人 hnRNPA2/B1shRNA 慢病毒载体的构建*

刘 瑶**，石 祥，方 文***
（贵州医科大学 临床生化教研室，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的：**构建人核内不均一核糖核蛋白 A2/B1（*hnRNPA2/B1*）基因的短发夹 RNA（shRNA）慢病毒载体。**方法：**根据 *hnRNPA2/B1* 基因序列，设计 4 对 hnRNPA2/B1 shRNA 的干扰序列和 1 对阴性对照序列（NC-ShRNA）；合成靶序列双链 DNA，与 pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体连接，通过测序鉴定阳性克隆；用构建的慢病毒表达载体和包装质粒共转染 HEK293T 细胞，荧光显微镜下观察转染病毒 72 h 后细胞中绿色荧光蛋白的表达，以验证共转染是否成功，超滤法浓缩病毒原液并测定病毒滴度。**结果：**经酶切和 BLAST 对测序结果比对，重组克隆中插入的序列与设计合成的 4 对 shRNA 及 1 对阴性对照 oligo DNA 完全一致，提示慢病毒载体构建成功；荧光显微镜下，HEK 293T 细胞可见强绿色荧光蛋白表达，慢病毒载体成功共转染入 HEK 293T 细胞，病毒滴度为 5×10^{11} TU/L。**结论：**成功构建人 hnRNPA2/B1 基因 shRNA 慢病毒载体，病毒滴度达 5×10^{11} TU/L。

［关键词］RNA 干扰；慢病毒；293T 细胞；载体；短发夹 RNA；核内不均一核糖核蛋白基因
［中图分类号］Q782 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2016）06-0630-05
DOI：10. 19367/j. cnki. 1000-2707. 2016. 06. 003

Construction and Identification of Lentivirus Vector of shRNA for Human hnRNPA2/B1 Gene

LIU Yao, SHI Xiang, FANG Wen
（*Department of Clinical Biochemistry, Guizhou Medcial University, Guiyang 550004, Guizhou, China*）

［**Abstract**］**Objective**: To construct lentivirus vector of shRNA for human *hnRNPA2/B1* gene. **Methods**: According to the sequence of hnRNPA2/B1 gene, 4 pairs of interference sequence containing hnRNPA2/B1 shRNA and 1 pairs of interference sequence containing negative control were designed. Targeted double chain DNA was synthesized and connected to the lentivirus vector. Positive clones were identified by sequencing. The constructed vector of slow virus expression vector and packaging plasmids were co-transfected to HEK293T cells. The expression of green fluorescent protein was observed under fluorescence microscope 72 h after virus transfection in order to verify whether co-transfection was successful or not. Ultrafiltration concentrated virus solution and the virus titer was determined. **Results**: Comparison of the results of enzyme digestion and blast sequencing showed that the insertion sequence of the recombinant clones was completely consistent with 4 pairs of shRNA and 1 pair negative control DNA oligo, indicating that the Lentivirus vector containing shRNA hnRNPA2/B1 was successfully constructed. Under the fluorescence microscope, the 293T HEK cells showed strong green fluorescent protein expression, indicating that the slow virus vector was successfully co-transfected into 293T HEK cells. The virus titer was 5×10^{11} tu/L. **Conclusions**: Lentivirus vector of shRNA for human hnRNPA2/B1 gene is successfully constructed, and the virus titer is 5×10^{11} tu/L.

［**Key words**］RNA interference; lentivirus; 293T cells; vector; Short hairpin RNA; heterogeneous nuclear ribosomal protein gene

*［基金项目］国家自然科学基金（81560481）
**贵州医科大学 2013 级硕士研究生
***通信作者 E-mail：281123997@qq. com
网络出版时间：2016－06－16 网络出版地址：http://www. cnki. net/kcms/detail/52. 5012. R. 20160616. 1648. 024. html

