

AKT2 基因短发夹结构 RNA 慢病毒载体的构建及鉴定 *

崔 勇 陈 静 王君玉 王 麒 胡国汉 骆 纯 卢亦成[△]

(第二军医大学附属长征医院神经外科 上海市神经外科研究所 上海 200003)

摘要 目的:构建丝/苏氨酸蛋白激酶 2(AKT2)基因 RNA 干扰(RNAi)慢病毒载体。方法:利用公用网站按照 RNAi 序列设计原则,设计 RNAi 靶点序列并合成靶序列的 Oligo DNA,退火形成双链 DNA,与经 MluI 和 ClaI 进行酶切后的 PLVTHM 载体连接产生 shRNA 慢病毒载体。应用 shRNA 慢病毒载体转染 293T 细胞及 U87 细胞,测定病毒滴度,流式细胞仪测定 U87 细胞的转染效率,PCR 及 Western blot 鉴定 AKT2 基因在 U87 细胞中的下调作用。结果:成功构建了 shRNA-AKT2 慢病毒载体,经测序与设计合成的靶向链完全一致。荧光显微镜下观察 293T 细胞感染效率大于 90%,病毒滴度为 3.59×10^7 TU/ml,流式细胞仪测定对 AKT2 细胞的转染效率为 86.93%。PCR 测定 shRNA 载体感染 U87 细胞后 AKT2 的干扰效率为 68%。Western Blot 结果显示该慢病毒载体对 AKT2 的表达有较为显著的敲减作用。结论:成功构建了人胶质瘤细胞株 AKT2 基因 RNAi 慢病毒载体,为后续的体内外功能学试验创造了条件。

关键词 丝/苏氨酸蛋白激酶 2; RNA 干扰; 短发夹结构 RNA; 慢病毒载体

中图分类号 Q75 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)08-1413-04

Construction and Identification of Lentiviral Vector-Mediated Short Hairpin RNA of AKT2 Gene*

CUI Yong, CHEN Jing, WANG Jun-yu, WANG Qi, HU Guo-han, LUO Chun, LU Yi-cheng[△]

(Department of Neurosurgery, The Affiliated Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Institute of Shanghai Neurosurgical Research, Shanghai, 200003, China)

ABSTRACT Objective: To construct a lentiviral vector-mediated RNA interference (RNAi) of AKT2 gene. **Methods:** In accordance with RNAi sequence design principles in the public Web site, RNAi target sequences were designed, then the target sequences of Oligo DNA were synthesized and annealed to double-stranded DNA, which were connected with PLVTHM-GFP vector digested by MluI and ClaI. Short hairpin RNA lentiviral vectors were constructed. 293T cells and U87 cells were transfected by shRNA lentiviral vector and virus titer was determined. Transfection efficiency U87 cell was determined by flow cytometry. The expression of the AKT2 gene in U87 cells was identified by PCR and Western blot. **Results:** The lentiviral vector of AKT2- shRNA-oligonucleotide chain was inserted correctly, infection efficiency of 293T cells observed under fluorescence microscope was more than 90%, the virus titer was 3.59×10^7 TU/ml; Transfection efficiency was 86.93%. AKT2 interference rate was 68%. shRNA lentiviral vectors inhibited the expression of AKT2. **Conclusion:** A lentiviral vector of AKT2- gene RNAi was constructed successfully by the genetic engineering technology, and it provides a condition for further research in vitro and vivo.

Key Words: AKT2 ;RNA interference ;Short hairpin RNA ;lentiviral vector

Chinese Library Classification(CLC): Q75 Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)08-1413-04

前言

慢病毒载体作为新一代高效表达载体推进了肿瘤的基因治疗研究。siRNA 介导的基因干扰技术是近几年发展起来的一个崭新的研究领域,因其简便易行并且具有特异性和高效性,已经成为研究基因功能和基因表达调控的重要方法^[1,2]。慢病毒感染靶细胞发挥基因沉默的作用稳定而持久,可显著提高 RNA 干扰(RNAi)的抑制效率。慢病毒载体能稳定介导基因沉默或过表达,具有很高的转染效率和较长时间的持续效应^[3,4]。

