

文章编号 1006-8147(2020)06-0505-05

论 著

长链非编码 RNA(AC073934.6)慢病毒质粒构建及其对 HEY 和 HeLa 细胞系 *SND1* 表达的影响

扈利红, 邱宝晨, 辛灵彪, 张纬

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 天津 300070)

摘要 目的: 构建长链非编码 RNA AC073934.6(*lncRNA-AC*)的慢病毒质粒, 在 HEY 和 HeLa 细胞中稳定表达, 并观察其对邻近基因 *SND1* 表达的影响。方法: 提取基因组 DNA, 扩增出 *lncRNA-AC* 外显子 1(F1R1)和外显子 2(F2R2), 化学合成外显子 3(F3R3)。利用重叠延伸 PCR 获得上述 3 个 DNA 片段的连接产物(F1R3); 通过同源重组的方法将 F1R3 和慢病毒载体 pLVX-IRES-Puro 连接起来, 构建 pLVX-*lncRNA-AC* 重组质粒。用慢病毒包装的方法获得过表达 *lncRNA-AC* 的慢病毒, 随后感染 HEY 和 HeLa 细胞系, PCR 检测 *lncRNA-AC* 的转录, 通过实时荧光定量 PCR 和 Western 印迹检测 *SND1* 表达。结果: 通过菌液 PCR 和测序验证了重组质粒 pLVX-*lncRNA-AC* 构建成功; 利用慢病毒感染细胞后, 通过 PCR 检测过表达 *lncRNA-AC* 的稳定株构建成功; 在稳定株中通过实时荧光定量 PCR 检测 *SND1* 的 mRNA 水平, 在 HEY 细胞系中, WT 和过表达 *lncRNA-AC* 后 *SND1* 的 mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.14 和 1.24 ± 0.19 , 两者比较, 差异无统计学意义($t=1.761, P=0.07$); 在 HeLa 细胞系中, 两者的表达量分别为 1.02 ± 0.09 和 0.83 ± 0.13 , 差异无统计学意义($t=2.081, P=0.14$), 同时 Western 印迹检测 *SND1* 的蛋白水平无明显差异。结论: 在 HEY 和 HeLa 细胞系中过表达 *lncRNA-AC* 不影响 *SND1* 的表达。

关键词 *lncRNA*; 质粒构建; 同源重组; *SND1*

中图分类号 Q784

文献标志码 A

Construction of *lncRNA*(AC073934.6) lentiviral plasmid and its effects on *SND1* expression in HEY and HeLa cell lines

HU Li-hong, QIU Bao-chen, XIN Ling-biao, ZHANG Wei

(Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To construct a lentiviral plasmid of long non-coding RNA AC073934.6(*lncRNA-AC*) stably expressed in HEY and HeLa cell lines, and observe its effects on the expression of *SND1*. **Methods:** *lncRNA-AC* exon 1(F1R1) and exon 2(F2R2) were amplified by using the extracted genomic DNA as template, and exon 3(F3R3) was chemically synthesized. The target product(F1R3) of *lncRNA-AC* was obtained by overlap extension PCR that ligated the above three DNA fragments. F1R3 and the lentiviral vector pLVX-IRES-Puro were ligated by homologous recombination to construct recombinant pLVX-*lncRNA-AC* plasmid. Virions, over-expressing *lncRNA-AC*, was obtained by lentivirus packaging, and subsequently infected with HEY and HeLa cell lines. PCR was used to test the transcription of *lncRNA-AC*. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blotting were used to detect the expression of *SND1*. **Results:** The recombinant plasmid pLVX-*lncRNA-AC* was successfully constructed by bacterial PCR and sequencing. Lentivirus was used to infect cells to construct a stable overexpressing *lncRNA-AC* strain which was tested by PCR. The mRNA level of *SND1* was detected by real-time fluorescent quantitative PCR in stable strains. In the HEY cell line, the relative expression of *SND1* mRNA in WT and overexpression of *lncRNA-AC* were 1.00 ± 0.14 and 1.24 ± 0.19 , there was no statistical difference($t=1.761, P=0.07$). In the HeLa cell line, the expression levels were 1.02 ± 0.09 and 0.83 ± 0.13 , the difference was not statistically significant($t=2.081, P=0.14$), and there was no significant difference in the protein level of *SND1* detected by Western blotting. **Conclusion:** In HEY and HeLa cell lines, overexpression of *lncRNA-AC* can not affect the expression of *SND1*.

