

两种高效 RNA 干扰载体系统的构建及应用*

杨明 付汉江 铁轶 朱捷 江红 郑晓飞**

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 在真核细胞基因功能研究中, RNA 干扰 (RNAi) 已成为一种强有力的选择性沉默基因表达的实验工具. 建立一套可在哺乳动物培养细胞中高效、经济地表达 siRNA 的载体系统是 RNA 干扰研究的必要前提之一. 从 HepG2 细胞基因组 DNA 中克隆得到 H1 全长启动子 (374 bp), 以之为基础构建了两套 RNA 干扰载体系统, pSL 和带有绿色荧光蛋白 (EGFP) 标签的 pESL, 并对 p53 基因进行了相应的 RNA 干扰研究. 干涉质粒瞬时转染 HepG2 细胞后, 分别利用半定量 RT-PCR 和蛋白质印迹检测 p53 表达水平. 与商品化载体 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 相比, pSL 和 pESL 对 p53 基因表达具有更高的干涉效率. 结果显示: 干涉载体 pSL 和 pESL 能高效特异地下调目的基因表达, 可作为哺乳动物中基因功能分析的有效工具.

关键词 RNA 干扰, H1 启动子, p53 基因

学科分类号 Q782

基因组计划的完成使人类深入理解自身生理和病理分子基础的梦想成为可能. 但是直到目前, 仍有至少 15 000 个到 35 000 个已知人类基因的功能还不清楚^[1]. 为了加强人类对自身生物学过程的了解, 以及为制药工业提供更多新的药物靶点, 对这些未知功能基因进行功能研究已显得越来越重要. RNA 干涉方法的应用已经极大地影响了基因功能研究的方式^[2-3]. 目前, RNA 干涉的具体应用策略主要有两种: 其一, 直接向细胞中转染 siRNA (化学合成或体外转录)^[4-6]; 其二, 通过向细胞中转入可内源性表达 siRNA 或 shRNA 的载体系统 (质粒或病毒载体), 间接表达 siRNA^[7-11]. 其中, 前者因为 siRNA 的高成本及干涉效率的瞬时性, 其应用受到极大地限制. 因此, 载体策略已逐渐成为进行 RNAi 研究的首选.

与核酸和反义核酸表达载体的构建类似, RNA 干涉载体的构建主要采用 RNA 聚合酶 III (Pol III) 启动子. Pol III 启动子共分为三类, 其中第三类 (Type III) 启动子 (包括 H1 和 U6 启动子), 由于可在人类细胞中高水平地表达目的 RNA 分子, 以及其所有的顺式作用元件皆位于待转录物的 5' 外侧区域^[12, 13], 因此非常适于 RNA 干涉载体的构建. 但是, 因为 U6 启动子要求待转录物的第一个核苷酸为鸟嘌呤核苷酸, 所以在 RNA 干涉序列的选择上就有了很大的局限性, 尤其对于 mRNA 序列较短的基因局限更为明显. H1 启动子则不存在上

述限制. 因此, 相比之下, H1 启动子更适于 RNA 干涉载体的构建. 本实验正是基于以上考虑, 利用全长 374 bp 的 H1 启动子序列构建了两种 RNA 干涉载体 pSL 和带有绿色荧光蛋白 (EGFP) 标签的 pESL. 以 RNA 干涉 p53 基因为例, 并以只包含 H1 启动子末端 100 bp 序列的商品化载体 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 为阳性对照, 验证了 pSL 和 pESL 的干涉效率. 实验结果表明, pSL 和 pESL 不但能够高效地抑制目的基因的表达, 而且与 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 相比, 具有更高的干涉效率. 干涉载体 pSL 和 pESL 的成功构建为下一步其他基因的基因沉默及功能研究打下良好的基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种. pEGFP-C1 载体购自 Clontech 公司. pSilencer™ 3.1-H1 hygro (Ambion 公司产品) 由本室钱俊杰博士馈赠. pGH-T 载体由本室自制, 详见文献[14]. 大肠杆菌 DH5 α 由本室自存.

