

# 西农萨能羊 *FAS* 基因 shRNA 序列筛选 及其腺病毒载体的构建

王 伟, 罗 军\*, 赵旺生, 李建华, 张 晓, 王龙坛

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨陵 712100)

**摘 要:** 山羊脂肪酸合酶 (Fatty acid synthase, FAS) 是脂肪酸合成的关键酶, 对乳腺短、中链脂肪酸合成起重要调控作用。设计了 shRNA-5544、shRNA-5936、shRNA-6132 3 条针对 *FAS* 基因不同区域的小发夹 RNA (Short hairpin RNA, shRNA) 及一条阴性对照序列 shRNA-NC, 并构建表达这 4 条 shRNA 序列的入门载体及其靶基因与红色荧光蛋白基因的融合表达载体, 二者共转染 HEK 293 细胞进行有效序列筛选, 结果显示 shRNA-5544 和 shRNA-5936 序列具有明显的干扰效果。在 LR Clonase- II 重组酶作用下, 分别将 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5936 及 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 入门载体与腺病毒骨架载体 pAd/PL-DEST 进行 LR 重组, 经氨苄青霉素及氯霉素抗性筛选后成功获得 3 个重组腺病毒载体, *Sca* I 酶切鉴定及测序分析证实所构建的重组腺病毒载体中插入序列与设计序列一致。重组腺病毒载体经 *Pac* I 酶切线性化后, 利用 Lipofectamine 2000 转染 HEK 293 细胞, 10~12 d 后收集病毒, 在 HEK 293 细胞中反复扩增 3 次后, 获得高滴度的重组腺病毒, 利用 TCID<sub>50</sub> 法测定重组腺病毒滴度分别为  $6 \times 10^8$  PFU/mL (表达 shRNA-5544 序列)、 $5 \times 10^8$  PFU/mL (表达 shRNA-5936 序列) 及  $6 \times 10^8$  PFU/mL (表达 shRNA-NC 序列), 为进一步在原代培养的山羊乳腺上皮细胞中进行 *FAS* 基因的 RNA 干扰研究奠定基础。

**关键词:** 西农萨能羊; 乳腺; 脂肪酸合酶基因; shRNA; 腺病毒载体

中图分类号: S852.65; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2010)03-0006-07

## Screening of shRNA Sequence Target Xinong Saanen Goat *FAS* Gene and the Construction of Recombinant Adenovirus Vector

WANG Wei, LUO Jun\*, ZHAO Wangsheng, LI Jianhua,  
ZHANG Xiao and WANG Longtan

(College of Animal Science and Technology, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,  
Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Goat fatty acid synthase (FAS), a central multifunctional enzyme in charge of fatty acid synthesis in mammary gland, plays a significant role in regulation of short-and medium-chain fatty acid. This study designed three short hairpin RNA (shRNA) sequences shRNA-5544, shRNA-5936, and shRNA-6132 targeting different area of *FAS* gene and one negative control sequence, then constructed four entry vectors containing shRNA expression cassette as well as pDsRed1-C1 vector expressing target gene by cotransfecting HEK 293 cell. The result showed that entry vector expressing shRNA-5544 and shRNA-5936 sequences caused an obvious interference effect. Then ampicillin and chloramphenicol were successfully applied to identify three recombinant adenovirus vectors generated by LR recombination between entry vector (pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5936, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC) and backbone vector (pAd/PL-DEST). *Sca* I diges-

\* 收稿日期: 2009-05-27 修回日期: 2009-10-09

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863 计划)项目(2008AA10Z135)资助。

作者简介: 王伟(1983-), 男, 硕士研究生。E-mail: weiwangs@gmail.com

\* 通讯作者: 罗 军, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

tion identification and sequencing analysis indicated that the sequence inserted into pAd/PL-DEST vector was the same with designed shRNA template. Recombinant adenovirus vector was transfected into HEK 293 Cell by Lipofectamine 2000 reagent after linearization by *Pac* I digestion. The cell lysates harvested during 10 to 12 days post transfection were employed to perform virus amplification in HEK 293 cells for three times to generate high-titer virus. The titer of the adenoviral stock was determined by TCID<sub>50</sub> method and respectively reaches  $6 \times 10^8$  PFU/mL (Expressing shRNA-5544 sequence),  $5 \times 10^8$  PFU/mL (Expressing shRNA-5936 sequence), and  $6 \times 10^8$  PFU/mL (Expressing shRNA-NC sequence), respectively. The attaining of recombinant virus lays a foundation for RNA interference research of FAS gene in primary goat mammary epithelial cells.