丝/苏氨酸蛋白激酶 2 (serine/ threonine kinase β , AKT2) 是近年发现的一种原癌基因,多种颅外恶性肿瘤的发生发展与 AKT2 的扩增、过表达和激酶活性升高有关,且肿瘤增殖和侵袭与 AKT2 的表达水平和激酶活性密切相关^[5]。本实验针对 AKT2 基因构建 RNAi 慢病毒载体,以建立 AKT2 表达降低的细胞系,为研究 AKT2 对人胶质瘤细胞株生物学行为的影响奠定基础。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金(30930094)

作者简介:崔勇(1979-)男,硕士研究生,主要研究方向为胶质瘤。E-mail: ben_cuiyong@126.com.

[△]通讯作者:卢亦成,主任医师,教授,博士生导师 E-mail: luy305@163.com.

(收稿日期 2010-12-23 接受日期 2011-01-17)

1.1 试剂及材料

胎牛血清(Invitrogen),大肠杆菌菌株 DH5 α (Invitrogen), 胰蛋白酶(Invitrogen)。质粒 DNA 提取试剂盒(Axygen)。细胞培养箱(healforce)荧光倒置显微镜(奥林帕斯)。AKT2 抗体(台湾 abnova) β -actin 抗体(Santa Cruz) 二抗(Cellsignaling),限制性内切酶(Takara) KOD-PLUS(TOYOBO) T4 连接酶(TOYOBO) 小、大量抽提试剂盒(Axygen)等。Trizol(Invitrogen) 逆转录试剂盒(MBI Fermentas) Quant qRT-PCR(SYBR Green I) Kit(TIANGEN) Real-Time PCR 仪(ABI) 低温冷冻离心机(Eppendorf) BCA 蛋白定量试剂盒(申能博采) 聚丙烯酰胺(博大泰克) PVDF 膜(Millpro) AB 显影液(TIANGEN)。

1.2 细胞株、菌株及质粒

慢病毒载体系统(LVTHM 载体):组成为 pRsv-REV, pMDlg-pRRE pMD2G 和 pLVTHM, 其中 pLVTHM 含有目的基因 pRsv-REV, pMDlg-pRRE pMD2G 含有病毒包装所必须的元件。H1 启动子后的 MluI 和 ClaI 为插入位点:目的片断插入 MluI, ClaI 位点,由 H1 启动子调控表达,该慢病毒载体中含有 EF1-alpha 启动子调控的 GFP 表达。病毒包装细胞系 293T(ATCC)、U87 胶质瘤细胞(中国科学院上海研究所细胞库)。

1.3 方法

1.3.1 AKT2miRNA 干扰载体序列设计 参考 Pscherer A 等^[2]的设计方案,根据 Genbank AKT2 mRNA 序列(M 95936) 所选择的靶序列通过基因 Blast 分析以排除 siRNA 非特异性的抑制其基因的可能。合成其发卡样两端配对的寡核苷酸链,直接连入酶切后的 RNA 干扰载体上。设计特异性寡核苷酸(针对靶基因序列设计并合成 shRNA 序列(下划线区域为干扰序列)如下:5'-GACGAAACACCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTC - TCGAGACGTGACACGTTCCGAGAATTTTGAATTCGGA-TCC-3'(序列由 OligoEngine Workstation2.0 设计,由 Invitrogen 公司合成)

