

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00857

特异性 siRNA 抑制 *hTERT* 基因表达的位置及时间效应

曾永秋, 税青林, 赵矫, 张志宏, 余红, 赵小平

四川省泸州医学院医学生物学与遗传学教研室, 泸州 646000

摘要: 为了探讨不同位点 siRNA 在不同时间点对人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞中 *hTERT* mRNA 表达的抑制作用, 设计并化学合成 4 对针对人端粒酶逆转录酶(*hTERT*)基因的特异性 siRNA。以脂质体法转染入 MCF-7 细胞, 在转染后 12 h、24 h、48 h、72 h 和 5 d, 用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞中 *hTERT* mRNA 的表达。与对照组相比, 4 段 siRNA 中有 3 段在转染后 12 h 即对 *hTERT* mRNA 的表达产生抑制, 48 h 抑制率最高, 72 h 后下降, 其中位于 *hTERT* mRNA 二级结构中的结构相对简单区域的 siRNA 抑制率最高, 达到 75%, 说明特异性 siRNA 对 *hTERT* 基因有明显的抑制效果, 且该抑制效应具有位置及时间依赖性。

关键词: siRNA; *hTERT* 基因; 位置效应; 时间效应

Positional and time effects of specific siRNA inhibit the expression of *hTERT*

ZENG Yong-Qiu, SHUI Qing-Lin, ZHAO Jiao, ZHANG Zhi-Hong, YU Hong, ZHAO Xiao-Ping

Department of Medical Biology and Genetics, Luzhou Medical College, Luzhou of Sichuan Province 646000, China

Abstract: To explore the inhibitory effect in different positions siRNA on *hTERT* mRNA expression in MCF-7 cells at the different time points, we Designed and chemically synthesized four pairs of siRNA which aimed at human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene specifically, which were transfected into the MCF-7 cells by liposome method, and then the expression of *hTERT* mRNA in MCF-7 cells was tested respectively by half-quantity RT-PCR at 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 5 d after transfection. Compared with the control groups, there were three pieces of siRNA that inhibit the expression of *hTERT* mRNA at 12 h after transfection among the four pieces. The highest inhibition ratio occurred at 48 h after transfection, and after 72 h the ratio descended, when the siRNA sequence was located at the relative simple structure site in the secondary structure of *hTERT* mRNA had the highest inhibition ratio, which was 75% ($P < 0.01$), which indicated that the specific siRNA had obvious inhibition effect on *hTERT* gene, and the effect was dependant positionally and timely dependence.

Keywords: siRNA; *hTERT* gene; position effect; time effect

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近年来发现的一种重要的转录后基因沉默现象。目前在体外培养的哺乳动物细胞中通过siRNA(small interfering RNA)进行RNA干扰的实验技术已日趋成熟, 但无

论是体内表达还是体外合成siRNA的方法其原理最终都是通过序列特异性siRNA与相关蛋白结合而形成沉默复合物(RNA - induced silence complex, RISC), 继而识别与其互补的靶基因mRNA并与之结合, 从

收稿日期: 2007-11-06; 修回日期: 2008-01-04

基金项目: 四川省教育厅课题项目(编号: 04JY029-020-1)资助[Supported by the Project of Education of Sichuan Province (No. 04JY029-020-1)]

作者简介: 曾永秋(1980-), 女, 四川泸州人, 助教, 研究生, 研究方向: 肿瘤分子遗传学。Tel: 13568639528; E-mail: yongqiu120@163.com

通讯作者: 税青林(1954-), 男, 四川射洪人, 教授, 本科, 研究方向: 肿瘤分子遗传学。Tel: 13982766398; E-mail: shuiql889@163.com

