

山羊 *PTHrP* 基因干扰重组腺病毒的制备与鉴定

邢瑞芳, 郑惠玲, 刘雪梅, 闫林慧, 安俊辉, 杨振宇, 祝珍珍

西北农林科技大学 动物科技学院, 杨凌 712100

摘要: 甲状旁腺激素相关蛋白 (Parathyroid hormone related protein, PTHrP) 具有广泛生物学功能, 对调控钙代谢具有重要作用。采用 RNA 干扰和重组腺病毒技术, 对山羊乳腺上皮细胞中 *PTHrP* 基因表达进行沉默, 为进一步研究该基因在乳腺上皮细胞中的功能奠定基础。采用 BLOCK-iT shRNA 腺病毒干扰系统, 将设计好的寡聚 shRNA-322/357 经退火复性后插入穿梭质粒 pENTR/CMV-GFP/U6 中。经 Western blotting 检测干扰效率后, 选择 pENTR/CMV-GFP/U6-322 与病毒骨架质粒 pAd/PL-DEST 进行同源重组, 成功获得重组干扰腺病毒载体 pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322, 并转染 HEK-293 细胞, 通过包装、扩增后产生干扰重组腺病毒 AD-PTHrP-322, TCID₅₀ 法测定其滴度为 2.0×10^9 PFU/mL。用 AD-PTHrP-322 感染山羊原代乳腺上皮细胞(MOI=200), 经实时定量 PCR 及 Western blotting 检测表明在病毒感染 24 h、48 h 和 72 h 后, 山羊乳腺上皮细胞中 *PTHrP* mRNA 表达量分别下调了 29.2%、68.1% 和 82.6% ($P < 0.05$), 其蛋白表达水平也明显下调, 干扰效果明显。

关键词: 山羊, 甲状旁腺激素相关蛋白, RNA 干扰, 腺病毒

Preparation and identification of recombinant adenoviruses carrying short hairpin RNA targeting parathyroid hormone related protein of goat

Ruifang Xing, Huiling Zheng, Xuemei Liu, Linhui Yan, Junhui An, Zhenyu Yang, and Zhenzhen Zhu

College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: Parathyroid hormone related protein (PTHrP) has important biological functions in calcium metabolism. The aim of this study was to silence the expression of *PTHrP* by RNA interference and recombinant adenovirus, and to provide a material to investigate the relative functions of *PTHrP* in goat mammary gland epithelial cell. The Block-iT shRNA interference system was used in this experiment. We designed and synthesized two pairs of complementary single-strand DNA oligonucleotides (shRNA-322/357) targeting two different sites of *PTHrP* mRNA. Then the oligonucleotides were inserted into

Received: March 24, 2011; **Accepted:** May 18, 2011

Supported by: Key Scientific and Technological Special Program for the Development of Transgenic Species (No. 2009ZX08009-162B), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. Z109021002), Natural Science Foundation of Shannxi Province (No. K332021011).

Corresponding author: Huiling Zheng. Tel/Fax: +86-29-87092164; E-mail: Zheng.huiling@yahoo.com

转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-162B), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. Z109021002), 陕西省自然科学基金 (No. K332021011) 资助。

shuttle vector pENTR/CMV-GFP/U6. After detection of the interference efficiency by Western blotting, we chose pENTR/CMV-GFP/U6-322 and adenovirus backbone vector pAD/PL-DEST to produce recombinant vector pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322. The first generation recombinant adenovirus particles (AD-PTHrP-322) were produced and further amplified by transfecting HEK-293 cells. The titer of the recombinant adenovirus reached 2.0×10^9 PFU/mL determined by TCID₅₀ assays. The result of real-time quantitative PCR indicated that mRNA expression levels of gene were reduced 29.2%, 68.1% and 82.6% ($P < 0.05$), respectively, when goat mammary gland epithelial cells were infected with AD-PTHrP-322 after 24, 48 and 72 h, in which *PTHrP*. Western blotting also showed that the expression of PTHrP was reduced by infecting the cells with AD-PTHrP-322. AD-PTHrP-322 has been proved with significant interference effect on expression of *PTHrP*.