1.3.2 shRNA 表达质粒构建与鉴定

H1 启动子后的 MluI 和 ClaI 为插入位点:目的片断插入 MluI, ClaI 位点,由 H1 启动子调控表达,该慢病毒载体中含有 EF1-alpha 启动子调控的 GFP 表达。vshRNA 载体的构建:使用 MluI 和 ClaI 进行酶切消化,酶切反应体系为:纯化的 PLVTHM 质粒 1.5 μ l, 10xbuffer 5 μ l, MluI1 μ l, ClaI 1 μ l,加 ddH₂O 41.5 μ l 至总反应体系为 50 μ l。将上述混合的反应物置于 37 $^{\circ}$ C 37 $^{\circ}$ C 酶切 3h 后终止反应,胶回收。双链 DNA oligo 制备:目的片断 shRNA 利用 3'和 5'的单链退火获得,将合成互补的两条寡核苷酸各取 1 μ l,加入 21 μ l 的退火缓冲液,加双蒸水 16 μ l 至总体积为 20 μ l 95 $^{\circ}$ C 孵育 4 min, 75 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 55 $^{\circ}$ C 10 分钟, 35 $^{\circ}$ C 10 分钟, 15 $^{\circ}$ C 10 分钟。得到退火产物。克隆制备与鉴定:稀释好的退火产物与 vshRNA 载体连接。于 4 $^{\circ}$ C 12 h 连接反应制备克隆连接液,转化感受态细胞 DH-5 α ,铺于氨苄青霉素抗性的培养皿,37 $^{\circ}$ C 过夜,转化后的 pLVTHM-shRNA 平板挑菌,摇菌,抽质粒,送测序挑取重组质粒菌落进行鉴定。

1.3.3 慢病毒制备及检测 慢病毒包装系统 4 质粒载体分别进

行高纯度无内毒素抽提,共转染 293T 细胞,转染后 12h 更换为完全培养基,收集转染 72 h 的 293T 细胞上清液,浓缩 500 μ l PBS 重悬病毒沉淀。包装完成的慢病毒液转染接种于 24 孔板的 293T 细胞,在荧光显微镜下观察各孔中 GFP 表达量,计算病毒滴度(TU)/ml。AKT2 shRNA 干扰慢病毒载体和对照空载体慢病毒载体感染 U87 细胞后第五天,收集细胞 1 $\times$ 10⁶ 个, 1000r/min 离心 5min, 弃去培养液, PBS 洗一次,离心去 PBS, 3ml PBS 重悬,流式细胞仪检测感染效率。

1.3.4 定量 PCR 和 western Blot 鉴定目的基因表达 AKT2 的 shRNA 干扰载体、对照空载体慢病毒转染第三天的 U87 细胞,抽提总 RNA 及蛋白,定量 PCR 和 western Blot 分别检测 AKY2 基因在 RNA 和蛋白水平的表达。数据采用仪器自带软件分析:ABI Prism 7300 SDS Software;采用 $\Delta\Delta ct$ 方法计算基因的表达式及沉默效率: $\Delta\Delta ct = (\text{待测样品的目的基因的 } ct \text{ 的平均} - \text{待测样本的内参基因的 } ct \text{ 的平均}) - (\text{对照样品的目的基因的 } ct \text{ 的平均} - \text{对照样本的内参基因的 } ct \text{ 的平均})$ 基因的表达式 $F = 2^{-\Delta\Delta ct}$, 目标基因的沉默效率为 $1 - 2^{-\Delta\Delta ct}$

2 结果

2.1 构建的 shRNA 干扰载体的鉴定

测序结果(图 1)证实 RNA 干扰慢病毒载体与设计合成的靶向链完全一致,插入片断位于 88-158bp,下划线为干扰序列,测序结果(部分):ATTGAAAAATTATTTGACTGTAACA-CAAAGATATTAGTACAAAAATACGTGACGTAGAAAGTAA-TAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTAAATTATGTTTTA-AAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATT-TCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAA-ACACCGGTTCTCCGAACGTGTGTCACGTCTCGAGACGTGACACGTTCCGAGAATTTTGAATTCGGATCCATTAGGCGG-CCGCGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGTTATT-AATAGTAATCAATTACGGG……

2.2 荧光检测结果及病毒滴度测定

AKT2-RNAi 慢病毒转染 293T 细胞培养 2 天后的荧光显微镜观察慢病毒上报告基因 GFP 的表达,与显微镜下观察细胞数比对后计算其感染效率 $\geq 90\%$,证实慢病毒载转染入 293T 细胞。Lenti-shRNA 的滴度为 3.59×10^7 TU/ml。