而导致 mRNA 降解, 所以 siRNA 的设计对于 RNAi 的作用就显得尤为重要。已有大量研究表明^[1,2], 针对同一基因 mRNA 序列的不同区域设计的 siRNA 其抑制效果差异很大, 有的甚至完全没有抑制能力。因此, 对于一个特定基因来说, siRNA 最佳靶序列的选择是决定 RNAi 成败的关键。同时有报道指出^[3], 在体外哺乳动物细胞中, RNAi 作用呈现剂量和时间依赖性效应。本研究以在人乳腺癌 MCF-7 细胞中高表达的人端粒酶逆转录酶(Human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*) 基因作为靶基因, 针对该基因 mRNA 的不同位点设计了 4 段 siRNA, 采用半定量 RT-PCR 的方法筛选 *hTERT* 基因的最佳靶序列, 并分析其位置效应及时间效应。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞株购自四川大学华西医学中心实验肿瘤研究室, 脂质体 DOTAP 购自瑞士 Roche 公司, TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, TaKaRa RNA

PCR Kit Ver.3.0 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 靶向 *hTERT* 的 siRNA 的设计与合成

根据 GenBank 中 *hTERT* 基因 mRNA 序列(共 4 015 个碱基), 采用 Ambion 公司的网上设计软件(www.ambion.com)设计该基因的 RNAi 靶序列, 并参照 RNAstructure 4.5 软件预测的 *hTERT* mRNA 二级结构选择了 4 段 siRNA, 分别是:

(1) siRNA-1037:

sense-ACCAAGCACUCCUCUACUTT, antisense-AGUAGAGGAAGUGCUUGGUCU;

(2) siRNA-2037:

sense-UGUUCAGCGUGCACAACUATT, antisense-UAGUUGAGCACGCUGAACAGT;

(3) siRNA-2481:

sense-UCCUACGCUUCAUGUGCCATT, antisense-UGGCACAUGAAGCGUAGGAAG;

(4) siRNA-2985:

sense-UCUUGCGGCUGAAGUGUCATT, antisense-UGACACUUCAGCCGCAAGACC。

4 段序列在二级结构中的位置如图 1 所示, 其中

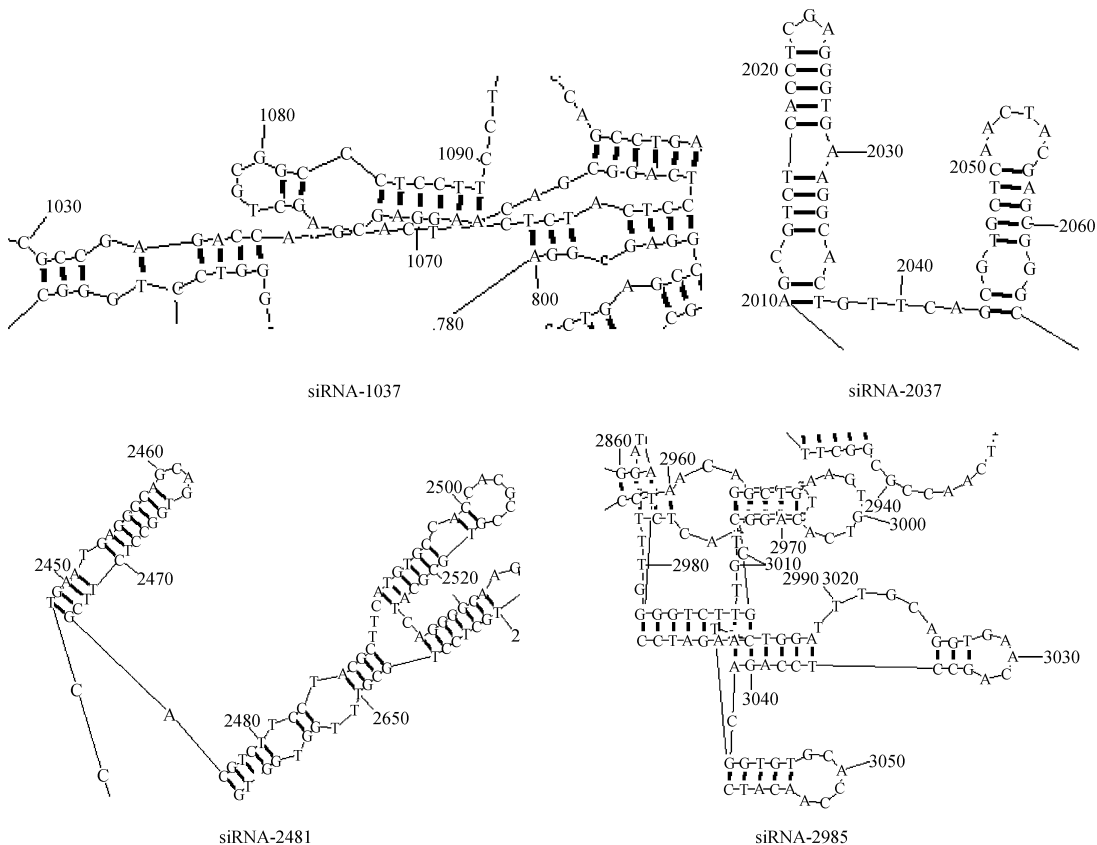


图 1 各组 siRNA 在 *hTERT* mRNA 二级结构中的位置

Fig. 1 Positions of siRNA at the secondary structure of *hTERT* mRNA

siRNA-2037 所处位置的结构相对较简单, 而 siRNA-2985 所处结构则较复杂, 分支多且紧密。另设计一段不针对任何基因的阴性对照序列: sense-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT, antisense-ACGUGACACGUUCGGAGAATT, 且该阴性对照用 GFP 绿色荧光标记以便观察转染效率。以上序列经 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)检索证实与其他基因无同源性。以上 siRNA 均由上海吉玛公司合成。

1.2.2 细胞培养与转染

人乳腺癌 MCF-7 细胞株在 37℃、5%CO₂、10% 新生小牛血清中常规方法培养和传代, 于转染的前一日接种 2×10^5 个/mL 指数生长期的细胞于 6 孔板中, 并设 siRNA-1037 组、siRNA-2037 组、siRNA-2481 组、siRNA-2985 组、空白对照组和阴性对照组。取 25 μ L HBS 液稀释 2.5 μ g siRNA, 另取 35 μ L HBS 液稀释 15 μ L DOTAP 脂质体转染试剂, 将 siRNA 稀释液与脂质体稀释液混匀, 15 min 下静置 15 min, 直接将上述转染复合物加入各个培养孔中混匀(空白组不加任何试剂)。将 6 孔板置于 37℃、5%的 CO₂ 培养箱中培养, 6 h 后更换为常规培养基继续培养, 转染后 12 h 将阴性对照组置于荧光显微镜下观察发荧光细胞所占比例, 以判断转染效率。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测抑制效应

转染 12 h、24 h、48 h、72 h 和 5 d 后, 分别收集各组细胞, 用 TRIzol 法进行细胞总 RNA 的提取。

hTERT 基因及内对照 β -肌动蛋白(β -actin)基因的 PCR 引物均运用 Primer Premier 5.0 设计软件设计, *hTERT* 上游引物序列: 5'-CTGAAGTGTCACAGC-CTGTTT-3', *hTERT* 下游引物序列: 5'-CACACATG-CGTGAAACCTGTA-3', 扩增片段长度为 111 bp。内对照 β -肌动蛋白(β -actin)基因上游引物: 5'-GG-GACCTGACTGACTACCTC-3'; β -actin 下游引物序列: 5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTG-3', 扩增片段长度为 546 bp。*hTERT* 与内对照 β -actin 的 PCR 反应在一个管里进行, 按照两步法试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0 说明书操作, 反转录条件为 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5 min, PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 再延伸 5 min。扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳完毕后用紫外凝胶成像分析仪照相并用 BandLeader 软件灰度扫描。

1.3 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 进行多样本均数两两比较的 q 检验方差分析, 由 SPSS11.0 软件统计包完成。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 转染后 12 h 荧光显微镜下观察细胞转染效率