Keywords: goat, parathyroid hormone related protein, RNA interference, adenovirus

甲状旁腺激素相关蛋白 (Parathyroid hormone related protein, PTHrP) 是最初从与高钙血症相关的恶性肿瘤组织中分离得到的一种分泌性蛋白质, 具有与甲状旁腺激素 (Parathyroid hormone, PTH) 相类似的基因结构和生物学活性^[1]。PTHrP 在生命过程中广泛表达, 通过与细胞表面相应的受体相结合发挥内分泌、旁分泌或自分泌作用。具有参与组织器官生长发育, 促进细胞的增殖分化, 影响心肌收缩和心率, 诱导破骨细胞分化和成熟等多种生物学功能^[2-6]。最近研究发现, PTHrP 能抑制细胞的凋亡、促进 VSMC 细胞增生、促进 IL28 的分泌等^[7-8]。哺乳动物在妊娠和泌乳期, 通过从骨向乳汁转移大量钙, 满足幼仔对钙的需求。研究证明乳腺中的 PTHrP 表达量在泌乳期达到峰值, 且血浆中的 PTHrP 水平也随之增加。抑制小鼠乳腺上皮细胞中 *PTHrP* 基因的表达, 将导致血液循环中 PTHrP 水平下降, 骨转移降低, 骨量丢失减少。给山羊注射 PTHrP, 乳腺中的钙含量上升^[9-12]。由此可见, 乳腺中的 PTHrP 在泌乳期间对机体的骨转移和钙代谢有重要作用。但迄今为止, 其中的分子机理并不清楚。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指细胞利用内源性或外源性的双链小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 激发相关的酶复合物对同源性的 RNA 进行切割、降解, 导致细胞内特定基因在 mRNA 水平上的表达显著降低^[13]。RNA 干扰是目前研究基因功能最常用的手段之

一。已经证实, 在一些机体内引入合成的双链 siRNA 能有效抑制基因表达^[13], 且 siRNA 的干扰效果显著高于反义 RNA^[14]。但是由于 siRNA 易被降解, 干扰效果只是暂时的, 限制了其应用范围^[15]。为了解决这个难题, 诞生了新的技术, 采用携带 shRNA 的腺病毒载体干扰哺乳动物细胞内源基因的表达^[16]。

本研究根据山羊 *PTHrP* 基因的 mRNA 序列, 设计能在体内转录的小发夹结构 RNA (shRNA), 将该序列连接到 BLOCK-iT 腺病毒 RNA 干扰系统中, 构建重组腺病毒载体, 经 HEK-293 细胞包装扩增后, 感染山羊乳腺上皮细胞, 检测干扰效率。为进一步研究 PTHrP 在泌乳期乳腺中的功能机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pAdTrack-CMV-PTHrP 超表达质粒、HEK-293 细胞、山羊乳腺上皮细胞、山羊 PTHrP 多克隆抗体由本实验室制备及保存; BLOCK-iT (pENTR/CMV-GFP/U6, pAd/PL-DEST)、LR Clonase II、superscript II 反转录酶、Lipofectamine 2000 Reagent、表皮生长因子 (EGF) 购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、SYBR Premix Ex *Taq* (Perfect Real Time) 试剂盒购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 胰岛素和氢化可的松购自 Sigma 公司; *Pac* I 内切酶购自 Fermentas 公司; BCA 总蛋

白定量试剂盒购自 Thermo Scientific 公司; DMEM (高糖)、DMEM/F-12、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 靶向 *PTHrP* 基因的 shRNA 干扰序列的设计与合成

以山羊 *PTHrP* 基因的 mRNA 序列(GenBank Accession No. GU573787) 为模板, 使用 siRNA 在线设计程序 (<http://www.promega.com/siR-NADesigner/program/default.asp>) 设计 2 对靶向 *PTHrP* 基因的 shRNA 干扰序列及 1 对阴性对照干扰序列。每对 shRNA 干扰序列中间以 9 个脱氧核苷酸的 Loop 结构 (TTCAAGAGA) 相连, 两端分别添加 *BamH* I 和 *Xho* I 酶切位点, 正义链 3'端添加 TTTTTT 终止信号 (表 1)。经过 Blast 比较, 与山羊基因库无明显的同源性。由上海生物工程公司合成上述 shRNA 的 cDNA 单链。

1.2.2 *pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA* 载体的构建

将已合成的正反 shRNA 寡核苷酸单链稀释后退火, 形成具有黏性末端的 DNA 双链。用 *BamH* I 和 *Xho* I 双酶切 *pENTR/CMV-GFP/U6* 载体并回收大片段, 将退火产物与酶切回收产物按 3:1 的摩尔比在 T4 DNA 连接酶作用下 4 °C 连接过夜。热激法转化大肠杆菌 TOP10 感受态, 挑取单菌落,