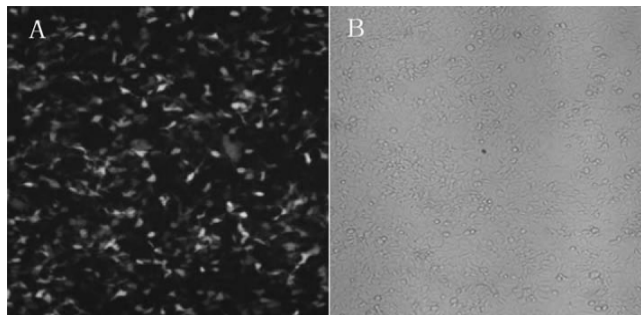


图 1 A:荧光显微镜下 Lenti-shRNA 转染 293T 细胞;
B 光镜下 Lenti-shRNA 转染 293T 细胞。

Fig 1 A: 293T cells transfected with Lenti-shRNA observed via fluorescence microscope; B: 293T cells transfected with Lenti-shRNA observed light microscope

2.3 慢病毒载体感染效率检测

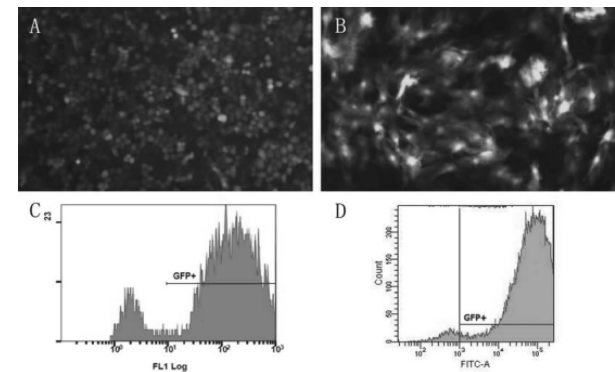


图2 慢病毒质粒转染 U87 细胞 A Lenti-shRNA 转染 U87 ; B Lenti-GFP(空病毒)转染 U87 C 流式细胞仪检测 Lenti-shRNA 感染效率为 86.93% D Lenti-GFP(空病毒)感染效率为 90.26%

Fig 2 U87 cells transfected with Lentivirus. : A:U87 cells transfected with Lenti-shRNA observed via fluorescence microscope. B:U87 cells transfected with Lenti-shRNA observed via fluorescence microscope. C.Infection efficiency of Lenti-shRNA is 86.93% (Flow cytometry) D.Infection efficiency of Lenti-GFP(Control) is 90.26% (Flow cytometry)

2.4 定量 PCR 和 Western Blot 鉴定目的基因表达

定量 PCR 检测 shRNA 载体感染 U87 细胞后 AKT2 的干扰效率为 68% ,Western Blot 结果显示 lenti-shRNA 病毒感染 U87 细胞后可以显著下调 AKT2 蛋白水平的表达。

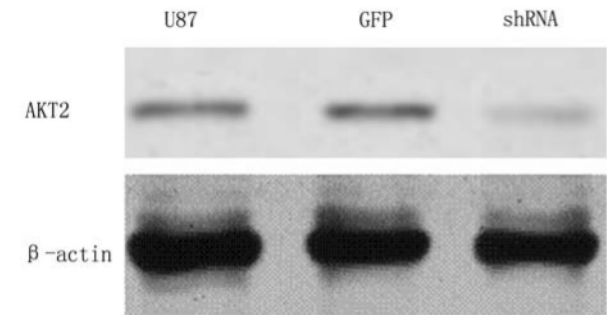


图3 Western Blot 检测 AKT2 蛋白的表达
Figure 3 AKT2 was detected by western blot

3 讨论

本研究在参考 Pscherer A^[6]成功经验的基础上设计合成针对 AKT2 基因靶位点编码 shRNA 的 DNA 模板 ,与慢病毒 LVTHM 载体连接,成功构建了 shRNA-AKT2 慢病毒载体 经测序与设计合成的靶向链完全一致.shRNA-AKT2 慢病毒载体转染 293T 细胞及 U87 细胞,荧光显微镜下观察 293T 细胞感染效率≥90% ,证实慢病毒载转染入 293T 细胞.经病毒滴度测定 Lenti-shRNA 的滴度为 3.59×10⁷TU/ml ;流式细胞仪测定对 U87 细胞的转染效率为 86.93%。根据 Western Blot 结果可以看出 ,shRNA-AKT2 慢病毒载体对 AKT2 的表达有较为显著的敲减作用 ,PCR 测定 shRNA 载体感染 U87 细胞后 AKT2 的干扰效率为 68%。

