

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01491

## 重组质粒 pSUPER-HBs RNAi 的构建及筛选

罗祥基,程庆保,徐峰\*,谭蔚锋,姜小清,张柏和,王红阳,吴孟超  
第二军医大学东方肝胆外科医院胆道一科,上海 200438

**[摘要]** **目的:**利用 pSUPER-RNAi 载体系统进行 HBs RNAi 序列的初步筛选和干扰效果鉴定。**方法:**设计并合成针对 HBs 基因区的 3 条 siRNA (HBs-siRNA1、HBs-siRNA2、HBs-siRNA3), 构建 3 种重组载体 pSUPER-HBs-siRNA, 与 HBV 质粒同时瞬转入胚肾 293T 细胞, 72 h 后观察转染效果, 实时定量 PCR 和 ELISA 法鉴定 3 种干扰序列对 HBs 的干扰效果, 筛选最佳干扰序列。**结果:**成功构建 3 种干扰质粒 pSUPER-HBs-siRNA, 能高效转染人胚肾上皮细胞 293T, 转染效率在 70% 以上; 实时定量 PCR 和 ELISA 法结果均显示 HBs-siRNA2 可有效抑制 HBs 的表达, 抵制率可达 80%, 而 HBs-siRNA1、HBs-siRNA3 干扰效果不显著, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论:**成功构建 3 种干扰质粒 pSUPER-HBs-siRNA, 筛选出其中能有效抑制 HBs 基因表达的 pSUPER-HBs-siRNA2 序列, 为后续研究奠定了基础。

**[关键词]** pSUPER 载体; HBs 基因; 小 RNA 干扰; 筛选

**[中图分类号]** R 373.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1491-04

### Construction and screening of pSUPER-HBs-siRNA efficiently targeting HBs gene

LUO Xiang-ji, CHENG Qing-bao, XU Feng\*, TAN Wei-feng, JIANG Xiao-qing, ZHANG Bai-he, WANG Hong-yang, WU Meng-chao

Department of Biliary Surgery, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To develop a system to screen for the effective siRNA sequence targeting HBs gene and to identify the interference efficiency. **Methods:** Three HBs-targeting siRNA segments (HBs-siRNA1, HBs-siRNA2, and HBs-siRNA3) were designed, synthesized and cloned into pSUPER vector to construct three recombinant plasmids pSUPER-HBs-siRNA, which were then transfected into human embryonic kidney 293T cells together with HBV plasmid. The transfection efficiency was observed 72 h later, the interference efficacies of the 3 segments were identified by real-time PCR and ELISA analysis, and the best one was identified. **Results:** Three recombinant plasmids of pSUPER-HBs-siRNA were constructed successfully and effectively transfected into 293T cells to induce RNAi, with a transfection rate higher than 70%. The results of real-time PCR and ELISA analysis showed that HBs-siRNA2 silenced the HBs gene expression by more than 80%. Compared with HBs-siRNA2, HBs-siRNA1 and HBs-siRNA3 did not demonstrate obvious interfering effect ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** We have successfully constructed 3 siRNA sequences targeting HBs, and pSUPER-HBs-siRNA2 can effectively silence HBs genes, which paves a way for future study.

**[KEY WORDS]** pSUPER vector; HBs gene; small interfering RNA; screening

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1491-1494]

近年来随着双链 RNA 合成技术和载体技术的不断进步, RNAi 技术在多个领域内被广泛应用, 包括功能基因组学、遗传学、干细胞生物学及信号转导规律等方面。不少研究<sup>[1-5]</sup>将其应用于抗 HBV 治疗, 取得了一定的效果, 这对于乙型肝炎和肝细胞癌的诊治, 具有诱人的应用前景。采用化学合成或者质粒载体编码小发夹 RNA (shRNA) 的方法将针对

S 基因的 siRNA 导入细胞内, 可以抑制 HBV 的复制。此外, 通过 pre-miRNAs 结构也可以携带 siRNA 进入细胞内发挥 RNAi 作用, 且更符合体内的生理情况, 但目前缺乏可利用的 miRNA 骨架携带 siRNA 抑制 HBs 蛋白, 尤其是由 pol II 类启动子启动的 RNAi 技术<sup>[6-7]</sup>。为此, 本研究设计并合成了针对 HBs 基因区的 3 条 siRNA, 利用 pSUPER 载体

