

读者来信

shRNA 慢病毒质粒的构建技巧*

秦俊文^{1,2**} 谢琪璇^{1,2**} 蔡冬青² 秋山泰身³ 井上纯一郎³

(1 暨南大学生殖免疫研究所 广州 510632 2 暨南大学再生医学教育部重点实验室 再生医学香港中文大学

暨南大学联合实验室 科技部及广东省科技厅国际科技合作基地 广州 510632)

(3 东京大学医科学研究所分子发癌分野 东京 108-8639)

携带 shRNA 慢病毒质粒的慢病毒宿主范围广,能感染分裂期与非分裂期细胞,转染效率高,shRNA 在宿主细胞中能高效、长期稳定地表达,因此 shRNA 慢病毒载体正被越来越广泛地应用于 RNAi 研究和疾病治疗中。然而,shRNA 慢病毒质粒设计的合理性直接影响 RNAi 的效果。构建 shRNA 慢病毒质粒时综合利用多种设计和构建技巧,包括合理选择与靶基因同源的特异性核苷酸序列并作适当改变,以及选择合适的 loop 核苷酸序列等都将大大提高 shRNA 抑制靶基因表达的效果。这些方法对 shRNA 的设计和 shRNA 慢病毒质粒的构建具有重要的参考和指导意义。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是利用序列特异性的、与靶基因同源的双链 RNA (double-strand RNA, dsRNA) 对靶基因转录后的 mRNA 的分解,从而抑制靶基因表达的一种转录后基因沉默现象^[1]。RNAi 现象最初是由 Fire 等^[2] 研究线虫时发现的;此后, RNAi 的研究取得了突飞猛进的发展。由于 RNAi 抑制靶基因表达具有特异性强、快速、高效等优点,现已被广泛应用于基因功能分析、细胞内信号转导通路研究,以及抗肿瘤、抗病毒和基因治疗中^[3-7]。最初的 RNAi 实验采用体外合成小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 的方法,但存在费用昂贵、转移到细胞内的 siRNA 半衰期短、其本身不能持久性表达、对靶基因表达的抑制作用短暂等缺点,从而使其应用受到较大的限制。而将小发卡状 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 载体导入细胞后,能在细胞内稳定地转录生成 shRNA,并进一步加工生成靶基因特异性 siRNA,因此可以发挥长期抑制靶基因表达的作用。

普通的 shRNA 非病毒性载体虽可转染到周期性分裂期细胞中,但几乎无法将其转染到非分裂期细胞、原代细胞、未分化细胞以及人和动物个体中去。而利用病毒包括腺病毒 (adenovirus)、逆转录病毒 (retrovirus) 和慢病毒 (lentivirus) 等来转染 shRNA 病毒性载体,因其转染效率高、操作简便以及 shRNA 在宿主细胞中能高效、稳定地表达等优势已被广泛用于 RNAi 的研究和治疗中。特别是携带 shRNA 载体的慢病毒,有着广泛的宿主范围,能感染分裂期与非分裂期细胞^[6],并能将外源基因有效地整合到宿主染色体上,从而达到持久性表达 shRNA 的目的;而且产生的 shRNA 靶向性好,可有效抑制靶基因表达。此外,产生的慢病毒可进一步浓缩,从而大大提高其转染效率^[8]。与腺病毒和逆转录病毒相比,慢病毒本身对宿主几乎不产生免疫原性,因而具有更高的安全性^[9]。基于上述特点,表达 shRNA 的慢病毒载体除可广泛应用于周期性和非周期^[10] 性细胞、干细胞等的基因功能研究外,也为原代细胞乃至动物个体基因功能的研究提供了可能性,同时也使人和动物的基因沉默治疗成为可能^[11-14]。然而,现阶段大多数 shRNA 慢病毒质粒产生的 shRNA,其抑制靶基因表达的效果并不尽如人意。究其原因,多与 shRNA 慢病毒质粒的设计和构建缺陷有关。

shRNA 慢病毒质粒由慢病毒载体、U6 或 H1RNA 启动子、与靶基因同源的特异性核苷酸序列正义链和反义链、

收稿日期:2010-11-01 修回日期:2011-01-08

* 广东省自然科学基金(9451063201002016)、暨南大学引进人才科研启动基金(51209004)、中央高校基本科研业务费专项资金(21610406)资助项目

