

## 基于 PCR 的 siRNA 表达框的制备

郭秋野<sup>1</sup>, 马文丽<sup>1</sup>, 张宝<sup>1</sup>, 吴清华<sup>1</sup>, 严律<sup>1</sup>, 郑文岭<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>南方医科大学基因工程研究所, 广东 广州 510515; <sup>2</sup>华南基因中心, 广东 广州 510830 )

**摘要:**目的 改进目前基于 PCR 的方法制备 siRNA 表达框 转染细胞后产生高效的 RNA 干扰作用。方法 从 K562 细胞中提取基因组 DNA, 以此为模板, PCR 扩增 U6 启动子序列并克隆至 pMD18-T 载体中, 用载体上的引物进行扩增, 所得产物即制成作为扩增 siRNA 表达框的模板。选择 *p53* 为靶基因 扩增制备 siRNA 表达框 测序验证后, 转染 SH-SY5Y 细胞 48h 后提取 RNA 进行 RT-PCR 检测 RNA 干扰的效应。结果 测序结果表明所克隆的 U6 启动子序列正确。细胞转染表达框, 在 mRNA 水平上 *p53* 基因的表达明显受到了抑制。结论 本实验所制作的基于 PCR 的方法制备 siRNA 表达框可以很好地应用于 RNAi 作用研究。

**关键词:** RNAi; siRNA; U6 启动子; PCR 表达框架; SH-SY5Y 细胞

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)04-0483-03

## Preparation of small interfering RNA expression cassette based on PCR technique

GUO Qiu-ye<sup>1</sup>, MA Wen-li<sup>1</sup>, ZHANG Bao<sup>1</sup>, WU Qing-hua<sup>1</sup>, YAN Lu<sup>1</sup>, ZHENG Wen-ling<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Genomic Research Center of South China, Guangzhou 510830, China

**Abstract:** **Objective** To modify the current PCR-based method for rapid and efficient preparation of small interfering RNA (siRNA) expression cassette to improve the efficiency of RNA interference. **Methods** The U6 promoter sequence was amplified by PCR using the genomic DNA of K562 cells as the template, and cloned into pMD18-T vector which served as the template for further PCR amplification with the primers on the plasmid. The amplified product was directly used as the template for preparing siRNA expression cassette. The siRNA expression cassette targeting *p53* gene was amplified, verified by sequencing, and transfected into SH-SY5Y cells. After a 48-hour transfection, the cells were harvested and the total RNA was for RT-PCR for evaluating the effect of RNA interference. **Results** The sequencing result confirmed the correct U6 promoter sequence cloned from K562 cells. After transfection of SH-SY5Y cells for 48 h with siRNA expression cassette, the *p53* gene expression was inhibited at the mRNA level in comparison with the control cells as demonstrated by RT-PCR detection. **Conclusion** The siRNA expression cassette prepared using the established method described hereby can be well applicable in RNA interference research.

**Key words:** RNA interference; small interfering RNA; U6 promoter; expression cassettes; polymerase chain reaction; SH-SY5Y cells

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 引发的转录后的基因沉默。dsRNA 经核酸酶降解成 21-23nt 的小片段干扰 RNA (small interference RNA, siRNA), 并以其为模板, 特定位点, 特定间隔降解与之序列相应的 mRNA。目前有多种制备 siRNA 的方法, 其中 PCR 制备的 siRNA 表达框架 (siRNA expression cassettes, SECs) 是一种由 PCR 扩增得到的 siRNA 表达模板, 能够直接导入细胞进行表达而无需事先克隆到载体中。该模板包括一个 RNA pol III 启动子, 一段发夹结构 siRNA, 一个 RNA pol III 终止子位点。与 siRNA 表达载体不同的是 SECs 不需要载体克隆等颇为费