荧光显微镜下观察(图 2A), 判断荧光细胞占所有细胞总数的 80% 以上, 高倍镜下(图 2B)看见荧光

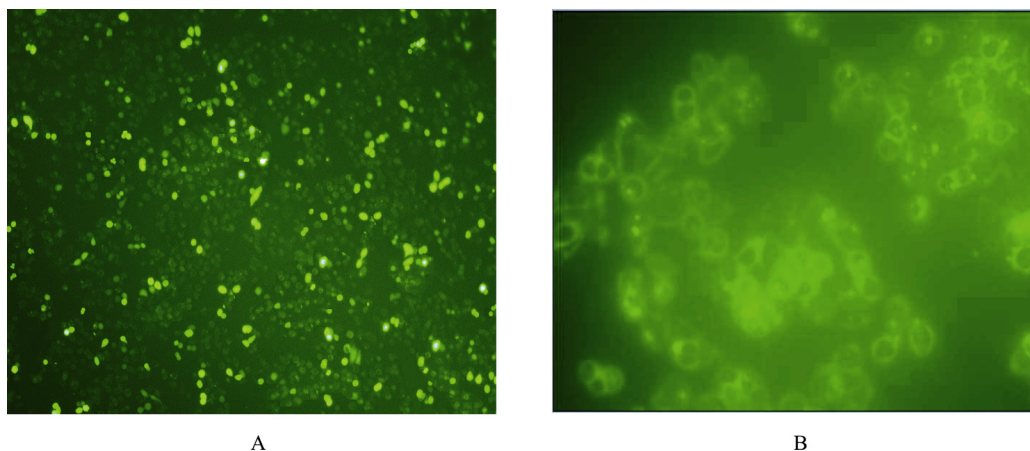


图 2 荧光显微镜对转染效率的检测

A: 荧光显微镜下的 MCF-7 细胞(100 \times); B: 荧光显微镜下的 MCF-7 细胞(500 \times)。

Fig. 2 Detection of the transfection rate under fluorescence microscope

A: The cultured MCF-7 cells under fluorescence microscope(100 \times); B: The cultured MCF-7 cells under fluorescence microscope(500 \times).

细胞轮廓清晰、状态良好,即应用 DOTAP 脂质体转染试剂转染 MCF-7 细胞可以获得 80% 以上较高的转染效率,且细胞生长状态良好,细胞毒性较低。

2.2 半定量 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳图显示(图 3):与对照组相比,转染后 12 h, siRNA-1037 及 siRNA-2037 的 *hTERT* 扩增片段条带(111 bp)的亮度已出现减弱,且随检测时间的延长减弱程度越明显,48 h 达到最低亮度,72 h 开始逐渐恢复亮度;

siRNA-2481 目的条带亮度也出现减弱,但不如以上两组明显;而 siRNA-2985 则无明显改变。灰度扫描半定量结果显示(表 1,图 4), siRNA-1037、siRNA-2037 及 siRNA-2481 的 *hTERT* mRNA 相对表达量分别与空白组及阴性对照组相比,均有不同程度的下降,且均在 48 h 下降到最低点,其中 siRNA-2037 下降最明显,48 h 下降约 75% ($P < 0.01$)。而 siRNA-2985 的 *hTERT* mRNA 相对表达量则无明显变化。

表 1 各组 *hTERT* mRNA 相对表达量
Table 1 Relative expression of *hTERT* mRNA in each group

	12 h	24 h	48 h	72 h	5 d
空白组 Blank	0.745 ± 0.011	0.738 ± 0.008	0.751 ± 0.012	0.730 ± 0.009	0.742 ± 0.015
阴性对照组 Negative control	0.737 ± 0.014	0.760 ± 0.020	0.739 ± 0.009	0.744 ± 0.015	0.751 ± 0.010
siRNA-1037	0.510 ± 0.016	0.405 ± 0.008	0.289 ± 0.017	0.376 ± 0.017	0.613 ± 0.015
siRNA-2037	0.422 ± 0.009	0.331 ± 0.014	0.192 ± 0.007	0.350 ± 0.016	0.574 ± 0.012
siRNA-2481	0.716 ± 0.013	0.569 ± 0.010	0.405 ± 0.009	0.526 ± 0.012	0.730 ± 0.019
siRNA-2985	0.741 ± 0.014	0.728 ± 0.015	0.743 ± 0.016	0.721 ± 0.013	0.735 ± 0.008

