

## shRNA 下调家蚕细胞系 *BmCREB* 的表达

樊宗标, 张鸿雁, 赵怡姣, 宋红生\*

(上海大学生命科学学院, 上海 200444)

**摘要:** shRNA(short hairpin RNA)是一种干扰基因表达、研究基因功能的有效方法。CREB(cAMP response element binding protein)是真核生物重要而又保守的转录调控因子,参与许多生理功能的调节。作者前期的研究发现,家蚕 CREB (*BmCREB*) 的表达与家蚕滞育的诱导密切相关。为进一步阐明 *BmCREB* 调控家蚕滞育的分子机制,利用 pMD18-T 质粒构建 *BmCREB* 的干扰质粒 pMD18-U6-shRNA, 转染家蚕卵巢细胞系 (BmN), 对其下调 *BmCREB* 的表达进行研究。结果表明, 在 BmN 细胞系中转染 1  $\mu\text{g}$  shRNA, 72 h 后能有效地下调 *BmCREB* 蛋白的表达量, 最高干扰效率达 63.0%。不同干扰片段 shRNA 质粒的干扰效果差异很大, 其中 T-227 的干扰效果最好。这些结果为进一步利用 shRNA 方法在家蚕体内下调基因表达, 研究 *BmCREB* 基因与家蚕滞育的关系奠定基础。

**关键词:** shRNA; 家蚕; *BmCREB*

中图分类号: S881.26

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)04-0567-06

### Down-regulation of *BmCREB* by shRNA in *Bombyx mori* cell lines

FAN Zongbiao, ZHANG Hongyan, ZHAO Yijiao, SONG Hongsheng

(College of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444)

**Abstract:** Short hairpin RNA (shRNA) is an effective method for interfering gene expression and gene function research. CREB (cAMP response element binding protein), an important and conservative transcriptional factor in eukaryote, regulates many physiological functions. According to our previous research, *Bombyx mori* CREB (*BmCREB*) is closely relative to the diapause induction in the silkworm. In order to clarify the molecular mechanism of *BmCREB* in diapause induction, we constructed the interfering vector pMD18-U6-shRNA of *BmCREB* shRNA and transfected in a *Bombyx mori* ovary cell line (BmN). The expression of *BmCREB* was detected by Western blot and RT-PCR. The results showed that *BmCREB* was efficiently reduced by 63.0% with the transfection of 1  $\mu\text{g}$  T-227 plasmid in 72 hours. The down-regulation of *BmCREB* was significant within different shRNA plasmids. Plasmid T-227 had the best efficiency. These results would lay a foundation for the further research on *BmCREB* mechanism of the *Bombyx mori* diapause by shRNA *in vivo*.

**Key words:** shRNA; *Bombyx mori*; *BmCREB*

RNAi (RNA interference) 是一种反向遗传学技术,可以高效、特异性地下调目的基因的表达,已成为研究基因功能的有力手段<sup>[1-2]</sup>。RNAi 的原理是外源双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA), 引入体内由 RNA 酶 III 相关的核酸酶 (Dicer) 加工为 21~23 个核苷酸长度的双链 RNA 片段,称为小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 与特异蛋白结合形成沉默复合物 (RISC), 识别具有同源序列

的 mRNA, 介导其降解<sup>[3-4]</sup>。由于使用的 dsRNA 不同, RNAi 的策略包括长链 dsRNA、siRNA 和 shRNA (short hairpin RNA) 等。体外合成长链 dsRNA 介导的 RNAi 在昆虫中广泛使用<sup>[5-6]</sup>, 而在哺乳动物中长链 dsRNA 会引起细胞毒性, 是利用体外合成 21~23 个核苷酸的 siRNA 方法<sup>[7]</sup>, 同时 siRNA 方法也适合于昆虫<sup>[5, 8-10]</sup>。无论长链 dsRNA 还是 siRNA, 由于体外合成 dsRNA 的成本较高, 而且 dsRNA 会

收稿日期: 2015-04-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31172147) 和上海市教委创新项目 (09YZ38) 共同资助。

