

小鼠 FSP27 基因沉默的前脂肪细胞系的建立*

姚慧斓 李 蓬**

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 用含有针对小鼠 FSP27 基因的 siRNA 慢病毒, 感染小鼠前脂肪细胞系 3T3-L1, 建立小鼠 FSP27 基因沉默的前脂肪细胞系, 为进一步研究该基因在脂肪细胞分化和脂肪代谢过程中的作用提供实验材料. 根据小鼠 FSP27 基因设计双链 siRNA, 克隆至 pSilencer2.1-U6 质粒, 形成含 U6-siRNA box 的重组质粒. 在 293T 细胞中检测 siRNA 沉默 FSP27 基因的效率, 结果显示, siRNA 可以高效地抑制外源小鼠 FSP27 的表达. 将 U6-siRNA box 重组到慢病毒载体 FG12 上, 并将慢病毒载体与其他辅助载体用磷酸钙法转入 293T 细胞, 包装成慢病毒. 收集、浓缩、纯化病毒上清并用来感染靶细胞 3T3-L1, 检测感染效率和内源蛋白表达量的变化. 结果显示, 该 siRNA 可以高效地抑制内源小鼠 FSP27 的表达, 并且 siRNA 插入基因组中, 形成稳定表达. 至此, 小鼠 FSP27 基因沉默的前脂肪细胞系成功建立, 为研究 FSP27 基因的功能提供了研究基础.

关键词 慢病毒载体, siRNA, CIDE, FSP27, 3T3-L1 细胞系

学科分类号 Q522

CIDE (cell death-inducing DFF45-like effectors) 家族是近几年发现的与细胞凋亡相关的一组新基因, 因与 DNA 片段化因子 45 (DNA fragmentation factor, DFF45) 在 N 端高度同源而得名^[1]. 该蛋白质家族在人中有 3 个成员: CIDE-A, CIDE-B 和 CIDE-3; 在老鼠中, 3 个同源基因分别为 mCIDE-A, mCIDE-B 和 mFSP27. 在人肾上皮细胞系 293T 中过表达 CIDE 家族的 3 个蛋白质均可诱导非 caspase 依赖的细胞凋亡^[1,2], 同时研究也发现 CIDE-A 和 CIDE-B 引起的细胞凋亡可以被 DFF45 所抑制^[1]. Chen 等^[3]的研究表明, CIDE-B 与其他 CIDE 家族成员形成同源或异源二和 / 或多聚体, 其 C 端的 CIDE-C 结构域是 CIDE-B 引起细胞凋亡、定位的重要结构域.

关于 CIDE-A 的研究集中在 2 个方面. 首先, 同 CIDE-B 类似, CIDE-A 也参与细胞凋亡的调控. Iwahana 等^[4]指出, 转化生长因子 (transforming growth factor-beta, TGF- β) 可以抑制 CIDE-A 的糖基化, 同时高水平的去糖基化形式的 CIDE-A 可以抑制 TGF- β 1 依赖的细胞凋亡. 另一方面, *cidea* 基因敲除的小鼠与野生型小鼠相比, 新陈代谢速度更快, 脂肪降解速度更高, 体脂指数 (overall body adiposity index) 明显减少, 可以抵抗高脂食物所诱

发的肥胖症和糖尿病^[5]. Nordstrom 等^[6]发现, 在肥胖症的人身上, CIDE-A 的表达量为正常人的 50%, 并且 CIDE-A 的作用部分受到 TNF- α 的调节.

无论是在细胞凋亡领域还是在肥胖症和糖尿病领域的研究都提示着 CIDE 家族功能上的重要性. 但是目前为止, 对于 mFSP27/CIDE-3 的研究还处于非常初步的阶段. mFSP27 特异地表达在分化后的脂肪细胞, 如 TA1、3T3-L1 中^[7], 其表达受到肿瘤坏死途径 (tumor necrosis pathway) 的调节^[8], 但是其具体功能仍不清楚. 近年来, RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术的出现, 为研究内源性基因功能提供了强有力的研究工具. 本研究针对 mFSP27 基因, 设计、合成和筛选出有效抑制 mFSP27 表达的 siRNA, 并构建了带有 mFSP27 siRNA 的慢病毒载体, 成功包装出慢病毒, 感染靶细胞 3T3-L1, 为后期在细胞系中研究 mFSP27 的功能奠定基础.