*国家重点基础研究发展规划项目(973) (2002CB513103) 和自然科学基金资助项目(30200073).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931237, E-mail: zhengxf@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-11-12, 接受日期: 2004-12-31

1.1.2 细胞与主要试剂. HepG2 细胞系购自中国科学院细胞库. 各种限制性内切酶, rTaq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶及绿豆芽核酸酶均购自大连宝生物公司. pfuTaq DNA 聚合酶和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒皆购自北京天为时代科技有限公司. 质粒提取试剂盒和 ImProm- II™ 反转录酶均为 Promega 公司产品. Trizol 试剂及 Lipofectamine 2000 转染试剂皆购自 Invitrogen 公司. 硝酸纤维素膜为 Amersham pharmacia 公司产品. 抗 P53 蛋白鼠单克隆抗体及抗 Actin 蛋白山羊多克隆抗体皆购自 Santa Cruz 公司. 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗羊 / 鼠二抗为北京中山公司产品. ECL 检测试剂盒购自 Pierce 公司. 所有引物均为北京三博远志生物技术公司产品. 序列测定由上海博亚生物技术公司完成.

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞基因组 DNA 的提取. 收集 10^6 个细胞, 加入 400 μ l 裂解液 (10 mmol/L Tris pH 8.0, 0.1mol/L EDTA, 0.5% SDS), 充分混匀后加入蛋白酶 K 至终浓度 0.1 g/L, 37℃ 保温过夜. 次日, 等体积 Tris 饱和酚抽提 2 次后, 等体积氯仿 / 异戊醇 (24:1) 抽提 1 次. 上清加入等体积的异丙醇, 于 -20℃ 沉淀过夜. 次日, 12 000 g 离心 10 min, 70% 乙醇洗沉淀, 离心后室温干燥. 最后, 加入 50 μ l 含 20 mg/L RNase 的 TE 溶解沉淀, 定量, 并于 -20℃ 保存备用.

1.2.2 引物的设计. 引物 1 和 2 (primer 1 和 2) 用于从 HepG2 基因组 DNA 中克隆 H1 启动子, 正向引物 primer 1: 5' TTA TAG GGA GCT GAA GGG AAG GGG GTC ACA 3', 反向引物 primer 2: 5' GGG AAA GAG TGG TCT CAT ACA GAA CTT

ATA 3'. 引物 3 和 4 (primer 3 和 4) 用于从质粒 pGH-T-H1 中克隆 H1 启动子, 并在 H1 启动子上游增加一段 T7 引物序列, 正向引物 primer 3: 5' GAAGATCTTAA TA CGACTCACTA TAGGGTTATAG GGAGCTGAA GGGAAG 3' (下划线为 *Bgl* II 位点; 斜体为 T7 引物序列), 反向引物 primer 4: 5' AAAACTGCAG CCCGGGAAAGAGTGGTCTCAT ACAGAACTTATAAGA 3' (前后两下划线分别为 *Pst* I 和 *Sma* I 位点). 引物 5 和 6 (primer 5 和 6) 用于从 pEGFP-C1 质粒中克隆 SV40-polyA, 正向引物 primer 5: 5' GAAGATCTAGATAACTGATC TAATCAGCCATACCACATTTG 3' (*Bgl* II), 反向引物 primer 6: 5' CGAAGCTTTTACGCGTTAA GATACATTG ATG 3' (*Hind* III).

1.2.3 干涉载体 pSL 和 pESL 的构建. 从 HepG2 基因组 DNA 中克隆 H1 启动子, PCR 产物连入 pGH-T 载体得 pGH-T-H1. 以之为模板利用引物 3 和 4 进行 PCR 扩增, 产物经 *Bgl* II 和 *Pst* I 双酶切后, 与经 *Bam* H I 和 *Pst* I 双酶切的 pEGFP-C1 连接, 构建成 pEH. pEH 先经 *Ase* I 和 *Bgl* II 双酶切, 再利用绿豆芽核酸酶 (MB nuclease) 削平黏性末端, 然后自身环化连接, 构建成干涉载体 pSL. 同时, 以 pEGFP-C1 为模板利用引物 5 和 6 扩增得 SV40-polyA 序列片段, 后者经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切后连入 pEH 的上述酶切位点, 构建成干涉载体 pESL.