作者简介: 樊宗标, 硕士研究生。E-mail: 547313765@qq.com

\* 通信作者: 宋红生, 副教授。E-mail: hssong@staff.shu.edu.cn

随着在体内的降解,逐渐丧失干扰作用,它们的干扰效果具有瞬时性<sup>[11]</sup>。shRNA 是根据靶向基因序列设计合成左右对称的 19~29 nt 的片段,中间为 4~23 nt 的 loop 序列,退火后形成小分子量发卡状 shRNA,通过构建质粒在体内表达 shRNA<sup>[12]</sup>。与体外合成 dsRNA 相比,shRNA 在细胞中产生的干扰更稳定和持久<sup>[13-15]</sup>。

家蚕是鳞翅目昆虫的模式生物,已广泛利用 RNAi 技术研究基因功能<sup>[5,16]</sup>。家蚕胚胎期利用长链 dsRNA 干扰靶标基因比较成功<sup>[6]</sup>,而幼虫期注射合成的长链 dsRNA 效果不理想。最近研究揭示,siRNA 方法也能有效下调家蚕基因表达<sup>[9,17-18]</sup>。作者在研究家蚕滞育的过程中发现 CREB (cAMP response element binding protein) 基因与环境诱导家蚕滞育密切相关<sup>[19]</sup>。为了进一步明确家蚕 CREB (*BmCREB*) 基因调控家蚕滞育的机制,本研究利用 U6 启动子表达 shRNA,探讨在家蚕 BmN 细胞系用下调 *BmCREB* 的方法,为进一步在体水平下调 *BmCREB* 研究家蚕滞育的机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

家蚕卵巢细胞系(BmN)由中科院植物生理研究所黄勇平研究员实验室提供。BmN 在含 10%胎牛血清(FBS)的 TC-100 培养基(购自美国 Thermo 公司)中生长,28℃生化培养箱中培养。细胞培养至密度为  $10^6 \sim 10^7$  个·mL<sup>-1</sup> 时传代,传代周期约为 6 d。所有操作在无菌条件下进行。

### 1.2 方法

**1.2.1 shRNA 质粒的构建与鉴定** 利用家蚕基因组(<http://silkworm.genomics.org.cn/>)得到家蚕 U6 启动子序列,根据选定的 *BmCREB* 干扰序列设计引物(引物序列见表 1,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成),运用 PCR 技术,合成 U6-shRNA 片段:以 U6 启动子为模板,上游引物(引物序列见表 1)BmU6 F 来自 U6 的 5'端,下游引物 R1、R2 分别包括 sense、11 个碱基(GTGTGCTGTCC)的 loop 结构和 antisense。用 BmU6 F 和 R1 进行第 1 轮 PCR 产物作为模板,再通过 BmU6 F 和 R2 进行第 2 轮 PCR,得到 U6-shRNA 片段,两端酶切位点分别为 *Apa*I 和 *Bgl* II。通过 TA 克隆最终连接到 pMD18-T 载体上,经转化得到 shRNA 表达质粒。利用 *Apa*I 和 *Bgl* II 酶切位点,将合成的 U6-shRNA 片段连接到 pMD18-T 载体上,得到 shRNA 干扰质粒 pMD18-U6-shRNA。根据干扰 *BmCREB* 靶位点不

