

靶向口蹄疫病毒 shRNA 表达载体转染后特异性 siRNA 的分子检测

蔡扩军¹, 孟庆玲^{1*}, 乔军^{1*}, 陈创夫¹, 马饰委¹, 黄炯², 张再超¹, 田振中¹, 杨丽红¹ (1. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆畜牧科学院 兽医研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:通过 Poly A polymerase 对小干扰 RNA 分子 (Small interfering RNA, siRNA) 3' 端进行加“Poly A”处理, 然后进行 RT-PCR 扩增, 并将扩增产物克隆到 T 载体上进行测序。结果表明, 通过该方法可以快速检测 FMDV 特异性 siRNA 分子的表达, 这为 siRNA 的干扰 FMDV 复制分子机制和抗 FMDV 转基因动物细胞水平的评价研究提供了技术支撑。

关键词: siRNA; 表达; 反转录 PCR; 口蹄疫病毒

中图分类号: S852. 652 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-4545(2013)01-0049-04

Detection of specific siRNA after transfection of shRNA expression vector targeting FMDV

CAI Kuo-jun¹, MENG Qing-ling^{1*}, QIAO Jun^{1*}, CHEN Chuang-fu¹, MA Shi-wei¹, HUANG Jiong², ZHANG Zai-chao¹, TIAN Zhen-zhong¹, YANG Li-hong¹ (1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 2. Veterinary Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830000, China)

Abstract: RNA interference, mediated by small interfering RNA, is a fast developed post-transcriptional gene silencing method in recent years, which has been extensively used in the fields of gene function research. To identify whether siRNA was expressed in BHK-21 cells after interference vector targeting Foot-and-mouth disease (FMDV) was transfected, Poly A polymerase was used to add poly-A tails to the 3' end of siRNA, then reverse transcription PCR (RT-PCR) technique was used and introduced to detect siRNA expression, the product was subcloned into T Vector and sequenced. Experiment results showed that this method is a fast and facile tool to detect siRNA and study siRNA interfering mechanisms in FMDV replication and assessment of transgenic animal cells anti-FMDV.

Key words: small interfering RNA (siRNA); expression; RT-PCR; FMDV

* Corresponding author

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是偶蹄类动物的一种急性、热性、高度接触性传染病^[1]。目前, 使用传统灭活疫苗免疫和扑杀相结合仍是防控口蹄疫的主要措施。但是仍然不能控制口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 的感染与传播, 这就促使人们寻求有效的措施防控口蹄疫。RNA 干扰 (RNAi) 是近年来发现的短链双股 RNA

可高效阻断其互补 mRNA 转录的现象, 该现象在包括人类在内的大多数物种体内广泛存在, 是研究基因功能、肿瘤治疗、抗病毒感染的新型工具^[2]。目前, RNAi 技术在人免疫缺陷病毒 (HIV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、口蹄疫病毒 (FMDV) 等抗病毒感染方面的成功尝试, 为预防和治疗病毒感染提供了新的工具^[3-5]。

目前, 在哺乳动物细胞中, 主要应用 2 种相关的技术来实现 RNAi。一种方法是向哺乳动物细胞直接转染人工合成的长度为 19~22 bp 并且 3' 末端具有突出碱基的小干扰 RNA (small/short interfering RNA, siRNA)^[6], 另一种方法是利用表达质粒或者

收稿日期: 2011-11-28

基金项目: 国家转基因重大专项 (2009ZX08006-003B)

作者简介: 蔡扩军 (1985-), 男, 硕士。

* 通讯作者

病毒载体在哺乳动物细胞中表达小发夹 RNA (Short hairpin RNA, shRNA)^[7-10]。shRNA 被 Dicer 酶(RNAase III 家族中对双链 RNA 具有特异性的酶)切除发卡环结构加工成为 siRNA, siRNA 是一类 20~25 个核苷酸长度的双链 RNA 分子,其结构是一段完全互补的 RNA 双链,两端各有 2 个未互补的碱基。其主要在 RNAi 通路中起作用,干扰特异基因的表达。由于 siRNA 片段小,没有 poly(A)尾巴,这给 siRNA 检测方法的建立带来了困难。本试验为鉴定口蹄疫病毒 shRNA 干扰载体转染 BHK-21 细胞后是否表达了 siRNA,本试验首先加尾酶在 siRNA 的 3'端加上 1 段 poly(A)尾巴,然后用 5'端含有接头序列的 poly(T)引物进行反转录,使第一链 cDNA 加上 1 段接头,再利用 1 条与 siRNA 序列特异的正向引物就可实现 PCR 扩增,将扩增产物克隆到 T 载体上并进行测序。结果表明,本试验建立的检测 siRNA 的方法具有简便、快速的特点,可直接检测特异性表达的 siRNA 分子,为抗口蹄疫病毒 RNA 干扰转基因动物细胞水平评价研究提供了技术支撑。