提取质粒, 双酶切鉴定。电泳条带正确的质粒送往 Invitrogen 公司测序。并把测序正确的质粒分别命名为 *pENTR/CMV-GFP/U6-322*、*pENTR/CMV-GFP/U6-357*、*pENTR/CMV-GFP/U6-NC*。

1.2.3 有效 shRNA 序列的筛选

将构建好的 *pENTR/CMV-GFP/U6-322*、*pENTR/CMV-GFP/U6-357*、*pENTR/CMV-GFP/U6-NC* 载体分别与 *pAdTrack-CMV-PTHrP* 超表达载体共转染融合度为 70%~80% 的 HEK-293 细胞, *pENTR/CMV-GFP/U6-322*、*pENTR/CMV-GFP/U6-357*、*pENTR/CMV-GFP/U6-NC*、*pAdTrack-CMV-PTHrP* 超表达载体单独转染, 并设空白对照, 转染的步骤按照 Lipofectamine 2 000 Reagent 说明书进行。48 h 后进行 Western blotting 检测: 收集全部细胞和培养基于离心管内, 3 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液, RIPA 裂解液裂解细胞, 取上清进行蛋白定量 (BCA 法), SDS-PAGE 凝胶电泳, 转 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次, *PTHrP* 兔抗羊多克隆抗体一抗 (1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗 (1:5 000 稀释), 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次; ECL 显影分析结果, 筛选出干扰效率较高的穿梭载体用于构建重组腺病毒载体。

表 1 靶向 *PTHrP* 基因的 shRNA 寡核苷酸单链

Table 1 Sequence of oligonucleotides of shRNA for targeting *PTHrP*

Primer name	Primer sequence (5'-3')
ShRNA-322 positive-sense strand	GATCCCTAACAAGGTGGAGACATATTCAAGAGATATGTCTCCACCTTGTTAGTTTTTTC
ShRNA-322 antisense strand	TCGAGAAAAAACTAACAAGGTGGAGACATATCTCTTGAATATGTCTCCACCTTGTTAGG
ShRNA-357 positive-sense strand	GATCCGAAGACGCCCGGCAAGAAATTCAAGAGATTTCTTGCCGGGCGTCTTCTTTTTTC
ShRNA-357 antisense strand	TCGAGAAAAAAGAAGACGCCCGGCAAGAAATCTCTTGAATTTCTTGCCGGGCGTCTTCG
ShRNA-NC positive-sense strand	GATCCTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGGAGAATTTTTTC
ShRNA-NC antisense strand	TCGAGAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACGTTCCGGAGAAG

1.2.4 pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 重组腺病毒载体的构建

将 pENTR/CMV-GFP/U6-322, pENTR/CMV-GFP/U6-NC 载体分别与腺病毒骨架载体 pAD/PL-DEST 在重组酶 LR Clonase II 的作用下进行 LR 重组反应。反应体系为: pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA (50~150 ng), pAD/PL-DEST 150 ng, LR Clonase 2 μ L, 加 TE 缓冲液至总体积 10 μ L。25 $^{\circ}$ C 孵育过夜。反应产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态, 氨苄抗性筛选, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养过夜。次日挑取单克隆菌落接种于含氨苄抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 8~12 h。取适量菌液涂布于含氯霉素抗性的 LB 平板上, 在含氯霉素抗性的 LB 平板上不能生长的初步判定为阳性克隆。将菌液送往 Invitrogen 公司测序, 测序正确的载体即为 pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322, pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-NC 重组腺病毒载体。

1.2.5 腺病毒的包装、扩增及滴度测定

Pac I 酶切重组腺病毒载体使之线性化, 乙醇沉淀法纯化酶切产物, 用 Biophotometer (Eppendorf) 测定回收产物的浓度和纯度。取 5 μ g 纯化的质粒转染 HEK-293 细胞以包装腺病毒。转染后 3 d 可在荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况, 当大多数细胞从培养瓶底部脱落时, 收集细胞及培养液于离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃掉大部分上清液, 将细胞重悬后在液氮与 37 $^{\circ}$ C 水浴中反复冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 即为第 1 代病毒原液。

