

RNAi 表达载体对 *avUCP* 基因表达的抑制作用

仲 明^{1,2}, 张宏福^{1*}, 董枫岚^{1,3}, 王润平¹, 刘 燕², 杨 琳²

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室, 北京 100094; 2. 华南农业大学动物科技学院, 广州 510642; 3. 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘 要: 研究 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)表达载体对 *UCP* 基因的抑制作用。针对鸡解耦联蛋白(avian uncoupling protein, *avUCP*)基因, 构建 4 种 RNAi 质粒表达载体(分别称为 A、B、C 和 D 号载体)。再经过脂质体法转染成肌纤维细胞, 应用荧光定量 PCR 及流式细胞术检测其对 *avUCP* mRNA 及蛋白表达的影响。构建的 4 种表达载体均抑制了 *avUCP* 的 mRNA 及蛋白的表达, 其中转染 C 号载体的成肌纤维细胞 *avUCP* mRNA 表达相当于空白对照组的 14.6%, 蛋白抑制率达 93.7%。RNAi 表达载体可以有效的抑制 *avUCP* 基因的表达。

关键词: RNA 干扰; *avUCP*; 表达载体; FQ-PCR; 成肌纤维

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)04-0352-04

The Inhibitory Effects of siRNA Expression Vector on the Expression of *avUCP* Gene

ZHONG Ming^{1,2}, ZHANG Hong-fu^{1*}, DONG Feng-lan^{1,3}, WANG Run-ping¹,
LIU Yan², YANG Lin²

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal SciencI, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology, Southern China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: To investigate the inhibitory effects of RNAi(RNA interference) expression vector on the expression of *avUCP* gene. Four siRNA expression vectors (A, B, C and D) were constructed to be aimed directly at *avUCP* gene. The recombinants were transfected into myofibroblast with liposomes. Expression of *avUCP* was detected with fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and flow cytometry. Four kinds of expression vectors could reduce the expression of *avUCP* mRNA and protein all in myofibroblast. The expression of *avUCP* mRNA reduced to 14.6% of control group, and the protein inhibition ratio reached 93.7%. The RNAi expression vector can effectively inhibit the expression of *avUCP* gene.

Key words: RNA interference(RNAi); *avUCP*; expression vector; fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR); myofibroblast

UCP 是位于线粒体内膜的质子转运体, 影响着 ATP 的形成。当线粒体中有更多的燃料被氧化时, 结果所释放的能量以热能的形式释放出来, 而不是形成 ATP^[1]。由此推测: *UCP* 基因对机体能量代谢可能呈现负调控机制; 利用 RNA 干扰技术抑制

UCP 基因表达, 有可能成为分子营养学中动物能量代谢调控研究的重要方向且有望取得有实际应用价值的能量调控方法和手段。

RNA 干扰(RNAi)是指由双链 RNA 引发的转录后基因沉默机制, 它通过 21-23nt 的双链 RNA

收稿日期: 2006-03-20

基金项目: “863”计划资助项目(2003AA243046); “973”计划资助项目(2004CB117507)

作者简介: 仲 明 (1963-), 男, 南通市人, 副教授, 博士, 主要从事动物营养学与分子营养学研究, E-mail: zmxcx@163.com

* 通讯作者: 张宏福, E-mail: zhanghf6565@sina.com

(double-stranded RNA, dsRNA)或发夹状 RNA (short hairpin RNAs, shRNAs)与特异性 mRNA 的结合导致靶基因的降解,进而导致目的产物表达的下调^[2]。本研究利用能在细胞内自主合成发夹状 RNA 的表达质粒转入鸡成肌纤维细胞,观测其对于 *avUCP* mRNA 及蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

成肌纤维细胞取自孵化 10 d 的鸡胚; siSTRIKETM U6 Hairpin Cloning System-Neomycin 质粒载体购自 Promega 公司;脂质体转染试剂盒购自 Invivogen 公司;限制性内切酶 *Pst* I、RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒均购自 Promega 公司;所有 DNA 序列均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 *avUCP* 基因序列引自 GenBank, 登录号 AB088685。利用 siRNA Target Finder program (www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)、Sfold program (<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>)、Mfold program 和 data-progress 在线进行 siRNA 序列设计。最后在 *avUCP* 的序列中选取 AACC CACC GACG TGGT CAAG G(404~424), AAGG TGCG GTTC CAGG CTCT G(421~441), AACT CCAT CATT AACT GCGG C(559~579), AAGA CGCG GTAC ATGA ACGC C(718~738)4 段作为靶序列,针对 4 段靶序列相应设计 4 对(每对两条互补的序列)DNA 序列,经 blast 分析证明与禽类其他编码序列无同源性。序列的两端为 *Pst* I 的酶切位点,中央的 10 个碱基为发夹状序列,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。合成的序列如下:

Construct A: Oligo 1; 5'-ACCGCCACCGACGTGGTCAAGTTCTTCCTGTCAAACCTTGACCACGTTCGGTGGGTTTTTC-3', Oligo 2; 3'-GGGTGGCTGCACCAGTTCCAAGAAGGACAGTTTGGAACTGGTGCAGCCACCCAAAAAGACGT-5'; Construct B: Oligo 1; 5'-ACGGGTGCGGTTCCAGGCTCTGTTCTTCCTGTCAAACAGAGCCTGGAACCGCACCTTTTTTC-3', Oligo 2; 3'-CCACGCCAAGGTCCGAGCAAGAAGGACAGTTTGTCTCGGACCTTGGCGTGGAAAAAGACGT-5'; Con-

struct C: Oligo 1; 5'-ACCGCTCCATCATTAACGTGCGGCTTCTTCCTGTCAAAGCCGCAGTTAATGATGGAGTTTTTC-3', Oligo 2; 3'-GAGGTAGTAATTGACGCCGAAGAAGGACAGTTTTCGGCGTCAATTACTACCTCAA AAAGACGT-5'; Construct D: Oligo 1; 5'-ACCGGACGCGGTACATGAACGCCTTCTTCCTGTCAAAGGCGTTCATGTACCGCGTCTTTTTTC-3', Oligo 2; 3'-CTGCGCATGTACTTGCAGGAAGAAGGACAGTTT CCGCAAGTACATGGCGCAGAAAAAGACGT-T-5'。

将上述序列退火形成双链 DNA,酶切后插入 psiSTRIKETM 空质粒载体,分别命名为质粒 A、B、C 和 D(具体操作方法参见 Promega 公司 siSTRIKETM U6 Hairpin Cloning System (Human) 技术手册)。

1.2.2 细胞的培养及质粒转染 鸡胚成肌纤维细胞培养于含 20% 小牛血清的 RPMI-1 640 培养基中,在 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养至对数生长期。转染采用脂质体法,按 LyoVectTM 试剂说明书进行。将质粒 A、B、C、D 及空质粒分别转染鸡胚成肌纤维细胞,通过 G418(600 μg/mL)抗性筛选^[3,4],将阳性克隆细胞扩增并保存,分别命名为鸡胚成肌纤维 A、鸡胚成肌纤维 B、鸡胚成肌纤维 C、鸡胚成肌纤维 D。

1.2.3 *avUCP* mRNA 的表达检测 采用荧光定量 PCR 法。试验共设 6 组:空白对照组、空质粒载体组、鸡胚成肌纤维 A 组、鸡胚成肌纤维 B 组、鸡胚成肌纤维 C 组、鸡胚成肌纤维 D 组,每组设 6 个重复。以 GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶)为内对照。
① RNA 提取及逆转录,操作参照试剂盒说明书。
② PCR 扩增,应用 FTC-2000 型实时荧光定量 PCR 仪进行扩增。各组引物设计如下:*avUCP* 上游引物; 5'-GAATGTGTGTACTGCAAGCA-3', 下游引物; 5'-CACAGTGGCTTTTGACAGTT-3'。TAQman 探针: 5'-CAGCATATGGATTCCCATCTC-3'。GAPDH 上游引物: 5'-TGGGTGTGAACACGAGAA-3', 下游引物: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3', TAQman 探针: 5'-CTGCACACCAACTGCTTAGC-3'。其中探针于 5' 端标记荧光发光基团 FAM, 3' 端标记荧光淬灭基团 TAMRA。从各样品荧光定量 PCR 动力学曲线中判读其荧光阈值循环数(Cycle threshold, Ct)值,根据公式 ($X = YC_{tn} - C_{tx} \times N$) 计算样品中的模板 cDNA 的相