1 材料与方法

1.1 FMDV RNA 干扰载体、细胞、菌种 M1(shRNA)干扰载体由本实验室马饰委博士构建(已证明对 FMDV 有较强抑制作用); BHK-21 细胞由石河子大学保存,于 37℃、5% CO₂ 培养,生长液为含有 8% 犊牛血清的 DMEM (DMEM 13.7 g、NaHCO₃ 3.6 g、FBS 80 mL、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 mg/L,定容至 1 000 mL, pH 7.2),维持液为含 2% 犊牛血清的 DMEM; DH5 α 大肠杆菌由本校动物科技学院病毒学实验室保存。

1.2 主要试剂 Trizol、反转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit、高保真 PfuDNA 聚合酶、TaqDNA 聚合酶、T 载体、胶回收试剂盒等购于购自大连 TaKaRa 公司;脂质体 LipofectamineTM2000 (Invitrogen 公司);DMEM 培养基 (Gibco 公司);All-in-OneTM miRNA Q-PCR Detection Kit (GeneCopoeia 公司)

1.3 引物设计 根据 siRNA 序列,运用分子生物学软件 primer 5.0 设计出其特异性上游引物,然后送到华大生物工程公司合成。M1 上游引物:5'-GCCAAGAGGACAAAGCGCTG-3'; M1 下游引物:GeneCopoeia 公司提供的通用下游引物。

1.4 转染 将 2 $\times 10^5$ BHK-21 细胞接种至六孔板中,每孔加入含 8% 犊牛血清的 DMEM 培养液 2

mL, 37℃、5% CO₂ 条件下培养 12~24 h 后待细胞长满至 90%。用 DMEM 原液洗细胞 2 次,每孔再加入 1.5 mL 原液。同时用原液分别稀释 4 μ g M1 质粒及 10 μ L LipofectamineTM2000 各至 250 μ L,室温孵育 5 min 后将两者轻轻混合,室温下静置 20 min。将上述 DNA-脂质体混合液逐滴加至细胞上,轻轻混匀。37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养 5 h。弃转染液,加入 2 mL 含 5% FBS 的 DMEM 培养液继续培养 48 h。同时设立不转染的正常对照。

1.5 Trizol 法提细胞总 RNA 及 siRNA 3'端进行加“Poly A”处理 用 Trizol 提取转染后的细胞总 RNA。在冰上的预冷 RNase free 的反应管内加入 Total RNA 2 μ g; 2.5 U/ μ L PolyA polymerase 1 μ L; 10 $\times$ PolyA Polymerase Buffer 2 μ L; 10 $\times$ rATP Solution 2 μ L; ddH₂O (RNase/DNase free) 补至 20 μ L。混匀,短暂离心后在 37℃ 反应 15 min。

1.6 Poly A 化的 RNA 进行 RT-PCR 反应 在冰上预冷的 RNase free 的反应管内加入以下试剂至总体积 13 μ L: PolyA 反应液 2 μ L; 25 $\times$ Oligo dT Adaptor 1 μ L; ddH₂O (RNase/DNase free) 10 μ L,混匀,短暂离心,直接 65℃ 变性 10 min 后立即放置冰上至少 2 min。再加入以下试剂至总体积 25 μ L: RNA-Primer Mix 13 μ L; 5 $\times$ RT Reaction Buffer 5 μ L; 25 mmol/L dNTP 1 μ L; 25 U/ μ L RNase Inhibitor 1 μ L; 200 U/ μ L M-MLV RTase (RNase H free) 1 μ L; ddH₂O (RNase/DNase free) 4 μ L。混匀,短暂离心后在 42℃ 反应 60 min,再进行 85℃ 5 min 灭活处理。取 cDNA 5 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L、引物 (25 pmol/ μ L) 各 1 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L、水 33.7 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L (5 U/ μ L),混匀,96℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 20 s, 56℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 36 个循环, 72℃ 延伸 7 min。