目前,癌症的治疗主要以化疗为主,但由于肿瘤细胞耐药性的产生,导致肿瘤细胞对多数的化疗药物不敏感[1]。本课题组前期采用洛铂作用于宫颈癌细胞后,经双向电泳及质谱技术分析鉴定差异表达蛋白,发现核内不均一核糖核蛋白 A2/B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, hnRNPA2/B1)表达下调[2]。研究发现 *hnRNPA2/B1* 基因参与了 RNA 的拼接、前体信使 RNA(Pre-mRNA)的成熟和降解,端粒、端粒酶 DNA 序列的调节及细胞的增值、分化和凋亡等过程[3],因此推测对 *hnRNPA2/B1* 基因的研究可有助于寻找治疗肿瘤的新靶点。本研究用含 *hnRNPA2/B1* 的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)与 pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体连接,构建含靶向 hnRNPA2/B1 shRNA 的重组慢病毒载体,为研究 *hnRNPA2/B1* 基因的作用及分子机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料及试剂

pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体(含表达绿色荧光蛋白基因,上海吉满公司)、大肠杆菌菌株 DH5α(上海吉满公司)、HEK293T(中国科学院细胞库)、限制性内切酶 BamH I、EcoR I 和 Taq polymerase(NEB 公司,美国),Trizol 、Plasmid 大抽 Kit(QIAGEN 公司,美国),DMEM 细胞培养基(Hyclone 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青公司),细胞培养瓶(Corning 公司,美国),0.25% 胰蛋白酶(Gibco 公司,美国)。

1.2　方法

1.2.1　shRNA 靶点选择及引物的设计　针对目的基因 hnRNPA2/B1 序列(GeneID 3181),利用 INVITROGENE 公司提供的 RNA 干扰序列设计软件,设计多个 RNA 干扰靶点序列,根据 NCBI BLAST 同源性分析,选择最佳的动力学参数的 4 个靶点 ShNRA,同时随机选择 1 个阴性对照 NC-shRNA(表 1),根据选择的基因序列分别设计并合成 4 对 shRNA 及 1 对阴性对照寡聚单链(oligo)DNA(表 2)。

表 1　hnRNPA2/B1 基因的 4 条特异性靶序列

Tab. 1　Specific target sequences of hnRNPA2/B1 gene

shRNA 编号	目标序列
1-shRNA	CAGAAATACCATACCATCAAT
2-shRNA	TGACAACTATGGAGGAGGAAA
3-shRNA	GGGCTCATGTAACTGTGAAGA
4-shRNA	GCTTTGTCTAGACAAGAAATG
NC-shRNA	TTCTCCGAACGTGTCACGT

表 2　shRNA 和 NCshRNA 序列

Tab. 2　Oligo of 4 pairs of shRNA and 1 pair NC shRNA

oligo 名称	Oligo DNA 序列(5'~3')
3935hnRNPA2/B1-shRNA1-T(EcoRI)	gatccGCAGAAATACCATACCATCAATCTCGAGATTGATGGTATGGTATTTCTGTTTTTTg
3935hnRNPA2/B1-shRNA1-B(BamHI)	aattcAAAAAACAGAAATACCATACCATCAATCTCGAGATTGATGGTATGGTATTTCTGCg
3936hnRNPA2/B1-shRNA2-T(EcoRI)	gatccGTGACAACTATGGAGGAGGAAACTCGAGTTTCCTCCTCCATAGTTGTCATTTTTTg
3936hnRNPA2/B1-shRNA2-B(BamHI)	aattcAAAAAATGACAACTATGGAGGAGGAAACTCGAGTTTCCTCCTCCATAGTTGTCACg
3937hnRNPA2/B1-shRNA3-T(EcoRI)	gatccGGGCTCATGTAACTGTGAAGACTCGAGTCTTCACAGTTACATGAGCCCTTTTTTg
3937hnRNPA2/B1-shRNA3-B(BamHI)	aattcAAAAAAGGGCTCATGTAACTGTGAAGACTCGAGTCTTCACAGTTACATGAGCCCg
3938hnRNPA2/B1-shRNA4-T(EcoRI)	gatccGCTTTGTCTAGACAAGAAATGCTCGAGCATTTCTTGTCTAGACAAAGCTTTTTTg
3938hnRNPA2/B1-shRNA4-B(BamHI)	aattcAAAAAAGCTTTGTCTAGACAAGAAATGCTCGAGCATTTCTTGTCTAGACAAAGCg
NC-shRNA1-T(EcoRI)	gatccGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCGGAGAACTTTTTTACGCGTg
NC-shRNA1-B(BamHI)	aattcACGCGTAAAAAAGTTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAAACGTGACACGTTCGGAGAACg

1.2.2　ShRNA 慢病毒重组质粒的构建　吸取上下游引物 10 μL 放入 PCR 管内,95 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min、37 ℃ 2 min 和 25 ℃ 2 min 进行退火。酶切体系为 shRNA 5 μg、10 × Buffer 5 μL、BamHI 2 μL 和 EcoRI 2 μL,用 ddH_2O 补足至 50 μL。37 ℃酶切 30 min 后进行电泳,电泳结束后,切下包含目的片段的胶条,回收载体。按照 3 μL 回收载体、Oligo 引物 1 μL、T4 DNA ligase buffer 1.5 μL 和 T4 DNA 连接酶 1 μL,用 ddH_2O 补足体积至 15 μL,于 25 ℃水浴中孵育 30 min,使 shRNA 载体与引物的连接。把连接产物全部加入感受态细胞中,于冰上放置 20 min,后于 42 ℃水浴中热击 90 s。然后迅速置于冰上放置 2~3 min。加入不含抗生素的 LB 培养基 1 000 μL 于 37 ℃,150 r/min 振荡培养 45 min。3 000 r/min 离心 2 min,弃掉约 850 μL 的上清液,将管底的菌液吹打散开,加入到含有相应抗性的培

养皿中,用灭菌的涂布器涂匀,倒置于 37 ℃恒温培养箱内过夜培养。挑取单菌落,进行小量摇菌培养。测序鉴定阳性克隆。

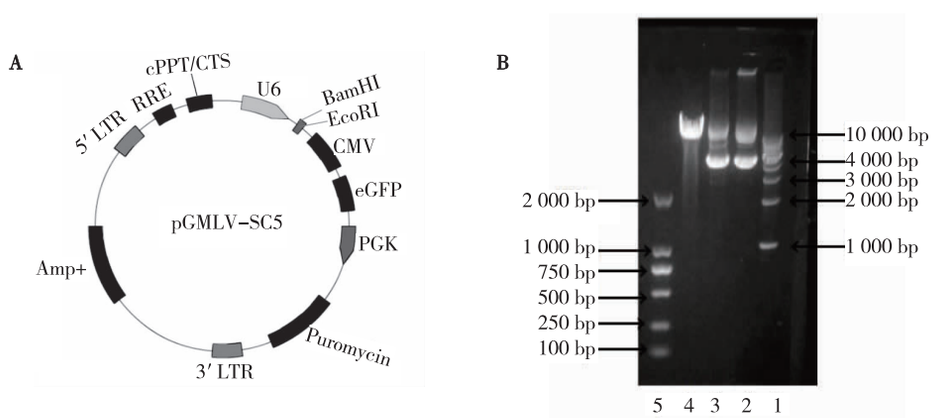
1.2.3 慢病毒包装　将 293T 细胞置于含 10% FBS 的 1640 培养基的 10 cm 培养皿中生长,当细胞长到 70% ~80% 时细胞换无血清培养基培养 1 ~2 h 后转染。取无菌 1.5 mL EP 管,加入 DMEM 培养基 1 mL、shRNA 10 μg、Lenti-HG Mix 10 μL 和 HG transgene reagent 60 μL,混匀后,室温放置 15 ~ 20 min 后均匀滴加到提前换过液的培养皿中共转染。共转染 10 ~ 12 h 时,均匀滴加 100 × Enhancing buffer(120 μL/平皿)促进转染。共转染 18 ~ 20 h 时换液,48 h 后,吸取细胞上清液于 50 mL 离心管,4 ℃,4 500 r/min 离心 5 min;上清液用 0.45 μm 滤器过滤后转移到新的离心管中,最后将滤液分批转移到浓缩装置中,4 ℃,4 500 r/min 离心 10 min,此时滤器上层的液体即为病毒浓缩液。将病毒浓缩液以 50 μL/管进行分装, -80 ℃保存备用。