1.2.4 针对 p53 基因的干涉质粒构建. 合成针对 p53 基因的 siRNA 模板 DNA 片段 p53i 和 Ap53i^[7] 及与之相对应的无关序列片段 sc-p53i 和 sc-Ap53i (表 1). 将 p53i 及 sc-p53i 的正义和反义链退火后, 连入经 *Sma* I 和 *Hind* III 双酶切的 pSL 和 pESL 中, 构建

Table 1 Sequences of hairpin siRNA template oligonucleotides and their scrambled sequences

Name	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
p53i	GACTCCAGTGGTAATCTACTTCAAGAGAGTAGATTACC ACTGGAGTCTTTTAA	AGCTTAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTCTCTTGAA GTAGATTACCACTGGAGTC
sc-p53i	ACTACATGGACTCTTGGCATTCAAGAGATGCCAAGAGT CCATGTAGTTTTTAA	AGCTTAAAAAACTACATGGACTCTTGGCATCTCTTGAA TGCCAAGAGTCCATGTAGT
Ap53i	GATCCGACTCCAGTGGTAATCTACTTCAAGAGAGTAGA TTACCACTGGAGTCTTTTAA	AGCTTAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTCTCTTGAA GTAGATTACCACTGGAGTCG
sc-Ap53i	GATCCACTACATGGACTCTTGGCATTCAAGAGATGCCA AGAGTCCATGTAGTTTTTAA	AGCTTAAAAAACTACATGGACTCTTGGCATCTCTTGAA TGCCAAGAGTCCATGTAGT

成干涉质粒 pSL-p53i 和 pESL-p53i 及对照质粒 pSL-sc-p53i 和 pESL-sc-p53i. 将 Ap53i 及 sc-Ap53i 的正义和反义链退火后, 连入经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 中, 构建成干涉质粒 pSilencer-p53i 及对照质粒 pSilencer-sc-p53i.

1.2.5 干涉质粒及对照质粒的转染. 将 HepG2 细胞按 3×10^5 个 / 孔种于六孔细胞培养板中, 当细胞 80% 融合时, 参照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书分别转染质粒 pSL-p53i, pSL-sc-p53i, pESL-p53i, pESL-sc-p53i 及 pSilencer-p53i 和

pSilencer-sc-p53i. 转染时, 质粒与 Lipofectamine 2000 的比例按 1:2 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 进行.

1.2.6 p53 基因 mRNA 表达水平的检测. HepG2 细胞转染后 48 h 提取总 RNA, 定量 1 μg , 并利用 Oligo(dT)反转录得 cDNA. 利用 p53 和 β -actin 特异引物 (表 2) 扩增 cDNA 条带, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 并利用 AlphaImager™ 1220 凝胶成像分析系统进行光密度扫描, 比较转染不同质粒细胞的 p53 基因在 mRNA 水平上的表达差异.

Table 2 Sequences of primers for RT-PCR

Gene	Primer(sense) (5'→3')	Primer(antisense) (5'→3')
p53	CAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC	CTATGTCGAAAAGTGTTCCTGTCATC
β -actin	GGCATCGTGATGGACTCCG	GCTGGAAGGTGGACAGCGA

1.2.7 p53 基因蛋白质表达水平的检测. 转染后 48 h 收集细胞, 裂解, Bradford 法蛋白质定量后进行蛋白质印迹实验. 取 80 μg 蛋白质, 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移至硝酸纤维素膜. 分别用 P53 和 Actin 一抗孵育 1.5 h 后, 相应二抗孵育 2 h, ECL 检测.

1.2.8 统计分析. 实验结果采用 SAS8.0 软件进行统计学分析, 用方差分析各实验组之间的差别.

2 结 果

2.1 H1 启动子的克隆

从 HepG2 基因组 DNA 中克隆 H1 启动子全长序列^[12], PCR 产物连入 pGH-T 载体得 pGH-T-H1. *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pGH-T-H1 可得与目的片段大小相符的片段. 测序后, 证明序列无误(图 1).

2.2 干涉载体 pSL 和 pESL 的构建

pEH 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切后, 阳性克隆应有 250 bp 的目的片段, 经测序正确后, 用于下步实验. pSL 正确重组子经 *Nco* I 酶切后, 应得 1.8 kb、1.6 kb 和 0.7 kb 3 个片段, 经测序无误后用于下步实验. pESL 经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切后,

阳性克隆应得 250 bp 的目的片段, 测序正确后用于下步实验 (图 2 和图 3).