*高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(704002).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62797121, E-mail: li-peng@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2007-01-22, 接受日期: 2007-03-02

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料. 大肠杆菌菌株 DH5 α 和 TOP10 (本室冻存); mFSP27 表达质粒 pCMV5-HA-mFSP27 (本室构建); siRNA 表达载体 pSilencer2.1-U6-Hygro (Ambion 公司); 慢病毒载体 FG12 和包装质粒 pMDLg/pRRE, pREV-Rev, pVSVG (新加坡 Zilong Wen 博士惠赠, 图 1), 质粒均由氯化铯梯度离心制备; 包装细胞 293T (本室冻存); 3T3-L1 (ATCC 公司); 设计的单链 DNA 由 Invitrogen 公司合成. 质粒测序由北京奥科生物公司完成.

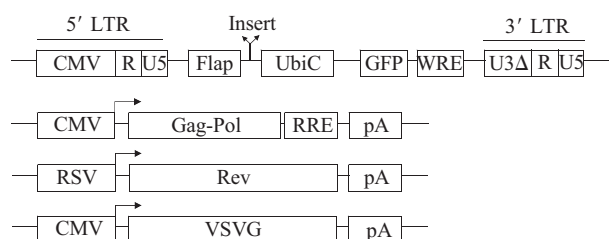


Fig. 1 Schematic representation of the lentiviral system

1.1.2 试剂. 限制性内切酶、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段、牛小肠碱性磷酸酶 (NEB); DNA ligation kit (TaKaRa 公司); 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、预染蛋白 Marker、100 bp DNA ladder、1 kb DNA ladder (Tiangen 公司); DMEM 培养液 (Gibco 公司); 新生牛血清、胎牛血清 (Gibco 公司); poly(L-lysine) (Sigma 公司), 磷酸钙转染试剂: 2.5 mol/L CaCl₂, 过滤除菌分装, -20℃ 保存备用; 2×BBS (pH 6.95): 16.36 g/L NaCl, 10.66 g/L BES (Calbiochem 公司), 0.21 g/L Na₂HPO₄, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 6.95.

1.1.3 抗体. mFSP27 多克隆抗体由本室制备; anti-HA 抗体 (Santa Cruz 公司); anti-FABP 抗体 (ADI 公司); anti-perilipin 抗体 (RDI 公司); ECLTM anti-Rabbit IgG-HRP 和 anti-Mouse IgG-HRP (Amersham 公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. 包装细胞 293T 在 37℃、5% CO₂ 条件下, 培养于含有 10% NBS 的 DMEM 完全培养液中. 用 BBS 转染时, 293T 在 37℃、3% CO₂ 条件下培养过夜. 3T3-L1 细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下, 培养于含有 10% NBS 的 DMEM 完全培养液中. 3T3-L1 的诱导分化: 3T3-L1 细胞培养到

100% 汇合, 细胞出现接触抑制. 接触抑制 2 天后, 在完全培养液中加入胰岛素, 终浓度为 5 mg/L; IBMX, 终浓度为 0.5 mmol/L; 地塞米松, 终浓度为 1 μmol/L; 培养 2 天后, 改用只含有 5 mg/L 胰岛素的完全培养液培养, 每隔 2 天换一次液, 直到细胞分化.

1.2.2 siRNA 的设计和合成. 根据 GenBank 报道的 FSP27 基因序列 (NM_178373), 参考 Ambion 公司的设计软件, 设计、合成针对 mFSP27 编码区 (270~291) 碱基序列 5' AATCGTGGAGACAGAA-GAATA 3' 的 DNA 寡核苷酸链如下: 正义链, 5' GATCCGTCGTGGAGACAGAAAGAATATTCAAG-AGATATTCTTCTGTCTCCACGATTTTTTGGAAA 3'; 反义链, 5' AGCTTTTCCAAAAAATCGTGG-AGACAGAAAGAATATCTCTTGAATATTCTTCTG TCTCCACGACG 3'.