时的步骤, 可以直接由 PCR 得到, 所需要时间短, 因此成为筛选 siRNA 的最有效工具。本实验建立一种基于 PCR 的 siRNA 表达框制备的制备方法, 对传统的制备方法有所改进, 并以 *p53* 为参照靶基因进行了验证。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试剂 PremixTaq、逆转录酶 AMV、Oligo(dT) 18、pMD 18-T vector、PCR 产物纯化试剂盒 购自 Takara 公司, Trizol 购自上海申能博彩生物科技有限公司。Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司

1.1.2 细胞株、细菌 K562 细胞、XL-100 细菌, 为本实验室保存。SH-SY5Y 细胞, 由中国医学科学院章静波教授提供。

#### 1.2 方法

收稿日期: 2005-09-09

作者简介: 郭秋野 (1977-), 男, 硕士研究生, 主要从事表达谱基因芯片等相关分子生物学的研究

通讯作者: 马文丽, E-mail: Wenli@fimmu.com

12.1 U6 启动子克隆及鉴定 提取 K562 细胞基因组 DNA 作为模板,以 u6 5'GCAGGCCCTGGGCAGGAAGAGGGCCTAT3' , $\mu$ 6 5'CGGATCCTCGTCCTTTCCACAAGATATATA3' 分别作为上下游引物对 U6 启动子进行扩增 PCR 反应体系为:上下游引物各 2  $\mu$ l (20 mol/L),模板 2  $\mu$ l (100 ng) 2 $\times$ premix 25  $\mu$ l,加超纯水 19  $\mu$ l。反应条件为 94  $^{\circ}$ C 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环,72  $^{\circ}$ C 7 min。对 PCR 产物进行纯化,将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接。转化大肠杆菌感受态细胞 XL-1,涂板(含氨苄,X-gal 和 IPTG)过夜培养,挑取白色单菌落进行培养。使用 pMD18-T 载体上的引物(SO100 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3',SO101 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')进行 PCR 鉴定,然后选取 PCR 的阳性克隆用 SO101 进行测序,测序结果与 NCBI 中的 GENE BANK 的核酸数据库进行 BLAST 检索,验证 U6 启动子克隆的正确性。

1.2.2 制备 p53 RNAi PCR 表达框及鉴定 以 SO100 和 SO101 的引物扩增出的产物作为模板,以 u6 5'GCAGGCCCTGGGCAGGAAGAGGGCCTA T3' 为上游引物,U6p53 RACTGTAAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTggatccTCGTCCTTTCCACAAGA,U6p53 FACTGTAAAAAAGTAGATTACCACTGGAGTCTGGATCCTCGTCCTTTCCACAAGA 为下游引物分别进行扩增,反应条件 94  $^{\circ}$ C 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 45 s,循环 30 次,72  $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物纯化后,T-A 克隆至 pMD18-T 载体上,使用载体上的引物 SO101 进行序列测定。

1.2.3 p53 RNAi PCR 表达框的扩增 用上述经过测序验证的表达框克隆质粒做模板,用引物 SO100 和 SO101 进行扩增,纯化 PCR 产物,准备进行转染。

1.2.4 转染 SH-SY5Y 细胞 SH-SY5Y 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养(不加抗生素),培养条件为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>。当细胞汇合率达到 80%时,在 6 孔板中进行转染(参照 lipofectamine<sup>TM</sup>2000 试剂盒使用方法),同样条件加入不含 siRNA 的转染试剂作为空白对照。培养 48 h 后,进行光镜观察并进行检测。

1.2.5 RT-PCR 检测 SH-SY5Y 细胞 p53 基因的表达 收集对照组和处理组 SH-SY5Y 细胞,每管约  $1 \times 10^7$  个细胞。用 Trizol 法(参照 Trizol 试剂说明书)分别提取每组的总 RNA,用 50  $\mu$ l DEPC 水完全溶解 RNA 沉淀,取 1  $\mu$ l RNA 测定 D<sub>260/A280</sub>,取 5  $\mu$ g 进行变性甲醛凝胶电泳检测 RNA 有无降解。分别取总 RNA 2.0 g,5 $\times$ 第一链缓冲液 10  $\mu$ l,dNTP (10 mmol/L) 5  $\mu$ l,RNase 抑制剂 1  $\mu$ l Oligo (dT)18 (50 mol/L) 10  $\mu$ l,

