

# 绵羊抑制素 shRNA 慢病毒干扰载体的构建与鉴定

张瑞杰, 苗向阳

(中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘要:** 构建并鉴定了针对绵羊抑制素  $\alpha$  亚基(*INHA*) 基因的 shRNA (Small hairpin RNA, shRNA) 慢病毒干扰载体, 为进一步制备优质、高产转基因绵羊奠定基础。设计并合成 4 条针对绵羊 *INHA* 基因的 shRNA 表达序列( shRNA1、shRNA2、shRNA3、shRNA4) 及 2 条阴性对照序列( NC1、NC2) 将其分别连接到空载体 pGFP-V-RS 中, 得到 4 个 shRNA 表达载体( 即 shRNA 干扰载体) pGFP-V-RS-shRNA 和 2 个阴性对照载体 pGFP-V-RS-NC; 同时构建绵羊 *INHA* 的高效表达载体 pIRES2-eGFP-INHA, 然后将构建好的 4 个 shRNA 干扰载体及 2 个阴性对照载体分别与 *INHA* 高效表达载体瞬时共转染 293T 细胞, qPCR 法进行干扰效果筛选, 挑选干扰效果最佳的 shRNA 干扰载体构建慢病毒干扰载体。qPCR 检测结果表明, shRNA 干扰载体 pGFP-V-RS-shRNA3 的干扰效果最好, 用它构建的慢病毒干扰载体经测序验证表明其已建成功。绵羊 *INHA* shRNA 慢病毒干扰载体构建成功, 为进一步制备优质高繁转基因绵羊奠定了基础。

**关键词:** 抑制素  $\alpha$  亚基; 慢病毒; 小发夹 RNA; RNA 干扰; 绵羊

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)03-0021-07

## Construction and Identification of a Lentiviral Vector Expressing shRNA for RNA Interference Sheep Inhibin Alpha Subunit ( INHA)

ZHANG Rui-jie, MIAO Xiang-yang

(Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** To construct a lentiviral vector expressing shRNA for RNA interference of sheep inhibin alpha subunit ( INHA) gene and assess its gene silencing effect in 293T cell by cotransfected with an efficiently expressional INHA vector constructed simultaneously. Make preparation for producing high quality and high fecundity transgenic sheep. Design and synthesis 4 shRNA expressing sequences( shRNA1, shRNA2, shRNA3, shRNA4) and 2 control sequences( NC1, NC2) for sheep *INHA* gene, and then attach them to a blank plasmid vector: pGFP-v-RS, thus 4 shRNA expressing vector( that is shRNA interfering vector) pGFP-V-RS-shRNAs and 2 negative control vector pGFP-V-RS-NCs were generated; At the same time, construct an efficiently expressional vector of sheep *INHA* pIRES2-eGFP-INHA, then cotransfect 4 shRNA interfering vectors and 2 negative control vectors with efficiently expressional *INHA* vectors into 293T cell respectively and instantaneously, assess the interference effect of 4 shRNA interfering vectors contrasting with/in comparison to the 2 negative control vectors by qPCR, choose the shRNA interfering vector with the best interference effect, and construct it into corresponding lentiviral vector. The qPCR results indicate that the shRNA interference vector pGFP-V-RS-shRNA3 has the best interference effect, and the lentiviral vector constructed by it has been proved to be successfully constructed by sequencing results. Lentiviral interference vector for sheep *INHA* shRNA has been constructed successfully, and make the preparation for furtherly producing high quality and high fecundity transgenic sheep.

**Key words:** INHA; Lentivirus; shRNA; RNAi; Sheep

抑制素主要是由卵泡颗粒细胞和睾丸支持细胞分泌的糖蛋白质激素, 在生理状况下它能选择性地

收稿日期: 2011-02-11

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08008-004B; 2008ZX08008-003); 中国农业科学院创新基金项目(2004-院-1); 中国农业科学院优秀科技创新团队资助