1.2.3 pSilencer-siFSP27-270 载体的构建. 取单链 DNA 合成片段各 1 μg 在退火缓冲液中 95℃ 孵育 4 min, 让反应混合物缓慢冷却至室温, 内单链寡核苷酸退火生成双链 DNA. 用 T4 多聚核苷酸激酶处理双链 DNA, 在 5' 端加上磷酸基团. 在 2.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 检查退火产物的生成; 将退火所得的双链 DNA 与 BamH I 和 Hind III 线性化处理的 pSilencer 连接. 连接产物转化进入 DH5 α , 并在氨苄抗性的 LB 平板上进行重组克隆的筛选. 测序鉴定带有 siRNA 的阳性克隆.

1.2.4 siRNA 效率的检测. 用磷酸钙法向 293T 细胞中单独转入 mFSP27 表达质粒 pCMV5-HA-mFSP27, 引起 293T 中 mFSP27 的过表达, 并同时转入 mFSP27 表达质粒和不同量的 siRNA 表达载体 pSilencer-siFSP27-270. 转染后 24 h, 用 PBS 洗细胞 2 遍, 用 1.2×SDS 上样缓冲液收细胞提取总蛋白质. SDS-PAGE, 转印 PVDF 膜, 用抗 HA 的抗体做蛋白质印迹检测 siRNA 的效率, 并用抗 tubulin 的抗体检测 tubulin 的含量作为上样量的对照.

1.2.5 重组慢病毒载体 FG12-siFSP27-270 的构建. 将 pSilencer-siFSP27-270 中的 RNAi box 用 Hind III 和 EcoR I 切下, 用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段抹平, 连接进入 Hpa I 线性化, 并 CIAP 处理的慢病毒载体 FG12 中. 连接产物转化进入 TOP10 菌株, 并在氨苄抗性的 LB 平板上进行重组克隆的筛选. 用 BamH I 和 Xba I 酶切鉴定阳性克隆.

1.2.6 慢病毒的包装. 包装细胞 293T 在 37℃、5% CO₂ 条件下, 培养于含有 10% NBS 的 DMEM 完全培养液中. 转染前 24 h, 用 PBS 配置 0.001% poly (L-lysine) 包被培养皿. 用长满的 293T 来分盘. 细胞达到 80%~90% 汇合时进行转染. 转染前 1 h, 给细胞换液, 每 10 cm 的培养皿加入 9 ml DMEM. BBS-CaCl₂ 转染, 每 10 cm 培养皿加入慢病毒载体 FG12-siFSP27-270 10.0 μg, MDLg/pRRE 6.5 μg, pRSV-Rev 2.5 μg, pVSV.G 3.5 μg. 在涡旋振荡器上轻柔充分混合, 逐滴加入等量的 2×BBS. 室温静置 15 min 后, 逐滴加入细胞中. 在 37℃ 3% CO₂ 条件下培养. 12~16 h 后换液. 转染后 48 h 和 72 h 各收一次上清液, 将 2 次收集的清液混合在一起, 用 0.22 μm 的滤器过滤. 室温下, 70 000 g 离心 2 h. 弃去上清, 保留病毒颗粒沉淀. 每 30~40 ml 病毒原液用 1 ml HBSS 小心充分重悬. 将 1 ml 病毒浓缩液加入到 3 ml HBSS 配置的 20% 蔗糖溶液上, 室温 50 000 g 离心 2 h. 弃去上层液体, 每 1 ml 病毒浓缩液用 100 μl HBSS 重悬. 将重悬液加到 eppendorff 管中, 在涡旋振荡器上轻柔振荡 10 min. 分装病毒 50 μl/管, 保存在 -80℃.

1.2.7 慢病毒滴度的测定. 在 12 孔板中接种 293T, 细胞达到 70% 融合时感染, 记录每孔的细胞总数. 将病毒浓缩液依次作 1:10 的梯度稀释, 稀释 6~

7 次. 用不同病毒浓度的培养液, 感染过夜 (8~12 h). 换液, 培养 24 h 后, 用荧光显微镜观察 GFP 的表达. 选择带有荧光数在 5~50 的孔, 统计荧光数和此时的细胞总数. 按照稀释方式计算病毒滴度.

