

# shRNAs(short hairpin RNAs) 在哺乳动物细胞中引发的基因沉默

Patrick Paddison, Greg Hannon

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA

## 介绍

RNA干扰(RNAi)首先在线虫(*Caenorhabditis elegans*)和植物中发现,开始时认为是一种奇特的生物现象,但很快就成为这些生物系统强有力的基因研究工具。试验证明 dsRNA(double-stranded RNA)诱导的基因沉默广泛存在于各种物种当中,包括植物、真菌、昆虫、原生动动物以及真核生物等[1]。通过研究小片段干扰RNAs(siRNAs)和表达后的shRNAs在哺乳动物细胞中的作用,研究人员发现人或鼠基因组的任何基因都能成为dsRNAs诱导基因沉默的靶向基因。因此, RNAi很快成为哺乳动物细胞体系研究的标准实验技术。

我们和其他一些实验室构建了用于哺乳动物细胞产生小片段dsRNA的体内表达载体,类似于内源表达的hairpin RNAs[2]。在试验中,我们利用U6 RNA polymerase III启动子产生的含有反向重复序列(21-29核苷酸)的转录子来形成shRNA,它会被Dicer加工并进入RNAi途径。携带有shRNA表达载体的质粒短暂转染哺乳动物细胞足以引起基因沉默。令人惊奇的是,应用不同靶定效率的shRNA,能产生类似等位基因沉默的一系列表象。

几个因素可能影响基因沉默的效率,像靶序列的特征、转染的效率以及靶向mRNA和蛋白的丰度及稳定性。对于表达的shRNA,我们推荐每个靶基因采用3-6个不同的发夹结构。大部分情况下,至少一个shRNA能引发高于90%的knockdown效应。当然,在进行生物学试验前一定要进行检测,确认是shRNA引发基

因沉默(western blotting, 免疫荧光或者RT-PCR)。对于转染效率不高的细胞系,应进行多次转染从而提高基因 knockdown 的效率。对于单次转染,应在转染后的48-96小时内进行基因knockdown效率的检测。这里,我们报道了利用FuGENE 6 转染试剂转染NIH/3T3细胞引发暂时基因沉默的一种简单方法。

## 材料和方法

试验通过用早幼粒细胞蛋白(promyelocytic leukemia protein, PML)特异的shRNA诱导基因沉默,所用试剂为FuGENE 6 转染试剂,细胞系为NIH 3T3, 试验程序如下:

### 细胞培养

NIH 3T3细胞以含10%胎牛血清的DMEM培养基培养。

### shRNA载体构建

PML p53和Tyro29nt shRNA克隆入U6表达载体方法参照Paddison和Hannon[2]

### 转染

细胞培养在6-孔板,每孔含2ml的培养基,细胞浓度为 $1 \times 10^5$ /well, 上板培养一天后进行转染。

转染试剂配置如下:以不含血清的DMEM 培养基稀释的 FuGENE 6 按 3:1 的比例与 500ng shRNA载体混合,形成转染复合物,温育15分钟。

细胞转染程序如下: 6-孔培养板的每孔中加入100  $\mu$ l含500ng shRNA载体(分别为PML-特异性的shRNA表达质粒、p53质粒或者Tyro29nt对照载体)的转染复合物, 转染后16小时换培养基。

转染48小时后从细胞中提取总蛋白, 细胞裂解液成份为0.2% NP-40、600mM KCl、50mM Hepes、0.2mM EDTA、0.2mM EGTA和10% glycerol。其中另加入蛋白酶抑制剂(Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche)和deSUMOase抑制剂(2-Iodoacetamide, calbiochem; N-Ethylmaleimide, Sigma)。

## Western blotting

蛋白电泳采用8%的聚丙烯酰胺凝胶, 上样量为每孔25  $\mu$ g蛋白。电泳后, 蛋白被转移至尼龙膜。膜放置入封闭缓冲液TBST中(Tris缓冲液、5% 脱脂奶粉和0.05% 吐温), 23 $^{\circ}$ C温育1小时。检测PML的一抗为鼠PML单克隆抗体(mAb37, CSHL), 抗体用TBST缓冲液按1:250稀释, 23 $^{\circ}$ C温育1小时。然后用洗液(TBST)洗3次, 每次15分钟。接下来将尼龙膜放入二抗溶液(鼠抗IgG HRP-conjugate, Upstate), 加入底物(Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche), 在X-ray胶片上检测信号。

## 结果

U6表达载体形成的小于30bp的shRNAs引发序列特异性的基因沉默[4]。图1显示用FuGENE 6转染试剂诱导shRNA表达质粒转染NIH3T3细胞

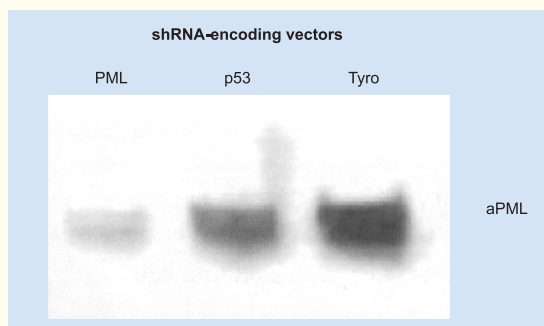


图1:转染PML特异性shRNA表达载体或p53-、Tyro29nt-特异性shRNA对照载体后, NIH3T3细胞总蛋白的Western blot

48小时后PML的knockdown情况。从图中可以看出, 用PML-特异的shRNA表达质粒转染的细胞, PML的表达被强烈抑制。然而编码p53或者Tyro29nt特异基因的质粒转染后的细胞, PML的表达不受影响。

## 讨论

利用shRNA技术引发的暂时基因沉默拓宽了现代基因抑制技术的范围, 给予研究人员在细胞学和疾病研究方面新的方向。我们的结果显示, 在载体介导的哺乳动物细胞基因沉默的研究中, FuGENE 6转染试剂是一个有利的工具。

## Reference 参考文献

1. Hannon GJ(2002), Nature 11;418:244-251
2. Paddison PJ, Hannon GJ(2002), Cancer Cell 2: 17-23
3. Hemann MT et al.(2003), Nat Genet 33:396-400
4. Passison PJ et al.(2002), Genes Dev 16:948-958
5. Paddison PJ et al.(2002), Proc Natl Acad Sci USA 99:1443-1448

品名	包装	目录号
FuGENE 6 Reagent	1ml	1 1814443 001

更多siRNA转染信息, 请登录[www.roche-applied-science.com/sis/fugene](http://www.roche-applied-science.com/sis/fugene)

产品信息