作者简介: 张瑞杰(1986-), 男, 河北邢台人, 硕士, 主要从事基因工程及转基因动物方面的研究。

通讯作者: 苗向阳(1968-), 男, 山东莱州人, 研究员, 博士, 主要从事基因工程与功能基因组学及转基因动物方面的研究。

抑制垂体合成和分泌促卵泡素(FSH),从而影响卵巢上卵泡的发育和成熟,是调节家畜繁殖力的重要生殖激素之一。完整的抑制素分子由一个 $\alpha$ 亚基与一个 $\beta$ 亚基通过二硫键连接而成。在生物体中,只有当 $\alpha$ 亚基与 $\beta$ 亚基处于结合状态时,抑制素才具有生物活性。近年来,有研究表明,绵羊抑制素 $\alpha$ 亚基多态性位点的差异可能与其繁殖力有关<sup>[1-2]</sup>。而更多的研究显示通过抑制素主动免疫,使动物产生抑制素抗体,解除内源性抑制素对垂体FSH合成和释放的抑制作用可以提高动物的繁殖力<sup>[3-6]</sup>。然而,抑制素免疫作用的短暂性,决定了其不可能作为一种长效机制,将亲代高繁殖性状传递给子代。为了解决这一问题,本研究从小发夹RNA(Small hairpin RNA, shRNA)入手,构建了针对绵羊抑制素 $\alpha$ 亚基的shRNA慢病毒干扰载体,为使子代动物获得与亲本相同的繁殖力并使动物体内抑制素的表达水平得到持续性抑制创造了条件。

小发夹RNA是一种具有发夹状结构的小分子RNA,它可以通过RNAi途径使特定基因的表达沉默。与siRNA干扰作用的短暂性不同,shRNA可构建成相应的载体,将载体导入细胞之后,就可以在其U6或H1启动子的作用下持续表达shRNA<sup>[7]</sup>。从而可将基因沉默作用传递到后代细胞或生物体中。慢病毒以其较低的转染条件(可转染分裂和非分裂细胞)和较高的转染效率被广泛应用于基因表达的研究中。因此本试验采用构建shRNA慢病毒干扰载体的方法来进行高繁殖力绵羊新品种的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

表1 设计并合成的shRNA有效干扰序列

Tab.1 The designing and synthesizing shRNA RNAi sequences

合成的4对shRNA oligo The designing 4 shRNA oligo	序列5'-3' Sequence 5'-3'
pGFP-V-RS-shRNA1 <sup>+</sup>	NNNNCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACANNNNN
pGFP-V-RS-shRNA2 <sup>+</sup>	NNNNATGCCACGGAGTCTGATCTTCTAGCAGANNNNN
pGFP-V-RS-shRNA3 <sup>+</sup>	NNNNGGCATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAANNNNN
pGFP-V-RS-shRNA4 <sup>+</sup>	NNNNCTTTTGGATGGGATTGGATTATTCACCTNNNNN

1.2.2 *INHA*高表达载体构建 对*INHA*基因的编码区进行全序列分析,检查基因内部有无特别复杂二级结构和重复序列;根据基因序列分析的结果,进行*INHA*单链寡核苷酸片段的设计及合成,并在序列的末端添加酶切位点。利用PCR将合成的单链寡核苷酸片段拼接成完整的基因;将合成好的序列装入pMD-18T载体并转化至感受态细胞DH5a;测序验证重组克隆中基因序列是否与要求相符;通过重叠PCR将基因序列中突变点修复;将修复后的全

HEK293、DMEM+10%胎牛血清、脂质体2000、OptiMEM培养液、0.05% Trypsin、HQ高纯度质粒抽提试剂盒、Trizol、逆转录试剂盒、platinum Pfx Polymerase、pLenti6/BLOCK-iT-DEST、BLOCK-iT U6 RNAi Entry Vector Kit、Stbl3感受态细胞、293T细胞、DMEM+10%FBS、LR clonase II enzyme mix、RNase H、DH5 $\alpha$ 感受态细胞等均购自上海英俊公司;pMD-18T载体、pIRES2-eGFP载体由TaKaRa公司提供;EcoR I、Xho I内切酶、T4连接酶购自NEB公司;BIO-RAD荧光定量PCR仪、Olympus荧光显微镜、Thermo CO<sub>2</sub>培养箱、氯仿、无水乙醇等为本实验室保存。

### 1.2 方法

1.2.1 构建shRNA干扰载体 利用Invitrogen公司shRNA在线设计工具 <http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>针对绵羊*INHA*基因(L28815)的核苷酸序列设计合成4对shRNA单链寡核苷酸片段(表1),再将4对合成好的shRNA片段用ddH<sub>2</sub>O溶解成100  $\mu$ mol/L,互补单链各取5  $\mu$ L两两混合,进行退火。接着将4份shRNA片段混合物在95 $^{\circ}$ C加热5 min,放置室温自然冷却20 min,形成双链shRNA片段。然后将退火的双链shRNA继续稀释成10 nmol/L浓度,用载体构建试剂盒将4对双链shRNA片段分别插入到shRNA表达载体pGFP-V-RS中,室温连接30 min,构建4个shRNA表达质粒,最后将shRNA表达质粒转化至感受态细胞DH5a,在每个转化平板中分别挑取3个克隆进行测序,验证重组克隆中插入片段序列是否与设计的shRNA寡核苷酸序列一致。