取第 1 代病毒原液重新接种融合度为 70%~

80% 的 HEK-293 细胞, 3~4 d 后, 待细胞完全出现病变效应时收毒, 依据之前方法反复冻融 3 次, 收集上清液, 即得到第 2 代病毒液。重复上述“感染-冻融-收集”步骤数次, 得到高滴度腺病毒, 分别命名为 AD-PTHrP-322, AD-PTHrP-NC。

使用 TCID₅₀ (半数组织培养感染剂量) 法测定腺病毒的滴度。将 HEK-293 细胞接种 96 孔板中, 待细胞融合度达到 60% 时, 取病毒液分别以不同的稀释度 (10^{-3} ~ 10^{-10}) 感染细胞。10 d 后观察每一稀释梯度出现的细胞病变效应 (Cytopathic effect, CPE) 的孔数, 按照 Spearman-Kärber 公式计算腺病毒的滴度。

1.2.6 腺病毒感染乳腺上皮细胞

将山羊乳腺上皮细胞按 5×10^5 个/孔接种于 12 孔培养板, 次日以确定的最佳浓度的重组腺病毒感染山羊乳腺上皮细胞, 试验共设计 5 个处理组, 包括 AD-PTHrP-322 感染 24 h、48 h、72 h 组、AD-PTHrP-NC 感染组、未感染病毒的空白组, 每个处理组设置 6 个重复。

1.2.7 荧光定量 PCR 检测 PTHrP 基因 mRNA 的表达

提取山羊乳腺上皮细胞的总 RNA, superscript II 反转录酶 (Invitrogen) 进行反转录得到 cDNA, 以此 cDNA 作为模板进行 Real time PCR。根据 GenBank 公布的基因序列, 用 primer 5.0 进行引物设计, 设计 PTHrP 及内参基因 β -actin 的实时定量 PCR 引物 (表 2)。采用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) 试剂盒及 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪。所有定量 PCR 反应均重复 3 次,

表 2 Real time PCR 所用引物

Table 2 Primers used for real time PCR

Gene	Primers sequences (5'-3')	Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	Product size (bp)	GenBank Accession No.
PTHrP	S: TTACGGCGTCGGTTCTTCCT	56	205	GU573787
	A: GCGTCTTCAGTGGCTGCTCT			
β -actin	S: TACGGCGTCGGTTCTTCCT	56	142	AF481159
	A: CCCTCATCATCAGACCCAAAT			

20 μL 反应体系: 10 μL 2 \times SYBR Green premix, 上下游引物各 0.8 μL (20 pmol/mL), 模板 cDNA 2 μL 以及 DEPC 水 6.4 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环; 65 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$ 每隔 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 读板 1 次, 绘制熔解曲线。分析各基因的熔解曲线并用电泳鉴定 PCR 产物。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目的基因 mRNA 表达水平进行相对定量分析。

1.2.8 Western blotting 检测 PTHrP 蛋白表达

依次收集腺病毒感染 24 h、48 h 和 72 h 后的山羊乳腺上皮细胞, Western blotting 检测各组细胞中 PTHrP 蛋白的表达水平。

1.2.9 统计与分析

所有组别的实验至少重复 3 次, SPSS 13.0 进行 ONEWAY ANOVA 检验, 用 SSR 法进行多重比较, $P < 0.05$ 时即认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 载体的构建

pENTR/CMV-GFP/U6 质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后产物的大小约为 4.6 kb (图 1)。将其与双链 shRNA 连接、转化后, 提取质粒并分别进行双酶切鉴定, 可切出一条约 59 bp 大小条带, 结果见图 2。测序结果表明 pENTR/CMV-GFP/U6-322、pENTR/CMV-GFP/U6-357、pENTR/CMV-GFP/U6-NC 中插入的序列与所设计的序列完全一致, 证明载体构建成功。

2.2 有效 shRNA 序列的筛选

提取转染 48 h 后的 HEK-293 细胞中的总蛋白质, Western blotting 检测结果表明重组干扰质粒 pENTR/CMV-GFP/U6-322 与 pENTR/CMV-GFP/U6-357 均具有干扰效果, 其中 pENTR/CMV-GFP/U6-322 的干扰效果相对较好, pENTR/CMV-GFP/U6-NC 无干扰效果, 与预期结果一致 (图 3)。选择穿梭质粒 pENTR/CMV-GFP/U6-322 和 pENTR/CMV-GFP/U6-NC 进一步构建重组腺病毒载体。