**Key words:** Xinong Saanen goat; Mammary gland; Fatty acid synthase gene; shRNA; Adenovirus vector

脂肪酸合酶(Fatty acid synthase, FAS)是由β-酮酯酰合酶(β-ketoacyl synthase, KS)、乙酰/丙二酸单酰基转移酶(Acetyl-CoA and malonyl-CoA transacylases, MAT)、脱水酶(Dehydratase, DH)、烯酰基还原酶(Enoyl reductase, ER)、酮酯酰还原酶(Ketoacyl reductase, KR)、酰基载体蛋白(Acyl carrier protein, ACP)和硫酯酶(Thioesterase, TE)7个功能域组成的多功能复合酶,广泛存在于动、植物组织细胞中,在脂肪酸合成中居核心地位,与细胞能量储存、膜结构、胞内信号转导以及蛋白质的乙酰化密切相关<sup>[1-3]</sup>。生物信息学分析发现 FAS 是脂代谢基因中唯一具有适应性进化特征的基因<sup>[4]</sup>,在不同物种间其大小及部分功能存在差异。研究表明,体外分离的山羊脂肪酸合酶具有终止长链脂肪酸而形成中链脂肪酸的功能,而在兔、鼠等非反刍动物中此功能则由独立的硫酯酶 II (Thioesterase II)来完成<sup>[5-6]</sup>。利用化学合成的 siRNA 干扰人前列腺癌细胞中 FAS 基因后,细胞脂肪生成能力显著降低,特别是磷脂及甘油三磷酸合成减少<sup>[7]</sup>,但目前尚无 FAS 基因调控细胞内短、中链脂肪酸合成的研究报道。众所周知,山羊奶短、中链脂肪酸种类丰富并且含量高,对人类营养吸收障碍综合征、小肠功能失调等代谢疾病有显著的预防作用<sup>[8]</sup>,然而羊奶短、中链脂肪酸含量高的机理并不清楚。因此研究奶山羊 FAS 基因的功能对阐明羊奶短、中链脂肪酸含量高的分子机理以及通过遗传或营养学手段调控羊奶中有益脂肪酸含量具有重要的理论及现实意义。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是研究基因功能的一种重要手段,它是在 mRNA 水平上阻断基因信息通路,导致特异性的基因表达沉

默。腺病毒载体作为哺乳动物细胞表达载体、重组疫苗载体及基因治疗载体,具有显著优点,其病毒颗粒比较稳定,可感染分裂和非分裂细胞,进入细胞内并不整合到宿主细胞基因组,安全性高。以腺病毒为媒介,可以实现在原代培养的细胞中进行高效、稳定的 RNA 干扰研究。笔者采用 Invitrogen 公司的 BLOCK-iT 腺病毒 RNA 干扰系统,构建 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 入门载体及表达 FAS 基因 DH、ER、KR、ACP 及 TE 功能域与红色荧光蛋白基因的融合表达载体 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE,将二者共转染 HEK 293 细胞筛选有效的干扰序列,在此基础上构建表达有效干扰序列的重组腺病毒载体,并在 HEK 293 细胞中包装重组腺病毒,为在山羊乳腺上皮细胞进行 FAS 基因的 RNA 干扰研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

美国 Invitrogen 公司的 BLOCK-iT 腺病毒 RNA 干扰系统 pENTR/CMV-GFP/U6 及 pAd/PL-DEST 质粒,GT116 菌株均由美国芝加哥大学荷德明博士惠赠;pGEM-T Easy Vector、T4 连接酶购自美国 Promega 公司;红色荧光蛋白载体 pDsRed1-C1,含有 FAS 基因 DH、ER、KR、ACP、TE 功能域片段的质粒 pGEM-T-DH-ACP、pGEM-T-TE 质粒,HEK 293 细胞系均由西北农林科技大学奶山羊研究室保存;高纯度质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;LA Taq DNA 聚合酶及限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、*Hind* III、*Sca* I、*Xba* I 均购自大连 TaKaRa 公司;Lipofectamine 2000、LR Clonase II 购自美国 Invitrogen 公司;标准胎牛血清购自天津灏