AMV 2  $\mu$ l,加无菌超纯水至 50  $\mu$ l。室温放置 10 min,42  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,冰浴 2 min。以此逆转录产物为模板,分别加入 2 $\times$ premix $\times$ 10  $\mu$ l p53 上下游引物(上游 TTGAGGTGCGTGTTTGTG,下游 TTTATGGCGGGAGGTAGA)及作为内对照的 GAPDH 引物(GAPDHF CAACGGATTTGGTTCGTATT,GAPDHR CACAGTCTTCTGGGTGGC)各 1  $\mu$ l (20 mol/L),总体积 20  $\mu$ l。反应条件 94  $^{\circ}$ C 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 45 s;循环 30 次,72  $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果

### 2.1 人的 U6 和 H1 启动子片段克隆

首先从培养的人 K562 细胞中提取染色体 DNA,以此为模板,采用特异性引物进行 PCR 扩增,图 1 显示的是 PCR 扩增产物电泳结果,从图中可以看到 U6 启动子的片段长度为 250 bp 左右,且片段单一,无杂带。PCR 产物的结果片段长度大小与预期片段长度相符。

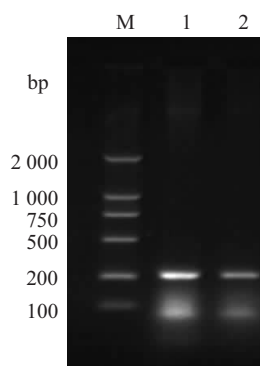


图 1 U6 启动子的 PCR 产物电泳  
Fig.1 Amplification of human U6 promoter by PCR  
M: DNA marker DL2000; Lanes 1 and 2: PCR products of U6 promoter

### 2.2 siRNAs 的测序结果

纯化、测序后,经比对,可知合成的 siRNAs 序列完全正确,可直接用于转染。

### 2.3 p53 基因 RNAi 表达框的扩增

用上述经过测序验证的表达框克隆质粒做模板,用引物 SO100 和 SO101 进行扩增,纯化后的 PCR 产物电泳检测的条带单一清晰,PCR 扩增成功,可以进行下一步转染(图 2)。

### 2.4 siRNA 对 SH-SY5Y 细胞形态学上的影响

将纯化的 PCR 产物转染 SH-SY5Y 细胞,48 h 后镜下观察,对照组细胞变化不明显,而转染表达框者,细胞生长减缓,细胞可见长长的突起生长(图 3)。

### 2.5 siRNA 对 SH-SY5Y 细胞 p53 基因 mRNA 表达的影响

采用 RT-PCR 的方法,检测干扰后 p53 基因表达变化,如图 4、5 所示,可以看出干扰之后处理和对照

组内参照 GAPDH 基因均可检测到,在 mRNA 水平, p53 基因表达下调。

### 3 讨论

RNA 干扰作用(RNA interference, RNAi)是由于一段双链的 RNA 进入机体或细胞中,进而导致在机体或细胞中与之有同源序列基因 mRNA 的降解,最终蛋白质的表达将会受到抑制,甚至表达受到完全抑制,即沉默(silencing),这种现象是由 Fire 等在研究线虫的过程发现的<sup>[1-3]</sup>。通过对其机制研究发现将在体外合成短的双链 RNA 分子(small interfering RNA, siRNA)转染到细胞后仍然有很好的沉默效果,具有序列特异性,可以避免长链 RNA 分子的副作用,导致其它基因的沉默。RNAi 不但是生物普遍所具有的一种现象,它可能参与了细胞正常的生长、发育的调控,因而对 RNAi 机制本身的研究具有重要的理论意义。另外,科学工作者们发现这一作用是研究后基因组一个革命性工具,在以往为了研究一个基因的功能,通常是采用的方法是基因敲除,操作非常繁琐,而这种技术相对而言简单,而且可以达到与敲除相近的效果<sup>[4]</sup>。最重要的一点,这种技术可能应用于药物上,目前有许多实验证实它可以抑制病毒在体内的复制,使肿瘤细胞向低恶性分化,预示着有着良好的临床应用前景<sup>[5]</sup>。