对拷贝数。N: Ct 值为 C_{tn} 的标本的模板拷贝数。X: Ct 值为 C_{tx} 的标本模板拷贝数。Y: 根据标准曲线计算获得的 Ct 值减少 1 个循环对应的模板 DNA 增加的倍数。

1.2.4 流式细胞仪检测 avUCP 蛋白的表达 利用美国 BD(BectonDicknson)公司出品的 FACSsort 流式细胞仪(FCM)检测空白对照组、空质粒载体组、鸡胚成肌纤维 A 组、鸡胚成肌纤维 B 组、鸡胚成肌纤维 C 组、鸡胚成肌纤维 D 组(6 组细胞)中 avUCP 蛋白的阳性表达百分率(基因蛋白表达的定量分析方法参照 Morkve 等和 Kelsten 等提出的荧光指数(Fluorescence index, FI)表示基因蛋白的相对含量^[5])。校正机器后,先设定收集门,以固定条件收集样本,每项检测重复 6 次。每个样品管收集 104 个细胞后进行分析,采用 Macintosh Quadra 650 计算机和 Cell Quest 软件收集处理样品数据。机器测试条件为 FSC 电压 E-1,增益 6.72;SSC 电压 335 mV。

蛋白抑制率(%)=

$$\left(1 - \frac{\text{转染后待测样品蛋白平均荧光强度}}{\text{转染后空白对照样品蛋白平均荧光强度}}\right) \times 100\%$$

1.2.5 统计学分析方法 试验结果以 $\bar{x} \pm SE$ 表示。利用 SPSS 13.0 for windows 中的 One-Way ANOVY 程序进行均数差异性比较,以 LSD 法比较平均数间的差异显著性。

表 1 各组 avUCP mRNA 表达及流式细胞检测蛋白值 (n=6)

Table 1 Expressions of avUCP mRNA and protein detected with FQ-PCR and flow cytometry(n=6)

组别	avUCP mRNA/(10 ⁵ copies/ng)	avUCP protein/%	Protein inhibition ratio/%
空白对照组 Blank control	8.2±0.38 ^a	66.7±2.4 ^a	
空质粒载体组 Blank plasmid	7.9±0.03 ^a	63.9±3.2 ^a	27.1
成肌纤维 A 组 Myofibroblast A	1.6±1.34 ^{cd}	22.9±1.1 ^c	88.3
成肌纤维 B 组 Myofibroblast B	3.6±1.85 ^b	29.3±1.4 ^b	83.8
成肌纤维 C 组 Myofibroblast C	1.2±1.23 ^d	17.7±0.9 ^d	93.7
成肌纤维 D 组 Myofibroblast D	2.3±1.60 ^{bc}	24.7±0.9 ^c	86.5

同一列中具有不同字母表示差异显著(P<0.05)

Different letters within a column are significantly different from each other(P<0.05)

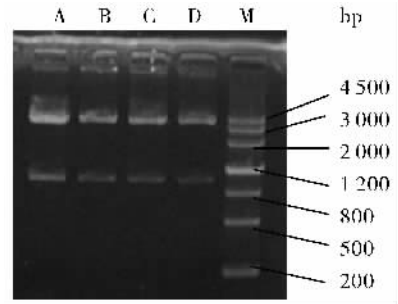
2.3 对蛋白表达的影响

流式细胞仪的检测结果证实 RNAi 表达载体对 avUCP 蛋白表达具有抑制作用。鸡胚成肌纤维 A、

2 结果

2.1 质粒的构建

将合成的片段退火形成双链 DNA 与载体 psiS-TRIKETM 连接构建重组质粒,分别命名为质粒 A、B、C 和 D。以常规方法转化感受态大肠杆菌 Top10 后,重组质粒经 Pst I 酶切鉴定(见图 1)且经上海生工生物工程技术有限公司测序证实为所需要的质粒。



M. MD103-01 DNA marker

图 1 质粒经 Pst I 酶切后电泳鉴定

Fig. 1 Electrophoresis results of plasmids cut with Pst I

2.2 对 avUCP mRNA 转录的影响

试验各组 avUCP mRNA 表达检测及流式细胞仪对 avUCP 蛋白值检测结果见表 1。由表 1 可见,鸡胚成肌纤维 A 组、B 组、C 组、D 组的 avUCP mRNA 转录水平均较空白对照组明显降低,其中鸡胚成肌纤维 C 组 avUCP mRNA 的转录水平仅相当于空白对照组的 14.6%,两者比较差异显著(P<0.05)。空质粒载体组对 avUCP mRNA 的转录无明显的抑制作用。