1.2.4 病毒滴度的测定　将 HEK 293T 细胞培养至对数生长期,细胞胰酶消化计数,按照 8 000 细胞/孔接种 96 孔板,37 ℃培养过夜;细胞长至 30% ~50% 时进行转染,用含有 10% FBS 的细胞培养液以 10 为倍数进行病毒梯度稀释,选取所需的细胞孔,吸去培养基 90 μL,取 90 μL 慢病毒稀释液加入每孔细胞中,放入 37 ℃的细胞培养箱中培养。24 h 后去除含慢病毒的培养基,加入完全培养基 100 μL,48 h 后在荧光显微镜下观察各孔中表达绿色荧光蛋白的细胞数量,病毒滴度为表达荧光的细胞数 × 稀释倍数。

2 结果

2.1 pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体构建及鉴定

构建的 pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体如图 1。图 2B 中的泳道 4 为 pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体 DNA 经过 B*amH*I 和 E*coR*I 酶切后,形成线性的 DNA 分子;而泳道 2 和 3 均为未酶切的质粒 DNA,可见环形和超螺旋的质粒 DNA 条带,泳道 1、5 为标准分子量参照物(marker),电泳结果验证所提取的 DNA 为 pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体 DNA。测序结果经过 BLAST 软件比对,重组克隆中插入的序列与设计合成的 4 对 shRNA 及 1 对阴性对照 oligo DNA 完全一致(图 2),慢病毒载体构建成功。



注:A 为 pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体模式,B 为电泳结果

图 1　pGMLV-SC1 RNAi 慢病毒载体模式及电泳结果

Fig. 1　Map of pGMLV - SC1 RNAi lentiviral vector

2.2 慢病毒载体的包装及滴度测定

hnRNPA2/B1-shRNA1、shRNA2、shRNA3、shRNA4 及 NC-shRNA 病毒感染 HEK 293T 细胞,荧光显微镜下可见细胞生长良好,细胞内可见强的绿色荧光(图 4),说明慢病毒载体包装成功,在含有 10×10^{-5} 个/L 细胞浓度的慢病毒液孔中观察到表达绿色荧光蛋白的细胞数均 >50。病毒的滴度为 5×10^{11} TU/L。

3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是导入一条 RNA 序列,此序列与目的基因的 mRNA 序列同源,因此可以将目的基因的 mRNA 有效的特异降解,使目的基因失去应有的功能[4]。目前, RNA 干扰的方法最常用的是直接转染 siRNA 和构建