1.2.8 用重组慢病毒载体感染靶细胞 3T3-L1. 3T3-L1 在 12 孔板中生长到 40% 左右时, 取 100 μl 病毒浓缩液, 感染过夜. 第 2 天给细胞换液, 再培养 24 h, 在荧光显微镜下观察病毒感染情况. 带有 GFP 绿色荧光的细胞即为病毒感染成功的细胞.

1.2.9 检测内源 mFSP27 蛋白表达量的变化. 将病毒感染和未经病毒感染的 3T3-L1 分别接种在 6 cm 的培养皿中, 诱导分化至第 10 天. 用 RIPA 缓冲液裂解细胞, 超声破碎后 13 000 g 离心 30 min 收集上清. 蛋白质定量, SDS-PAGE, 转印 PVDF 膜, 用抗 mFSP27 的抗体做蛋白质印迹, 检测内源 mFSP27 蛋白表达量的变化, 用抗 FABP 和抗 perilipin 的抗体检测细胞分化水平, 并用抗 tubulin 的抗体检测 tubulin 的含量作为上样量的对照.

2 结 果

2.1 siRNA 表达质粒的鉴定结果

重组后的 pSilencer-siFSP27-270 质粒通过 DNA 测序筛选阳性克隆. DNA 测序结果表明, 我们所获得的 siRNA 与预期结果相符 (图 2).

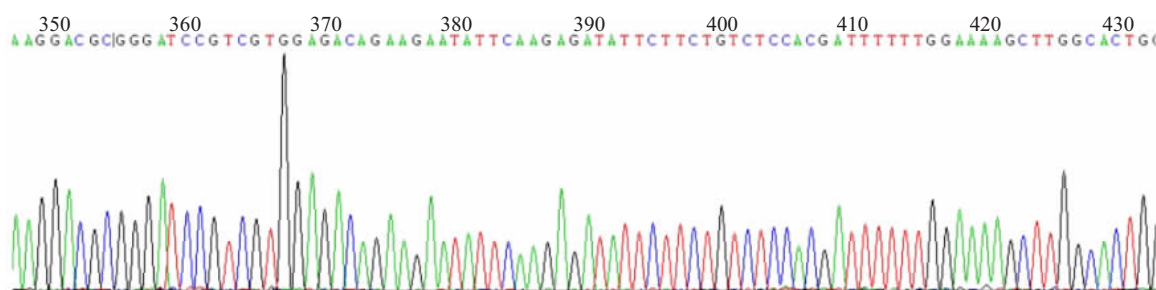


Fig. 2 DNA sequencing result of the pSilencer-siFSP27-270 (partial)

2.2 siRNA 效率的检测

用蛋白质印迹检测 293T 中单独转染 pCMV5-HA-mFSP27 及将 pCMV5-HA-mFSP27 与不同量的 pSilencer-siFSP27-270 共同转染后细胞中的 FSP27 表达量. 从图 3 中可以看到, 所合成的 siRNA 对于 mFSP27 表达有很强的抑制作用, 当加入 4 μg siRNA 后, 可以完全抑制 mFSP27 的表达. 阴性对照为不转质粒的细胞.

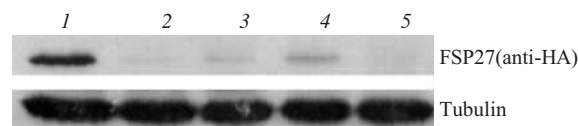


Fig. 3 Western blotting analysis of the efficiency of siRNA of mFSP27

1: pCMV5-HA-mFSP27 1 μg; 2: pCMV5-HA-mFSP27 1 μg + pSilencer-siFSP27-270 0.5 μg; 3: pCMV5-HA-mFSP27 1 μg + pSilencer-siFSP27-270 1 μg; 4: pCMV5-HA-mFSP27 1 μg + pSilencer-siFSP27-270 2 μg; 5: pCMV5-HA-mFSP27 1 μg + pSilencer-siFSP27-270 4 μg.