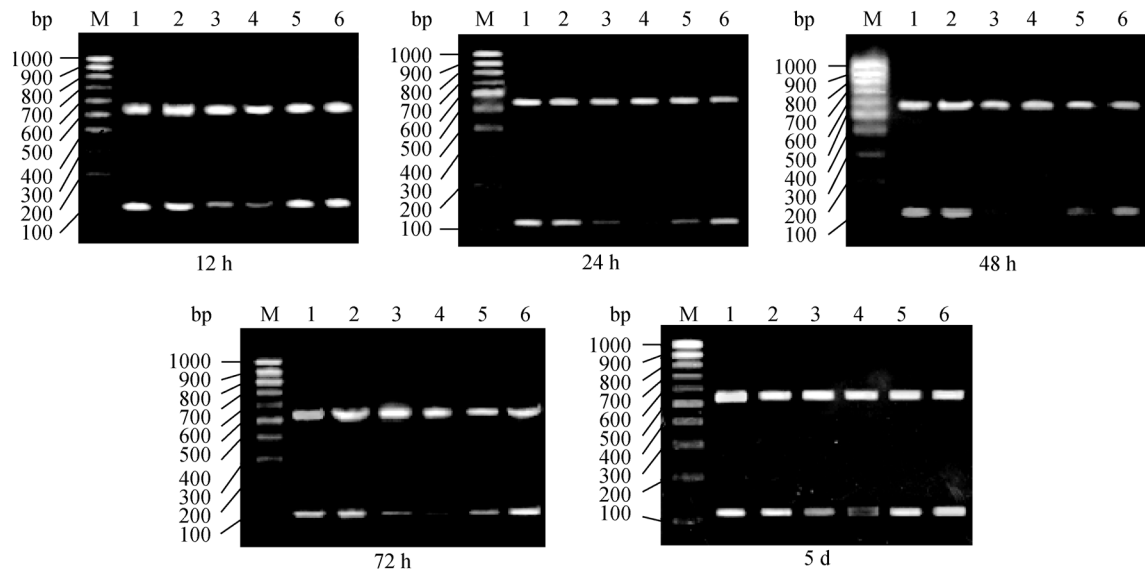


图 3 不同时间点 RT-PCR 检测结果
M: 100 bp DNA marker; 1: 空白组; 2: 阴性对照组; 3: siRNA-1037; 4: siRNA-2037; 5: siRNA-2481; 6: siRNA-2985。

Fig.3 Detection results of RT-PCR at different time points
M: 100 bp DNA marker; 1: Blank group; 2: Negative control group; 3: siRNA-1037; 4: siRNA-2037; 5: siRNA-2481; 6: siRNA-2985.

3 讨论

RNA 干扰作为一种新的基因沉默技术,具有高效、特异、快速、毒副作用小等优点,但其高效性

必须在有效的 siRNA 设计的基础上,即 siRNA 有效性高度依赖于靶点的位置^[2], siRNA 目标序列的选取是实验成功最重要的前提之一^[4]。而目前关于 siRNA 序列选择还没有确切的金标准,一般遵循下列原

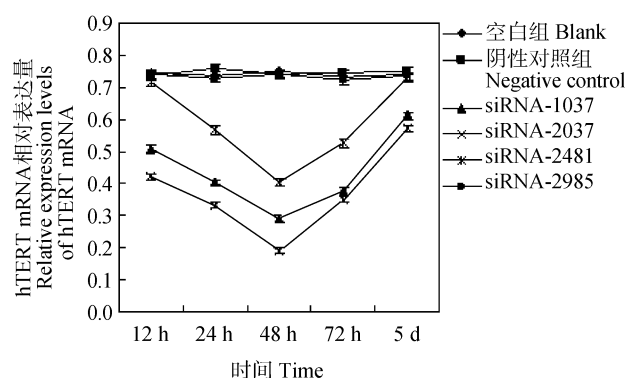


图4 各组不同时间点 *hTERT* mRNA 相对表达量

Fig.4 Relative expression levels of *hTERT* mRNA at different time points in each group