自从发现 RNAi 作用以来,认识到它具有重要的理论价值和广泛应用的前景,不管是科学工作者还是生物公司,都在开发相关的产品,目前应用 RNAi 技术主要有以下几种方法<sup>[6]</sup>:(1)体外合成 siRNA 分子。这种方法是应用比较早的,效果是明确的,但这种方法最大的缺点是合成的价格非常昂贵,是一般的实验室难以承受的,还有这种方法具有一定的副作用。(2)体外转录 siRNA。在体外将一段含 siRNA 分子的序列置于一些常见的启动子下游,如 T7, SP6 等,这种方法价格便宜,但保存较困难,合成量也受到一定的限制。(3)体外转录、酶切。首先在体外产生长链的双链 RNA 分子,然后用 RNase III 或 DICER 对其进行降解,从而形成一组 siRNA 的混和物。这种方法的优点在于不用去筛选有效的 siRNA 分子,可以获得很好的效果,但其缺点是产生非特异性基因的沉默。(4)siRNA 表达载体。将 siRNA 分子克隆到真核表达载体中,所用的启动子常见的有人的 H1 启动子和人、鼠的 U6 启动子,也有 CMV 启动子报道。这种方法是获得稳定表达细胞株很好的方法。(5)PCR 产物表达框。这种方法是利用体细胞内的 III 类 RNA 聚合酶(RNAPol III)的特性,将细胞的人的 H1 启动子和人、鼠的 U6 启动子克隆,将 siRNA 分子序列克隆其下游,再将这些 PCR 产物导入细胞内,利用体内的 RNA pol III 合成 siRNA<sup>[7]</sup>。与 siRNA 表达载体相比 PCR

(下转 489 页)

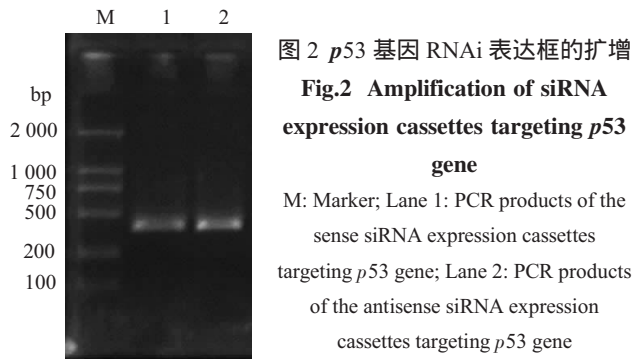


图 2 p53 基因 RNAi 表达框的扩增  
**Fig.2 Amplification of siRNA expression cassettes targeting p53 gene**  
 M: Marker; Lane 1: PCR products of the sense siRNA expression cassettes targeting p53 gene; Lane 2: PCR products of the antisense siRNA expression cassettes targeting p53 gene

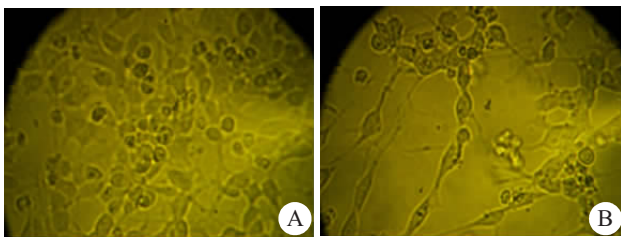


图 3 SH-SY5Y 细胞光镜照片

Fig.3 Normal (A) and transfected (B) SH-SY5Y cells under optical microscope (Original magnification: ×200)