2.3 重组慢病毒表达载体的鉴定结果

将 pSilencer-siFSP27-270 中的 U6-siRNA 用 *Hind*Ⅲ 和 *Eco*R I 酶切, Klenow 补平粘性末端, 克隆至 FG12 载体中, 构成重组慢病毒表达载体 FG12-siFSP27-270, 并用 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切鉴定. *Xba* I 位于 FG12 载体上, siRNA box 的 5' 端, 而 *Bam*H I 位于 siRNA box 的 3' 端, 因此 siRNA box 正向插入的阳性克隆可以释放出大小约 400 bp 的片段, 剩余的 FG12 载体大小约为 10 kb, 而反向插入克隆及空载体则不会有片段放出. 图 4 中的带 1 为正确重组的 FG12-siFSP27-270.



Fig. 4 Identification of recombinant FG12-siFSP27-270 by digestion of *Xba* I and *Bam*H I

1: Recombinant FG12-siFSP27-270 with U6-siRNA box correctly inserted; 2: Empty vector of FG12 without U6-siRNA inserted; 3: 1 kb DNA ladder; 4: 100 bp DNA ladder.

2.4 慢病毒滴度测定

用磷酸钙法将慢病毒载体系统中的 4 种质粒转入包装细胞中, 荧光显微镜下可见大量绿色荧光, 说明载体成功转入 293T. 转染 48 h 和 72 h 收集颗粒含有病毒的上清 460 ml 浓缩纯化病毒, 并用 293T 细胞检测病毒滴度, 最终得到 600 μ l 滴度为 2.36×10^4 TU/ μ l 的病毒.

2.5 慢病毒感染靶细胞的效率

用 100 μ l 病毒感染 3T3-L1, 24 h 后可见 90% 以上的 3T3-L1 带有 GFP 绿色荧光, 说明病毒可以有效地感染 3T3-L1, 效率不低于 90%. 感染的细胞经传代 2~5 次后, 以及诱导分化, 该荧光均未见减弱, 说明慢病毒感染后, 目的基因成功整合到 3T3-L1 细胞的基因组. 图 5 为 3T3-L1 诱导分化以后, 20 倍显微镜下可以看到积累的脂肪滴(图 5a),

在荧光显微镜中观察, 大于 90% 的细胞带有绿色荧光(图 5b).

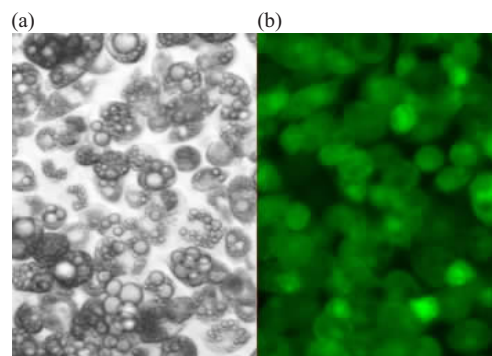


Fig. 5 Differentiation of 3T3-L1 after infecting by lentivirus

(a) Morphology of lipid droplets in 3T3-L1 after differentiation (20 $\times$).

(b) GFP fluorescence in 3T3-L1 (20 $\times$).

2.6 siRNA 对于内源靶蛋白的抑制效率

3T3-L1 分化至第 10 天, 用蛋白质印迹检测细胞内源 mFSP27 的表达量, 并用未分化的细胞(D0)作为对照. 从图 6 中可以看到, 分化到第 10 天的 3T3-L1 中产生了大量内源的 mFSP27, 但是经过慢病毒感染的细胞中由于有 siRNA 的表达, mFSP27 蛋白量显著下降, 说明慢病毒介导 siRNA 可以建立起稳定的小鼠 FSP27 基因沉默的 3T3-L1 细胞系. 同时检测分化相关的基因 FABP 和脂肪滴上的结构蛋白 perilipin, 两者在正常细胞和用慢病毒感染细胞中的表达没有明显区别, 说明慢病毒的感染及 siRNA 的表达并不影响细胞的正常分化.