近来研究表明多种细胞外信号可通过激活 AKT2 激酶活性阻止细胞发生凋亡 ,从而导致肿瘤细胞耐药^[7,8]。翁丹卉等^[9]实

验研究进一步证明 ,AKT2 在介导化疗药物诱导的肿瘤细胞凋亡中发挥了重要作用 ,其在卵巢癌中介导了细胞存活通路的信号传导 ,使卵巢癌细胞能抵抗化疗药物诱导的凋亡 ,通过 RNAi 特异地降低 AKT2 的表达水平 ,能增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性 ,促进细胞凋亡 ,有助于提高化疗疗效。

为了深入研究 AKT2 基因在胶质瘤中的功能机制及其对胶质瘤化疗耐药关系的影响 ,本研究设计并构建了针对人 AKT2 基因的 shRNA ,以期通过 RNAi 沉默胶质瘤该基因的表达研究其作用机理及其与胶质瘤化疗耐药机制的研究。RNAi 利用具有同源性的双链小分子 RNA 诱导序列特异的目标基因的沉默 ,可以迅速阻断基因活性。它具有高度的特异性、普遍性、沉默效率高、稳定性好、操作简单、重复性好等特点。研究表明^[10,11]RNAi 能够在哺乳动物中抑制特定基因的表达 ,而且抑制基因表达的时间可以控制在发育的任何阶段 ,产生类似基因敲除的效应^[12]。与传统的基因敲除技术相比 ,这一技术具有投入少 ,周期短 ,操作简单等优势。作为一种研究工具 ,小 RNA 干扰的主要不足在于其进入细胞后容易被降解 ,作用时间短暂。为克服此缺陷 ,人们设想利用载体介导小干扰 RNA (small interfering RNA ,siRNA) 体内表达技术 ,其原理是将 siRNA 对应的 DNA 模板插入载体位于 RNA 聚合酶 启动子下游 ,在 RNA 聚合酶 作用下转录产生含发夹结构的 siRNA 即 shRNA。设计针对靶基因的 siRNA 模板 DNA ,将其与质粒连接后转染细胞 ,DNA 模板在细胞内转录形成的 shRNA 具有与 siRNA 同样的抑制靶基因表达的作用 ,更重要的是这种作用可持续数月之久^[13]。

慢病毒载体是在 HIV-1 病毒基础上改造而成的病毒载体系统 ,Robinson DA 等^[14]的研究表明 ,慢病毒(lentivirus vector)介导的 RNAi 能够在哺乳动物的细胞内稳定表达 siRNA ,且具有长期抑制基因表达 ,不易引起宿主免疫反应等特性。从应用慢病毒为载体感染哺乳动物细胞的论文发表以来 ,尚无从野生型的病毒到病毒载体确定的致病性的文献报道。此外 ,慢病毒载体还能有效感染并整合到非分裂细胞中。因此 ,慢病毒介导 RNAi 已成为当前基因治疗载体研究的热点^[15]。国内有关慢病毒载体介导的 shRNA 干扰 AKT2 的表达报道尚不多见 ,本试验在参考 Pscherer A 等成功经验的基础之上设计干扰序列 ,节省了试验成本提高了试验效率。结果表明慢病毒介导的 RNAi 感染胶质瘤细胞 U87 ,可高效稳定的转入胶质瘤细胞 U87 ,并初步证实其对细胞的 AKT2 基因表达有明显抑制作用。本实验成功构建慢病毒载体干扰 AKT2 的表达 ,为后续的体内、外试验奠定了基础。

参考文献(References)