**[收稿日期]** 2008-07-05 **[接受日期]** 2008-09-20

**[基金项目]** 上海市科委重点基金 (54119519). Supported by Fund for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (54119519).

**[作者简介]** 罗祥基, 副教授、副主任医师. E-mail: xjluo2002@126.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070773, E-mail: victorf2255@hotmail.com

携带 siRNA, 与 HBV 质粒共转染人胚肾 293T 细胞, 实时定量 PCR 和 ELISA 法鉴定 3 条干扰序列的干扰效果, 筛选出能有效抑制 HBs 基因表达的 siRNA 序列, 为后续研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 pSUPER 载体为中国科学院上海生命科学院细胞与生物化学研究所惠赠, Midi 质粒纯化试剂盒购自 Qiagen 公司, TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司, HBsAg ELISA 检测试剂盒由上海吉凯生物公司提供, 脂质体转染试剂 Lipofectamine Reagent 为 Life Technologies 公司产品, Jet PEI 转染试剂购自 Polyplus 公司, G418 购自 Invitrogen 公司。Western 印迹半干式电转移仪为 Bio-Rad 公司产品; PCR 仪为 Fprogo2D 型 (Techne, Cambridge, England); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, iCycle iQ)。

1.2 3 种 pSUPER-HBs-siRNA 质粒的构建 HBs 基因区内根据干扰序列的设计原则, 选择 3 段靶序列, 化学合成 DNA 模板。人工合成针对 HBV (GenBank U95551 株) 基因组中, 所在 HBs 序列 460~478、636~654 和 2 935~2 953 碱基处的 19 bp 反向互补序列, 5' 端加入 *Bgl*II 粘性末端, 3' 端加入 *Hind*III 粘性末端。引物设计: (1) HBs-siRNA1 序列 (636~654 bp): 正义 5'-AGC TTT TCC AAA AAA TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCT CTT GAA GGC CCA CTC CCA TAG GAA TGG G-3', 反义 5'-GAT CCC CAT TCC TAT GGG AGT GGG CCT TCA AGA GAG GCC CAC TCC CAT AGG AAT TTT TTG GAA A-3'; (2) HBs-siRNA2 序列 (460~478 bp): 正义 5'-AGC TTT TCC AAA AAG GTA TGT TGC CCG TTT GTC TCT CTT GAA GAC AAA CGG GCA ACA TAC CGG G-3', 反义 5'-GAT CCC CGG TAT GTT GCC CGT TTG TCT TCA AGA GAG ACA AAC GGG CAA CAT ACC TTT TTG GAA A-3'; (3) HBs-siRNA3 序列 (2 935~2 953 bp): 正义 5'-AGC TTT TCC AAA AAA TCC AGA TTG GGA CTT CAA TCT CTT GAA TTG AAG TCC CAA TCT GGA GGG-3', 反义 5'-GAT CCC CAT CCA GAT TGG GAC TTC AAT TCA AGA GAT TGA AGT CCC AAT CTG GAT TTT TTG GAA A-3'。以上引物均由上海生工生物技术服务公司合成。合成后上下游寡核苷酸链在 100 mmol/L NaCl 溶液中, 于沸水浴中 5 min 后自然冷却, 即得到双链的带有 *Bgl*II 和 *Hind*III 粘性末端的 RNAi oligo DNA 片段;

pSUPER-Vector 质粒用 *Bam*HI + *Hind*III 酶切回收 4 700 bp 片段; 而后连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态菌, 卡那霉素筛选阳性克隆, RNAi oligo DNA 片段是否接入用测序鉴定。

1.3 脂质体转染 293T 细胞 转染前 24 h, 293T 铺 6 孔板, 使之在转染时达到 60% 的汇合度。每孔转染情况: 在 Eppendorf 管中用 100  $\mu$ l DMEM (无血清) 稀释 HBV 质粒 (1.0  $\mu$ g), pSUPER-HBs-siRNA 质粒 (0.5  $\mu$ g), 然后加入 6  $\mu$ l Plus<sup>TM</sup> Reagent, 室温孵育 15 min; 同时, 在另一个 Eppendorf 管中用 100  $\mu$ l DMEM (无血清) 稀释 4  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent。把 2 个 Eppendorf 管中的内容物混匀, 室温孵育 15 min, 随后补足 DMEM 至 1 ml 的转染体积并混匀。吸去培养皿原培养基, 加入 DNA-Plus<sup>TM</sup>-Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent 混合物, 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub>, 孵育 3 h。补 DMEM (含血清) 至正常培养体积, 继续在 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。48 h 后收集细胞上清液和 RNA, 进行后续 ELISA 和 RT-PCR 检测。