洋生物制品科技有限公司;6孔及96孔细胞培养板购自美国Costar公司;25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶购自丹麦NUNC公司;PCR引物由上海生物工程有限公司合成,shRNA模板由美国IDT公司合成。

### 1.2 靶向FAS基因的shRNA干扰序列的设计及合成

根据GenBank公布的西农萨能羊FAS基因序列,利用在线siRNA选择程序(<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>)设计3条FAS-siRNA,即siRNA-5544:GGGCAAACACATCGGCAAAA;siRNA-5936:GAGACGCCATGCTGGATAA;siRNA-6132:GGAGCGCATATGCGAGAAG。不针对任何已知基因的阴性对照序列参照Ambion公司公布的Negative Control siRNA序列,即siRNA-NC:ACTACCGTTGT-TATAGGTG。在siRNA基础上,按图1所述原则设计shRNA,得到shRNA正义链、反义链模板为:shRNA-5544-sense:5'-GATCCGGGCAAACACATCGGCAAAGAGTACTGTTTGCCGATGTGTTTGCCC TTTTTC -3'。shRNA-

5544-antisense:5'-TCGAGAAAAAAGGGCAAACACATCGGCAAACAGTACTCTTTGCCGATGTGTTTGCCCG-3'。shRNA-5936-sense:5'-GATCCGAGACGCCATGCTGGATAAGAGTACTGTTATCCAGCATGGCGTCTCTTTTTTC-3'。shRNA-5936-antisense:5'-TCGAGAAA AAAGAGACGCCATGCTGGATAACAGTACTCTTATCCAGCATGGCGTCTCG-3'。shRNA-6132-sense:5'-GATCCGGAGCGCATATGCGGAAGGAGTACTGCTTCTCGCATATGCGCTCCTTTTTTTC-3'。shRNA-6132-antisense:5'-TCGAGAAAAAAGGAGCGCATATGCGAGAAGCAGTACTCCTTCTCGCATATGCGCTCG-3'。shRNA-NC-sense:5'-GATCCACTACCGTTGTTATAGGTGGAGTACTGCACCTATAACAACGGTAGTTTTTTTTTC-3'。shRNA-NC-antisense:5'-TCGAGAAAAAACTACCGTTGTTATAGGTGCAGTACTCCACCTATAACAACGGTAGTG-3'。

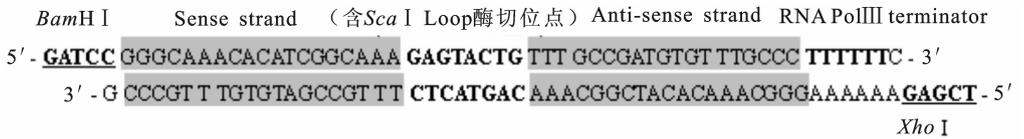


图1 shRNA模板DNA设计示意图

Fig. 1 Schematic outline of DNA encoding shRNA sequence

### 1.3 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA载体的构建

合成的4对shRNA单链模板用退火缓冲液溶解后,将正反义链退火形成双链寡核苷酸。退火缓冲液配方为10 mmol/L Trisbase,50 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,pH调至7.6。反应体系为20 μL:其中200 μmol/L正、反义链各5 μL,退火缓冲液2 μL,灭菌双蒸水8 μL。退火条件为95℃水浴10 min,水温自然冷却至室温时取出样品于-20℃冷冻保存备用。用*Bam*H I及*Xho* I双酶切pENTR/CMV-GFP/U6载体并回收,然后将退火产物与pENTR/CMV-GFP/U6载体双酶切回收产物连接,取连接产物利用热激法转化GT116大肠杆菌,抽提质粒进行*Sca*I酶切鉴定。

### 1.4 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE表达载体的构建

利用Oligo 6软件设计引物,分别从pGEM-T-DH-ACP(包含FAS基因的DH、KR、ER及ACP功能域)、pGEM-T-TE(含TE功能域)质粒

中扩增DH-ACP、TE片段,其中DH-ACP片段的上游引物DH-ACP-U 5'端增加*Hind* III酶切位点,TE片段的下游引物TE-L 5'端添加*Xba* I酶切位点。引物序列如下:DH-ACP-U:5'-AAGCTT ACGTCAACCCCAACGGGCT - 3';DH-ACP-L:5'-GAACACGGTGGTGGAGC-CCTC -3';TE-U:5'-ATCGAGGGCTCCAC-CACCGTGTTCAC-3';TE-L:5'-TCTAGACTAGCCCTCCCGCACGCTGAC -3'。