Key words *lncRNA*; plasmid construction; homologous recombination; *SND1*

非编码 RNA(non-coding RNAs, ncRNAs)是一种不编码蛋白质的 RNA, 通常按照其核苷酸的数量
基金项目 国家自然科学基金青年项目(81802588); 天津市自然科学基金青年项目(17JCQNJC12600); 天津市高等教育委员会科技发展基金一般项目(2016YD18)

作者简介 扈利红(1996-), 女, 硕士在读, 研究方向: *SND1* 在海马体中的作用; 通信作者: 张纬, E-mail: zhangjingyi98@163.com。

分为两类, 其中长度小于 200 个核苷酸的称为小 ncRNAs, 包括微小 RNAs(miRNAs)、短干扰 RNAs(siRNAs)和小核仁 RNAs(snoRNAs)等, 而长度大于 200 个核苷酸的则称为长链非编码 RNA(lncRNAs)。近几年的研究发现 lncRNAs 在胞核和胞浆里均有功能^[1]。在胞核里 lncRNA 可以起到招募转录相关蛋

白并识别 DNA 的作用;在胞浆里通过吸附小miRNAs 避免其与 mRNA 结合,进而间接影响 mRNA 的稳定性^[2]。因此 lncRNA 可以参与许多的生命活动以及疾病的发生和发展^[3-5]。

长链非编码 RNA AC073934.6(*lncRNA-AC*)是最近被鉴定出的一个不编码蛋白质的转录产物。它位于人的 7 号染色体 q32.1 区,长 7 328 bp,包含 3 个长度分别为 340 bp、112 bp、43 bp 的外显子,但目前尚没有对其功能的研究。*SND1*(staphylococcal nuclease domain containing 1)蛋白是一个保守的多功能蛋白,前期的研究已表明,*SND1* 在基因转录、mRNA 剪切、mRNA 稳定性等方面发挥重要作用,进而参与细胞分化和肿瘤细胞的增殖和转移^[6-10]。近期研究发现 *SND1* 在卵巢癌中高表达,并能促进卵巢癌细胞的转移^[11]。但目前为止,对于 *SND1* 本身的表达调控机制尚不清楚。*lncRNA-AC* 与 *SND1* 基因在基因组上的位置靠近,因此 *lncRNA-AC* 可能会通过调控 *SND1* 进而参与肿瘤的增殖和转移。本研究利用同源重组的方法构建了真核 pLVX-*lncRNA-AC* 重组质粒,并在 HEY 和 HeLa 两种细胞系中成功表达,探讨 *lncRNA-AC* 与 *SND1* 的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 慢病毒质粒载体 pLVX-IRES-Puro、包装质粒 pMD2.G、包装质粒 psPAX2 由天津医科大学生物化学与分子生物学系石磊教授馈赠;DH5α 感受态大肠杆菌 *E.coli* (BC102)购自博迈德生物公司;人肾上皮细胞 293T、人卵巢癌细胞 HEY、人宫颈癌细胞 Hela 均来自本实验室。

1.1.2 实验试剂 限制性内切酶 *Xho* I (FD0694)和 *Xba* I (FD0684)、BCA 蛋白测定试剂盒(#SA242678)、revert aid first strand cDNA synthesis kit(K1622)均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;primestar[®] max DNA polymerase (R045A) 和 primestar[®] gxl DNA polymerase(R050Q)购于 Takara 公司;genbuildertm-

cloningkit(L00701)购自 GenScript;去内毒素质粒提取试剂盒(PD1222-01)购自 Biomiga;DNA 快速凝胶回收试剂盒(28704)购自 QIAGEN;tripureisolationreagent(11667165001)购自 Roche;trans 2K DNA marker(BM101-01)购于北京全式金公司。多克隆鼠源抗 SN4 抗体为本实验室制备;辣根过氧化物酶标记的抗鼠源 IgG 二抗(120495)购自 KPL;LumiGLO 化学发光底物(D0018-2)购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 数据库查找 *lncRNA-AC* 与 *SND1* 在基因组上的位置关系 打开 UCSC 数据库(<http://genome.ucsc.edu/>)搜索 *SND1* 与 *lncRNA-AC* 的位置关系。