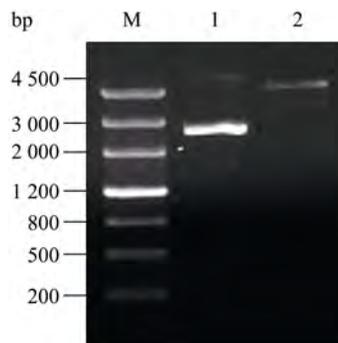


图 1 pENTR/CMV-GFP/U6 质粒及其双酶切产物

Fig. 1 pENTR/CMV-GFP/U6 digested with *Bam*H I and *Xho* I. 1: pENTR/CMV-GFP/U6; 2: double digestion products; M: DNA marker III.

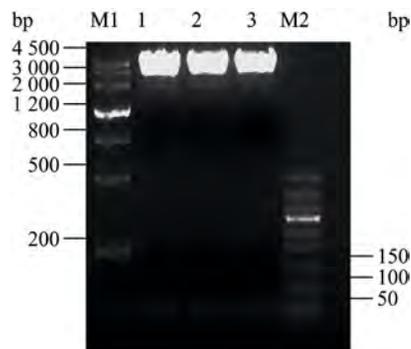


图 2 pENTR/CMV-GFP/U6-shRNA 质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pENTR/CMV-GFP/U6-322, 357 and NC plasmid. by enzyme digestion 1-3: pENTR/CMV-GFP/U6-322, 357 and NC double digestion products, respectively; M1: marker III; M2: 50 bp ladder.

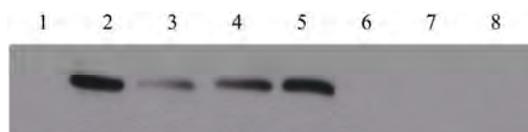


图 3 在 HEK-293 细胞中 shRNA 干扰效果检测

Fig. 3 Detection of interference efficiency of shRNA in HEK-293 by Western blotting. 1: blank control; 2: transfected by pAdTrack-CMV-PTHrP; 3: cotransfected by pENTR/CMV-GFP/U6-322 and pAdTrack-CMV-PTHrP; 4: cotransfected by pENTR/CMV-GFP/U6-357 and pAdTrack-CMV-PTHrP; 5: cotransfected by pENTR/CMV-GFP/U6-NC and pAdTrack-CMV-PTHrP; 6: transfected by pENTR/CMV-GFP/U6-322; 7: transfected by pENTR/CMV-GFP/U6-357; 8: transfected by pENTR/CMV-GFP/U6-NC.

2.3 pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-shRNA 重组腺病毒载体的构建

用 pENTR/CMV-GFP/U6-322 和 pENTR/CMV-GFP/U6-NC 分别与骨架质粒进行同源重组, 将重组产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 经氨苄青霉素及氯霉素双重筛选后, 提取质粒, 结果如图 4 所示。测序结果显示, 重组腺病毒载体中所插入序列与设计序列完全一致, 证明重组腺病毒载体 pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322、pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-NC 构建成功。

2.4 腺病毒的包装、扩增及滴度测定

线性化重组腺病毒载体 pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322, pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-NC 转染 HEK-293 细胞, 6 d 左右细胞开始出现病变效应, 12 d 后大部分细胞变圆, 脱壁 (图 5)。收毒后用病毒上清液反复感染 HEK-293 细胞 4 次后, 得到高滴度病毒 AD-PTHrP-322 和 AD-PTHrP-NC。TCID₅₀ 法测定腺病毒滴度分别为 2.0×10^9 PFU/mL 和 1.3×10^9 PFU/mL。

2.5 重组腺病毒感染乳腺上皮细胞

以不同剂量的重组腺病毒感染山羊乳腺上皮细胞, 48 h 观察结果, MOI 为 200 的实验组, 细胞未发生明显病变且荧光表达量较多, 因此确定此浓度

为最佳感染浓度。

2.6 Real-time Quantitative PCR 检测乳腺上皮细胞中 PTHrP 基因 mRNA 表达的变化

利用 Real-time Quantitative PCR 对腺病毒感染后的山羊乳腺上皮细胞进行 mRNA 水平的检测, 结果表明在 AD-PTHrP-322 病毒转染 24 h、48 h 和 72 h 后, 山羊乳腺上皮细胞中 PTHrP 基因的表达量分别下调了 29.2%、68.1% 和 82.6%, 干扰效果明显 (图 6)。