1.4 ELISA 检测 每孔加入待测标本 50  $\mu$ l, 设阴、阳性对照各 2 孔, 每孔加入阴性对照 (或阳性对照) 各 1 滴, 并设空白对照 1 孔。每孔加入酶复合物 1 滴 (空白对照孔除外), 充分混匀, 封板, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。手工洗板, 弃去孔内液体, 洗涤液注满各孔, 静置 5 s, 甩干, 重复 5 次后拍干。每孔加显色剂 A 液、B 液各 1 滴, 充分混匀, 封板, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。每孔加入终止液 1 滴, 混匀。用酶标仪读数, 取波长 450 nm, 参考波长 630 nm, 先用空白孔校零, 然后读取各孔光密度 (D) 值。

1.5 实时定量 RT-PCR 检测 首先抽提细胞 RNA, RT 合成 cDNA 第一链。PCR 体系 (50  $\mu$ l): RT 产物 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$  Reaction Buffer 5  $\mu$ l, dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu$ l, P1 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, P2 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, SYBR Green 1  $\mu$ l, Taq polymerase 0.5  $\mu$ l, MilliQ water 40  $\mu$ l。Real-Time PCR 参数: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s 35 循环, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

1.6 统计学处理 采用 SAS 8.2 软件, 利用 *t* 检验进行组间比较,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 3 种 pSUPER-HBs-siRNA 质粒的构建及转染结果 成功构建 3 种 pSUPER-HBs-siRNA 质粒, 3 段序列 (460~478, 636~654, 2 935~2 953) 经 Blast 搜索对比, 未发现有其他基因序列与之同源; 三者脂

质体转染效率均在 70% 以上(图 1)。

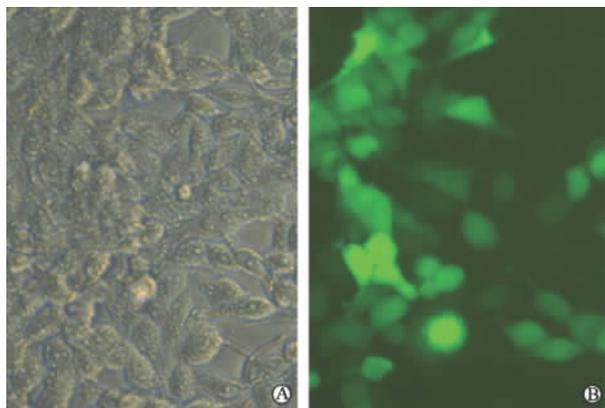


图 1 重组质粒共转染后 293T 细胞

Fig 1 Cotransfection efficiency of pSUPER-siRNA and pcDNA 3.1-HBV 3.6 vector into 293T cells

A: Mock control; B: Cotransfection group with pSUPER-siRNA and pcDNA 3.1-HBV 3.6 vector. Original magnification:  $\times 200$

2.2 ELISA 及实时定量 RT-PCR 检测结果 转染 72 h 后采用 ELISA 及实时定量 PCR 鉴定干扰序列 RNAi 效果。ELISA 结果显示(图 2A), HBs-siRNA2 有抑制 HBs 蛋白表达的作用, 抑制效率可达 80%, 而 HBs-siRNA1、3 干扰效果不显著, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。Real-time PCR 检测结果表明, HBs-siRNA2 干扰作用达到 80%, 而 HBs-siRNA1、3 没有显著抑制作用(图 2B), 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