** 通讯作者,电子信箱:tjunwen@jnu.edu.cn,txqx@jnu.edu.cn

loop 序列、RNA 聚合酶 III 终止子构成(图 1)。通过 RNA 聚合酶 III 依赖的启动子 U6 或 H1 的作用,转录生成 shRNA,其在细胞内进一步加工生成靶基因特异性 siRNA。

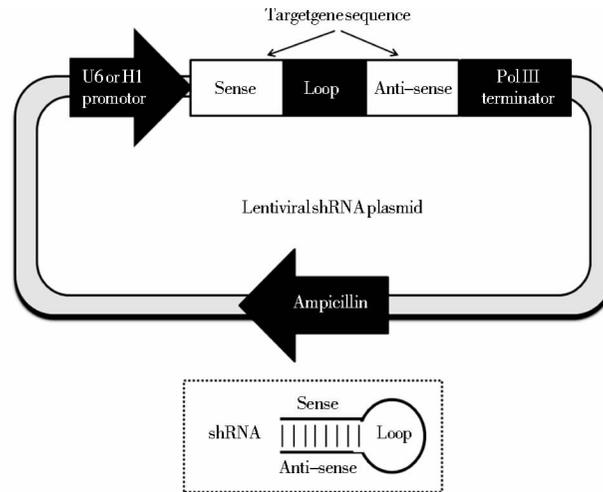


图 1 shRNA 慢病毒质粒的构件和 shRNA 示意图

Fig. 1 The map of lentiviral shRNA plasmid and shRNA

shRNA 慢病毒质粒产生 shRNA 阻断靶基因表达的作用与其最优化构建是密不可分的。在构建 shRNA 慢病毒质粒的过程中,与靶基因同源的特异性核苷酸序列的选择以及必要的碱基序列的改变、loop 序列的选择、shRNA 慢病毒质粒高级结构的形成等因素都直接影响 shRNA 的表达及其抑制靶基因表达的效果。

鉴于此,首先对 shRNA 质粒构建中产生 shRNA 的与靶基因同源的特异性核苷酸序列的选择,可以利用 Ambion、Invitrogen 等公司提供的软件进行筛选,也可以根据需要自行设计,同时应遵循以下原则:(1)选取的核苷酸序列必须是靶基因的特异性核苷酸序列;(2)选取的靶基因序列长度一般为 19~29nt,最常用的是 21~23nt;(3)选取的靶基因特异序列最好位于起始密码子之后的 50~100nt 或终止密码子之前的 50~100nt;(4)选取的核苷酸序列中 GC 的含量为 40%~50%;(5)选取的核苷酸序列中应避免连续三个及以上的 G、C、A 或 T 出现;(6)选取的核苷酸序列不应形成自身的 loop 构造,也不应与 loop 的部分核苷酸序列形成新的 loop 构造。也就是说,整个 shRNA 必须是只有一个特定且唯一的 loop 构造;(7)选取的核苷酸序列应以一个 G 碱基开始(U6 启动子)或以一个 A 碱基开始(U6 或者 H1 启动子),如果没有,应在选取的核苷酸序列的 5' 端添加一个 G 或 A;(8)选取的核苷酸序列在设计构成 shRNA 时,其正义链的 3' 端必须是 A 或 T,如果不是,应将其变成 T,其反义链相应的碱基也作相应改变。例如,GTG TAA ACT GTG CTG TGT CCG,我们应将最后一个碱基 G 变成 T,从而使其正义链变为 GTG TAA ACT GTG CTG TGT CCT,反义链就相应地变为 AGG ACA CAG CAC AGT TTA CAC;(9)选取的核苷酸序列在设计构成 shRNA 时,从其正义链(不是反义链)中随机选出三个碱基,变成其他碱基,以减少其解离难度,更好地发挥其抑制靶基因表达的效果。通常是将 C 变成 T,A 变成 G。例如,原序列为 GTG TAA ACT GTG CTG TGT CCA,我们可将其中的第 6(A)、13(C)、19(C)个碱基分别变成 G、T、T,从而使其正义链变成 GTG TAG ACT GTG TTG TGT TCA,而其反义链仍为 TGG ACA CAG CAC AGT TTA CAC。

