

在活体小鼠中筛选 IZP3 基因 RNAi 有效靶位点的研究 Selecting the RNAi Efficiency Target Sites of IZP3 Gene by Mouse *in vivo*

庄淑珍, 李菁菁, 郑耀虎, 张富春*

ZHUANG Shu-Zhen, LI Jing-Jing, ZHENG Yao-Hu and ZHANG Fu-Chun*

新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室 新疆生物资源基因工程重点实验室 乌鲁木齐 830046

Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046, China

摘 要 ZP3 作为精子结合的靶对象在卵母细胞受精中起着关键作用,也因此而成为研究哺乳动物受精机理的焦点。本研究参照新疆草原兔尾鼠卵透明带 3 区 zona pellucida 3 gene of *Lagurus lagurus* (IZP3) 的 mRNA, 选择了针对 IZP3 mRNA 的 3 个区域合成寡聚核苷酸连接到干扰载体 pGenesil-1 上, 构建了 3 个针对 IZP3 mRNA 的重组干扰载体, 和 pCDNA3-IZP3 表达载体采用脂质体法共转染 HeLa 细胞以及通过尾静脉大容量快速注射法 (Hydrodynamics-based transfection method, HD 法) 共注射小鼠, 半定量 RT-PCR 和 real-time PCR 检测 HeLa 细胞和小鼠肝脏中 IZP3 mRNA 的表达情况, 以筛选干扰 IZP3 mRNA 的有效靶位点。结果表明, 通过 HD 法共注射干扰载体和表达载体后, 外源基因 mRNA 在小鼠肝脏中的表达和共转染 HeLa 细胞后在 HeLa 细胞中的表达情况是一致的, 有 2 个干扰载体可以有效干扰 IZP3 mRNA 的表达。研究还说明, 利用 HD 法以小鼠作为实验材料筛选 RNA 干扰的有效靶位点是一条切实可行的方法。

关键词 RNA 干扰, 靶位点, 共转染, 尾静脉大容量快速注射法

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)06-0979-05

Abstract As the combining target with sperms, ZP3 undergoes an important role in the fertilization of oocytes and therefore it has been the focus in studying the mechanism of mammalian. According to the sequence of the zona pellucida 3 gene of *Lagurus lagurus* (IZP3), three RNA interference recombinant vectors were constructed with pGenesil-1 aiming at IZP3 mRNA by synthesizing oligonucleotides. And then co-transfected into the HeLa cells by Lipofectamine2000 and co-injected into the mice by hydrodynamics-based transfection method with the expression vector pCDNA3-IZP3. In order to select the efficient target sites of IZP3 for RNAi, the mRNA expression level of IZP3 gene in HeLa cells and the mouse liver was detected by semi-quantitative RT-PCR and real-time PCR. Results show that there are 2 interference vectors can interfere of the expression of IZP3 mRNA, and the mRNAs of the exogenous genes expressed in the mouse liver are coincident with those of in HeLa cells after co-transfected with the interference vectors and expression vector. It also suggests that the mice can be the experimental materials for selecting the efficiency target sites of the RNA interference.

Key words RNA interference, target site, co-transfection, hydrodynamics-based transfection method

Received: April 28, 2006; Accepted: June 25, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30360062) and the China Postdoctoral Science Foundation.

* Corresponding author. Tel: 86-991-8583259; Fax: 86-991-8583259; E-mail: zfc@xju.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No.30360062)和中国博士后科学基金资助项目资助。微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

RNA 干扰(RNA interference , RNAi)技术 ,是将与内源 mRNA 编码区同源的小片段(19 ~ 23bp)外源双链 RNA(double stranded RNA , dsRNA)导入细胞中 ,通过一系列细胞内反应引发细胞中相应 mRNA 的降解 ,从而导致特定基因表达沉默的一种技术。利用 RNAi 技术可将过去无法确认的基因进行分类 ,该技术现已成为线虫、果蝇等低等生物基因功能研究的有效工具^[1]。RNAi 技术在哺乳动物中的研究也越来越多 ,Harbort 等^[2]将 siRNA 转入包括人 HeLaSS6 细胞在内的几种培养的哺乳类细胞中 ,结果发现有 21 种基因沉默 ,其中 13 种基因为细胞生长所必需的必需基因。这 13 种基因的功能表型与过去利用其他方法研究它们的表型是一致的 ,说明利用 RNAi 技术研究基因功能具有可靠性和快速性。