则: (1) 选择以碱基 A 或 G 开始的 19~21 nt 大小的目的 mRNA。(2) GC 含量为 50% 左右时最佳, 从起始密码子后的 50~100 个碱基后开始, 通常在编码区域(Coding region)内进行设计, 不要使用具有 4 个以上 G 或 C 的连续结构(即 GGGG 或 CCCC); (3) 使用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)将目标序列和相应的基因组数据库进行比较, 以避免和其他编码序列的同源性; (4) 通过实验或软件模拟分析靶 mRNA 的二级结构, 常使用的软件如 mFOLD、RNAstructure、GENETYX-Mac8.0 等。而有关 siRNA 沉默效应的很多研究已经表明^[5-7], mRNA 二级结构中茎、环、螺旋的长度和稳定性能影响寡脱氧核苷酸的靠近和结合, 特别是靶 mRNA 与 siRNA 反义链结合区域的二级结构对 siRNA 活性的影响很大。如果在此区域 mRNA 形成的二级结构比较复杂, siRNA 就很难结合到此区域, RNA 干扰的效果就会受到影响甚至完全不起作用。2003 年 Rosel 等^[8]用计算机软件 MFold(2.3 版)对 *ICAM* 基因 mRNA 的二级结构进行分析, 根据软件预测的二级结构上的可及位点(Accessible site)和不可及位点分别设计了 siRNA, 结果发现根据可及位点设计的 siRNA 的活性明显强于不可及位点, 陈香梅等^[9]用同样的软件分析了 *BAB5A* 基因的二级结构, 也发现 siRNA 的作用效率与目的基因 mRNA 靶位点的可及性密切相关。

本室前期研究发现^[10], 在乳腺癌组织中端粒酶阳性表达率高达 90.38%, 而作为端粒酶催化亚单位的 *hTERT* 基因在乳腺癌细胞中也呈现高表达状态, 且是端粒酶活化和细胞癌变的限速步骤^[11]。本实验

针对乳腺癌 MCF-7 细胞 *hTERT* 基因设计了 4 对 siRNA, 同时运用 RNAstructure 4.5 软件预测靶基因 mRNA 的二级结构, 并找到了这 4 段 siRNA 序列在二级结构中的位置, 最终半定量 RT-PCR 检测结果显示, 位于二级结构中结构较简单区域设计的 siRNA 抑制效率达到了 75%, 而结构最复杂区域设计的 siRNA 对靶基因几乎没有抑制作用。说明靶基因 mRNA 的二级结构确实是影响 siRNA 干扰效果的一个重要参数, 其作用机制可能是通过影响 RISC 及其它效应蛋白与目的序列的结合来实现。尽管由于技术上的原因, 目前使用的二级结构分析软件大多只能对 mRNA 的二级结构进行预测, 缺乏准确性, 但根据特定靶基因 mRNA 的结构特点来进行 siRNA 的设计, 仍然不失为筛选高效率干扰序列的有效途径。

此外, 实验同时还证明了 siRNA 的干扰效果具有时间依赖性, 转染后 48 h 达到最高抑制率, 与何国平等^[3]的研究结果完全一致, 分析其原因可能是由于 siRNA 易被降解, 且哺乳动物中缺乏 siRNA 自我增殖机制, 所以用这种方法介导的 RNAi 在哺乳动物细胞内持续时间较短, 72 h 后抑制率逐渐下降。同时本实验还设计了荧光标记的阴性对照对转染效率进行评价, 80% 的转染效率保证了实验的顺利进行以及抑制效果的真实可信。

参考文献(References):

