al.* Specific interference with gene expression induced by long double- stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001 ; 98 : 14428 - 14433.
- [3] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T *et al.* Duplexes of 21- nucleotide RNAs mediate RNA interference in culture mammalian cells [J]. *Nature* 2001 ; 411 #94 - 498.

编辑 许昌泰