卵透明带(zona pellucida , ZP)是环绕在哺乳动物卵母细胞表面的一层酸性糖蛋白 ,厚约 7 μm ,其作用为调节特异的精卵结合并阻止多精受精的出现。受精时 ,它与精子所具有的特异性卵子结合蛋白相识别并结合 ,从而完成受精过程。ZP 主要由三种硫酸化的糖蛋白组成 ,即 ZP1、ZP2 和 ZP3 ,而 ZP3 作为精子结合的靶对象在受精中起着关键作用。RNAi 作为研究基因功能的一种手段 ,可以通过对 IZP3 基因的敲除研究其功能 ,以进一步阐明 IZP3 基因在卵母细胞受精过程中的作用。本研究参照新疆草原兔尾鼠卵透明带 3(zona pellucida 3 gene of *Lagurus lagurus* , IZP3) 以往的研究^[3] ,选择了针对 IZP3 mRNA 的 3 个区域合成寡聚核苷酸连接到干扰载体 pGenesil-1 上 ,和 pCDNA3-IZP3 表达载体采用脂质体法共转染 HeLa 细胞和通过尾静脉大容量快速注射法(Hydrodynamics-based transfection method , HD 法)共注射小鼠 ,以期筛选得到有效的干扰 IZP3 mRNA 的靶位点 ,为在卵母细胞水平上干扰 IZP3 mRNA 的表达 ,探讨 IZP3 对精卵结合的影响作用做准备。

1 材料和方法

1.1 质粒 DNA

siRNA 真核表达载体的构建 :载体 pGenesil-1 (图 1)含抗 G418 的耐药基因 ,可在 G418 作用下筛选稳定转染的细胞。其携带的增强型绿色荧光蛋白 (EGFP)基因 ,可直接在荧光显微镜下观察转染效率并挑取成功转染的细胞克隆。依据 AAGN17C 的选择原则 ,结合 RNA Structure3.71 模拟 IZP3 mRNA 二级结构 ,选择了其中以 AAG 开头的位于茎环结构环部附近的 3 个区域合成寡聚核苷酸。具有互补序列的能够编码短发夹 RNA(shRNA)的双链寡核苷酸由武汉晶赛公司合成 ,结构为 :BamH I + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + Sal I + Hind III。此互补序列为两条反向重复序列 ,中间 9 个插入碱基分别为 TTCAAGACG 和 AAGTTCTGC ,两端分别带有 BamH I 和 Hind III 的酶切位点 ,编码的 shRNA 的序列插入到 pGenesil-1 的 BamH I 和 Hind III 之间 ,其转录产物所形成的 siRNA 的作用靶点分别为新疆草原兔尾 IZP3 mRNA(GenBank No. AF515621) 558-576、819-837 以及 894-912 位核苷酸 ,各片段已利用 Blast 进行查询 ,确定其为特异性序列。阴性对照双链寡核苷酸转录产物所形成的 siRNA 的作用序列不与任何人、鼠类基因同源。双链寡核苷酸序列见表 1。

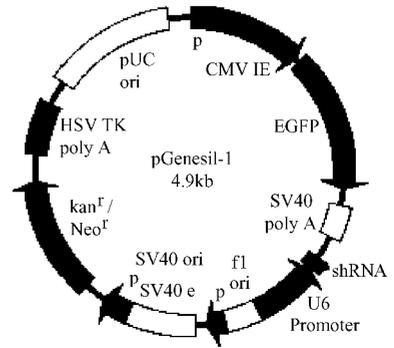


图 1 载体 pGenesil-1 结构

Fig.1 Structure of the pGenesil-1vector

表 1 合成的用于构建干扰载体的寡核苷酸(包含所选序列的正义和反义序列)
Table 1 The synthesized oligonucleotide for constructing interference vector
(Including the sense sequences and anti-sense sequences)