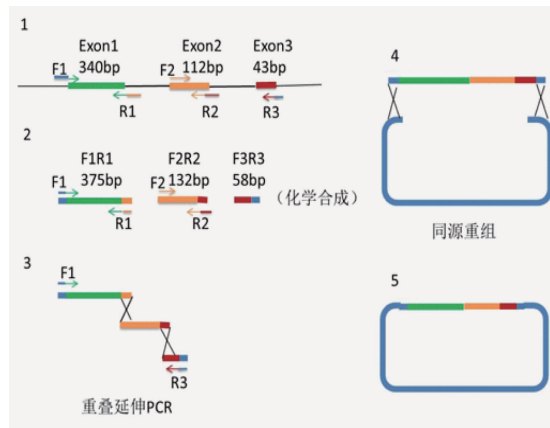
1.2.2 目的片段的获取 收集 1×10⁶ 个卵巢癌细胞 HEY,提取细胞基因组 DNA。根据 *lncRNA-AC* 以及真核表达质粒 pLVX-IRES-Puro 的基因序列,设计出针对 *lncRNA-AC* exon1 和 exon2 的引物(F1+R1、F2+R2),并将化学合成的第 3 个外显子作为引物(F3+R3)(表 1),引物由金唯智生物科技有限公司合成。利用同源重组的方法(图 1),以基因组 DNA 为模板,F1+R1 为引物,扩增出含第 1 个外显子的 DNA 片段(F1R1);同时,通过巢式 PCR 获得第 2 个外显子,首先以 F2+R3 为引物,扩增出 *lncRNA-AC* 中包括第 2 个和第 3 个外显子的 DNA 片段(F2R3),再以 F2R3 为模板,F2+R2 为引物,扩增出含第 2 个外显子的 DNA 片段(F2R2)。然后将化学合成的第 3 个外显子的 DNA 片段(F3R3)单链经过退火变成双链。利用重叠延伸 PCR,以上述 3 个 DNA 片段为模板,F1+R3 为引物,获得目的基因(F1R3)。

1.2.3 载体与目的基因的体外连接及阳性克隆的鉴定 使用去内毒素质粒提取试剂盒提取 pLVX-IRES-Puro 载体,进行 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切,胶回收酶切产物,把酶切产物和目的片段进行同源重组。同源重组的总反应体系是 20 μL,加入目的基因、线性化的载体、同源重组试剂 GenBuilder 2× Master Mix 和 ddH₂O。反应条件是 50℃连接 15 min。

表 1 *lncRNA-AC* 的引物序列

Tab 1 Primer sequences for *lncRNA-AC*

引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
F1:TTTCCGGTGAATTCCGATTTCGAAGGATGGGCTAA	375
R1:TTAGGACCGACTTCAGGATTTTTAGCCAAGGTAAAATGT	
F2:AATCCTGAAGTCGGTCCTAA	132
R2:AATACCTCCAGCTTCTTGATCTTTTCAGATAAGGGGGACT	
F3:ATCAAGAAGCTGGAGGTATTTGTTTAAAGTTCAACCATCTCAACGGCCGCGGATCC	58
R3:GGATCCGCGCCGCTTGAGATGGTTGAACTTTTAAACAAATACCTCCAGCTTCTTGAT	



注:F1R1:以 F1+R1 为引物,扩增出的 DNA 片段;F2R2:以 F2+R2 为引物,扩增出的 DNA 片段;F3R3:化学合成的第 3 个外显子

图 1 *lncRNA-AC* 质粒构建示意图

Fig 1 Schematic diagram of *lncRNA-AC* plasmid construction

重组后的产物转化至感受态大肠杆菌 DH5 α 中,将菌液涂在含氨苄青霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单克隆,用 F1+R3 引物做菌落 PCR,筛选在 525 bp 左右有条带的阳性菌落,大量培养,一部分菌液送金唯智生物科技有限公司进行测序鉴定,另一部分提取质粒保存备用。