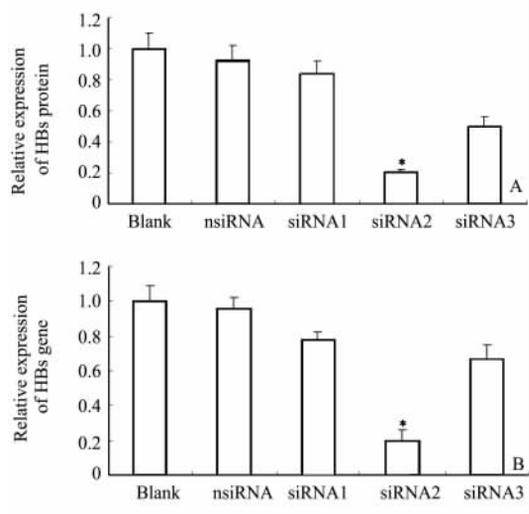


图 2 pSUPER-HBs-siRNA 质粒转染后 ELISA(A)和实时定量 PCR(B)检测结果

Fig 2 Results of ELISA (A) and real-time PCR (B) after cotransfection with pSUPER-HBs-siRNAs and pcDNA 3.1-HBV 3.6 vector

\*  $P < 0.05$  vs blank group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

目前较为常用的 siRNA 制备技术包括体外制备和体内表达两种。体外制备的 siRNA 需要专门的 RNA 转染试剂将 siRNA 转到细胞内; 而采用 siRNA 质粒表达载体和 PCR 制备的 siRNA 表达框架体系则是由转染到细胞中的 DNA 模板在体内转录出 siRNA。后者的优点在于不需要直接操作 RNA<sup>[8-10]</sup>。本研究通过基于 miRNA 骨架, 由 CMV 启动子启动 RNAi 载体表达被证实为有效的 HBs RNAi 干扰序列, 所以通过该靶点可以降解 HBV 除了 HBx 之外的所有 3 个开放阅读框的 mRNA, 为下一步抑制 HBV 复制以及 HCC 相关肿瘤信号转导通路的研究奠定了基础。

使用合成的 siRNA 瞬时转染与使用质粒载体表达体系产生 RNAi 有各自的优缺点。使用合成 siRNA 是即时性, 转染后马上启动沉默过程, 而质粒载体需要体内转录, 甚至 Dicer 的加工过程, 因而需要经过一段时间方可见到沉默效应<sup>[9-10]</sup>。质粒载体非常容易被扩增, 不像 siRNA 合成那样费时费力。质粒载体更大的好处在于其产生的沉默效应持久, 这种载体系统可以应用于具有较长半衰期蛋白的基因降解, 同时可用于制备持续表达 shRNA 的稳定细胞系, 使得具有稳定基因沉默效应转基因动物的制备成为可能<sup>[11-12]</sup>。

本研究所包装的慢病毒是基于 miRNA 发挥作用的, 相对于化学合成 siRNA 以及质粒转染 shRNA, 通过 pre-miRNAs 结构携带 miRNA 进入细胞内发挥 RNAi 作用, 更符合体内的生理情况, 具有明显优势, 抑制效果也更加明显。本研究成功构建了基于 miRNA 的慢病毒 RNAi 载体, 由 CMV 启动子启动, 筛选出较有效的 HBs 沉默 RNAi 片段, 为下一步针对 HBs 和 HCC 的研究奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] Morrissey D V, Blanchard K, Shaw L, Jensen K, Lockridge J A, Dickinson B, et al. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication[J]. Hepatology, 2005, 41: 1349-1356.
- [2] Morrissey D V, Lockridge J A, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, et al. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23: 1002-1007.
- [3] Chan D W, Ng I O. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells [J]. J Pathol, 2006, 208: 372-380.
- [4] Carmona S, Ely A, Crowther C, Moolla N, Salazar F H, Marion

P L, et al. Effective inhibition of HBV replication *in vivo* by anti-HBx short hairpin RNAs[J]. Mol Ther, 2006, 13: 411-421.

[5] Wu H L, Huang L R, Huang C C, Lai H L, Liu C J, Huang Y T, et al. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant[J]. Gastroenterology, 2005, 128: 708-716.

[6] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120: 15-20.

[7] Dykxhoorn D M, Novina C D, Sharp P A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4: 457-467.

[8] Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5: 355-365.

[9] Pushparaj P N, Aarathi J J, Manikandan J, Kumar S D. siRNA, miRNA, and shRNA: *in vivo* applications[J]. J Dent Res, 2008, 87: 992-1003.

[10] Zhao H, Ardel T, Ardel W, Shogen K, Darzynkiewicz Z. The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA)[J]. Cell Cycle, 2008, 7: 3258-3261.