2.7 Western blotting 检测 PTHrP 蛋白表达

通过 Western blotting 检测乳腺上皮细胞中的 PTHrP 蛋白表达量, 结果表明空白组与 NC 组的

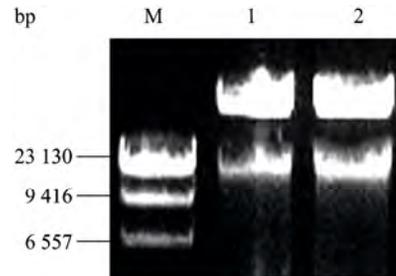


图 4 pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322 和 NC 凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322 and NC. 1-2: pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322 and NC, respectively; M: λ DNA/*Hind* III.

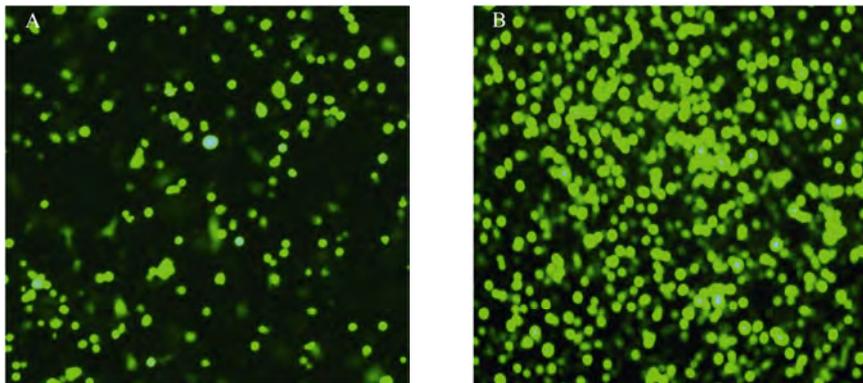


图 5 腺病毒包装和收毒时 HEK-293 细胞中 GFP 的表达情况

Fig. 5 The expression of GFP in the process of adenovirus package. A and B represents fluorescence microscopic image of HEK-293 cell 6 d and 12 d after transfection of pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322, respectively.

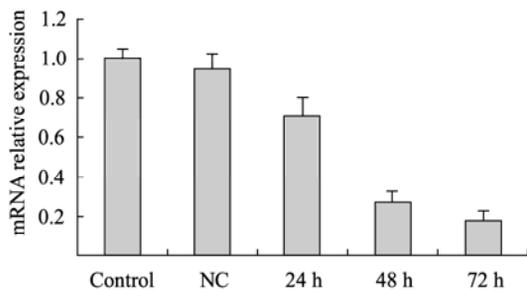


图6 *PTHrP* 基因的 RT-QPCR 分析结果

Fig. 6 Real-time quantitative PCR analysis of *PTHrP*.

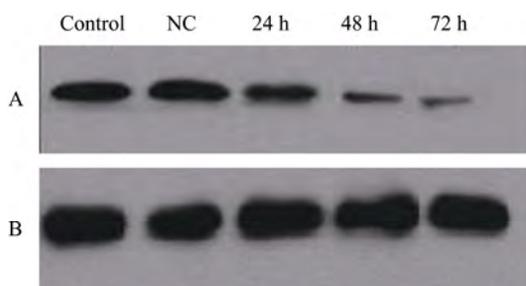


图7 Western blotting 检测 AD-PTHrP-322 的干扰效率

Fig. 7 Interference efficiency of AD-PTHrP-322 analyzed by Western blotting. (A) Anti-PTHrP. (B) Anti- β -actin.