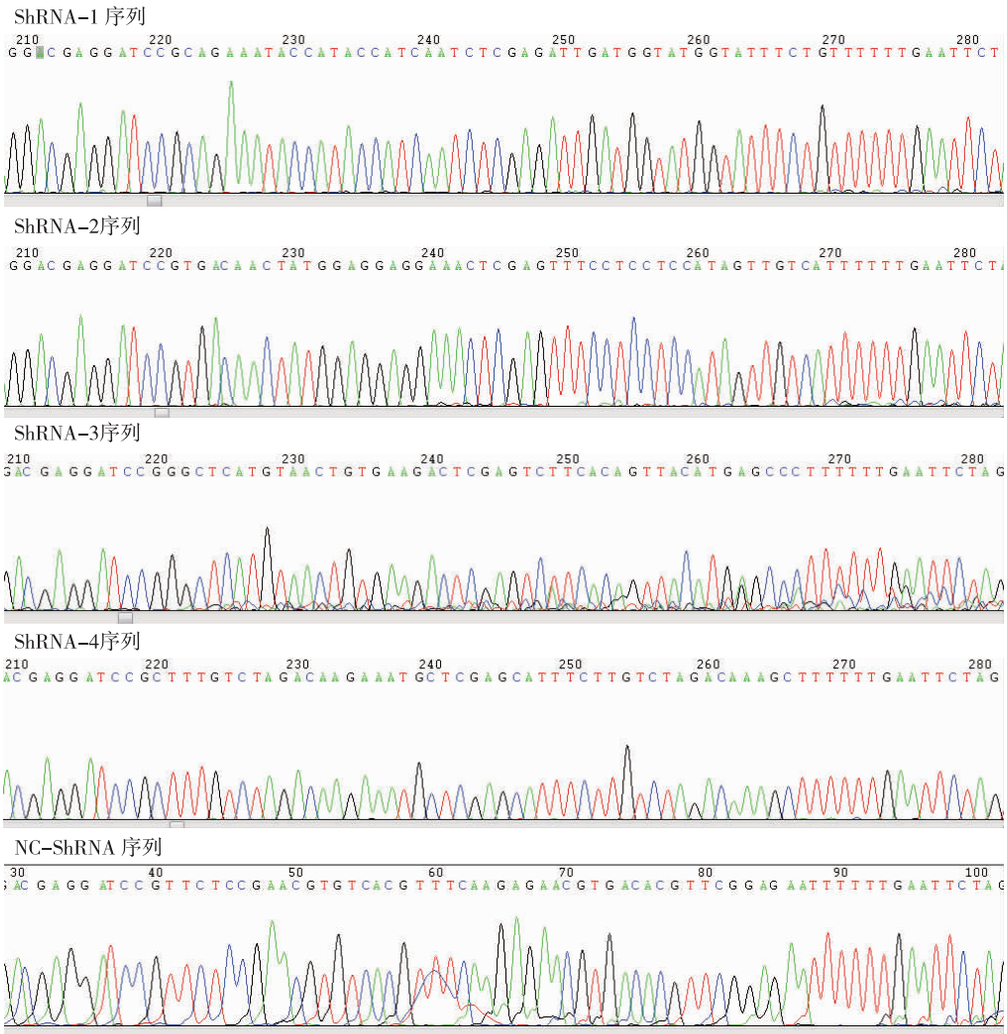
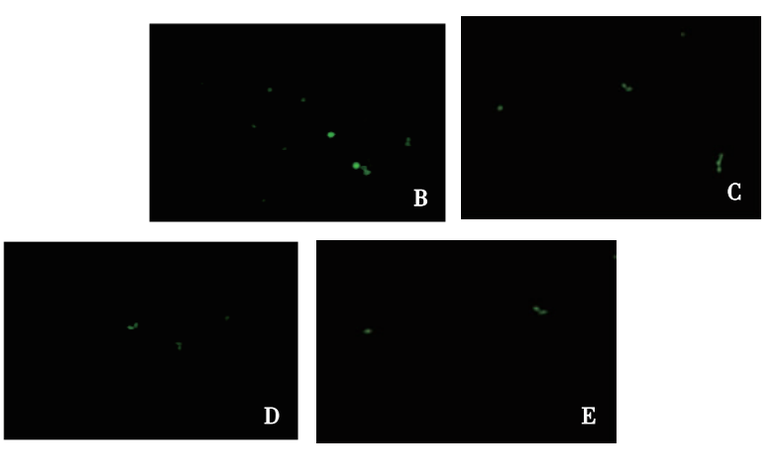