长片段用Xho I和EcoR I酶切后连接至目的载体pIRES2-eGFP,并转化到感受态细胞DH5a中;测序验证重组克隆中目的基因片段的序列信息,获得正确的*INHA*高效表达载体。

### 1.2.3 shRNA干扰载体的筛选

1.2.3.1 shRNA干扰载体和*INHA*高表达载体的扩增 分别接种干扰质粒和高表达载体菌液至5 mL LB培养液中,37 $^{\circ}$ C摇床(220 r/min)过夜,用HQ高纯度质粒抽提试剂盒提取相应质粒。

1.2.3.2 shRNA 干扰载体和 *INHA* 高表达载体瞬时共转染 293T 细胞 将状态良好、处于对数生长期的 293T 细胞用 0.25% 胰酶消化,用完全培养基悬浮成单细胞悬液,细胞计数后,按照每孔  $5 \times 10^5$  个细胞接种于六孔板的每个孔中;培养过夜,观察细胞生长状态。在细胞覆盖率 80% 左右时,进行转染试验;用无血清 Opti-MEM 轻洗细胞 2 次,加入 1.5 mL Opti-MEM;分别用 250  $\mu$ L Opti-MEM 稀释 3  $\mu$ g 干扰质粒 shRNA1、shRNA2、shRNA3、shRNA4 及阴性对照质粒 NC1、NC2 轻轻混匀,加入 1  $\mu$ g 的高表达载体;用 250  $\mu$ L Opti-MEM 稀释 10  $\mu$ L lipofectamine 2000 试剂,轻轻混匀,室温孵育 5 min;轻轻混合已稀释质粒和 lipofectamine 2000 稀释液,室温放置 20 min;将每管 500  $\mu$ L 质粒复合物慢慢加入到各细胞孔中,轻轻混匀;在 37 $^{\circ}$ C、5% 的 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 4~6 h 后,换上完全培养液(不含抗生素),放置在 37 $^{\circ}$ C、5% 的 CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养过夜;第 2 天观察细胞转染情况。

### 1.2.3.3 qPCR 方法检测干扰载体的干扰效果

1.2.3.3.1 293T 细胞总 RNA 的提取 细胞瞬时转染 48 h 后,轻轻吸净培养液,用 PBS 轻洗 2 遍,每孔细胞样品中各加入 1 mL Trizol 液,用枪头吹吸混匀,尽量让细胞全部裂解,室温放置 5 min;每管中各加入 0.2 mL 氯仿,盖紧离心管,反复颠倒混匀 15 s,12 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。取上层水相于一新的离心管中,每管中各加 0.5 mL 异丙醇,轻轻混匀,室温放置 10 min,12 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。弃去上清液,每管中加入 1 mL 的 75% 的酒精轻轻洗涤沉淀,12 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。小心弃去上清液,然后室温或真空干燥 5~10 min,注意不要干燥过分,否则会降低 RNA 的溶解度。然后将 RNA 溶于水中,55~60 $^{\circ}$ C 水溶 10 min。

1.2.3.3.2 将提取的 RNA 反转录成 cDNA 取一灭菌、无 RNA 酶的 eppendorf 管,每个样本加入 5  $\mu$ L (5  $\mu$ g) 细胞总 RNA、1  $\mu$ L 引物 (50  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L dNTP (10 mmol/L)、3  $\mu$ L DEPC 水得到 Mix 1;将 Mix1 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后,立即放置冰上 2 min;将 2  $\mu$ L 10 $\times$  Buffer、4  $\mu$ L Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L)、2  $\mu$ L dTT (0.1 mol/L)、1  $\mu$ L RNaseout (40 U/ $\mu$ L)、1  $\mu$ L 反转录酶 SuperScrip III (200 U/ $\mu$ L) 加入到 10  $\mu$ L Mix1 中,得到 Mix2 共 20  $\mu$ L;50 $^{\circ}$ C 水浴 50 min 后,85 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,立即放置到冰上 2 min,每管 Mix2 中加入 1  $\mu$ L 的 RNase H,37 $^{\circ}$ C 处理 20 min,所得到的 cDNA 保存在 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.3.3.3 qPCR 检测 *INHA* 基因的表达情况 分

别加入 0.5  $\mu$ L 上游引物、0.5  $\mu$ L 下游引物和 1.2  $\mu$ L cDNA 于 25  $\mu$ L PCR 反应体系中,用 qPCR 法检测细胞样品中目的基因和内参基因的表达量,根据 qPCR 反应曲线得到各样品目的基因和内参基因的 Ct 值 (Threshold cycle number, 域值循环数),采用  $\Delta\Delta$ Ct 的方法进行相对定量。使用转染阴性干扰载体的样品作为对照样品,比较各瞬时转染干扰载体组样品目的基因的表达,并计算干扰效果。