Code		Sequences
ZP31	Sense	5'-GATCCATCATCTCCACATCCACttcaagacgGTGGAATGTGGGAGATGATTTTTTTTGTGCGACA-3'
	Anti-sense	5'-AGCITGTCGACAAAAAATCATCTCCACATTCCACcgtctttaaGTGGAATGTGGGAGATGATG-3'
ZP32	Sense	5'-GATCCGCAGCTCTAGGAATACGATCttcaagacgGATCGTATTCTAGAGCTTTTTTTTGTGCGACA-3'
	Anti-sense	5'-AGCITGTCGACAAAAACAGCTCTAGGAATACGATCcgctttaaGATCGTATTCTAGAGCTGCG-3'
ZP33	Sense	5'-GATCCGCAAAGCCTGTTCCTTCAACttcaagacgGTTGAAGGAACAGGCITTTTTTTTGTGCGACA-3'
	Anti-sense	5'-AGCITGTCGACAAAAACAAAGCCTGTTCCTTCAACcgtctttaaGTTGAAGGAACAGGCITTTGCG-3'
HK	Sense	5'-GATCCGACTTCATAAGGCGCATGttcaagacgGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTGTGCGACA-3'
	Anti-sense	5'-AGCITGTCGACAAAAAGACTTCATAAGGCGCATGcgctttaaGCATGCGCCTTATGAAGTTCG-3'

pCDNA3-IZP3 由本实验室构建并保存,可在真核细胞内表达 IZP3 蛋白。

1.2 酶及主要试剂

实验中所用内切酶为大连 TaKaRa 公司产品, Taq DNA 聚合酶及 RT-PCR 所用 M-MLV、RNasin、DNase I (RNase-free) 购自大连 TaKaRa 公司, DMEM 干粉及胎牛血清、非必需氨基酸、青链霉素为 GIBCO 公司产品, TRIZOL Reagent 为 Invitrogen 公司产品, G418 购自上海生工公司。

表 2 Helal 细胞转染实验
Table 2 Transfection of Helal cells

Groups	pGenesil-ZP31	pGenesil-ZP32	pGenesil-ZP33	pGenesil-HK	pCDNA3-IZP3
Group I	+	-	-	-	+
Group II	-	+	-	-	+
Group III	-	-	+	-	+
Control I	-	-	-	+	+
Control II	-	-	-	-	+
Control III	-	-	-	-	-

Note: The control III was rejected 2.5mL saline only in the experiment "1.4.1 Mice and intravenous injection".

1.3.2 Helal 细胞中干扰外源基因表达效果检测:从筛选得到的一部分阳性细胞克隆中提取总 RNA, DNase I (RNase free) 消化后紫外分光光度计定量, 取 1 μ g 总 RNA 以 Oligo(dT)18 为反转录引物进行反转录, 以 β -actin 作为内参(目的片段长 155bp), 以半定量 RT-PCR 和 Real-time PCR 检测各组 IZP3 基因 mRNA 在 Helal 细胞中的表达情况。IZP3 半定量 RT-PCR 引物为 S516(5'-TTT CTC TCT CCG CCT GAT GG-3') 和 A888(5'-CTT ATC TGG GGT CTG GTT GG-3'), 目的片段长 378bp。IZP3 real-time PCR 所用引物为 Lzp3testp1(5'-CTG ATG GAG GAG AAC TGG AAC-3') 和 Lzp3testp2(5'-CAA TGG TGT GAT AGG GAG AGC-3'), 目的片段长 175bp。

1.4 siRNA 真核表达载体在小鼠肝脏中干扰外源基因表达效果检测

1.4.1 小鼠及尾静脉注射 6~8 周龄雌性昆明白小鼠(25g 左右) 购自新疆医科大学动物实验中心。表达质粒(pCDNA3-IZP3, 20 μ g) 和干扰质粒(4 μ g) 按与转染 Helal 细胞相同的比例(5:1) 溶于 2.5mL 灭菌生理盐水中, 按表 2 同样分组采用以流体力学为基础的大容量快速尾静脉注射法(Hydrodynamics-based transfection method, HD 法)^[5] 在 7s 之内注入昆明白小鼠尾静脉中。

1.4.2 小鼠肝脏中干扰外源基因表达效果检测:每组注射 3 只小鼠, 注射 8 h 后处死^[5], 取肝脏提取总 RNA, 其余步骤同 1.3.2。检测 pCDNA3-IZP3 和各干扰载体共注射小鼠后, 各组 IZP3 基因 mRNA 在小鼠

1.3 siRNA 真核表达载体在 Helal 细胞中干扰外源基因表达效果检测

1.3.1 细胞培养与转染:Helal 细胞由本实验室冻存。5 \times 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 其融合达 80% 左右时按表 2 分组进行转染。具体操作按脂质体说明书进行, 表达质粒与干扰质粒的比例为 5:1^[4]。转染 48 h 后按 1:10 稀释传代并换用选择培养基(500 mg/L G418) 继续培养 14 d, 然后将出现的细胞克隆在培养瓶中扩增培养并传代。