由于两个片段间具有相互重叠的区域,因此可以利用PCR技术将二者拼接成DH-ACP-TE长片段。扩增体系为10×LA Buffer II(含Mg<sup>2+</sup>)2 μL,dNTPs(各2.5 mmol/L)3 μL,上、下游引物各1 μL,LA Taq DNA聚合酶(5 U/μL)0.25 μL,DH-ACP质粒模板20 ng,TE质粒模板40 ng,添加水至20 μL;反应条件为95℃4 min;94℃30 s,68℃30 s,72℃3 min,30个循环;72℃10 min;4℃保存。将PCR产物连接到

pGEM-T Easy Vector 上,提取质粒分别利用 *Hind* III、*Xba* I 进行双酶切,回收目的片段并将其与 pDsRed1-C1 载体连接,转化感受态大肠杆菌,提取质粒进行酶切及测序鉴定。

### 1.5 有效 shRNA 序列的筛选

转染所用质粒的提取方法参照天根生化科技(北京)有限公司的高纯度质粒小提中量试剂盒说明书。采用 10% 的胎牛血清、含抗生素的 DMEM 高糖培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 HEK 293 细胞。转染前 1 d 接种生长状况良好的 HEK 293 细胞于 24 孔细胞培养板中,每孔细胞数约  $2 \times 10^5$ 。次日,待细胞生长至 90% 融合度时将构建好的 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5936、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-6132 及 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 质粒分别与靶基因表达质粒 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 共转染 HEK 293 细胞,以单独转染 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 质粒作为对照,每组设 3 个重复,整个筛选重复进行 2 次。试验组转染体系为:pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 质粒 600 ng, pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 质粒 400 ng, Lipofectamine 2000 2  $\mu$ L; 对照组转染体系为:pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 质粒 400 ng, Lipofectamine 2000 2  $\mu$ L。转染方法参照 Lipofectamine 2000 试剂使用说明书。转染 48 h 后,在荧光显微镜下观察结果。

### 1.6 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 重组腺病毒载体的构建及鉴定

选择具有明显干扰效果的 shRNA-5544、shRNA-5936 及阴性对照 shRNA-NC 序列构建重组腺病毒载体。利用 BLOCK-iT 腺病毒 RNA 干扰系统,在 LR Clonase-II 酶的作用下,使 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5936 及 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 质粒分别与腺病毒骨架质粒 pAd/PL-DEST 重组。反应体系及条件参照 LR Clonase-II 酶使用说明书。取反应产物 2~5  $\mu$ L 转化 TOP10 大肠杆菌,在含氨苄青霉素的 LB 平板上 37℃ 培养 14 h,挑取单克隆菌落接种于 2 mL 卡那抗性的液体 LB 培养基中,37℃ 振荡培养 12 h 后,用牙签接种菌液于含氯霉素抗性的 LB 平板上,不能在含氯霉素抗性的 LB 平板上生长的初步定为阳性克隆。抽提质粒进行 *Sca* I 酶切

鉴定,同时送菌液进行 DNA 测序鉴定。

### 1.7 腺病毒的包装、扩增及滴度测定

1.7.1 腺病毒的包装 将上述构建好的重组腺病毒载体在 TOP10 大肠杆菌中扩增,抽提质粒,取 5  $\mu$ g 的重组质粒用 *Pac* I 酶切,大片段经凝胶纯化回收后转染 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中生长融合度为 90% 的 HEK 293 细胞以包装重组腺病毒。转染后第 3 天在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况以跟踪腺病毒的包装与增殖过程。转染约 10~12 d 后,当出现明显的细胞病变反应,即细胞变圆,呈葡萄状,且约有 50% 细胞从培养瓶底部脱落时收毒:收集全部培养液及细胞至离心管中,3 000 r/min 离心 5 min,弃掉大部分上清(可收集于 -20℃ 保存备用),仅留下 2 mL 于离心管内,将细胞重悬后经 -80℃/37℃ 反复冻融 3 次,将冻融液 3 000 r/min 离心 5 min,收集含病毒的上清液,即为第 1 代病毒原液。