同,干扰质粒分别命名为 T-227、T-626、T-650 和 T-755,根据 GFP 序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/E17099.1>)设计的干扰质粒被命名为 T-GFP,作为试验的对照。构建好的质粒经酶切后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带进行测序鉴定。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
BmU6 F	CCGGAATTCAGGTTATGTAGTACACATTG
T-GFP R1	AAGGACAGCACACTTGTGGCTGTTGTAG TTGTACACTTGTAGAGCACGATA
T-GFP R2	CCATCGATAAAAAGTACAACACTACAACAG CCACAAGGACAGCACACTTGTGGCTGTTG
T-227 R1	CCGGACAGCACCGGTTGAATAACAGACT GCACCACTTGTAGAGCACGATA
T-227 R2	GAAGATCTAAAAAGGTGCAGTCTGTTATT CAACCGGACAGCACACGGTTGAATAACA
T-626 R1	GAGGACAGCACACTTGTATTGCTGCATA CTGCACTTGTAGAGCACGATA
T-626 R2	GAAGATCTAAAAAGCAGTATGCAGCGAAT CAAGAGGACAGCACACTTGTGATTTCGCT
T-650 R1	TCGGACAGCACAGCAATTGTCCATCTTGAT TCGCACTTGTAGAGCACGATA
T-650 R2	GAAGATCTAAAAAGCGAATCAAGATGGAC AATTCGGACAGCACAGCAATTGTCCATC
T-755 R1	GAGGACAGCACACTCAAGGCACTTGATGT ACTCCACTTGTAGAGCACGATA
T-755 R2	GAAGATCTAAAAAGGAGTACATCAAGTGC CTTGAGGACAGCACACTCAAGGCACTTG
Primer-F	GGAGCCTGACTGGGTAGAGTAAGTT
Primer-R	AGTTGGCATGGAAGGGATGGT
Actin F	GCGCGCTACTCGTTCCTACTACC
Actin R	GGATGTCCACGTCGCACTTCA
U6-227 F	GGATTTTATTACAAATTCTAAAGG
U6-227 R	CAACCGGACAGCACACGGTTG
CREB F	GGAGCCTGACTGGGTAGAGTAAGTT
CREB R	AGTTGGCATGGAAGGGATGGT

**1.2.2 细胞转染** 细胞转染使用 Effectene 转染试剂盒(购自德国 Qiagen 公司)。将细胞铺于 24 孔板内,每孔汇合率达 90%以上,细胞数量约  $7 \times 10^5$  个。铺板 12 h 后,吸出培养基向每孔中加入 350  $\mu$ L 新鲜培养基,同时在灭菌的 1.5 mL 离心管中将待转染的质粒与约 60  $\mu$ L 的 EC buffer 混合,再加入 8  $\mu$ L enhancer 并混匀,室温静置 5 min;再加入 25  $\mu$ L Effectene 并混匀,室温静置 10 min,向离心管中加入 350  $\mu$ L 新鲜培养基,混匀后加入到细胞中,培养 6 h 后换成正常的培养基培养。

**1.2.3 样品的提取** 转染后的细胞培养一定时间后,分别收集细胞抽提 RNA 和蛋白质。

总 RNA 抽提和纯化:吸去细胞培养孔板内的

培养基, 每孔中加入 0.5 ml 的 Trizol 试剂, 用移液器吹打并收集细胞至 1.5 mL 离心管中, 按 RNAiso 试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)方法, 抽提总 RNA。

**蛋白样品的制备与定量:** 吸去细胞培养孔板内的培养基, 用 PBS 缓冲液清洗细胞 2 次, 每孔中加 100  $\mu$ L RIPA 细胞裂解液(碧云天公司), 收集细胞至 1.5 mL 离心管中, 冰上静置 30 min; 12000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$  离心 30 min 取上清作为蛋白样品待用。蛋白定量用 BCA 试剂盒(碧云天公司), 定量的蛋白样品加入上样缓冲液, 使其浓度为 2  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 沸水煮 5 min, 立即放入冰上, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.4 半定量 RT-PCR** 按反转试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)的方法将抽提的总 RNA 反转成 cDNA, 作为 PCR 的模板。Actin 内参基因和 *BmCREB* 基因的引物序列见表 1。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统检测。

**1.2.5 蛋白的 SDS-PAGE 电泳及 Western blot** 用 12% 的浓缩胶和 6% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 每个泳道上样量 20  $\mu\text{g}$ , 用电转移法将蛋白条带转移到 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶 4 $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜; 使用 PBST 缓冲液清洗干净后, 加入一抗室温孵育 2 h, 用 PBST 洗 3 次, 每次 10 min; 加入二抗室温孵育 1 h, 用 PBST 洗 3 次, 每次 10 min。用 ECL 发光, 经胶片显影、停影、定影和水洗后晾干。一抗 CREB (Ab-133) 抗体由 SAB 公司生产, Actin(I-19) 抗体由 SANTA CRUZ 公司生产; 二抗为山羊抗兔 IgG (H&L) HRP 抗体由康成生物工程有限公司生产。