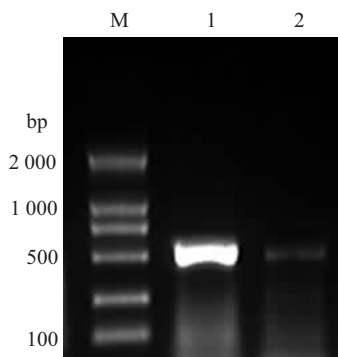


图 4 GAPDH 基因 RT-PCR 检测

Fig.4 Detection of GAPDH by RT-PCR

Lane 1: Normal control group; Lane 2: Transfection group

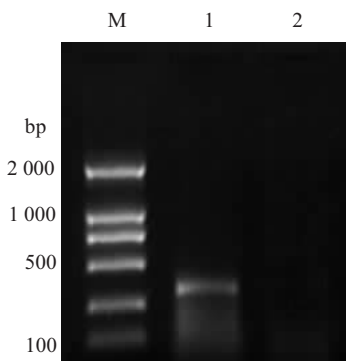


图 5 p53 基因 RT-PCR 检测

Fig.5 Detection of p53 gene by RT-PCR

Lane 1: Normal control group; Lane 2: Transfection group

合并 CSA-CSR 的 CHF 患者有效,经 3 个月的治疗可改善 CHF 患者的心功能<sup>[12]</sup>。但呼吸机对 CHF 患者的运用尚未广泛普及,还有待于临床医生观念的更新和更进一步的循证医学资料,也值得我们进行深入研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Lanfranchi PA, Braghiroli A, Bosimini E, et al. Prognostic value of nocturnal Cheyne-Stokes respiration in chronic heart failure [ J ] Circulation, 1999, 99(11): 1435-40.
- [ 2 ] Wright DJ, Tan LB. The role of exercise testing in the evaluation and management of heart failure [ J ] Postgrad Med J, 1999, 75(886): 453-8.
- [ 3 ] Kripke DF, Ancoli-Israel S, Klauber MR, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in ages 40~64 years: a population-based survey [ J ] Sleep, 1997, 20(1): 65-76.
- [ 4 ] Sin DD, Fitzgerald F, Parker JD, et al. Risk factors for central and obstructive sleep apnea in 450 men and women with congestive heart failure [ J ] Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(4): 1101-6.
- [ 5 ] 赵 蕾, 郭 阳, 王美懿. 慢性充血性心力衰竭患者伴睡眠呼吸障碍的临床分析 [ J ] 新疆医科大学学报, 2003, 26(3): 207-9.  
Zhao L, Guo Y, Wang XY. An investigation on sleep breathing disorder of patients with chronic congestive heart failure [ J ] J Xinjiang Med Univ, 2003, 26(3): 207-9.
- [ 6 ] 王宏宇, 胡大一. 心脏重构与心力衰竭(上) [ J ] 中国医刊, 2004, 39(5): 59-60.  
Wang HY, Hu DY. Heart remodeling and heart failure [ J ] Chin J Med, 2004, 39(5): 59-60.
- [ 7 ] Leuenberger UA, Brubaker D, Quraishi S, et al. Effects of intermittent hypoxia on sympathetic activity and blood pressure in humans [ J ] Auton Neurosci, 2005, 121(1-2): 87-93.
- [ 8 ] Kita H, Ohi M, Chin K, et al. The nocturnal secretion of cardiac natriuretic peptides during obstructive sleep apnoea and its response to therapy with nasal continuous positive airway pressure [ J ] J Sleep Res, 1998, 7(3): 199-207.
- [ 9 ] Moller DS, Lind P, Strunge B, et al. Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea [ J ] Am J Hypertens, 2003, 16(4): 274-80.
- [ 10 ] Liu H, Liu J, Xiong S, et al. The change of interleukin-6 and tumor necrosis factor in patients with obstructive sleep apnea syndrome [ J ] J Tongji Med Univ, 2000, 20(3): 200-2.
- [ 11 ] Hedner J, Ejjnell H, Caidahl K. Left ventricular hypertrophy independent of hypertension in patients with obstructive sleep apnea [ J ] J Hypertens, 1990, 8(10): 941-6.
- [ 12 ] Kasai T, Narui K, Dohi T, et al. Efficacy of nasal bi-level positive airway pressure in congestive heart failure patients with Cheyne-Stokes respiration and central sleep apnea [ J ] Circ J, 2005, 69(8): 913-21.