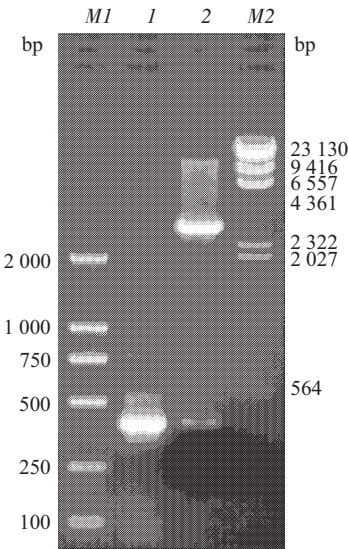


Fig.1 Cloning of H1 promoter

M1: DL2000 marker; M2: λ -*Hind* III digest DNA marker; 1: PCR products of H1 promoter; 2: digested products of pGH-T-H1 with *Bam*H I and *Hind* III.

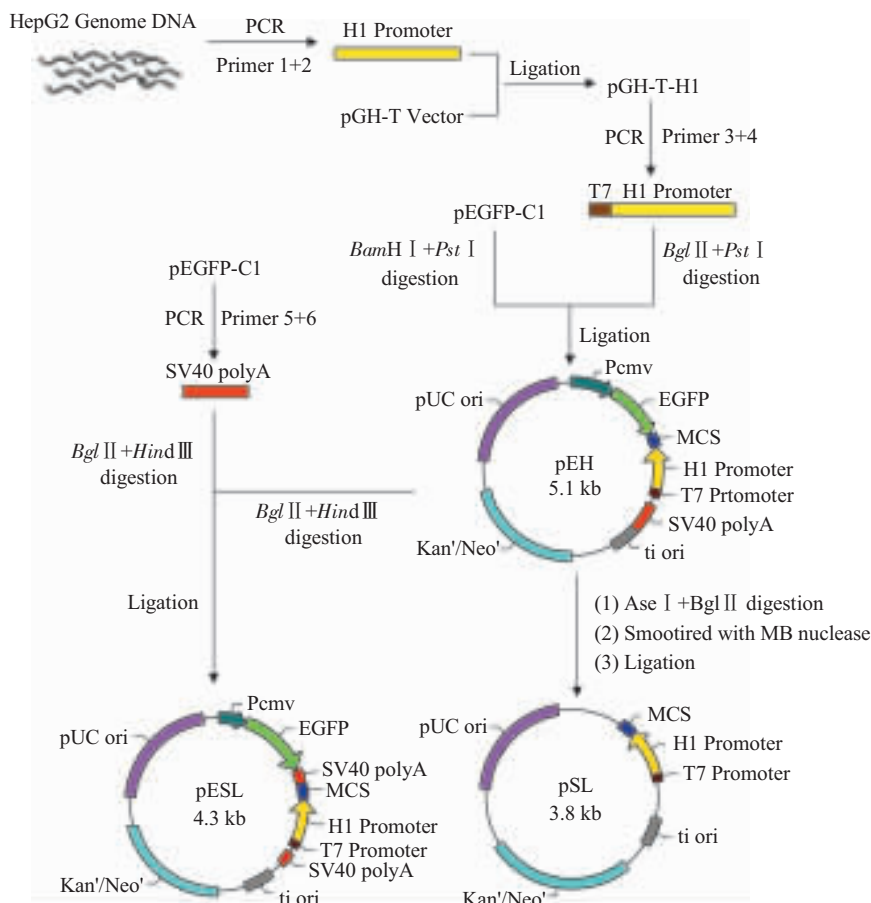


Fig.2 Construction of pSL and pESL

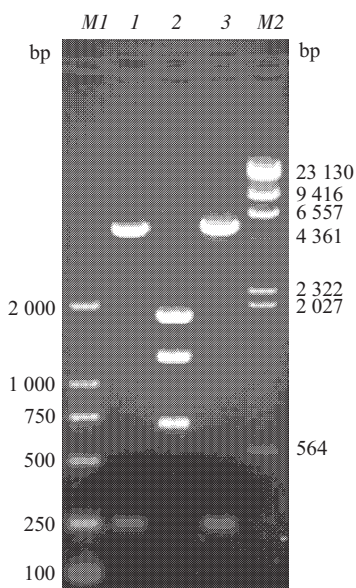


Fig.3 Restriction endonuclease analysis of pEH, pSL and pESL

M1: DL2000 DNA marker; M2: λ -Hind III digest DNA marker; 1: digested products of pEH with *EcoR* I and *Hind* III; 2: digested products of pSL with *Nco* I; 3: digested products of pESL with *Bgl* II and *Hind* III.