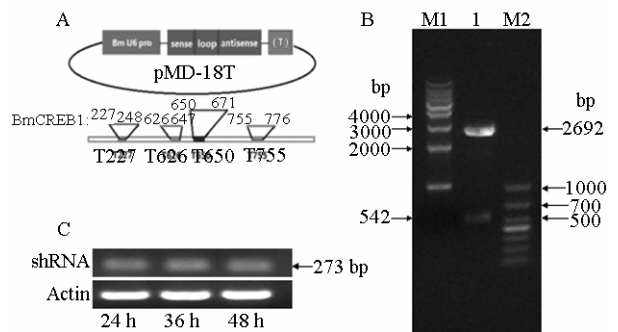
**1.2.6 数据分析** 利用凝胶成像系统采集 RT-PCR 和 Western blot 的实验数据, 采集到的数据用 Quantity One 软件定量分析, GraphPad Prism 6 进行统计分析。实验结果用平均值 $\pm$ 标准误差表示。显著性用 *t*-text 分析,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异,  $P < 0.001$  为极其显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BmCREB* 基因 shRNA 干扰质粒的构建与鉴定

利用 pMD18-T 载体构建了由家蚕 U6 启动子表达的 shRNA 干扰质粒。在 *BmCREB* 基因中分别选择了 4 个 21 nt 序列作为 shRNA 靶序列, T-227 对应于 *BmCREB* 的 227~248 bp 区段, T-626 为 626~647 bp 区段; T-650 为 650~671 bp 区段, T-755 为 755~776 bp 区段 (图 1A), T-GFP 为对应于 GFP

基因 499~520 bp 区段并设计 sense 和 antisense 构建质粒。按照 1.2 的方法构建质粒。酶切鉴定结果有 2692 bp 和 542 bp 2 个片段(图 1B), 经测序结果完全正确, 表明构建 shRNA 表达载体成功。为了鉴定质粒在家蚕细胞中表达, 针对 U6-shRNA-T227 序列, 设计了引物 U6-227F 和 U6-227R。将构建的质粒转染家蚕 BmN 细胞 24 h、36 h 和 48 h 后, 抽提细胞 RNA, 经纯化去除基因组 DNA, 用 RT-PCR 得到 273 bp 产物(图 1C), 经测序鉴定与 shRNA-227 的表达产物一致, 表明干扰质粒转染细胞后成功表达。



A: pMD18-U6-shRNA 结构图与家蚕 *BmCREB* 的 shRNA 靶点示意图; B: shRNA 干扰载体酶切鉴定结果图, M1 和 M2 为 Marker, I 为样品; C: shRNA 质粒在家蚕细胞系中表达的 RT-PCR 鉴定结果

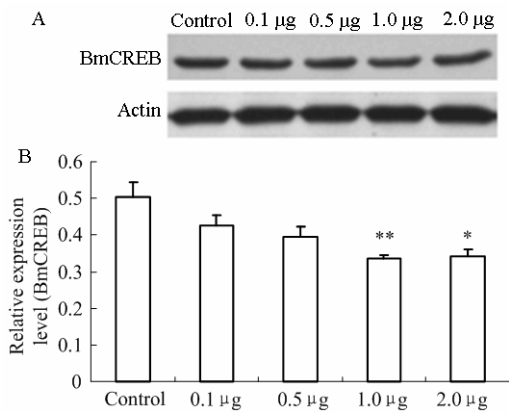
A: Structure of pMD18-U6-shRNA and diagram of shRNA targets of *BmCREB*; B: Enzyme identification by shRNA interference vectors, M1 and M2, Markers; I, sample; C: Identification of shRNA plasmid expressed in *Bombyx mori* cell line by RT-PCR