肝脏中的表达情况。同时以 β -actin 作为内参进行 real-time PCR 鉴定, 方法同 1.3.2。

1.5 统计学分析

采用 SPSS13 软件对实验中的数据进行统计分析。

2 结果

2.1 转染 Helal 细胞中干扰外源基因 mRNA 表达效果检测

2.1.1 半定量 RT-PCR 检测:Group I、Group II 的 IZP3 PCR 产物电泳带和 Control II 的相比明显减弱甚至达到看不到的程度; Group III 的 IZP3 PCR 产物电泳带和 Control II 的相比变化不明显; Control I 和 Control II 相比也无明显变化; 未转染任何质粒的 Control III 未见 IZP3 条带, 但各组均不影响 β -actin 的表达(图 2)。说明 siRNA 靶位点的选择对目的基因的干扰效果有一定的影响, siRNA 抑制基因表达有明显的位置效应, 共转染不同 siRNA 干扰质粒的 Helal 细胞外

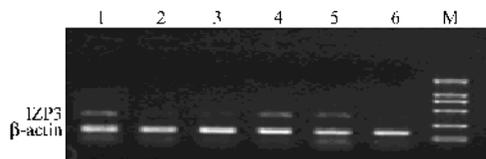


图 2 siRNA 干扰质粒和 pCDNA3-IZP3 共转染 Helal 细胞后 IZP3 表达的半定量 RT-PCR 检测

Fig. 2 Semi-quantitative RT-PCR for Helal cells co-transfected with RNAi vector and pCDNA3-IZP3

1: Control I; 2: Group I; 3: Group II; 4: Group III; 5: Control II; 6: Control III; M: DNA ladder

源目的基因 mRNA 表达量之间存在差异性。

2.1.2 Real-time PCR 检测 图 3 表明, Real-time PCR 结果是和图 2 的结果相对应的。由图 3 可以清楚地看出和 Control II 相比, Group I、Group II 的 Ct (Cycle threshold, Ct) 值明显高于 Control II 的 Ct 值 ($P < 0.05$), 说明这两组的起始模板拷贝数比对照组的要低, 而 Group III 的 Ct 值和 Control II 相比差别不是很明显 ($P > 0.05$), Control I 和 Control II 几乎没有差别 ($P > 0.05$)。作为内参的 β -actin 的 Ct 值在各组中几乎一致 ($P > 0.05$)。实验结果表明, Group I、Group II 对外源表达的 IZP3 mRNA 产生了明显的干扰效果, Group III 对 IZP3 mRNA 的干扰效果不是很明显。

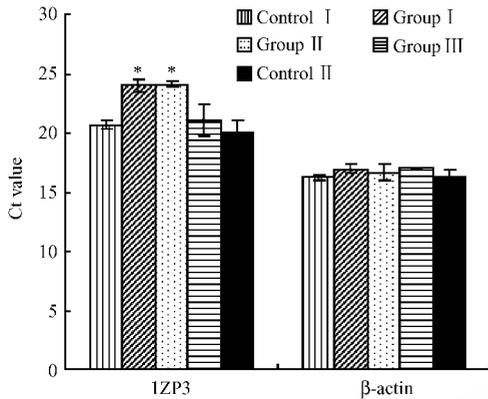


图 3 siRNA 干扰载体和 pCDNA3-IZP3 表达载体共转染 HeLa 细胞后 IZP3 和 β -actin mRNA 表达的 real-time PCR 结果

Fig.3 Real-time PCR results of the IZP3 and β -actin mRNA expressed in the HeLa cells after co-transfected by the siRNA interference vector and the pCDNA3-IZP3 expression vector

* Significantly different from Control II, $P < 0.05$.