图 2　慢病毒干扰载体中 oligo DNA 测序

Fig. 2　Map of Sequence lentiviral interfered vector



注:A 为 shRNA1,B 为 shRNA2,C 为 shRNA3,D 为 shRNA4 及 E 为 NC-shRNA

图 3　慢病毒 shRNA 感染的 HEK 293T 细胞中绿色荧光蛋白表达

Fig. 3　Fluorescence photos of the HEK 293T cells infected by shRNA lentiviral

shRNA 载体。在感染的细胞中,shRNA 序列能够被加工成需要的 siRNA,并稳定地传到子代细胞中发挥作用[5-6]。RNA 干扰技术现已在肿瘤发生、发展转移及肿瘤的耐药广泛应用[7-8]。有研究表明利用 RNA 干扰技术干扰基因的表达后,会增加列腺癌细胞、头颈部鳞癌、胰腺癌细胞等对抗癌药物的敏感性[9-13]。课题组前期用洛铂处理宫颈癌 Caski 细胞,经双向电泳及质谱技术分析鉴定差异表达蛋白,发现 hnRNPA2/B1 表达下调[2]。*hnRNPA2/B1* 基因能参与 RNA 的一系列生理活动和对端粒以及端粒酶的调节,同时对细胞的分化和凋亡也起到一定作用[3]。特别是对端粒酶的影响非常重要,参与了肿瘤细胞的凋亡[14],*hnRNPA2/B1* 是一种原癌基因,有研究证实 *hnRNPA2/B1* 基因在多种癌症中均高表达,干扰 *hnRNPA2/B1* 会增加抗癌药物对胰腺癌细胞的敏感性,hnRNPA2/B1 的表达降低,抑制肿瘤形成[15-16]。利用慢病毒构建的 shRNA 克隆经过慢病毒包装系统包装后,可用于感染传统转染试剂难于转染的细胞系如原代细胞,悬浮细胞和处于非分裂状态的细胞,并且在感染后可以整合到受感染细胞的基因组,进行长时间的稳定表达[17]。本研究用含 hnRNPA2/B1 的 shRNA 与 pGMLV-SC5RNAi 慢病毒载体连接,构建含靶向 hnRNPA2/B1 shRNA 的重组慢病毒载体,期望为研究 *hnRNPA2/B1* 基因的作用及分子机制奠定基础。本研究设计的 4 个靶点 ShNRA 及 1 个阴性对照 oligo DNA 经过测序并经 BLAST 对比证实了插入慢病毒中的干扰序列的方向和序列。将构建的慢病毒载体和包装质粒共同转染 HEK 293T 细胞,成功并且获得高浓度的病毒颗粒。

综上,本研究成功构建高浓度的 hnRNPA2/B1 shRNA 慢病毒载体,为研究 *hnRNPA2/B1* 基因的作用及分子机制奠定基础。

4　参考文献

[1] Shekhar MP. Drug resistance: challenges to effective therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2011(5):613-623.

[2] Li XQ, Ran L, Fang W. Lobaplatin arrests cell cycle progression, induces apoptosis and alters the proteome in human cervical cancer cell Line CaSki[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2014(3):291-297.

[3] Zech VF, Dlaska M, Tzankov A, et al. Prognostic and diagnostic relevance of hnRNPA2/B1, hnRNPB1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Detect prev, 2006(30):395-402.

[4] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001(18):363-372.

[5] Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing[J]. Annu Rev Genet, 2002(36):489-519.

[6] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002(67): 550-553.

[7] 田瑞敏,鄢佳程,王含彦,等. RNA 干扰技术在肿瘤基因治疗中的研究现状[J]. 重庆医学, 2013(7):811-814.

[8] Perry JK, Emerald BS, Mertani HC, et al. The oncogenic potential of growth hormone[J]. Growth Horm IGF Res, 2006 (5-6):277-289.

[9] Gill C, Dowling C, O'Neill AJ, et al. Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation[J]. Mol Cancer, 2009(8):39-47.

[10] Nozawa H, Tadakuma T, Ono T, et al. Small interfering RNA targeting epidermal growth factor receptor enhances chemosensitivity to cisplatin, 5-fluorouracil and docetaxel in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Sci, 2006(10): 1115-1124.

[11] Fujioka S, Son K, Onda S, et al. Desensitization of NFkappaB for overcoming chemoresistance of pancreatic cancer cells to TNF-alpha or paclitaxel[J]. Anticancer Res, 2012 (11):4813-4821.

[12] Arlt A, Muerkoster SS, Schafer H. Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2013 (2):346-358.

[13] Lee S, Yoon CY, Byun SS, et al. The Role of c-FLIP in Cisplatin Resistance of Human Bladder Cancer Cells[J]. J Urol, 2013(6): 2327-2334.

[14] Sinha P, Poland J, kohl S, et al. Study of the development of chemoresistance in melanoma cell line using proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2003(14):2386-2404.

[15] Golan-Gerstl R, Cohen M, Shilo A, et al. Splicing factor hnRNPA2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2011(13):4464-4472.

[16] Gu WJ, Liu HL, Liu WH, et al. Induction of pancreatic cancer cell apoptosis, invasion, migration, and enthancement of chemotherapy sensitivity of gemcitabine, 5-FU and oxaliplation by hnRNPA2/B1 siRNA [J]. Anticancer durgs, 2013(6):566-576.

[17] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: Basic to translational[J]. Biochem J, 2012(3):603-618.

(2016-03-28 收稿,2016-05-19 修回)

中文编辑:吴昌学;英文编辑:刘　华