图 1 *BmCREB* 基因 shRNA 质粒的构建与鉴定

Figure 1 Construction and identification of shRNA plasmid of *BmCREB*

### 2.2 不同剂量 shRNA 对 *BmCREB* 表达的影响

为了确定 shRNA 干扰的最适浓度, 分别按每个培养孔加入 T-227 质粒 0.1、0.5、1 和 2  $\mu\text{g}$ , 对照每孔加 T-GFP 质粒 1  $\mu\text{g}$ , 转染 BmN 细胞, 转染 48 h 后抽提蛋白, 用 Western blot 检测 *BmCREB*。结果表明 0.1~1  $\mu\text{g}$  量的干扰质粒都能下调 *BmCREB* 的表达(图 2A 和 2B), 并随着干扰质粒的增加下调效果增强, 与对照比较下调 16.5%~36.6%, 但转染 0.1  $\mu\text{g}$  和 0.5  $\mu\text{g}$  差异未达到显著, 而转染 1  $\mu\text{g}$  时, 分别达到极显著水平。当转染量达 2  $\mu\text{g}$ , *BmCREB* 的表达下调 34.2%, 与 1  $\mu\text{g}$  的下调相比并没有下降。结果表明, T-227 质粒能下调 *BmCREB* 的表达, 在一定浓度范围内存在剂量依赖性。



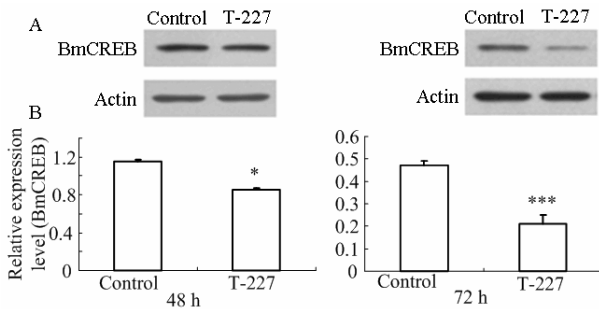
A: Western blot 结果; B: A 图的定量分析。差异分析均与对照比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

A: Result of Western blot; B: Quantitative analysis of Fig. A. Significant difference is compared with control, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 2 不同剂量 T-227 干扰质粒对 *BmCREB* 表达的影响  
Figure 2 Dose-dependent effects of T-227 on *BmCREB* expression

2.3 不同转染时间对 *BmCREB* 表达的影响

为了确定适合的干扰时间, 将 1 μg T-227 质粒转染家蚕 *BmN* 细胞后 48 h 和 72 h, 分别收集细胞, 抽提总蛋白, 用 Western blot 检测 *BmCREB* 表达量。结果如图 3 所示, 与 T-GFP 对照相比, 转染 48 h 和 72 h 都明显下调了 *BmCREB* 的表达, 分别达 23.9%和 63.0%, 其中转染 72 h 后达到极显著水平。提示随着转染时间增加, 下调作用增强。



A: Western blot 结果; B: A 图的定量分析。差异分析均与对照比较, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$

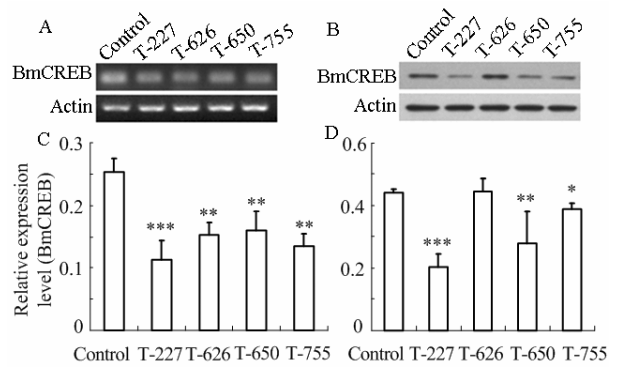
A: Result of Western blot; B: Quantitative analysis of Fig. A. Significant difference is compared with the control, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$

图 3 T-227 干扰质粒不同转染时间对 *BmCREB* 表达影响  
Figure 3 Time-dependent effects of T-227 on *BmCREB* expression