[1] Li GH, Wei H, Chen ZT, et al. STAT3 silencing with lentivirus inhibits growth and induces apoptosis and differentiation of U251 cells [J]. J Neurooncol .2009 .91(2):165-174
[2] Mathupala SP, Guthikonda M, Sloan AE. RNAi based approaches to the treatment of malignant glioma [J]. Technol Cancer Res Treat, 2006,5(3):261-269
[3] Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, et al. Lentiviral mediated RNA interference[J]. Hum Gene Ther 2002 ,13(18):2197
[4] Stewart S, Dykxhoorn D, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells[J]. RNA, 2003,9(4): 493-501
[5] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol- 3- kinase-AKT

- pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 489-501
- [6] Pscherer A, Schliwka J, Wildenberger K, et al. Antagonizing inactivated tumor suppressor genes and activated oncogenes by a versatile transgenesis system: application in mantle cell lymphoma [J]. FASEB J, 2006, 20(8): 1188-90
- [7] Yuan ZQ, Feldman RI, Sussman GE, et al. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK / p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK-1: implication of AKT2 in chemoresistance [J]. J Biol Chem, 2003, 278(26): 23432-23440
- [8] Gagnon V, Mathieu I, Sexton E, et al. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells [J]. Gynecol Oncol, 2004, 94(3): 785-795
- [9] 翁丹卉, 邢辉, 邓友星, 等. 短发卡状 RNA 抑制 AKT2 基因表达增强卵巢癌细胞对紫杉醇敏感性的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(14): 1041-1045
- WENG Dan-hui, XING Hui, DENG You-xing, et al. Induced apoptosis of ovarian carcinoma cells by using hairpin siRNA interfering AKT2 kinase expression [J]. Chinese Journal Of Cancer Prevention And Treatment, 2007, 14(14): 1041-1045(In Chinese)
- [10] Paddison PJ. RNA interference in mammalian cell systems [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 320: 1-19
- [11] Rangasamy D, Tremethick DJ, Greaves IK. Gene knockdown by Ecdysone-based inducible RNAi in stable mammalian cell lines [J]. Nat Protoc, 2008, 3(1): 79-88
- [12] 蔡明俊, 谢蕊繁, 韩林, 等. LRIG3 特异性 RNA 干扰真核表达载体的构建及稳定株筛选 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2009, 8(2): 122-126
- CAI Ming-jun, XIE Rui-fan, HAN Lin, et al. Construction of LRIG3 specific short-hairpin RNA expressing vector and screening of stably transfected cell done [J]. Chinese Journal Of Neurosurgical disease research, 2009, 8(2): 122-126(In Chinese)
- [13] Vlassov AV, Korba B, Farrar K, et al. shRNAs targeting hepatitis C: effects of sequence and structural features, and comparison with siRNA [J]. Oligonucleotides, 2007, 17(2): 223-236
- [14] Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, et al. A Lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference [J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 401-406
- [15] Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy [J]. Gene Ther, 2006, 13(6): 55

封面说明

共同的画卷

封面设计说明

自 1997 年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕, 2010 年, 可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊 2011 年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展。① 封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时 DNA 测序技术的研制成功为契机(图中, 偏下), 这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。② 封面图案以 2010 年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿), 最强壮晶胚的筛选技术, 人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上, 右, 中, 左), 这些不仅为不孕不育患者带来了福音, 同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③ 封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长, 繁殖的人造生命细胞 Synthia 的问世(六边形图, 右), 由干细胞培育出的肺脏(六边形图, 左)等最新研究成果。④ 封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机, 关于艾滋病的研究取得了很多成就, 但我们还没有攻克艾滋病, 特别是 Superbug 耐药性超级细菌的出现, 让无数人感到前所未有的恐慌(六边形, 中)。⑤ 生命科学的一切研究成果, 只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花, 因此图片采用波浪形设计, 如河流奔涌向前, 如画卷色彩缤纷, 如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过, 未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展, 需要有准备的大脑, 也需要灵光突闪的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域, 我们如图中的小孩一样, 睁大纯真的眼睛, 好奇的观察、了解, 我们也需要运用一系列的技术手段, 面对未知的一个个“黑箱”问题, 需要细心大胆的研究、推断, 同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机, 应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信, 《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台, 不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷, 让我们与你们共同分享灵感与喜悦, 成功与辉煌!