$\Delta\Delta$ Ct = (待测样品的目的基因的 Ct 平均值 - 待测样本的内参基因的 Ct 的平均) - (对照样品的目的基因的 Ct 的平均值 - 对照样本的内参基因的 Ct 的平均值)

基因的表达量  $F = 2^{-\Delta\Delta$ Ct}, 目标基因的沉默效率为  $1 - 2^{-\Delta\Delta$ Ct}。

1.2.4 用干扰效果最佳的 shRNA 干扰载体构建慢病毒载体 将干扰效果最好的 shRNA 片段 shRNA3 构建成 pENTR/U6-shRNA3,并与慢病毒载体 pLenti6/BLOCK-iT-DEST 重组,构建慢病毒载体。

1.2.4.1 pENTR/U6-shRNA3 的构建 根据干扰效果最好的 shRNA 干扰载体 pGFP-V-RS-shRNA3 中的有效 siRNA 干扰序列,设计并合成 2 条 shRNA 寡核苷酸单链 DNA 序列,将 2 条合成好的寡核苷酸单链 DNA 用 ddH<sub>2</sub>O 溶解成 100  $\mu$ mol/L,互补单链各取 5  $\mu$ L 两两混合,进行退火。然后将 2 份 Oligo 混合物在 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min,然后放置室温自然冷却 20 min,形成双链 DNA。将退火的双链 DNA 继续稀释成 10 nmol/L 浓度,取 4  $\mu$ L 双链 DNA 与 2  $\mu$ L pENTR<sup>TM</sup>/U6 在室温连接 30 min。然后用载体构建试剂盒 BLOCK-iT U6 RNAi Entry Vector Kit (Invitrogen, Catalog nos. K4944-00) 进行重组克隆,将双链的 shRNA oligo 插入到 shRNA 表达载体 pENTR<sup>TM</sup>/U6 vector 中,构建 shRNA 表达质粒,并转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$ 。每个转化平板分别挑取 4 个克隆,摇菌抽提质粒后进行测序(测序引物为 5'-GGACTATCATATGCTTAC-CG-3'),以验证重组克隆中插入片段序列是否与设计的寡核苷酸单链 DNA 序列一致<sup>[8]</sup>。

1.2.4.2 慢病毒干扰载体的构建 使用 Invitrogen 公司的 LR 重组系统将 pENTR/U6-shRNA3 与慢病毒载体 pLenti6/BLOCK-iT-DEST 进行重组。反应体系中加入 1  $\mu$ L shRNA 载体、2  $\mu$ L LR 克隆酶 II、1  $\mu$ L pLenti6/BLOCK-iT-DEST 及 6  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,25 $^{\circ}$ C 反应 1 h;加入 1  $\mu$ L 的蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C 反应 10 min;取 5  $\mu$ L 重组反应液转化 100  $\mu$ L 的 Stb13 感受态细胞;筛选阳性克隆并测序验证,保留测序验证正确的 LR 重组质粒。

表 2 shRNA 寡聚单链 DNA 序列

Tab.2 The single-strand DNA oligo sequence for shRNA

名称	寡聚单链 DNA 序列 5' to 3'
Oligo name	The single-strand DNA oligo sequence 5' to 3'
shRNA3-F	CACCGGCATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAACGAATTCTCATCTAAAGCTTTGATTTCATGCC
shRNA3-R	AAAAGGCATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATTCGTTCTCATCTAAAGCTTTGATTTCATGCC

2 结果与分析

2.1 shRNA 干扰载体 pGFP-V-RS-shRNA 的构建

针对 INHA 构建的 4 种 shRNA 干扰载体 pGFP-V-RS-shRNA 和两种阴性对照载体 pGFP-V-RS-NC , 经测序验证后 结果表明 所构建干扰载体中的靶序列与设计的有效干扰序列完全匹配 ,shRNA 干扰载体构建成功。

2.2 INHA 高效表达载体 pIRES2-eGFP-INHA 的

表 3 高效表达载体 pIRES2-eGFP-INHA qPCR 检测结果

Tab.3 The qPCR detecting resuct for effectively expressing vector PIREs2-eGFP-INHA

	Ct( target gene)	Ct( Actin)	ΔCt	ΔΔCt	2 <sup>-ΔΔCt</sup>
本底细胞 The background cells	32.66	13.83	18.83	0	1
高表达转染 The transfected cells	10.92	22.07	- 11.15	- 29.98	1 058 959 303