2.4 不同 shRNA 质粒对家蚕细胞系 *BmCREB* 表达的影响

针对 *BmCREB* 基因不同区域设计的 4 个 shRNA

质粒 T-227、T-626、T-650、T-755 和对照 T-GFP, 分别用 1 μg 质粒转染家蚕 *BmN* 细胞系 72 h 后, 分别抽提总 RNA 和总蛋白, 用 RT-PCR 和 Western Blot 分别检测 *BmCREB* 基因和蛋白的表达量。RT-PCR 的结果表明, 4 个 shRNA 质粒都显著地下调了 *BmCREB* 基因的表达(图 4A 和 4C), 其中 T-227 干扰效果最好, 与对照相比下调了 65.0%。Western Blot 的蛋白检测表明, 除 T-626 外, 其他 3 个质粒都显著地下调了 *BmCREB* 的表达(图 4B 和 4D), 其中 T-227 干扰效果最好, 与对照相比下调了 63.0%。这些结果表明, 不同 shRNA 对 *BmCREB* 的下调作用有明显差异。



差异分析均与对照比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

A: Result of RT-PCR; B: Result of Western blot; C: Quantitative analysis of Fig. A; D: Quantitative analysis of Fig. B. Significant difference is compared with the control, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

图 4 不同 shRNA 对 *BmCREB* 的下调作用

Figure 4 Down-regulation of different shRNA on *BmCREB* expression

3 讨论

RNAi 作为一种有效的基因沉默技术, 被广泛用于基因功能研究。shRNA 利用质粒在体内可以持续表达形成发卡结构的 siRNA, 具有低成本, 干扰效果持久等有效的特点<sup>[2]</sup>。利用 U6 启动子构建 shRNA 表达载体进行 RNAi 已被广泛应用, 但在家蚕中最早是 2008 年由 Ohtsuka<sup>[20]</sup>报道, 随后也有一些成功的应用<sup>[9,17-18]</sup>。Yamaguchi 等<sup>[18]</sup>研究表明, 家蚕胚胎期 shRNA 比长链 dsRNA 的干扰效果更好。本研究利用 pMD18-T 载体构建了 pMD18-U6-shRNA 质粒, 经脂质体转染家蚕 *BmN* 细胞系后, 能成功表达 *BmCREB* 的 shRNA, 并下调 *BmCREB* 的表达。结果表明, 利用 pMD18-U6-shRNA 质粒在家蚕细胞系中能有效干扰靶基因的表达。

剂量依赖的研究表明, *BmN* 细胞系中转染干扰质粒 0.1~1  $\mu\text{g}$ , 随着剂量增加, *BmCREB* 蛋白表达量下降, 1  $\mu\text{g}$  达到显著效果。而随着转染剂量进一步增加到 2  $\mu\text{g}$  时, 对 *BmCREB* 的抑制作用并未随浓度增加而增强。这种剂量依赖的现象在昆虫等其他物种中对不同基因的研究都有类似的现象。Tanaka 等<sup>[9]</sup>利用 NIAS-*Bm-oyanagi* 2 家蚕细胞系研究 shRNA 的 RNAi 方法时, 发现用 pLEX-4M 构建的 shRNA 质粒, 6~60 ng 范围内 RNAi 效果随转染剂量的增加逐渐增强, 而当转染量达到 120 ng 时干扰效果反而减弱。Yamaguchi 等<sup>[18]</sup>在家蚕胚胎期中干扰 *tyrosine hydroxylase (TH)* 基因表达, 分别注射 0~100  $\mu\text{mol/L}$  浓度 *TH-shRNA* 质粒, 干扰效果随着剂量增加逐渐增强, 但达到高浓度区域这种增强的趋势逐渐减弱。对于这些现象 Irie 等<sup>[21]</sup>认为, 在一定剂量范围内, 随着 siRNA 浓度增加, 反应体系的干扰效果逐渐增强, 但同时 RNA 腺苷脱氨酶 (adenosine deaminases acting on RNA, ADARs) 的作用增强会抵消这种干扰效果。ADARs 能不规则地脱去 dsRNA 中腺苷酸上的氨基, 使腺嘌呤(A)就变成了次黄嘌呤(I), 而次黄嘌呤(I)可以与鸟嘌呤(G)配对, 造成错配几率增加。因此, 如果 dsRNA 浓度过高, 由于产生过量 siRNA, 激活 ADARs 的活性, 从而对 RNAi 效果产生抑制。