表达量无明显差异, 干扰处理组随着时间的增长表达量不断减少(图7)。Western blotting 结果表明了腺病毒 AD-PTHrP-322 能够抑制山羊乳腺上皮细胞中 PTHrP 的蛋白质表达。

3 讨论

RNAi 是一种转录后水平的基因沉默, 能在生物体中高效特异地阻断某种基因的表达, 进而研究该基因及其相关基因的功能。目前普遍认为 RNAi 是研究哺乳动物特定基因功能的最有效途径之一^[16]。用一较小的发卡结构 RNAs (shRNAs) 与目的基因 mRNA 特异区域结合, 能显著降低目的基因的表达^[17-18]。本研究针对 *PTHrP* 基因设计并构建 shRNA 的重组腺病毒载体, 它能在细胞内折叠形成 19 bp 的有小 loop 区样的结构, 这种结构可被 Dicer 酶切割成成熟的 siRNA, siRNA 的引导链与解旋酶、

ATP 及多个蛋白形成诱导沉默复合体 (RISC), 随后识别靶 mRNA, 并通过碱基配对结合到靶 mRNA 上, 在距离 siRNA 3'端一定的位置上切割靶 mRNA, 从而沉默对应的靶基因^[19]。

腺病毒介导的 RNAi 导入哺乳动物细胞的效率高于质粒介导, 且一旦导入成功就可以在细胞内持续地产生所需的 siRNA, 能在细胞中较稳定表达, 并有较长时间的基因沉默作用。腺病毒感染靶细胞的范围较广, 可以感染原代细胞以及非分裂期的细胞, 且感染后并不整合到宿主细胞的基因组中, 不存在潜在致癌危险^[20]。此外, 腺病毒还具有外源载体容量高, 可同时表达多个外源基因, 包装扩增后能获得高滴度病毒等特点, 这些都使得它与其他方法相比具有独特优势。

本试验采用 BLOCK-iT 腺病毒 RNA 干扰系统, 其腺病毒骨架载体 (pAd/PL-DEST) 中含有 *ccdB* 的负筛选基因。*ccdB* 属大肠杆菌自杀基因, 它可以编码干扰大肠杆菌 DNA 促旋酶的一种蛋白从而抑制普通大肠杆菌如 DH5 α 、TOP10 的生长, 而 DB3.1 菌株对 *ccdB* 基因的产物具有抵抗作用, 可以用来保存和扩增含有该基因的 DNA。但当入门载体与腺病毒骨架载体重组之后, 阳性克隆会丢失 *ccdB* 基因及氯霉素抗性基因, 含有重组质粒的 TOP10 大肠杆菌能够存活, 这极大地提高了重组腺病毒质粒的筛选效率。

RNAi 干扰使基因沉默是在转录后起作用的^[21], 所以本试验通过实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 技术检测 shRNA 对转录后的 mRNA 和蛋白表达的影响。本试验选择的腺病毒载体为 E1 和 E3 区缺失的复制缺陷病毒, 在哺乳动物细胞中不能进行复制。HEK-293 细胞系能提供病毒的 E1、E3 组分, 可以实现病毒的包装。试验所得到的第 4 代腺病毒按 200 MOI 接种 24 h、48 h 和 72 h 后, 山羊乳腺上皮细胞中 *PTHrP* 基因的表达量分别下调了 29.2%、68.1% 和 82.6%。由于 shRNA 没有整合到

宿主细胞的基因组中, 其干扰作用是短期的^[22]。大量研究报道, shRNA 的干扰作用最多维持 1~2 周^[23]。Xiong 等用 shRNA 干扰 BxPC-3 细胞中 MK 基因, 发现第 3~5 天的效果最佳, 9 d 后 MK 的表达返回正常水平^[24]。Feng 等将携带 shRNA 的腺病毒感染 PK15 细胞, 发现能显著抑制 PVC2 的 DNA、RNA 和蛋白的合成, 并能维持 120 h^[25]。本试验结果与以上研究基本一致, 72 h 后的干扰效果最佳, 但后期效果有待进一步研究。

总之, 本研究成功制备了 PTHrP 基因的重组干扰腺病毒 AD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322, 滴度达 2.0×10^9 PFU/mL, 感染原代培养的山羊乳腺上皮细胞后, 实时定量 PCR 和 Western blotting 结果分析表明 PTHrP 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降, 即构建的重组腺病毒 pAD/PL-DEST/CMV-GFP/U6-322 对 PTHrP 的干扰效果显著, 可用于后续的该基因功能研究。