- [1] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2002, (20): 497-500. [\[DOI\]](#)
 - [2] Holen T, Amarzguoui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(8): 1757-1766. [\[DOI\]](#)
 - [3] HE Guo-Ping, ZHANG Si-Zhong, WANG Ying-Cheng, XIAO Cui-Ying, MA Yong-Xin, XU Wen-Ming, DING Lan, TAO Da-Chang, SUN Yan, CHEN Yu-Juan. Time and dose effect of RNA interference mediated by short hairpin RNA. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2005, 32(3): 258-267.
- 何国平, 张思仲, 王英成, 肖翠英, 马用信, 许文明, 丁兰, 陶大昌, 孙岩, 陈玉娟. 短发夹 RNA 介导 RNA 干扰的时间和剂量效应研究. *生物化学与生物物理进展*,

- 2005, 32(3): 258–267.
- [4] Yoshinari K, Miyahishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(2): 691–699. [\[DOI\]](#)
- [5] Schubert S, Grünweller A, Erdmann VA, Kurreck J. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J Mol Biol*, 2005, 348(4): 883–893. [\[DOI\]](#)
- [6] Heale BS, Soifer HS, Bowers C, Rossi JJ. siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(3): e30. [\[DOI\]](#)
- [7] Yiu SM, Wong PW, Lam TW, Mui YC, Kung HF, Lin M, Cheung YT. Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics*, 2005, 21(2): 144–151. [\[DOI\]](#)
- [8] Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(15): 4417–4424. [\[DOI\]](#)
- [9] CHEN Xiang-Mei, LI-Meng, LIU Shan-Shan, LI Yu. Positional effect of short interfering RNAs expressing vector targeting human *RAB5A*. *Chinese Journal of Endemiology*, 2006, 25(6): 699–702.
陈香梅, 李蒙, 刘珊珊, 李钰. siRNAs 表达载体沉默 *RAB5A* 基因的位置效应研究. *中国地方病学杂志*, 2006, 25(6): 699–702.
- [10] HE Guo-Ping, SHUI Qing-Lin, HUANG Yan, ZHANG Si-Zhong, YU Hong. Quantitative detection of telomerase activity and its association with clinicopathological characteristics in breast cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 2004, 23(9): 1041–1046.
何国平, 税青林, 黄燕, 张思仲, 余红. 乳腺癌组织中端粒酶活性的定量检测及其与临床病理的关系. *癌症*, 2004, 23(9): 1041–1046.
- [11] Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy? *Oncogene*, 2002, 21(4): 688–697. [\[DOI\]](#)

科学出版社科学出版中心生物分社新书推介 2008-05

精编分子生物学实验指南 (第五版)

【美】F.M.奥斯伯 R.布伦特 R.E.金斯顿 D.D.穆尔 J.G.塞德曼 J.A.史密斯
K.斯特拉尔 主编

金由辛 包慧中 赵丽云 等译校

978-7-03-020336-2 ¥180.00 2008年5月30日出版

本书是知名度很高、不断更新的《最新分子生物学实验方法汇编》(Current Protocols in Molecular Biology)系列的精编版本。新版对原有内容进行了修订和更新,包括:大肠杆菌、质粒和噬菌体, DNA 的制备和分析, DNA 和 RNA 的酶学操作, RNA 的制备和分析, 重组 DNA 文库的构建, 重组 DNA 文库的筛选, DNA 序列测定, 克隆化 DNA 的诱变, DNA 导入哺乳动物细胞, 蛋白质分析, 免疫学, DNA 蛋白质相互作用, 酿酒酵母, 原位杂交和免疫组织化学, 聚合酶链反应, 蛋白质的表达, 蛋白质磷酸化的分析, 生物信息学, 蛋白质相互作用的分析等; 又新增了染色质的装配与分析, 核酸阵列, 组合文库的建立和使用, 单个细胞或一群细胞间差异表达基因的发现和分析四章内容。

本书可供高等院校和科研机构从事分子生物学研究的科研工作者和研究生参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目