2.3 shRNA 干扰载体与 INHA 高表达载体共转染 293T 细胞检测结果

将 4 种 shRNA 干扰载体和两种阴性对照载体分别与 INHA 高效表达载体共转染 293T 细胞后 在荧光显微镜下观察 转入两种载体的 293T 细胞都能够表达 GFP 显示较强的绿色荧光信号 转染效率达 70% 以上。通过 qPCR 法检测 INHA 的表达 熔解曲

构建

构建的 INHA 高效表达载体 pIRES2-eGFP-INHA 经测序验证证明其中的靶序列与已报道的抑制素编码序列( Gene ID: L28815) 完全匹配。表明 pIRES2-eGFP-INHA 构建成功。q-PCR 法检测 INHA 的表达情况 结果表明 转染高表达质粒 pIRES2-EGFP-INHA 的细胞中 目的基因 INHA 的表达量与细胞本底相比升高 10<sup>10</sup> 倍( 表 3) 。

线分析未见杂峰 说明扩增产物单一特异 没有非特异性扩增 通过扩增曲线读取相应 Ct 值 经公式计算发现编号为 shRNA3 的序列对 INHA 的表达有显著的抑制作用 shRNA3 对 INHA 基因的沉默效果达 78.98% ( 以 NC1 以为对照) 或者 52.47% ( 以 NC2 以为对照) ( 图 1 ~ 3) 。

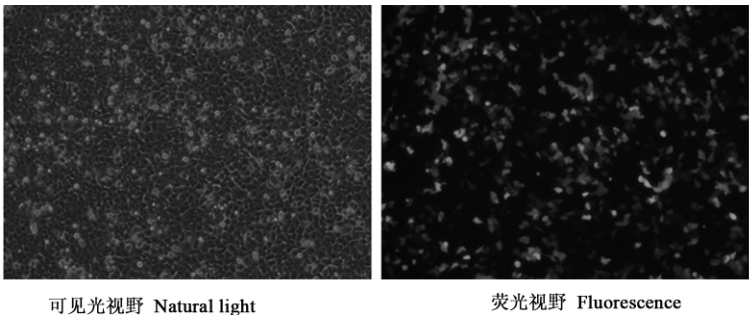


图 1 shRNA 干扰载体 pGFP-V-RS-shRNA3 与 INHA 高效表达载体 pIRES2-EGFP-INHA 共转染 293T 细胞荧光检测结果( 100 ×)

Fig.1 The green florescence result for cotransfecting 293T cells with pGFP-V-RS-shRNA3 and pIRES2-EGFP-INHA( 100 ×)

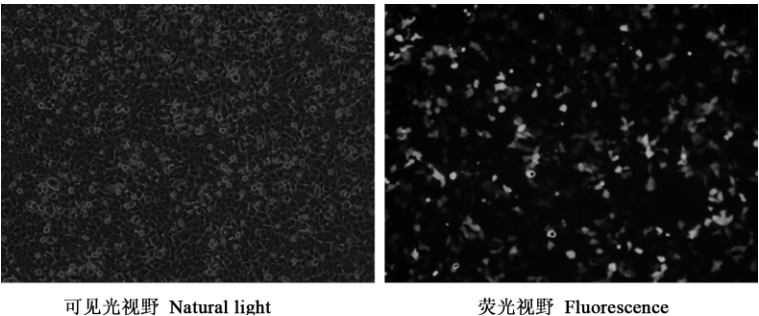


图 2 shRNA 干扰载体阴性对照 pGFP-V-RS-NC1 与 INHA 高效表达载体 pIRES2-EGFP-INHA 共转染 293T 细胞荧光检测结果( 100 ×)

Fig.2 The green florescence result for cotransfecting 293T cells with pGFP-V-RS-NC1 and pIRES2-EGFP-INHA( 100 ×)

## 2.4 根据干扰效果最佳的 shRNA 干扰载体构建慢病毒载体

2.4.1 shRNA 干扰载体 pENTR/U6-shRNA3 的构建 根据干扰效果最佳的 shRNA 干扰载体 pGFP-V-RS-shRNA3 的有效靶序列,设计合成 2 条 shRNA 单链寡核苷酸片段,在适当条件下将其连接到 shR-

NA 表达载体 pENTR/U6 中,得到 shRNA 干扰载体 pENTR/U6-shRNA3。对构建的 pENTR/U6-shRNA3 进行测序验证,结果表明,插入片段序列与设计的寡核苷酸单链 DNA 序列一致,shRNA 干扰载体构建成功。