1.7.2 腺病毒的扩增 取上述第 1 代病毒原液 500  $\mu$ L~1 mL 重新接种 HEK 293 细胞(生长融合度为 70%~80% 左右),待细胞完全病变时(约接种后 2~3 d)按前述方法反复冻融细胞 3 次,离心收集病毒上清液,即为第 2 代病毒悬液。用第 2 代病毒悬液多次感染 HEK 293 细胞,重复“感染-冻融-收集”,大量扩增重组腺病毒。

1.7.3 腺病毒滴度的测定 采用 50% 组织培养感染剂量法(TCID<sub>50</sub>)测定腺病毒滴度,具体过程参考朱自强<sup>[9]</sup>及 Svensson<sup>[10]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体的构建

由于预先设计的 shRNA 序列中添加 *Sca* I 酶切位点,因此退火后形成的双链寡核苷酸插入 pENTR/CMV-GFP/U6 载体后,经过 *Sca* I 酶切出现单一条带,且大小与预期结果相吻合,而对照 pENTR/CMV-GFP/U6 空载体不能被 *Sca* I 酶切开(图 2),表明 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5936、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-6132 及 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 载体构建成功。

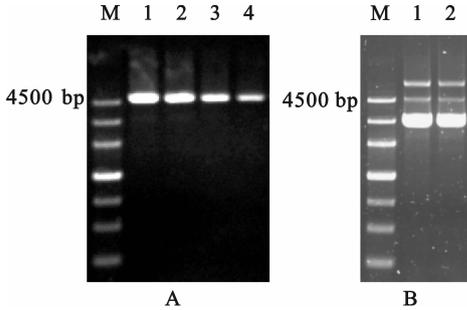
### 2.2 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 载体的构建

从 pGEM-T-DH-ACP、pGEM-T-TE 质粒中分别扩增 DH-ACP 及 TE 片段,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,分别在 4359 bp 及 789 bp 处出现特异性目的条带(图 3-A)。然后再以二者为模板,

利用 DH-ACP-U 引物及 TE-L 引物进行 PCR 扩增,得到 DH-ACP-TE 片段(图 3-B)。拼接后的产物插入 pGEM-T Easy 载体后,利用 *Hind* III 及 *Xba* I 酶切,回收目的片段与 pDsRed1-C1 载体连接,经 *Hind* III 酶切鉴定及测序鉴定表明成功构建了 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 载体。

### 2.3 有效 shRNA 序列的筛选

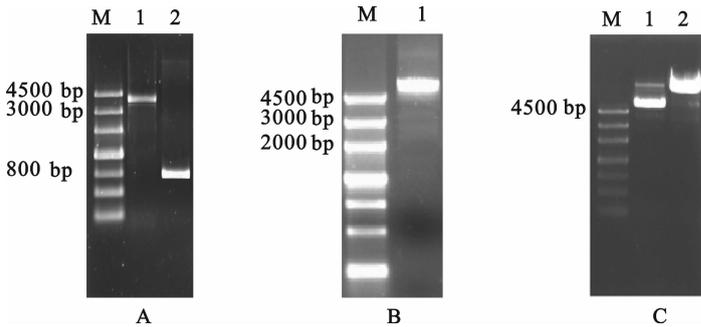
表达 shRNA 的干扰载体及阴性对照(表达绿色荧光)分别与靶基因表达载体 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE(表达红色荧光)共转染 HEK 293 细胞 48 h 后,在荧光显微镜下观察到各组中绿色荧光表达量一致,表明干扰载体的转染效率相同。与对照组相比 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-6132、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5936 转染组红色荧光表达量降低,表明所设计的 3 条序列均有干扰效果,其中 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5936 转染组红色荧光表达量降低最为明显;pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 阴性对照组的红色荧光强度与不转染干扰载体的对照组基本相同,与预期结果相符。红色荧光蛋白与脂肪酸合酶基因 DH-ACP-TE 片段形成融合蛋白,因此红色荧光蛋白表达量降低表明 DH-ACP-TE 的表达量降低,说明设计的 shRNA 序列对脂肪酸合酶基因具有干扰效果。从图 4 可以看出,表达 shRNA-5544 及 shRNA-5936 序列的载体干扰效果最显著,因此可以作为 FAS 基因 RNA 干扰研究的有效序列。



M. DNA Marker III; A. pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体的 *Sca* I 酶切分析; A 的 1-4. pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5936, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-6132, pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC; B. pENTR/CMV-GFP/U6 空载体的 *Sca* I 酶切分析; B 的 1-2. pENTR/CMV-GFP/U6 空载体, pENTR/CMV-GFP/U6 的 *Sca* I 酶切产物