(上接 485 页)

产物表达框可以快速筛选到有效的 siRNA,而且由于 PCR 产物表达框末端并限制性位点,使其更容易被克隆到质粒或病载体中,形成 PCR 产物表达框表达载体,PCR 产物表达框这种方法可以说是 siRNA 表达载体的一种补充,是筛选有效 siRNA 分子最好的方法<sup>[8]</sup>,本实验对该方法进行进一步的改进使其更加具有特异性。

实验中,首先从 K562 细胞中克隆了 U6 启动子,并将该产物连到载体上,通过测序进行了验证,序列完全正确。接着用含有启动子序列的载体为模板,用载体上的引物进行扩增,至此,完成了 U6 启动子表达框的设计工作。经典方法中大多以此为模板,用相应基因表达框的引物进行扩增,所得的 PCR 产物经纯化后就可以转染细胞<sup>[7]</sup>。在引物的合成中通常会有碱基的错误,而 siRNA 分子的作用是有序列的特异性,如果有一个碱基的错误,就很难实现基因的沉默。本实验中是将其与 T 载体相连,克隆到载体上进行测序,从克隆测序的结果中,找到序列正确的克隆,并以此克隆的质粒为模板,用载体的引物 SO100 和 SO101 进行扩增,此时 siRNA 的表达框两端,都含一段 40~50 bp 的序列,该序列可以保护转染进入细胞的 PCR 产物,防止快速降解,延缓在细胞的半衰期,可以增加基因的沉默效应<sup>[9]</sup>。同时也便于制作该基因的沉默表达框。

综上所述,我们对该表达框的效应进行了验证,采用了 p53 基因,在 mRNA 水平上,可以看出,细胞转染表达框后 p53 的表达明显受到了抑制,说明本实验所制作的 U6 启动子表达框是成功的。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Guo S, Kempheus KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed [ J ] Cell, 1995, 81(4): 611-20.
- [ 2 ] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [ J ] Nature, 1998, 391(6669): 806-11.
- [ 3 ] Cogoni C, Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms [ J ] Curr Opin Genet Dev, 2000, 10(6): 638-43.
- [ 4 ] Tavernarakis N, Wang S, Dorovokov M, et al. Heritable and inducible genetic interference by double stranded RNA encoded by transgenes [ J ] Nature Genetics, 2000, 24(2): 180-3.
- [ 5 ] Jacques JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference [ J ] Nature, 2002, 418(6896): 435-8.
- [ 6 ] Banan M, Puri N. The ins and outs of RNAi in mammalian cells [ J ] Curr Pharm Biotechnol, 2004, 5(5): 441-50.
- [ 7 ] Castanotto D, Li H, Rossi JJ. Functional siRNA expression from transfected PCR product [ J ] RNA, 2002, 8(11): 1454-60.
- [ 8 ] Castanotto D, Scherer L. Targeting cellular genes with PCR cassettes expressing short interfering RNAs [ J ] Methods Enzymol, 2005, 392: 173-85.
- [ 9 ] Wooddell CI, Van Hout CV, Reppen T, et al. Long-term RNA interference from optimized siRNA expression constructs in adult mice [ J ] Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(1): 117-27.