2.3 针对 p53 基因的干涉质粒构建

由于 siRNA 模板 DNA 片段连入 pSL 和 pESL 后, pSL 和 pESL 中的 *Sma* I 位点消失, 因此利用 *Hind* III 及 H1 启动子中的 *EcoR* I 位点进行酶切鉴定, 阳性质粒应切出 290 bp 的目的片段. 而连入 siRNA 模板 DNA 片段的 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 质粒, 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 正确重组子切出 3.2 kb、1.2 kb 和 160 bp 的目的片段. 重组质粒 pSL-p53i, pSL-sc-p53i, pESL-p53i, pESL-sc-p53i 及 pSilencer-p53i 和 pSilencer-sc-p53i 经测序分析无误后, 用于下步实验 (图 4).

2.4 干涉质粒及对照质粒的转染效率检测

在转染细胞进行 p53 基因 mRNA 及蛋白质表达水平的检测前, 利用倒置荧光显微镜观察 pESL-p53i 和 pESL-sc-p53i 的转染效率 (其余 4 种质粒的转染效率可为参照), 有荧光标记的细胞阳性率可达 80%, 这说明干涉及对照质粒可大量有效地进入 HepG2 细胞 (图 5).

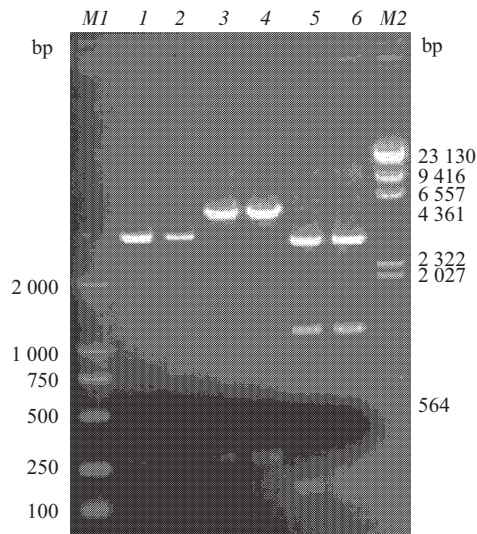


Fig.4 Restriction endonuclease analysis of RNAi plasmids
M1: DL2000 DNA marker; M2: λ -Hind III digest DNA marker; 1~6: digested products of recombinant plasmids with *EcoR* I and *Hind* III; 1: pSL-p53i; 2: pSL-sc-p53i; 3: pESL-p53i; 4: pESL-sc-p53i; 5: pSilencer-p53i; 6: pSilencer-sc-p53i.

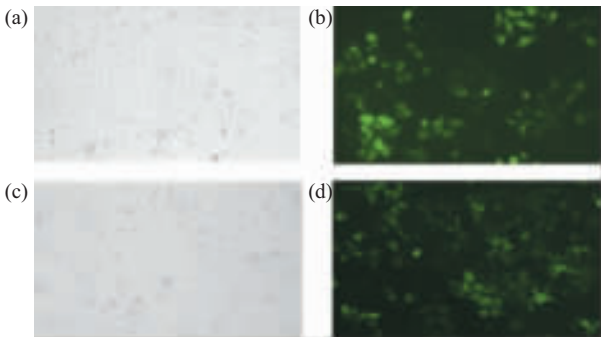


Fig.5 HepG2 cells transfected with pESL-p53i and pESL-sc-p53i (48 h after transfection)
(a), (b) (The same field of vision) pESL-p53i transfected; (c), (d) (The same field of vision) pESL-sc-p53i transfected ($\times 200$).

2.5 p53 基因 mRNA 表达水平的检测

半定量 RT-PCR 扩增出 p53 基因特异 cDNA 条带, 同时, 以相同体系扩增 β -actin 作为内对照 (引物序列参见表 2). 细胞内源的 β -actin 基因片段条带的亮度强弱相似, 证明 RT-PCR 的模板量一致. 光密度扫描结果表明, 空细胞与 pSL-sc-p53i、pESL-sc-p53i 及 pSilencer-sc-p53i 转染细胞四者的 p53 mRNA 表达量之间无显著性差异 ($P>0.05$). 与 pSL-sc-p53i 转染细胞相比 pSL-p53i 转染细胞 p53 基因 mRNA 表达的抑制率平均可达 87.66%, 与 pESL-sc-p53i 转染细胞相比 pESL-p53i 转染细胞

p53 基因 mRNA 表达的抑制率平均可达 81.53%, 而与 pSilencer-sc-p53i 转染细胞相比 pSilencer-p53i 转染细胞 p53 基因 mRNA 表达的抑制率平均只有 69.86%. 相同实验皆重复 3 次, 结果取平均值 (图 6).