B、C、D 4 组细胞 avUCP 蛋白的表达量均较空白对照组和空质粒载体组显著降低(P<0.05);4 组中鸡胚成肌纤维 A、C 组 avUCP mRNA 的表达量明

显低于鸡胚成肌纤维 B、D 组 ($P < 0.05$), 其中, 成肌纤维 C 组 *avUCP* mRNA 的表达量最低, 其值为 $1.2(10^5 \text{ copies/ng})$ 。鸡胚成肌纤维空质粒载体组与空白对照组的表达量之间差异不显著 ($P > 0.05$)。鸡胚成肌纤维 A、B、C、D 4 组 *avUCP* 蛋白抑制率分别为 88.3%、83.8%、93.7%、86.5%, 与空质粒载体组相比差异显著 ($P < 0.05$), 见表 1。

3 讨 论

既往的试验证明使用化学合成的 siRNA (Small interference RNA) 的确可以高效特异性地抑制外源性和内源性基因的表达^[6], 但同时也存在着操作困难、价格昂贵、抑制效果维持时间短等缺点。最近报道使用质粒 DNA 构建的 siRNA 表达载体, 可在细胞内长时间、稳定地生成干扰性小 RNA。这使得哺乳动物细胞内基因表达长期沉默成为可能^[7]。通常载体包含有 RNA 聚合酶 III (*Pol III*) 启动子 (H1 prom) 或 U6 启动子和一个有 5 个 T 的转录终止位点, 一个保守的 A 开始转录合成 RNA 遇到 5 个连续的 U 即终止, 转录产物在转录终止位点的第 2 个碱基处终止, 非常精确。只要将编码一小段对应目的基因特异序列, 且 RNA 能形成发夹结构的 DNA 序列插入载体中 *Pol III* 或 U6 启动子的下游, 转入哺乳动物细胞, 载体就能转录出短发夹状 RNA, 这种 RNA 很快在细胞中加工成为大约 21 个碱基大小的双链 RNA 分子, 随后启动 RNAi 过程^[7]。本研究使用的 psiSTRICKETM 载体含 U6 启动子, 也可在绝大多数哺乳动物细胞内自主合成小分子 RNA, 被广泛应用于反义 RNA 技术。

本研究设计构建了能够在细胞内表达针对 *avUCP* 基因的发夹状 RNA 的质粒并将其导入鸡成肌纤维细胞。试验结果表明, RNAi 质粒载体的导入明显抑制了阳性克隆中 *avUCP* mRNA 及蛋白的表达, 其中鸡胚成肌纤维 C 组 *avUCP* mRNA 的

表达水平相当于空白对照组的 14.6%, 蛋白抑制率达 93.7%。空质粒载体组与空白对照组的差异不显著, 排除了质粒本身对基因的抑制作用。证明本研究构建的 siRNA 表达载体能够在细胞内表达 siRNA, 长时间抑制目的基因表达, 为人类定向的大量、高效、优质、节能生产畜禽产品提供了新的思路和途径。

致 谢: 试验过程中得到了中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室和张文庆教授的支持与帮助, 在此表达深深的谢意和感激。

参考文献:

- [1] Enrique J, Kotz C M, Levine A S, *et al.* Regulation of the uncoupling protein gene expression [J]. *Eur J Endocrinol*, 1997, 136: 251~258.
- [2] Peter M W, Ming-Bo W, Tony L. Gene silencing as an adaptive defence against viruses [J]. *Nature*, 2001, 411 (14): 834~841.
- [3] Petite J N, Clark M E, Liu G, *et al.* Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells [J]. *Development*, 1990, 108: 185~189.
- [4] Thoraval P, Lasserre F, Coudert F, *et al.* Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white leghorn by transfer of early blastodermal cells [J]. *Poult Sci*, 1994, 73: 1 897~1 905.
- [5] 左连富. 流式细胞术与生物医学[M]. 沈阳: 辽宁科技出版社, 1996. 73~75, 247.
- [6] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411: 494~502.
- [7] Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells [J]. *Genes Dev*, 2002, 16 (8): 948~956.