其次,对 shRNA 质粒构建中 loop 核苷酸序列的选择,loop 的核苷酸序列为 4~11nt,通常 7~9nt 是合适的;loop 核苷酸序列可以选用已经报道的序列如 GCAAGAG、GAAGCTG 等,也可以自己设计,一般来说,其开始的碱基序列不应为 T;此外,核苷酸序列不应形成自身的 loop 构造。

再次,在合成 shRNA 慢病毒质粒时,由于目前常用的慢病毒载体的尺寸都比较大(10kbp 以上),直接将 shRNA 克隆入慢病毒载体比较困难。采用二步法,即首先将 shRNA 克隆到 PENTRTM/U6(可从 Invitrogen 等公司购入)等入门表达载体中,然后通过重组方法将 PENTRTM/U6 入门表达载体中的 shRNA 克隆到慢病毒载体(如 CS-Rfa-EG,日本理化学研究所;也可选用 Invitrogen 公司及其他公司的专用慢病毒载体)中的方法不失为一种切实可行的方

法。而且,利用 PENTRTM/U6 等入门表达载体,还可任意将其中的 shRNA 克隆到目的载体如腺病毒、逆转录病毒及其他的载体中去。笔者采用二步法合成 shRNA 慢病毒质粒。首先设计、合成能产生 shRNA 的双链 DNA 核苷酸,并将其克隆到 PENTRTM/U6 (Invitrogen 公司)入门表达载体中,通过基因测序,鉴定核苷酸序列的正确性,获得 PENTRTM/U6-shRNA 质粒。将此质粒导入表达该靶基因的细胞株中,检测 shRNA 抑制靶基因表达的效果。然后通过 LR 克隆酶(Invitrogen 公司,操作方法详见 Gateway[®] LR Clonase[®] II enzyme mix 使用说明书)的作用,将 PENTRTM/U6-shRNA 质粒中的 shRNA 克隆到慢病毒载体 CS-RfA-EG 中,限制酶酶切反应鉴定克隆的正确性,获得 shRNA 慢病毒质粒(LV-shRNA,图 2)。

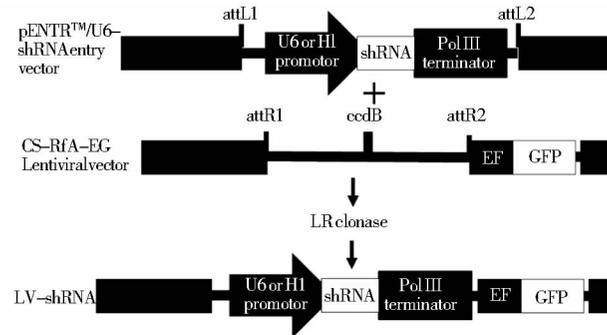


图 2 通过 LR 克隆酶的作用,将 PENTRTM/U6-shRNA 入门表达质粒中的 shRNA 重组到慢病毒载体 CS-RfA-EG 中

Fig.2 Based on the Gateway Technology, the gene targeting sequence can be easily moved from the entry clone (PENTRTM/U6-shRNA) to the lentiviral vector (CS-RfA-EG)

最后,将 shRNA 慢病毒质粒(如 LV-shRNA)及制备病毒的包装质粒[如 pCMV-VSV-G-RSV-Rev 和 pCAG-HIVgp(日本理化学研究所)]导入到 293T 细胞中,制备表达携带 shRNA 慢病毒质粒的慢病毒液。这些慢病毒液即可直接用于感染周期性分裂期细胞。例如,用于感染原代细胞及未分化细胞时,需先进行浓缩。笔者综合采用上述设计和构建要求,针对几个靶基因构建了 shRNA 慢病毒质粒,其产生的 shRNA 对抑制各自靶基因的表达均有满意的效果(尚未发表的结果)。