图 2 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体 *Sca* I 酶切鉴定

Fig. 2 *Sca* I endonuclease analysis of pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA vectors



M. DNA Marker III; A 的 1-2. DH-ACP 片段的 PCR 扩增产物, TE 片段的 PCR 扩增产物; B 的 1. DH-ACP 与 TE 的 PCR 连接产物; C 的 1-2. pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 质粒, pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 质粒的 *Hind* III 酶切产物

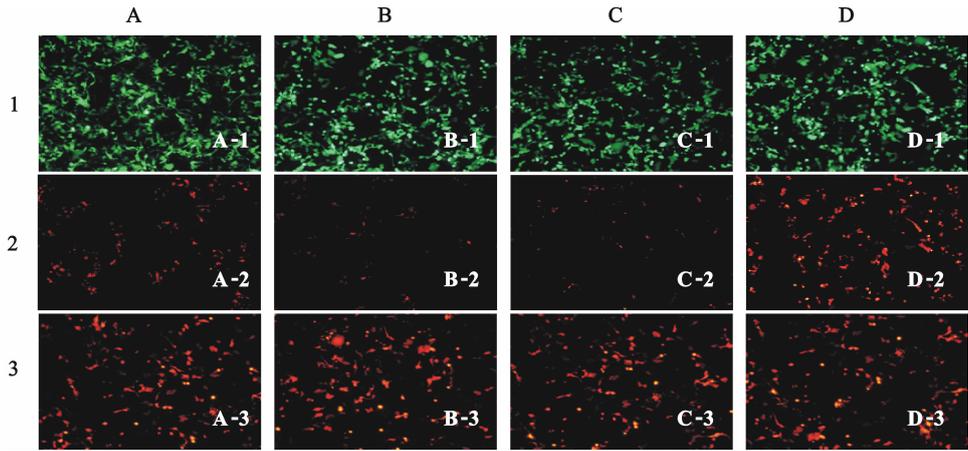
图 3 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 载体的构建

Fig. 3 Construction of pDsRed1-C1-DH-ACP-TE vector

### 2.4 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 重组腺病毒载体的构建及鉴定

反应产物转化 TOP10 大肠杆菌,分别经过氨苄青霉素及氯霉素双重筛选后,提取质粒进行 *Sca* I 酶切鉴定,试验组与对照组酶切产物经过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳出现不同条带,且酶切产物大小与预期值相符(图 5),表明 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pENTR/CMV-GFP/U6-

shRNA-5936、pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 质粒均与 pAd/PL-DEST 腺病毒骨架质粒重组成功。测序结果显示,重组腺病毒载体中所插入序列与设计序列完全一致,证明 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-5936 及 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 重组腺病毒载体构建成功。

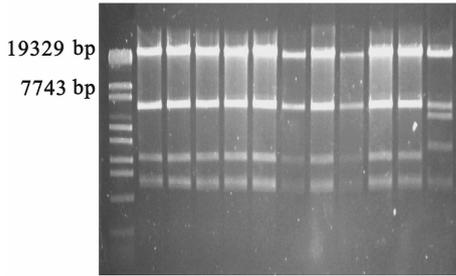


A 组、B 组、C 组、D 组分别为 shRNA-6132、shRNA-5544、shRNA-5936、shRNA-NC 序列的干扰效果检测;1(A1、B1、C1、D1)、2(A2、B2、C2、D2)分别为 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 干扰载体与 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 靶基因表达载体共转染 HEK 293 细胞 48 h 后荧光显微镜下绿色荧光及红色荧光表达情况;3(A3、B3、C3、D3)为对照组,即单独转染 pDsRed1-C1-DH-ACP-TE 靶基因表达载体 48 h 后荧光显微镜下红色荧光表达情况

图 4 RNA 干扰序列的筛选

Fig. 4 Screening of shRNA sequence for RNA interference

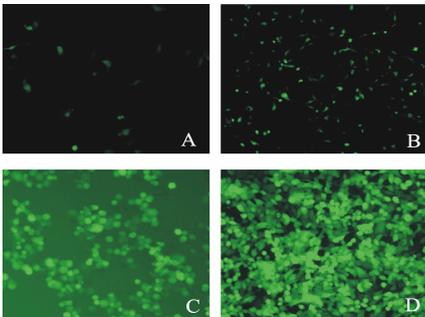
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