REFERENCES

- [1] Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev*, 1996, 76(1): 127–130.
- [2] Mau E, Whetstone H, Yu CY, et al. PTHrP regulates growth plate chondrocyte differentiation and proliferation in a Gli3 dependent manner utilizing hedgehog ligand dependent and independent mechanisms. *Dev Biol*, 2007, 305(1): 28–39.
- [3] Zheng HL, Yang ZY, Zhu ZZ, et al. Preparation of goat PTHrP polyclonal antibody and analysis of PTHrP expression map in tissues. *Chin J Anim Vet Sci*, 2011, 42(2): 177–181.
郑惠玲, 杨振宇, 祝珍珍, 等. 山羊 PTHrP 基因的多克隆抗体制备和组织表达图谱分析. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(2): 177–181.
- [4] Lozano D, de Castro LF, Dapia S, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast functions in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology*, 2009, 150(5): 2027–2035.
- [5] VanHouten JN, Dann P, Stewart AF, et al. Mammary-specific deletion of parathyroid hormone-related protein preserves bone mass during lactation. *J Clin Invest*, 2003, 112(9): 1429–1436.
- [6] Hildreth BE III, Werbeck JL, Thudi NK, et al. PTHrP 1-141 and 1-86 increase *in vitro* bone formation. *J Surg Res*, 2010, 162(2): e9–e17.
- [7] Tovar Sepulveda VA, Shen X, Falzon M. Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, 2002, 143(2): 596–606.
- [8] Gujral A, Burton DW, Terkeltaub R, et al. Parathyroid hormone-related protein induces interleukin 8 production by prostate cancer cells via a novel intracrine mechanism not mediated by its classical nuclear localization sequence. *Can Res*, 2001, 61(5): 2282–2288.
- [9] VanHouten JN. Calcium sensing by the mammary gland. *J Mam Gland Biol Neo*, 2005, 10(2): 129–139.
- [10] Onda K, Yamaguchi M, Ohashi M, et al. Modification of the analysis of parathyroid hormone-related protein in milk and concentrations of this protein in commercial milk and milk products in Japan. *J Dairy Sci*, 2010, 93(5): 1861–1867.
- [11] Barlet JP, Champredon C, Coxam V, et al. Parathyroid hormone-related peptide might stimulate calcium secretion into the milk of goats. *J Endocrinol*, 1992, 132: 353–359.
- [12] Sun W, Sun WW, Liu JN, et al. Alterations in phosphorus, calcium and PTHrP contribute to defects in dental alveolar bone formation in calcium-sensing receptor-deficient mice. *Development*, 2010, 137(6): 985–992.
- [13] Gaither A, Iourgenko V. RNA interference technologies and their use in cancer research. *Curr Opin Oncol*, 2007, 19(1): 50–54.
- [14] Barik S. Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. *J Mol Med*, 2005, 83(10): 764–773.
- [15] Watanabe A, Arai M, Yamazaki M, et al. Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca^{2+} uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37(3): 691–698.
- [16] Yuan J, Wang XB, Zhang Y, et al. shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell. *Mol Biol Rep*, 2006, 33(1): 43–49.
- [17] Hao DL, Liu CM, Dong WJ, et al. Knockdown of human p53 gene expression in 293-T cells by retroviral vector-mediated short hairpin RNA. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37(11): 779–783.

- [18] Kobayashi S, Higuchi T, Anzai K. Application of the BC1 RNA gene promoter for short hairpin RNA expression in cultured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4): 1305–1309.
- [19] Kleinhammer A, Wurst W, Kühn R. Gene knockdown in the mouse through RNAi. *Meth Enzymol*, 2010, 477(10): 387–414.
- [20] Tan R, Li CH, Jiang SJ, et al. A novel and simple method for construction of recombinant adenoviruses. *Nucl Acids Res*, 2006, 34(12): e89.
- [21] Li CX, Parker A, Menocal E, et al. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*, 2006, 5(18): 2103–2109.
- [22] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 2002, 16(8): 948–958.
- [23] Du YF, Xing YF, Zeng FQ, et al. The inhibitory effects of siRNA expression vector on CXCR4 expression in prostate carcinoma cell lines. *J Nanjing Med Univ*, 2006, 20(2): 104–108.
- [24] Xiong MY, Wang KZ. Recombinant adenovirus-mediated shRNA silencing of midkine gene in BxPC-3 cells. *J Nanjing Med Univ*, 2009, 23(2): 132–136.
- [25] Feng ZX, Jiang P, Wang XW, et al. Adenovirus-mediated shRNA interference against porcine circovirus type 2 replication both *in vitro* and *in vivo*. *Antivir Res*, 2008, 77(3): 186–194.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的 (Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法 (Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论 (Conclusions)：如系基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如系应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如DNA、ATP等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。