时间依赖的研究表明, 转染 *BmCREB* 的 shRNA 质粒后, 随着培养时间增加, 干扰效率增强, 转染后培养 72 h 是 48 h 的近 3 倍。Ohtsuka 等<sup>[20]</sup>在家蚕 *BmN* 细胞系中利用 shRNA 下调目的基因的结果同样发现, 转染干扰质粒后 72 h 比 48 h 干扰效果好。Tanaka 等<sup>[9]</sup>在家蚕 NIAS-*Bm-oyanagi* 2 细胞系中, 研究了不同 shRNA 质粒转染后 48 h、72 h 和 96 h 目的基因的表达, 发现干扰效果好的质粒, 都在转染后 72 h 显示出最强的下调作用, 而干扰效果差的质粒, 转染后 96 h 则要比转染 72 h 的干扰效果更好。在哺乳动物<sup>[22]</sup>和果蝇<sup>[10]</sup>细胞中, 转染干扰质粒 48~72 h 内, RNA 干扰的作用最显著, 随后干扰效果会降低。认为随着转染时间延长, 一方面靶 mRNA 的丰度恢复到注入 RNA 干扰质粒之前的水平, 表现出 siRNA 抵抗现象。另一原因可能是由于 siRNA 的活性逐渐降低, 而特异识别的序列发生点突变或产生抗 siRNA 的抗体, 导致干扰效果被抑制。本实验没有 72 h 以上的检测结果, 在家蚕 *BmN* 细胞系中 *BmCREB* 的 shRNA 持续干扰时间有待进一步研究。

靶序列的选择是 RNAi 成功的关键。影响

RNAi 效果的因素有很多, 其中靶点的选择尤为重要, 有时甚至 2 个碱基的差异就可导致干扰效果完全丧失<sup>[23-24]</sup>。我们的试验中选择了 *BmCREB* 基因上 4 个靶点, 分别构建了 pMD18-U6-shRNA 质粒 T-227、T-626、T-650 和 T-755。结果显示, T-227 无论在基因水平还是蛋白水平, 干扰效果都是最好。其他 3 个质粒的下调作用明显低于 T-227, 尤其是在蛋白水平, 有的甚至没有显示出下调作用。Song 等<sup>[22]</sup>在研究小鼠凋亡受体 *Fas* 基因时, 针对该基因设计了 6 个不同干扰靶点的 siRNA 进行体内实验, 结果显示 3 个靶点的干扰能够有效抑制目的基因的表达, 1 个靶点的抑制效率较低, 另外 2 个靶点则没有抑制作用。Giladi 等<sup>[25]</sup>针对 *HBV* 基因设计了 5 个靶点的 siRNA, 转染到 HepG2.2.15 细胞中, 只有 1 个 siRNA 有较强抑制效果, 而其他 siRNA 抑制效果较差。Yamaguchi 等<sup>[16]</sup>在家蚕胚胎 siRNA 研究也显示出靶位点序列选择的重要性, 靶序列 GC 含量增加有利于增强干扰效率。Attardo 等<sup>[26]</sup>在埃及斑蚊中研究 *YPP* 基因时发现, 双链 RNA 与 mRNA 的结合部位具有碱基偏好性, 这可能是影响 mRNA 沉默效果的原因之一。而影响干扰效果的另一个原因是基因脱靶<sup>[27-28]</sup>, 这是由于 RNAi 分子与细胞内部组件之间无意识的相互作用, 导致基因动摇以致脱离干扰靶点, 这个现象也显示出了 RNAi 机制的复杂性。

本研究在家蚕 *BmN* 细胞系中对利用 shRNA 下调 *BmCREB* 表达的方法进行了有益的探索, 特别是靶位点的选择, 将为进一步在在体水平研究家蚕 *CREB* 基因调控家蚕滞育机制奠定坚实基础。