M.  $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1, 2, 3, 4. pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-5544; 5, 6, 7, 8. pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-5936; 9, 10. pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-NC; 11. 对照, pAd/PL-DEST 空载体的 Sca I 酶切

图 5 重组腺病毒载体的 Sca I 酶切鉴定

Fig. 5 Sca I endonuclease analysis of recombinant Adenoviral vectors



A. 腺病毒基因转染 HEK 293 细胞 3 d 后的绿色荧光表达情况;B. 转染 7 d 后的绿色荧光表达情况;C. 转染 12 d 后细胞脱壁变圆,可以收毒;D. 高滴度的腺病毒感染 HEK 293 细胞 24 h 后绿色荧光表达情况

图 6 腺病毒的包装

Fig. 6 Adenovirus packaging

## 2.5 腺病毒的包装、扩增及滴度测定

pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-5544、pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-

5936 及 pAd/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA-NC 重组质粒经 Pac I 线性化后,转染 HEK 293 细胞,3d 后荧光显微镜下可观察到部分细胞有绿色荧光蛋白表达,7 d 后绿色荧光蛋白表达量增多,同时开始出现细胞病变效应,11 d 后 50% 的细胞从培养瓶底脱落时收集病毒(图 6)。病毒上清反复感染 HEK 293 细胞 3 次后,获得高滴度的腺病毒,经 TCID<sub>50</sub> 法计算得到腺病毒滴度分别为  $6 \times 10^8$  PFU/mL(表达 shRNA-5544 序列)、 $5 \times 10^8$  PFU/mL(表达 shRNA-5936 序列)及  $6 \times 10^8$  PFU/mL(表达 shRNA-NC 序列)。

## 3 讨论

RNA 干扰技术是研究基因功能的一个重要手段,目前 siRNA 的获得方式有多种,包括化学合成、体外转录、载体表达、体外酶切等。由于哺乳动物细胞不具备低等真核生物细胞所具有的扩增 RNAi 信号的机制,因此,人工合成或体外转录的 siRNA 分子在细胞内的作用是瞬时的,不适合用于靶基因表达受到抑制后细胞表型的长期变化的观察,也不适合进行文库的筛选;此外,体外制备的 siRNA 分子的成本比较高,而且 siRNA 在体外易被 Rnase 降解,操作相对比较复杂,这就限制了他们的应用<sup>[11-12]</sup>。目前,已经有许多报导描述了应用携带 siRNA 或小发夹 RNA(shRNA)的载体在哺乳动物细胞中表达 siRNA,成功地沉默目标基因的表达,这为研究高等真核生物的基因功能开创了新的方法<sup>[13-15]</sup>。携带和表达

siRNA 的载体主要有两类,一种是 DNA 质粒载体,另一种是病毒载体系统。DNA 质粒载体在原代培养的细胞转染效率很低,很难达到试验要求。选择腺病毒载体可以实现在原代细胞中高效表达针对目标基因的 shRNA,而且腺病毒系统相对于慢病毒载体安全性更高、更容易操作。另外,所采用的 BLOCK-iT 腺病毒 RNA 干扰系统具有诸多的优点,首先入门载体(pENTR/CMV-GFP/U6)含有绿色荧光蛋白报告基因,能够随时监测病毒的包装或扩增过程,其次腺病毒骨架载体(pAd/PL-DEST)中含有 *ccdB* 的负筛选基因、氨苄青霉素抗性基因及氯霉素抗性基因,在没有重组的情况下 *ccdB* 基因能使 TOP10 大肠杆菌致死,但当入门载体与腺病毒骨架载体重组之后,阳性克隆会丢失 *ccdB* 基因及氯霉素抗性基因,含有重组质粒的 TOP10 大肠杆菌能够存活,这极大地提高了重组腺病毒质粒的筛选效率。