2.2 siRNA 真核表达载体在小鼠肝脏中干扰外源基因表达效果检测

2.2.1 半定量 RT-PCR 检测 由图 4 可以看出, 共注射干扰质粒和表达质粒后, 各实验组和对照组 IZP3 mRNA 在小鼠肝脏中的表达和在 HeLa 细胞中的表达情况 (图 2) 一致。

2.2.2 Real-time PCR 检测 图 5 的结果和图 4 是相对应的, 而且其 PCR 扩增过程的动力学变化和图 3 相一致, 进一步说明了通过小鼠尾静脉大容量共注射干扰质粒和表达质粒的混合溶液来检测小鼠肝脏中外源目的基因的表达情况, 可以准确地筛选有效 siRNA 的靶序列。

3 讨论

RNAi 的作用提供了一种经济、快捷、高效的抑制特异基因表达的技术手段, 有助于研究该基因在

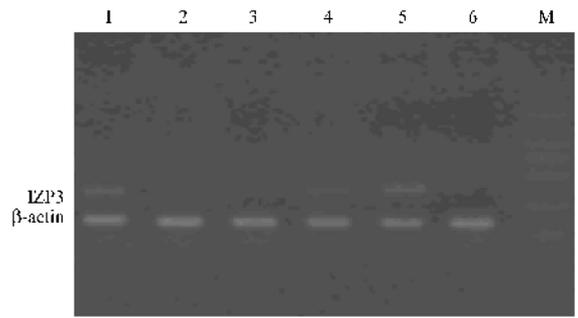


图 4 siRNA 干扰质粒和 pCDNA3-IZP3 共注射小鼠尾静脉后 IZP3 表达的半定量 RT-PCR 检测

Fig.4 Semi-quantitative RT-PCR results of the IZP3 expressed in the mouse liver after co-injected the siRNA vector and the pCDNA3-IZP3

1: control group I; 2: experimental group I; 3: experimental group II; 4: experimental group III; 5: control group II; 6: control group III; M: marker DL 2000.

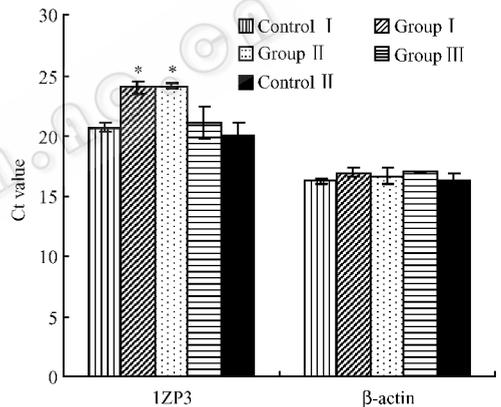


图 5 siRNA 干扰载体和 pCDNA3-IZP3 表达载体共注射小鼠尾静脉后 IZP3 和 β -actin mRNA 在肝脏中表达的 real-time PCR 结果

Fig.5 Real-time PCR results of the IZP3 and β -actin mRNA expressed in the mouse liver after co-injected the siRNA interference vector and the pCDNA3-IZP3 expression vector

* Significantly different from Control II, $P < 0.05$.

生物模型系统中的作用, 是研究基因功能的重要工具, 并且逐步成为病毒性、遗传性疾病以及肿瘤等基因治疗研究的一种手段。

随着研究的深入, 人们发现并不是所有针对靶基因 mRNA 序列随机设计的 siRNA 都能引起有效的基因沉默。早在 2002 年, Elbashire 及 Hoken 就分别提出过 siRNA 有效性高度依赖于靶点位置的观点^[6,7]。Song 等^[8]针对小鼠凋亡受体 Fas 基因设计了 6 条 siRNA, 其中只有 3 条有效。研究还发现, 即使 siRNA 的序列起始位置只错后 1 个或 2 个碱基, 其抑制效果也大大降低^[8,9]。Giladi 等^[10]的实验也

证实了这种观点。这些实验都表明,设计高效的 siRNA,选择基因 mRNA 作用位点至关重要。本研究设计的 3 条 siRNA 只有 2 条能有效抑制目的 mRNA 的表达,也证明了这一观点的正确性。