## 参考文献:

- [1] Hannon G J. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- [2] Christof F, Scott W L. Stable RNA interference rules for silencing[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 10-18.
- [3] Jackson A L, Bartz S R, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi[J]. *Nat Biotech*, 2003, 21(6): 635-637.
- [4] Zimmermann T S, Lee A C, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates[J]. *Nature*, 2006, 441(7089): 111-114.
- [5] Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt J S, et al. RNA interference in *Lepidoptera*: An overview of successful studies and implications for experimental design[J]. *J Insect Physiol*, 2011, 57(2): 231-245.
- [6] Quan G X, Kanda T, Tamura T. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene[J]. *Insect Mol Biol*, 2002, 11(3): 217-222.

- [7] Elbashir S M, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *Methods*, 2002, 26: 199-213.
- [8] Clemons A, Haugen M, Le C, et al. siRNA mediated gene targeting in *Aedes aegypti* embryos reveals that frazzled regulates vector mosquito CNS development[J]. *PLoS One*, 2011(6): e16730.
- [9] Tanaka H, Fujita K, Sagisaka A. shRNA expression plasmids generated by a novel method efficiently induce gene-specific knockdown in a silkworm cell line[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 41(2):173-179.
- [10] Elbashir S M, Martinez J, Patkaniowska A. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate[J]. *EMBO J*, 2001, 20(23): 6877-6888.
- [11] Fire A, Kostas S, Montgomery M, et al. Genetic inhibition by double-stranded RNA[P]. 2003, Google Patents.
- [12] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296: 550-553.
- [13] Michael T M, Christian P P, Brian B H, et al. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins[J]. *RNA*, 2002(8): 842-650.
- [14] Jodi L M, Ryan L B, Scott Q H, et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi[J]. *PNAS*, 2008, 105(15): 5868-5873.
- [15] Jose M S, Mamie Z L, Ken C, et al. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genome[J]. *Nat Genet*, 2005, 37: 1281-1288.
- [16] Jeffrey G S, Kristin M, Lyric B, et al. Towards the elements of successful insect RNAi[J]. *J Insect Physiol*, 2013, 59(12): 1212-1221.
- [17] Zhou F, Chen R T, Lu Y, et al. piggyBac transposon-derived targeting shRNA interference against the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus(BmNPV)[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(12):8247-8254.
- [18] Yamaguchi J, Mizoguchi T, Fujiwara H. siRNAs induce efficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): 1-7.
- [19] Song H S, Sun Y, Zhang Y. Molecular cloning and characterization of *Bombyx mori* CREB gene[J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2009, 71(1): 31-44.
- [20] Ohtsuka D, Nakatsukasa T, Fujita R. Use of *Bombyx mori* U6 promoter for inducing gene-silencing in silkworm cells[J].*Journal of Insect Biotechnolog*, 2008: 77.
- [21] Irie N, Sakai N, Ueyama T, et al. Subtype-and species-specific knockdown of PKC using short interfering RNA (siRNA)[J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2002, 298(5): 738-743.
- [22] Song E, Lee S K, Wang J, et al. RNA interference targeting *Fas* protects mice from fulminant hepatitis[J]. *Nat Med*, 2003, 9(3): 347-351.
- [23] Far R K, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(15): 4417-4424.
- [24] Javier M, Agnieszka P, Henning U, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi[J]. *Cell*, 2002, 110(5): 563-574.
- [25] Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, et al. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice[J]. *Mol Ther*, 2003, 8(5): 769-776.
- [26] Attardo G M, Higgs S, Klingler K A, et al. RNA interference-mediated knockdown of a GATA factor reveals a link to anautogeny in the mosquito *Aedes aegypti*[J]. *PNAS*, 2003, 100(23): 13374-13379.
- [27] Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(8): 948-958.
- [28] Singh S, Narang A S, Mahato R I. Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA[J]. *Pharmaceut Res*, 2011, 28(12): 2996-3015.