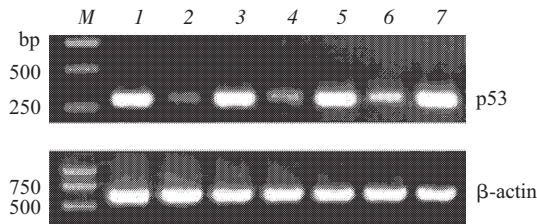


Fig.6 Determination of p53 mRNA expression using semi-quantitative RT-PCR in HepG2 cell transfected with RNAi plasmids and their control plasmids
1~7: HepG2 cDNA amplification by semi-quantitative RT-PCR using p53 and β -actin primers. M: DL2000 marker; 1: from normal HepG2 cells; 2~7: from HepG2 cells transfected with pSL-p53i, pSL-sc-p53i, pESL-p53i, pESL-sc-p53i, pSilencer-p53i and pSilencer-sc-p53i respectively.

2.6 p53 基因蛋白质表达水平的检测

实验结果显示, 细胞内源的 Actin 条带亮度强弱相近, 证明蛋白质印迹实验中蛋白质上样量一致. 光密度扫描结果表明, 空细胞与 pSL-sc-p53i、pESL-sc-p53i 及 pSilencer-sc-p53i 转染细胞四者的 P53 表达量之间无显著性差异 ($P>0.05$). 与 pSL-sc-p53i 转染细胞相比 pSL-p53i 转染细胞 P53 表达的抑制率平均可达 85.64%, 与 pESL-sc-p53i 转染细胞相比, pESL-p53i 转染细胞 P53 表达的抑制率平均可达 80.78%, 而与 pSilencer-sc-p53i 转染细胞相比, pSilencer-p53i 转染细胞 P53 表达的抑制率平均只有 70.38%. 与半定量 RT-PCR 分析所得的结论相同. 相同实验皆重复 3 次, 结果取平均值 (图 7).

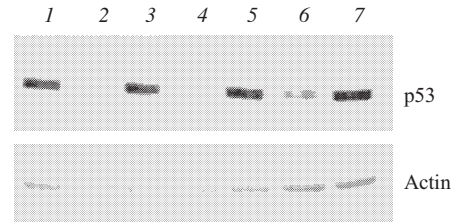


Fig.7 Determination of P53 expression using Western blotting in HepG2 cell transfected with RNAi plasmids and their control plasmids
1~7: HepG2 protein amplification by Western blotting using antibody of P53 and Actin. 1: from normal HepG2 cells; 2~7: from HepG2 cells transfected with pSL-p53i, pSL-sc-p53i, pESL-p53i, pESL-sc-p53i, pSilencer-p53i and pSilencer-sc-p53i respectively.

3 讨 论

从进化的角度讲, RNA 干涉代表着一种细胞自身抵抗病毒感染和转座子跳动的防御机制. 作为一种基因沉默的工具, RNA 干涉代表着一种能够应用于病毒性治疗疾病和基因功能研究的新技术. 然而, 直接应用 siRNA 的高昂费用及其作用的瞬时性使 RNA 干涉技术的进一步应用受到限制. 于是, 利用载体法在体内表达 siRNA 成为研究者的普遍选择. 在本实验中, 我们构建了两种高效、方便、经济和稳定的 RNA 干涉系统: pSL 和 pESL, 这为进一步的 RNA 干涉和基因功能研究打下了良好的基础.

pSL 和 pESL 是基于 H1 启动子全长序列 (374 bp) 构建的, 与商品化载体 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 相比具有更高的干涉效率. pSL 和 pESL 与 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 相比在启动子结构上主要有两点不同: a. pSL 和 pESL 的 H1 启动子为全长序列, 而 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 只包含 H1 启动子末端的 100 bp 序列; b. pSL 和 pESL 的 H1 启动子 3' 端为野生型, 未作任何改动, 但 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 3' 端的 6 个核苷酸被改构成 BamH I 位点. 可能正是由于以上原因, pSL 和 pESL 较之 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 具有更高的干涉效率.

pSL 和 pESL 干涉载体在 H1 启动子 3' 端的平端设计也使实验更加方便和经济. 在载体设计时, 我们注意到, H1 启动子 3' 端为 3 个连续的胞嘧啶. 因此, 我们在干涉载体中已有的 3 个胞嘧啶之后又人为地加上 3 个鸟嘌呤, 正好构成了一个 Sma I 的酶切位点. 这种设计不但没有改变 H1 启动子的序列, 而且使合成的 RNAi 模板寡核苷酸的长度更短, 从而降低了实验成本.