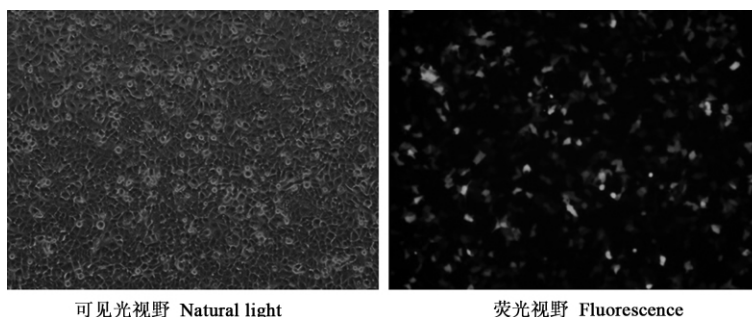


图3 shRNA 干扰载体阴性对照 pGFP-V-RS-NC2 与 INHA 高效表达载体 pIRES2-EGFP-INHA 共转染 293T 细胞荧光检测结果(100 ×)

Fig. 3 The green florescence result for cotransfecting 293T cells with pGFP-V-RS-NC2 and pIRES2-EGFP-INHA(100 ×)

50 60 70 80 90  
A C G A A A C A C C G G C A T T G A A A T C A A A G C T T T A G A T G A T A A C G A



图4 shRNA 干扰载体 pENTR/U6-shRNA3 测序结果(有效干扰位点:59~87)

Fig. 4 The sequencing result for the shRNA RNAi vector pENTR/U6-shRNA3( The effective site 29~87)

2.4.2 慢病毒干扰载体的构建 将 pENTR/U6-shRNA3 与慢病毒载体 pLenti6/BLOCK-iT-DEST 进行重组得到慢病毒干扰载体 pLenti6-shRNA3,对得到的慢病毒干扰载体进行测序验证,结果证明慢病

毒干扰载体 pLenti6-shRNA3 中的有效干扰序列设计的 shRNA 寡核苷酸序列匹配,慢病毒干扰载体构建成功(图5)。

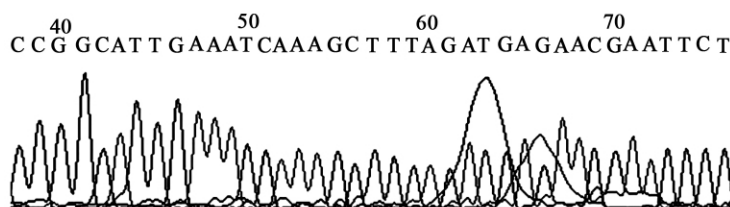


图5 慢病毒干扰载体 pLenti6-shRNA3 测序结果(干扰序列位点:40~68)

Fig. 5 The sequencing result for the shRNA RNAi vector pLenti6-shRNA3( The effective site-40~68)

## 3 讨论

抑制素是动物体产生的一种糖蛋白激素,它能特异性地抑制垂体细胞分泌及合成促卵泡素,从而影响卵巢上卵泡的发育和成熟,是调节家畜繁殖力的重要生殖激素之一。完整的抑制素分子由一个  $\alpha$  亚基与一个  $\beta$  亚基通过二硫键连接而成。在生物体中,只有当  $\alpha$  亚基与  $\beta$  亚基处于结合状态时,抑制素才具有生物活性。周文然等<sup>[2]</sup>采用 PCR-SSCP 技术检测抑制素  $\alpha$  (inhibin  $\alpha$ , INHA) 基因 5'调控区

和外显子 1 在高繁殖力绵羊品种(小尾寒羊)以及低繁殖力绵羊品种(中国美利奴绵羊、考力代绵羊和南非肉用美利奴绵羊)中的单核苷酸多态性,结果发现小尾寒羊、中国美利奴绵羊和考力代绵羊在 INHA 基因 5'调控区发生了 1 处碱基突变(316C→T),南非肉用美利奴绵羊没有发生这种突变;小尾寒羊和考力代绵羊在 INHA 基因外显子 1 中发生了 1 处碱基突变(877T→C),中国美利奴绵羊和南非肉用美利奴绵羊没有发生这种突变;初步表明 INHA 基因可能是影响小尾寒羊高繁殖力的一个主效基因