[11] Grimm D, Streetz K L, Jopling C L, Storm T A, Pandey K, Davis C R, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways [J]. Nature, 2006, 441: 537-541.

[12] Stegmeier F, Hu G, Rickles R J, Hannon G J, Elledge S J. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 13212-13217.

[本文编辑] 贾泽军

• 读者 作者 编者 •

### 中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(九)

汉语拼音名	中文名	拉丁名	英文名
Guanghuoxiang	广藿香	<i>Herba Pogostemonis</i>	Cablin Potchouli Herb
Guangjinqiancao	广金钱草	<i>Herba Desmodii Styracifolii</i>	Snowbell-leaf Tickclover Herb
Guangzao	广枣	<i>Fructus Choerospondiatis</i>	Axillary Choerospondias Fruit
Guanmutong	关木通	<i>Caulis Aristolochiae Manshuriensis</i>	Manshurian Dutchmanspipe Stem
Guanyejinsitao	贯叶金丝桃	<i>Herba Hyperici Perforati</i>	Common St. John'swort Herb
Guanzhong	贯众	<i>Rhizoma Cyrtomii</i>	Cyrtomium Rhizome
Guazhijin	瓜子金	<i>Herba Polygalae Japonicae</i>	Japanese Milkwort Herb
Guihua	桂花	<i>Flos Osmanthi Fragrantis</i>	Sweet Osmanthus Flower
Guijia	龟甲	<i>Carapax et Plastrum Testudinis</i>	Tortoise Shell
Guijianyu	鬼箭羽	<i>Ramulus Euonymi</i>	Winged Euonymus Twig
Guizhencao	鬼针草	<i>Herba Bidentis Bipinnatae / Herba Bidentis Pilosae</i>	Spanishneedles Herb /Railway Beggarticks Herb
Guizhi	桂枝	<i>Ramulus Cinnamomi</i>	Cassia Twig
Gujingcao	谷精草	<i>Flos Eriocauli</i>	Buerger Pipewort Flower
Gukeye	古柯叶	<i>Folium Cocoe</i>	Coca Leaf
Guojianglong	过江龙	<i>Caulis Entadae</i>	Entadae Stem
Guotanlong	过坛龙	<i>Herba Adianti Flabellulati</i>	Flabellate Maiden-hair Herb
Gushanlong	古山龙	<i>Caulis Arcangelisiae</i>	Mountain Dragon
Gusuobu	骨碎补	<i>Rhizoma Drynariae</i>	Fortune's Drynaria Rhizome
Guya	谷芽	<i>Fructus Oryzae Germinatus</i>	Rice-grain Sprout
Haifengteng	海风藤	<i>Caulis Piperis Kadsurae</i>	Kadsura Pepper Stem
Haijinsha	海金沙	<i>Spora Lygodii</i>	Japanese Climbing Fern Spore
Hailong	海龙	<i>Syngnathus</i>	Pipe fish
Haima	海马	<i>Hippocampus</i>	Sea Horse
Haipiaoxiao	海螵蛸	<i>Os Sepiae</i>	Cuttlebone
Haiyu	海芋	<i>Rhizoma Alocasiae Macrorrhizae</i>	Common Alocasia Rhizome
Haizao	海藻	<i>Sargassum</i>	Seaweed
Hamayou	蛤蟆油	<i>Oviductus Ranae</i>	Forest Frog's Oviduct
Huajuhong	化橘红	<i>Exocarpium Citri Grandis</i>	Pummelo Peel
Huangbai	黄柏	<i>Cortex Phellodendri</i>	Amur Corktree Bark
Huanghuajiazhutao	黄花夹竹桃	<i>Semen Thevetiae</i>	Luckynut Thevetia Seed
Huanghuamian	黄花棉	<i>Herba Malvastris Coromandeliani</i>	Coromandel Coast Falsemallow Herb
Huanghuamu	黄花母	<i>Herba Sidae Rhombifoliae</i>	Broomjutre Sida Herb
Huangjing	黄精	<i>Rhizoma Polygonati</i>	Manyflower Solomonseal Rhizome / Siberian Solomonseal Rhizome / King Solomonseal Rhizome
Huangjingye	黄荆叶	<i>Folium Viticis Negundo</i>	Negundo Chastetree Leaf