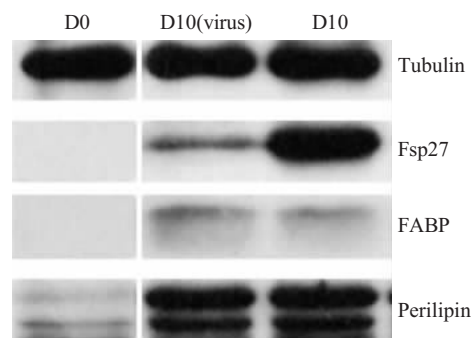


Fig. 6 Western blotting analysis of the efficiency of siRNA of endogenous mFSP27

3 讨 论

近年来, CIDE 家族蛋白在细胞凋亡, 脂肪和能量代谢方面均具有明显的作用, 正逐渐受到广泛的关注^[5]. 而 mFSP27 在脂肪细胞特异表达这一特点表明, 其在脂肪组织的分化和形成过程中可能具有

重要的作用, 但是其具体功能和分子机制目前仍不清楚. 因为过量表达 CIDE 家族蛋白将引起不同程度的细胞凋亡^[4], 在细胞系中过表达蛋白来研究分子机制的方法受到了很大的局限, 相反, 沉默敲除或者再恢复 mFSP27 来研究其下游调节基因表达变化和生物学特性的改变, 是备受重视的研究思路. 小鼠 FSP27 基因沉默的前脂肪细胞系的建立, 将为该基因功能的研究奠定必要的基础, 通过观察细胞的形态变化, 下游基因改变, 我们期待对于脂肪细胞的分化机制有进一步的了解, 并且期待应用这一模型开发新的针对糖尿病和肥胖症的新药物靶点.

随着近年来的发展, RNAi 技术成为特异性高效地沉默细胞内基因表达的重要工具^[9], 广泛应用于基因功能分析和基因治疗领域. 筛选特异性的高效的 siRNA 序列是 RNAi 技术的前提条件, 需要经过严密的设计和不断的实验检验, 在 FSP27 基因的 siRNA 筛选过程中我们发现: a. 虽然 siRNA 的效率与其在靶基因上的位置并没有特定的关系, 但是我们所设计的 6 对在靶基因上均匀分布的 siRNA, 位于基因中段偏前的 siRNA 效率相对较高; b. siRNA 中 G/C 含量在 30%~50% 之间时, 沉默效率比较高; c. 当 siRNA 的 3' 端突出碱基为 UU 时, 其基因抑制效率最高, 但是 3' 端突出碱基不能为 G, 因为 RNase 会降解以 G 为末尾的 RNA 单链; d. siRNA 中应避免 3 个以上的连续 G 和 C, 因为会降低双链 RNA 的稳定性, 同时也应避免 3 个以上 U 和 A, 可能会终止由 RNA 聚合酶 III 介导的转录^[10].

高效的转染系统是建立 FSP27 基因沉默前脂肪细胞的另一个重要方面. 小鼠来源的前脂肪细胞系 3T3-L1 在分化以后能够产生内源的 mFSP27^[7], 因此成为研究 mFSP27 功能的靶细胞. 但细胞系的独特性也为建立 mFSP27 沉默的细胞系设置了障碍. 首先, 该细胞系对于各种转染试剂不敏感, 用磷酸钙转染或脂质体转染效率在 10% 以下; 其次, 该细胞系不能无限传代, 其诱导分化的效率将随着传代时间的增加而降低, 利用转染筛选单克隆的方法也受到很大的局限^[11]. 来源于人类免疫缺陷病毒 -1 (HIV-1) 的慢病毒载体, 在建立 siRNA 介导的 mFSP27 沉默的细胞系中起到了重要的作用.

慢病毒载体与其他几种常用的病毒载体相比较具有很大的优势. 逆转录病毒体积大, 不能穿透核膜, 因此只能感染分裂期细胞^[12]; 其病毒滴度低,

感染效率低; 容纳外源基因的 DNA 片段长度不超过 8 kb; 腺病毒载体感染细胞时, 病毒 DNA 并不整合到染色体上, 因此在体内不能实现稳定的长期表达, 另外腺病毒容易引起免疫反应, 因而这 2 类病毒载体在本实验中都受到一定的限制. 慢病毒载体最大的特点是可以感染分裂期及非分裂期细胞, 容纳外源目的基因的片段大, 可以在体内长期地表达, 免疫反应小, 安全性较好^[13]. 因此, 慢病毒包装体系生成复制缺陷的慢病毒重组体, 能够高效地感染 3T3-L1 细胞, 得到的细胞群作为一个整体, 可以正确地了解 mFSP27 的功能. 同时, 慢病毒将 U6-siRNA box 整体插入到细胞基因中, 形成稳定的表达, 不会在传代和分化过程中丢失, 对于研究 mFSP27 在细胞内的作用奠定重要的物质基础.