应用 RNA 干扰技术的另一关键在于靶序列的筛选。在构建重组腺病毒载体之前先在 HEK 293 细胞中验证所设计序列的干扰效果,以节省时间及成本。将干扰载体及靶基因表达载体分别用绿色荧光和红色荧光标记,共转染 HEK 293 细胞,通过在荧光显微镜下观察绿色荧光及红色荧光的强度就可以判断干扰载体的转染效率及靶基因的干扰效率。由于采用两种不同荧光分别标记干扰载体及靶基因,使得干扰序列筛选过程省时高效,结果更直观可靠,而且可以同时筛选多条序列。另外,由于 *FAS* 基因结构复杂,cDNA 序列过长(编码区长度达到 7.5 kb),将整个编码区构建到红色荧光蛋白载体中,转染 HEK 293 细胞后,在荧光显微镜下只能观察到极少数细胞发红色荧光(数据未在文中显示),推测脂肪酸合酶影响红色荧光蛋白的空间结构或使转染效率降低,致使红色荧光表达量很低,因此本研究只将 *FAS* 部分功能域构建到红色荧光蛋白载体中,这样可以确保靶基因的表达效率,同时又不影响序列筛选的可靠性。

综上所述,本研究通过构建靶向 *FAS* 基因的干扰载体及该基因部分功能域的红色荧光蛋白融合表达载体,共转染 293 细胞后,获得两条(shRNA-5544 及 shRNA-5936)具有明显干扰效果的 shRNA 序列。通过 LR 重组,构建了表达 shRNA-5544、shRNA-5936 及阴性对照 shRNA-NC 序列的重组腺病毒载体,并且在 HEK 293 细胞中

成功获得了重组腺病毒,滴度分别为  $6 \times 10^8$  PFU/mL、 $5 \times 10^8$  PFU/mL、 $6 \times 10^8$  PFU/mL,为进一步在奶山羊乳腺上皮细胞中进行 *FAS* 基因的 RNA 干扰研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Wakil S J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme [J]. *Biochemistry*, 1989, 28(11): 4523-4530.
- [2] Asturias F J, Chadick J Z, Cheung I K, et al. Structure and molecular organization of mammalian fatty acid synthase [J]. *Nature structural & molecular biology*, 2005, 12(3): 225-231.
- [3] Maier T, Jenni S, Ban N. Architecture of Mammalian Fatty Acid Synthase at 4.5 Å Resolution [J]. *Science*, 2006, 311: 1258-1262.
- [4] O'Connell M J, McInerney J O. Adaptive evolution of the human fatty acid synthase gene: Support for the cancer selection and fat utilization hypotheses [J]. *Gene*, 2005, 360(2): 151-159.
- [5] Mikkelsen J, Hojrup P, Hansen H F, et al. Evidence that the medium-chain acyltransferase of lactating-goat mammary-gland fatty acid synthetase is identical with the acetyl/malonyltransferase [J]. *Biochemical Journal*, 1985, 227(3): 981-985.
- [6] Kundsén J, Grunnet I. Transacylation as a chain-termination mechanism in fatty acid synthesis by mammalian fatty acid synthetase. Synthesis of medium-chain-length (C8-C12) acyl-CoA esters by goat mammary-gland fatty acid synthetase [J]. *Biochemical Journal*, 1982, 202(1): 139-143.
- [7] Schrijver E D, Brusselmans K, Heyns W, et al. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells [J]. *Cancer research*, 63: 3799-3804.
- [8] Williams C M. Dietary fatty acids and human health [J]. *Annales de Zootechnie*, 2000, 49: 165-180.
- [9] 朱自强, 郑马庆, 余莹, 等. TIMP-3N 端结构域重组腺病毒载体的构建与鉴定 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2008, 5(4): 418-422.
- [10] Svensson L, Hjalmarsen A, Everitt E. TCID<sub>50</sub> determination by an immuno dot blot assay as exemplified in a study of storage conditions of infectious pancreatic necrosis virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 1999, 80: 17-24.
- [11] Kim D H, Rossi J J. Strategies for silencing human disease using RNA interference [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8(3): 173-184.
- [12] Einav Y, Agami R, Canaan D. shRNA-mediated RNA interference as a tool for genetic synthetic lethality screening in mouse embryo fibroblasts [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579: 199-202.
- [13] Fei Z L, Chen Z, Wang Z G, et al. Conditional RNA interference achieved by Oct-1 POU/rtTA fusion protein activator and a modified TRE-mouse U6 promoter [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 354: 906-912.
- [14] 杨谦, 赵惠贤. RNA 干扰技术及其应用研究进展 [J]. *西北农业学报*, 2005, 14(2): 13-17.
- [15] Fulvio M D, Henkels K M, Gomez-Cambronero J. Short-hairpin RNA-mediated stable silencing of Grb2 impairs cell growth and DNA synthesis [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 357: 737-742.