或是与之存在紧密遗传连锁的一个分子标记。对高繁殖力绵羊品种与低繁殖力绵羊品种之间抑制素  $\alpha$  亚基基因多态性的研究发现,高繁殖力绵羊品种与低繁殖力绵羊品种之间基因型分布差异都极显著 ( $P < 0.01$ )。田秀娥等<sup>[1]</sup>用 PCR-SSCP 方法检测和分析 3 个绵羊品种(滩羊、蒙古羊和小尾寒羊) *INH A* 基因的多态性,研究不同基因型对产羔数的影响,发现滩羊、蒙古羊和小尾寒羊 P1(5'调控区 282 核苷酸处发生的 1 处 A→G 突变)位点 C、D 基因频率分别为 0.840 和 0.160,0.852 和 0.148 及 0.162 和 0.838,均处于中度多态;P2 位点 E、F 基因频率分别为 0.784 和 0.216,0.787 和 0.213 及 1.000 和 0.000,滩羊和蒙古羊在该位点均处于中度多态;引物 P3 扩增片段中,滩羊和蒙古羊表现为 A、B 和 C 3 种单倍体基因型,而小尾寒羊仅表现出 A 和 B 2 种基因型。滩羊、蒙古羊和小尾寒羊的 A、B、C 基因型频率分别为 0.136,0.037 和 0.147;0.800,0.926 和 0.853 及 0.064,0.037 和 0.000。

鉴于 *INH A* 对绵羊繁殖力的影响,Li 等<sup>[4]</sup>将抑制素  $\alpha$  亚基(1~32)片段插入到 HBsAg-S 的羧基端,构建出一种抑制素 DNA 疫苗。用这种疫苗免疫 40 只绵羊,结果发现试验组绵羊的双胎率(39.2%)显著高于对照组绵羊的双胎率(10%)( $P < 0.05$ )。结果表明,用针对抑制素构建的 DNA 疫苗进行免疫可诱导产生更多的卵泡,从而增加产仔数。

慢病毒载体是一类重组逆转录病毒载体,由于其具有可感染分裂细胞及非分裂细胞、转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应等优点,作为一种重要的基因转移工具被应用于基因治疗和细胞分子生物学研究领域。小发夹 RNA 是一种具有发夹状结构的小分子 RNA,它可以通过 RNAi 途径使特定基因的表达沉默。近年来通过慢病毒载体表达的 shRNA 所介导的选择性基因沉默被广泛用于基因功能研究、药物靶点筛选、癌症研究及转基因动物研究等相关研究过程中<sup>[9-14]</sup>。Szulec 等<sup>[15]</sup>构建了一种基于慢病毒载体的条件性基因表达系统用于药物可控性转基因及有关 shRNAs 的表达。Singer 等<sup>[16]</sup>介绍了慢病毒载体在 shRNA 传递和基因转移中的应用,重点介绍了其在神经紊乱的基因治疗和转基因敲除动物制备过程中的应用。Zhang 等<sup>[17]</sup>将基于慢病毒载体的 shRNA 转入 caco-2 细胞中,构建了一系列稳定的乳腺癌耐药蛋白敲除细胞系。为乳腺癌的基因疗法开拓了新视野。Anastasov 等<sup>[18]</sup>用慢病毒载体介导的基因转移方法将 shRNA 有效地转移至 B 淋巴瘤细胞和 T 淋

巴瘤细胞中,研究了 cyclin D1 和 STAT3 两种蛋白在淋巴瘤细胞中的功能。Deng 等<sup>[19]</sup>研究了通过慢病毒载体介导的 shRNA 对小鼠中 B 型肝炎病毒的抑制作用。Liu 等<sup>[20]</sup>构建了针对人 periostin 的 shRNA 干扰慢病毒载体并研究了其对成纤维细胞目的基因表达的影响,结果发现构建的慢病毒 shRNA 慢病毒载体能显著降低 *POSTN* 基因和蛋白在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达,从而抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖。Wang 等<sup>[21]</sup>构建含下游调控元件的拮抗分子 *DREAM* 基因有效短发夹 shRNA 的慢病毒载体,利用 RNA 干扰技术抑制 *DREAM* 基因表达,开展对神经病理性疼痛基因治疗的试验研究。熊石龙等构建了针对人 *TF* 基因的 shRNA 慢病毒干扰载体,研究其对内皮细胞中组织因子(TF)表达的抑制作用。本试验采用体外构建抑制素(*INH A*) shRNA 慢病毒干扰载体的方法,将构建好的慢病毒载体包装到慢病毒液中,以制备用于增强绵羊繁殖力的基因转移工具。试验同时构建了绵羊 *INH A* 的高效表达载体,将 shRNA 干扰载体与此高效表达载体共转染 293T 细胞后,对 *INH A* 的表达情况进行检测,结果发现两种载体共转染的 293T 细胞中 *INH A* 的表达水平比只转入 *INH A* 高效表达载体的 293T 细胞中 *INH A* 的表达水平显著降低。从结果可以看出,绵羊 *INH A* shRNA 干扰载体可明显降低靶 *INH A* 基因的表达。