致谢 感谢新加坡分子细胞中心 Zilong Wen 博士惠赠 FG12、pMDLg/pRRE、pREV-Rev、pVSVG 质粒, 感谢叶菁博士在论文写作过程中的帮助.

参 考 文 献

- 1 Inohara N, Koseki T, Chen S, *et al.* CIDE, a novel family of cell death activator with homology to the 45 kDa subunit of DNA fragmentation factor. *EMBO J*, 1998, **17** (9): 2526~2533
- 2 Liang L, Zhao M, Xu Z, *et al.* Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation. *Biochem J*, 2003, **370** (1): 195~203
- 3 Chen Z, Guo K, Toh S Y, *et al.* Mitochondria localization and dimerization are required for CIDE-B to induce apoptosis. *J Biol Chem*, 2000, **275** (30): 22619~22622
- 4 Iwahana H, Yakymovych I, Dubrovskaya A, *et al.* Glycoproteome profiling of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: nonglycosylated cell death-inducing DFF-like effector A inhibits TGFbeta1-dependent apoptosis. *Proteomics*, 2006, **6** (23): 6168~6180
- 5 Zhou Z, Toh S Y, Chen Z, *et al.* Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet*, 2003, **35** (1): 49~56
- 6 Nordstrom E A, Ryden M, Backlund E C, *et al.* A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. *Diabetes*, 2005, **54** (6): 1726~1734
- 7 Danesch U, Hoeck W, Ringold G M. Cloning and transcriptional Regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. *J Biol Chem*, 1992, **267** (10): 7185~7193
- 8 Williams P M, Chang D J, Danesch U, *et al.* CCAAT/enhancer binding protein expression is rapidly extinguished in TA1 adipocyte cells treated with tumor necrosis factor. *Mol Endocrinol*, 1992, **6**: 1135~1141
- 9 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of

- 21-nucleotide RNAs interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, **441** (6836): 494~498
- 10 张美红, 周克元. 小干扰 RNA 的合理设计. 肿瘤防治研究, 2006, **33** (11): 837~839
- Zhang M H, Zhou K Y. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2006, **33** (11): 837~839
- 11 Orlicky D J, Schaack J. Adenovirus transduction of 3T3-L1 cells. J Lipid Res, 2001, **42** (3): 460~466
- 12 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. Cancer Cell, 2002, **2** (3): 243~247
- 13 Naldini L, Blomer U, Gallay P, *et al.* *In vivo* gene delivery and stable transduction fo nondividing cells by a lentiviral vector. Curr Opin Biotechnol, 1998, **9** (5): 457~463

Establishment of FSP27 Gene Knockdown Preadipocyte Cell Line*

YAO Hui-Lan, LI Peng**

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Obesity and its related metabolic diseases become major health problems in the world. Adipose tissue plays an important role in the development of obesity. FSP27, a member of the CIDE family proteins, is expressed at high levels in white adipose tissue and differentiated 3T3L1 cells. The objective of current study is to establish a FSP27 knockdown preadipocyte cell line to investigate the *in vivo* function of mouse FSP27. The double strand siRNA of mouse FSP27 corresponding to nucleotides 270 to 291 was synthesized and inserted into pSilencer2.1. pSilencer-siFSP27 was co-transfected into 293T cells with the HA-mFSP27 expression vector to test its knock-down efficiency. The FSP27 siRNA was then transferred to a lentiviral vector. Lentivirus were generated and used to infect 3T3-L1 cells. It was shown here that lentivirus containing FSP27siRNA can effectively knockdown FSP27 expression in 3T3-L1 cells. Establishment of FSP27 knock-down cell line provides a useful tool for the study of *in vivo* function FSP27.

Key words lentivirus vector, siRNA, cell death-inducing DFF45-like effectors(CIDE), FSP27, 3T3-L1 cell line

*This work was supported by a grant from The Key Knowledge Innovation Project of MOE (704002).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62797121, E-mail: li-peng@mail.tsinghua.edu.cn

Received: January 22, 2007 Accepted: March 2, 2007