就 pESL 干涉载体而言, 由于其带有 EGFP 标签, 故可在转染后很方便地观察转染效率. 这有利于实验的重复性. 但是, 可能正是因为带有 EGFP 标签的缘故, pESL 的干涉效率略低于 pSL.

另外, pSL 和 pESL 还具有以下优点. 例如, 位于 H1 启动子上游的 T7 引物序列使构建干涉质粒时的测序工作更为方便; 载体自身较短的长度使之具有了较高的转染效率; 载体骨架上的 neo^r 基因使转染后筛选特异基因稳定抑制的细胞株成为可能.

本实验构建了两种高效、方便、经济和稳定的 RNA 干涉载体系统: pSL 和 pESL, 并验证了其干涉效果. 这为进一步针对不同基因进行 RNA 干涉和功能研究提供了重要工具.

参 考 文 献

- 1 Saha S, Sparks A B, Rago C, *et al.* Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (5): 508~512
- 2 Paddison P J, Hannon G J. RNA interference: the new somatic cell genetics?. *Cancer Cell*, 2002, **2** (1): 17~23
- 3 McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 2002, **3** (10): 737~747
- 4 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411** (6836): 494~498
- 5 Yang D, Buchholz F, Huang Z, *et al.* Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (15): 9942~9947
- 6 Cao M, Ren H, Pan X, *et al.* Inhibition of EGFP expression by siRNA in EGFP-stably expressing Huh-7 cells. *J Virol Methods*, 2004, **119** (2): 189~194
- 7 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, **296** (5567): 550~553
- 8 Paul C P, Good P D, Winer I, *et al.* Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (5): 505~508
- 9 闫歌, 蒲丹, 唐霓, 等. RNA 干扰技术对肝癌细胞内源 survivin 基因表达的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (9): 829~833
Yan G, Pu D, Tang N, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (9): 829~833
- 10 Barton G M, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (23): 14943~14945
- 11 Arts G J, Langemeijer E, Tissingh R, *et al.* Adenoviral vectors expressing siRNAs for discovery and validation of gene function. *Genome Res*, 2003, **13** (10): 2325~2332
- 12 Baer M, Nilsen T W, Costigan C, *et al.* Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (1): 97~103
- 13 Myslinski E, Ame J C, Krol A, *et al.* An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29** (12): 2502~2509
- 14 杨明, 付汉江, 江红, 等. 一种高效 T 载体的构建及其对人端锚聚合酶(tankyrase)HPS 结构域的克隆. *军事医学科学院院刊*, 2004, **28** (3): 280~282
Yang M, Fu H J, Jiang H, *et al.* *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2004, **28** (3): 280~282

Construction of Two Highly Efficient RNAi Vectors and Their Application*

YANG Ming, FU Han-Jiang, TIE Yi, ZHU Jie, JIANG Hong, ZHENG Xiao-Fei**

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract RNA interference (RNAi), which could silence specific gene expression post-transcriptionally, has become a powerful tool for identifying gene function in eukaryotic cells. One important approach of RNA interference is to construct a vector system which can direct the synthesis of small interfering RNAs (siRNA) in cultured mammalian cells. The H1 RNA promoter (374 bp) was cloned from HepG2 genome DNA. Two RNAi vector systems, pSL and pESL which has an EGFP gene, were constructed and used to knock down the expression of p53 gene. Then, the mRNA and protein expression of p53 gene were detected by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting after the RNAi plasmids were transiently transfected to the HepG2 cells. It turned out that the RNAi efficiency of pSL and pESL are much higher than that of pSilencerTM 3.1-H1 hygro RNAi vector. Therefore, the data suggested that pSL and pESL RNAi vector systems, which could suppress specific gene expression with high efficiency, are new useful tools to identify gene functions in cultured mammalian cells.

Key words RNA interference (RNAi), H1 promoter, p53 gene

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2002CB513103) and The National Natural Sciences Foundation of China (30200073).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66931237, E-mail: zhengxf@nic.bmi.ac.cn

Received: November 12, 2004 Accepted: December 31, 2004

.....