1.7 siRNA-T 载体的构建与鉴定 将 PCR 扩增产物连入 T 载体上,连接转化后将大肠杆菌涂布于 LB(50 mg/L Amp) 平板, 37℃ 培养过夜。挑取 6 个阳性克隆菌进行 PCR 鉴定,送华大基因公司进行测序。

2 结果

2.1 siRNA 基因的扩增与克隆 经 3% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物约为 70 bp, 与预期值相符(图 1)。以重组质粒的阳性菌为模板,用 PCR 可扩增得到约 70 bp 的核酸片段(图 2)。

2.2 siRNA-T 载体部分核苷酸序列测序结果 以

Poly A polymerase 对 siRNA 3'端加“Poly A 尾”后的 RNA 为模板,通过 RT-PCR 技术,克隆得到 siRNA 分子,并将扩增产物克隆到 T 载体上进行测序,

通过对测序成功的 6 个 siRNA 分子的比较分析,结果表明 shRNA 表达载体转染细胞后被 Dicer 酶成功切割成 siRNA(图 3、表 1)

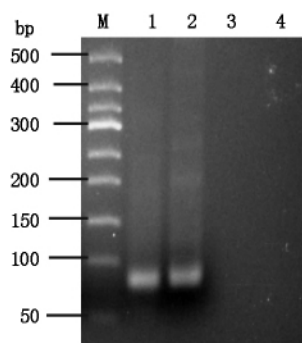


图 1 siRNA 基因 PCR 扩增结果 M. 50 bp DNA Marker; 1、2. 转染试验组 siRNA; 3. 未转染对照; 4. 阴性对照

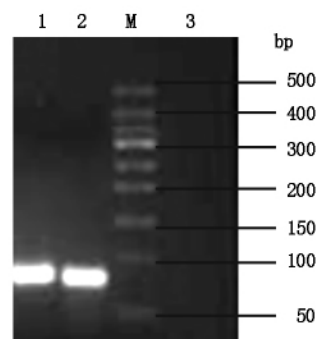


图 2 siRNA-T 阳性菌检测结果 M. 50 bp DNA Marker; 2. 转染试验组 siRNA; 3. 阴性对照

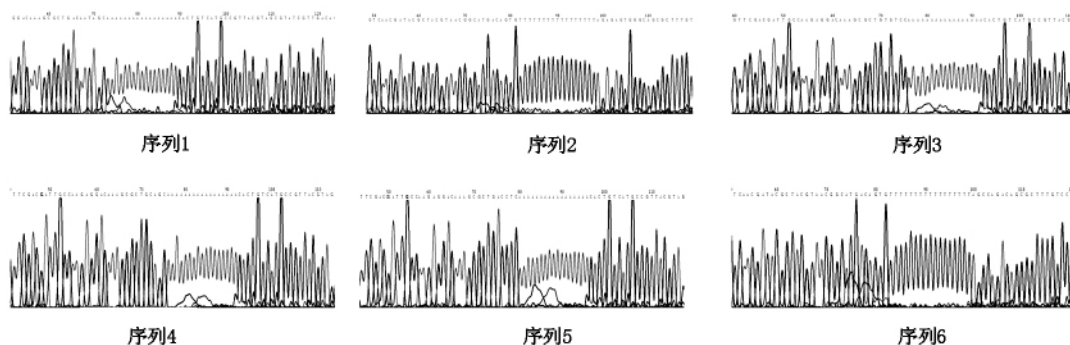


图 3 6 个 siRNA 分子的序列峰图

表 1 6 个 siRNA 分子序列比较分析结果

序列名称	序列(5'~3')
序列 1	TTCGACGATTGCCAAGAGGACAAAGCGCTGACAATAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCA
序列 2	TTCCAGAGATTGCCAAGAGGACAAAGCGCTGCCACTCTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGT
序列 3	TTCGACGATTGCCAAGAGGACAAAGCGCTGTGTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCTATGC
序列 4	TTCGACGGATTGCCAAGAGGACAAAGCGCTGCAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCTATGC
序列 5	TTCGACGGATTGGCCAAGAGGACAAAGCGCTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCTAT
序列 6	TTCCAGAGATTGCCAAGAGGACAAAGCGCTGTCTGGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCTAT

注:表黑体部分为 6 个测序样品共有的特异 siRNA 序列

3 讨论

口蹄疫传播迅速、难于防治,给畜牧业造成严重损失,被称为畜牧业的头号杀手。安全有效的疫苗是成功地预防、控制乃至最终消灭 FMD 的先决条件。但由于病毒毒力返强、病毒灭活不彻底、活病毒逃逸加工厂等不安全因素,世界上一些地区 FMD 的暴发似乎与灭活疫苗中残存的活病毒有关,促使人们寻求其它更加安全有效的 FMD 防控措施。

近年来 RNAi 技术迅猛发展, RNAi 作为天然存在的抗病毒免疫反应已经在哺乳动物细胞中被证实,它可以减少病毒 RNA 的数量、阻断病毒蛋白的表达、抑制病毒的复制、切断病毒的感染途径,从而达到预防和治疗病毒感染的目的^[11]。目前,在哺乳动物细胞中还没有找到内源的 siRNA,外源的 shRNA 介导的 RNAi 作用正是一种抵御机制。shRNA 是一段具有紧密发卡环的 RNA 序列,常被用于 RNA 干扰沉默靶基因的表达。它包含 2 个由 1 个

小环序列所分离的短反向重复序列,是由 Pol III 启动子控制的,其中 1 个反向重复序列与目的基因互补。shRNA 在转染细胞后被 Dicer 酶加工成特异性 siRNA,然后 siRNA 结合到 RNA 诱导沉默复合物上(RNA-induced silencing complex,RISC),该复合物以 siRNA 为指导,识别并切割互补 mRNAs 并将其降解,抑制其表达。

评价和筛选 RNA 干扰载体一般是由其转染细胞后干扰效果及生物活性决定的。目前为止,我们主要通过 RT-PCR 和 Western blotting 检测 shRNA 对特定基因和蛋白表达的抑制作用,筛选出 RNA 干扰效果最好的 shRNA,很少对 shRNA 干扰载体本身在转染后细胞后是否表达出 siRNA 做过研究,而表达出特异的 siRNA 又是 shRNA 表达载体发挥干扰效果的前提条件,因此,对 shRNA 干扰载体转染后特异性 siRNA 分子的检测具有重要意义。目前,多数研究人员采用 Northern blotting 来检测小分子 RNA 的存在,这种检测方法特异性和灵敏度不高,复杂而费力^[12-13]。本试验基于以上原因,在国内首次将检测 miRNA 的加“Poly A”尾方法和分子克隆方法相结合,来检测 siRNA 是否在转染后得以表达。本试验结果表明,M1 干扰载体在转染 BHK-21 细胞后表达出了特异 siRNA,建立的该方法可以简单快速的检测 shRNA 干扰载体是在细胞内先被切割成 siRNA,进而发挥干扰作用,为研究 RNA 干扰载体在细胞内发挥干扰作用的机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] Fred B. The history of research in foot-and-mouth disease virus[J]. Virus Res,2003(3):11.
- [2] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy[J]. Mol Interv,2002,2(3):158-167.
- [3] Qin X F, An D S, Chen I S, et al. Inhibiting HIV-1 Infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(1):183-188.
- [4] Radhakrishnan S K, Layden T J, Gartel A L, et al. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis[J]. Virology,2004,323(2):173-181.
- [5] 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 (6836):494-498.
- [6] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science,2002,296:550-553.
- [7] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cell[J]. Nat Biotechnol,2002,20:497-500.
- [8] Hasuwara H, Kaseda K, Einarsdottir T, et al. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats[J]. FEBS Lett,2002,532:227-230.
- [9] Yu J Y, DeRuiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,30:6047-6052.
- [10] Sui G C, Soohoo C, Affar E B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002,16:5515-5520.
- [11] 陈芸,朱作言. RNA 干扰在抗病毒研究中的应用[J]. 水生生物学报,2006,30(3):356-359.
- [12] Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z. Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes[J]. Methods,2007,43(2):140-145.
- [13] Pall G S, Codony-Servat C, Byrne J, et al. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot [J]. Nucleic Acids Res, 2007,35(8):60.