随着人类基因组计划的完成,对基因的研究进入了后基因组时代,即功能基因组时代。RNAi 技术为基因未知功能的研究提供了强有力的工具。不仅如此,RNAi 技术也正被越来越广泛地用于基因治疗中。与化学合成的 siRNA 相比,应用 shRNA 表达载体更方便、更低廉,产生的 shRNA 抑制靶基因表达的作用更持久,因而其使用也更广泛。特别是利用慢病毒转染 shRNA 慢病毒载体具有更多的优势(见前述);此外,慢病毒液具有高度稳定性,在 -70℃ 下可长期保存,至少保存 6 个月的慢病毒液其感染效率没有明显的改变。目前,shRNA 慢病毒载体已被用于周期性和非周期性细胞、原代细胞、干细胞等的基因功能研究以及人和动物的基因沉默治疗等^[12-15],显示出广阔的应用前景。相信随着研究的不断深入,特别是伴随着 shRNA 表达载体构建的最优化,载体导入技术、目的基因表达效率的提高及调控等的研究进展,shRNA 表达载体的实用性必将越来越高。

参考文献

- [1] Hannon G J. RNA interference. Nature, 2002, 418: 244-251.
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [3] Svoboda P. Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells. Curr Opin Mol Ther, 2007, 9: 248-257.
- [4] Subramanya S, Kim S S, Manjunath N, et al. RNA interference-based therapeutics for human immunodeficiency virus HIV-1 treatment: synthetic siRNA or vector-based shRNA? Expert Opin Biol Ther, 2010, 10: 201-213.
- [5] Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M. Strategies for *in vivo* delivery of siRNAs: recent progress. BioDrugs, 2010, 24: 195-205.
- [6] Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science, 1996,

- 272; 263-267.
- [7] Segura M M, Garnier A, Durocher Y, et al. New protocol for lentiviral vector mass production. *Methods Mol Biol*,2010,614: 39-52.
- [8] Segura M M, Garnier A, Durocher Y, et al. New protocol for lentiviral vector mass production. *Methods Mol Biol*,2010,614: 39-52.
- [9] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*,2003,33: 401-406.
- [10] Cockrell A S, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol*,2007,36: 184-204.
- [11] Singer O, Verma I M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr Gene Ther*,2008,8: 483-488.
- [12] Schaniel C, Lee D F, Lemischka I R. Exploration of self-renewal and pluripotency in ES cells using RNAi. *Methods Enzymol*,2010,477: 351-365.
- [13] Wu Z Z, Chao C C. Knockdown of NAPA using short-hairpin RNA sensitizes cancer cells to cisplatin: implications to overcome chemoresistance. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80: 827-837.
- [14] Shimizu S, Hong P, Arumugam B, et al. A highly efficient short hairpin RNA potently down-regulates CCR5 expression in systemic lymphoid organs in the hu-BLT mouse model. *Blood*, 2010, 115: 1534-1544.

科学出版社新书

蛋白质工程实验指南 John M. Walker 主编 苏晓东 等译

现代蛋白质工程是将分子生物学、蛋白质结构与功能分析、理论计算,以及生物化学有机结合的学科,其目标是快速及高效率地发展和改进实用的或有价值的蛋白质。本书分为两个部分,第一部分主要介绍了蛋白质理性设计的策略,包括理论计算方法,利用一些很有说服力的例证说明所设计蛋白质的全新特性,阐述了如何设计具有目标特性的蛋白质,并选择了很多如蛋白质-蛋白质相互作用、DNA 结合、抗体模拟,以及酶活性设计等具体实例;第二部分蛋白质的定向进化技术主要介绍了包括进化库设计的一般方法、进化库质量的统计评估、核酸混编的新方法,以及不同的选择筛选策略等。同时也给出了不同特性体外定向进化的一些实例,如蛋白质折叠类型、折叠热稳定性以及酶活性等。

中国至 2050 年农业科技发展路线图(英文版) 中国科学院农业领域战略研究组 主编 赵其国 译

本书明确了至 2050 年全球和我国农业发展面临的挑战与机遇,预测我国未来对农业科技的重大需求,提出至 2050 年我国农业科技领域发展战略目标、分阶段目标,提出各阶段农业科技发展的主要方向及可突破的重大科学技术问题,形成未来农业科技发展的总体路线图,并提出为实现以上目标所需要的体制、资源、人才等方面的政策建议。

更多信息请登录网站: www.lifescience.com.cn