总之,针对绵羊抑制素 *INH A* 的 shRNA 慢病毒干扰载体构建成功,为进一步制备高繁殖力绵羊,奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 田秀娥,孙红霞,王永军. 3 个绵羊群体 *INH A* 基因的遗传多态性及对产羔数的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(1):23-29.
- [2] 周文然,储明星,孙少华,等. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 *INH A* 的研究[J]. 农业生物技术学报,2007,15(1):32-36.
- [3] 张宁,罗军. 抑制素主动免疫对青年奶山羊生殖的影响[J]. 安徽农业科学,2007,35(26):8244-8245.
- [4] Li Han, Mao D G, Zhang D K, et al. Development and evaluation of a novel DNA vaccine expressing inhibin  $\alpha$  (1-32) fragment for improving the fertility in rats and sheep[J]. Animal Reproduction Science, 2007, 109(2008):251-265.
- [5] Li C, Zhu Y L, Xue J H, et al. Immunization against inhibin enhances both embryo quantity and quality in Holstein heifers after superovulation and insemination with

- sex-sorted semen [J]. *Theriogenology* 2009 ,71( 6) : 1011 – 1017.
- [6] Voge J L , Parker J B , Wheaton J E. Effects of immunization against alpha-inhibin using two adjuvants on daily sperm production and hormone concentrations in ram lambs [J]. *Domest Anim Endocrinol* 2009 ,37( 4) : 206 – 213.
- [7] Rao D D , Vorhies J S , Senzer N *et al.* siRNA vs. shRNA: similarities and differences [J]. *Adv Drug Deliv Rev* ,2009 ,61( 9) : 746 – 759.
- [8] 周 军 ,李建明 ,杨发达 ,等. 人 *CDH22* 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及稳定干扰 *CDH22* 基因的表达 [J]. *南方医科大学学报* 2008 ,28( 4) : 589 – 592.
- [9] Katja Sliva , Barbara S Schnierle. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA [J]. *Sliva and Schnierle Virology Journal* ,2010 ,7: 248
- [10] Hitz C , Steuber-Buchberger P , Delic , *et al.* Generation of shRNA transgenic mice [J]. *Methods Mol Biol* ,2009 ,530: 101 – 129.
- [11] Bos T J , De Bruyne E , Heirman C , *et al.* In search of the most suitable lentiviral shRNA system [J]. *Curr Gene Ther* ,2009 ,9( 3) : 192 – 211.
- [12] Henriksen J R , Buechner J , Lokke C *et al.* Inhibition of gene function in mammalian cells using short-hairpin RNA ( shRNA) [J]. *Methods Mol Biol* ,2011 ,703: 189 – 204.
- [13] Jia F J , Huang M , Yan Y C , *et al.* A strategy for constructing and verifying short hairpin RNA expression vectors [J]. *J RNAi Gene Silencing* ,2007 ,3( 1) : 248 – 253.
- [14] Milazzotto M P , Goissis M D , Feitosa W B , *et al.* Myostatin gene knockdown through lentiviral-mediated delivery of shRNA for in vitro production of transgenic bovine embryos [J]. *Zygote* 2010 ,18( 4) : 339 – 44.
- [15] Szulc J , Aebischer P. Conditional gene expression and knockdown using lentivirus vectors encoding shRNA [J]. *Methods Mol Biol* ,2008 ,434: 291 – 309.
- [16] Singer O , Verma I M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis [J]. *Curr Gene Ther* 2008 ,8( 6) : 483 – 488.
- [17] Zhang W , Li J , Allen S M , *et al.* Silencing the breast cancer resistance protein expression and function in caeco-2 cells using lentiviral vector-based short hairpin RNA [J]. *Drug Metab Dispos* ,2009 ,37( 4) : 737 – 44.
- [18] Anastasov N , Klier M , Koch I , *et al.* Efficient shRNA delivery into B and T lymphoma cells using lentiviral vector-mediated transfer [J]. *J Hematop* ,2009 ,2( 1) : 9 – 19.
- [19] Deng L , Li G , Xi L , *et al.* Hepatitis B virus inhibition in mice by lentiviral vector mediated short hairpin RNA [J]. *BMC Gastroenterol* 2009 ,9: 73.
- [20] 刘 畅 ,宋振华 ,秦泽莲. 人 periostin 干扰载体的构建及其对成纤维细胞目的基因表达的影响 [J]. *北京大学学报: 医学版* 2010 ,42( 5) : 503 – 508.
- [21] 王云皎 ,程智刚 ,于 鹏 ,等. 携带 *DREAM* 基因 shRNA 的慢病毒载体的构建及其对坐骨神经缩窄损伤大鼠的镇痛作用 [J]. *中南大学学报: 医学版* ,2009 ,34( 8) : 723 – 730.