为了使外源基因在动物体内更有效地表达以便进行基因功能研究、基因治疗以及获得转基因产物,Liu 等^[5]发明了 HD 法使外源基因通过外力的作用通过小鼠尾静脉进入肝脏细胞,并在其中表达。该技术的机理是高压作用引起肝细胞膜穿孔,从而使质粒进入细胞内部并在肝脏细胞中高水平表达。研究证明,将小鼠体重 10% 的含外源基因重组质粒的生理盐水在 5 s 内通过尾静脉注入小鼠肝脏,在注入体内后 8h 左右将会获得最高水平的转基因表达,且不会影响小鼠的正常生理机能^[11]。金振晓等^[12]利用 HD 法使人甘露糖结合凝集素(mannose-binding lectin, MBL)在小鼠肝脏细胞内表达,证明了真核表达载体 pcDNA3-MBL 裸质粒 DNA 静脉注射可以在小鼠肝脏中大量表达人 MBL 并分泌入血。贺晨霞等^[13]也用该方法在小鼠肝内获得了高水平的人凝血因子 IV 蛋白的表达。应用该方法我们实验室也进行了一些其它的基因表达研究,均在肝脏内获得了有效地转基因表达(资料未发表)。Kobayashi 等^[14]应用该方法研究了 RNAi 载体在剂量和时间上对外源基因表达的抑制效果,证明了 siRNA 对目的基因表达的抑制作用具有剂量依赖性和时间依赖性,并证明当干扰质粒和表达质粒共注射小鼠时,这两种质粒会定位在同一细胞中。本研究参照前人工作的基础,比较了将构建的针对新疆草原兔尾鼠卵透明带(IZP3)的干扰载体和表达 IZP3 的表达载体共转染 HeLa 细胞 48 h 和尾静脉共注射小鼠 8 h 后 HeLa 细胞和肝脏中 IZP3 mRNA 的表达情况,两种实验方法获得了一致的结果,证明所设计的 3 个干扰靶位点有 2 个具有很强的干扰效果,能有效抑制 pCDNA3-IZP3 的表达。结果表明,将 siRNA 干扰载体和表达目的基因的载体用 HD 法共注射小鼠,检测小鼠肝脏中目的 mRNA 的表达情况,可以筛选 RNA 干扰的有效靶位点。本研究证明,在筛选 RNA 干扰的有效靶位点时可以利用小鼠作为实验材料,为准确、快速地筛选 RNA 干扰有效靶位点提供了一条新的思路。

与共转染体外培养细胞相比,HD 法不仅经济,而且省时、省力,整个实验过程仅需 2 d 时间,而用体外转染细胞的方法筛选,则最少需要 2 周的时间,

若发生诸如污染等的意外情况,则需要更长的时间。本研究每组采用 3 只小鼠,每组至少重复实验 3 次,都获得了一致的结果,说明实验具有可重复性。本研究结果为今后以载体为基础的体内 RNAi 的诱导研究策略提供了有用的信息。

REFERENCES (参考文献)

- [1] McCaffrey AP, Meuse L, Pham T *et al.* RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, **418**(6893): 38 - 39
- [2] Harborth J, Elbashir SM, Bechert K *et al.* Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, 2001, **114**: 4557 - 4565
- [3] Li T(李涛), Zhang FC(张富春). The homologous analysis of gene sequence for *Lagurus lagurus* zona pellucida glycoprotein. *Journal of Xinjiang University (Natural Science Edition)* (新疆大学学报(自然科学版)), 2003, **20**(3): 269 - 271
- [4] Zeng ZK(曾志锋), Li YQ(李月琴), Tang DS(唐冬生) *et al.* Inhibition of HCMV UL49 gene expression by vector based RNAi. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2005, **25**(1): 39 - 43
- [5] Liu F, Song YK, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 1999, **6**: 1258 - 1266
- [6] Elbashir SM, Harborth J, Weber K *et al.* Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 2002, **26**: 199 - 213
- [7] Hohen T, Amarzguioui M, Wiiger MT *et al.* Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**: 1757 - 1766
- [8] Song E, Lee SK, Wang J *et al.* RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine*, 2003, **9**: 347 - 351
- [9] Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K *et al.* Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**: 691 - 699
- [10] Giladi H, Ketzinel-Cilad M, Rivkin L *et al.* Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Molecular Therapy*, 2003, **8**: 769 - 776
- [11] Zhang G, Gao X, Song YK *et al.* Hydroperation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Therapy*, 2004, **11**: 675 - 682
- [12] Jin ZX(金振晓), Liu WY(刘维永), Hu J(胡军) *et al.* Expression of human mannose-binding lectin in mice liver. *Chinese Journal of Immunology* (中国免疫学杂志), 2002, **18**: 828 - 831
- [13] He CX(贺晨霞), Wu WJ(吴文君), Ding YF(丁友法) *et al.* High expression of human FIX(hFIX) in mice liver directed by hydrodynamics-based transfection method. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 2003, **48**(5): 447 - 451
- [14] Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A *et al.* Vector-based *in vivo* RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *JPET*, 2004, **308**: 688 - 693