1.2.4 HEY、HeLa 细胞 *lncRNA-AC* 稳定株的构建及鉴定 包装质粒 pMD2.G、包装质粒 psPAX2 与重组质粒按照 3.95 μ g:7.3 μ g:11.25 μ g 混匀,利用聚乙烯亚胺(PEI)共转染至融合率为 70%的 293T 细胞中,分别在 24 h、48 h 收集病毒液并用 0.45 μ m 滤器过滤。

待 HEY、HeLa 细胞的融合率达到 60%,加入 9 mL 病毒液,1 mL 胎牛血清和 75 μ g polybrene。感染 48 h 后更换新培养基并加入 1 μ g/mL 嘌呤霉素进行筛选,阳性细胞即为稳定株。取 1×10^6 稳定株细胞,用 TRIzol 法提取总 RNA,分别取 3 μ g 逆转录为 cDNA,用 PCR 法检测 *lncRNA-AC* 的表达,实时荧光定量 PCR 检测 *SND1* 的 mRNA 水平,引物如下(表 2)。同时用 10 cm 皿培养细胞,随后提取总蛋白检测蛋白浓度,经 8% SDS-PAGE,检测感染 *lncRNA-AC* 之后 *SND1* 蛋白水平变化情况。

表 2 *lncRNA-AC* 和 *SND1* 的 qPCR 引物序列

Tab 2 qPCR Primer sequences for *lncRNA-AC* and *SND1*

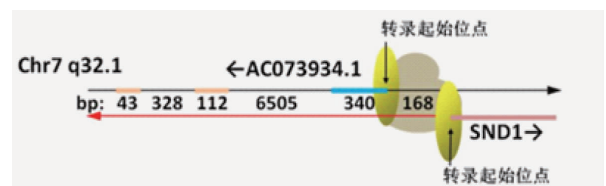
qPCR 引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
<i>lncRNA-AC</i> F1:CCACTCGACTTCCGACATT	162
<i>lncRNA-AC</i> R1:CCTCCAGCTTCTTGATCTTTC	
<i>SND1</i> F1:GGTGGACTACATTAGACCAGCC	123
<i>SND1</i> R1:AGACCTTTGCTGACAAGAGCCTC	
GAPDH F1:GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	131
GAPDH R1:ACCACCCTGTGCTGTAGCCAA	

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism7 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *lncRNA-AC* 与 *SND1* 在基因组上的位置关系 通过数据库发现,*lncRNA-AC* 的转录起始位点和 *SND1* 的转录起始位点之间仅有 168 bp,与 *SND1* 转录方向相反,AC073934.6 位于 *SND1* 基因反义链(图 2)。

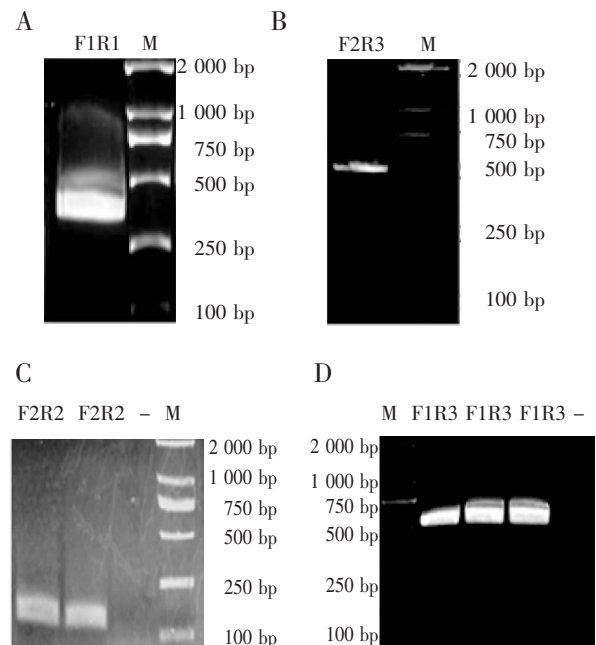
2.2 *lncRNA-AC* 基因片段获取 以基因组 DNA 为模板,成功获得 *lncRNA-AC* 的基因片段 F1R1、F2R2 和 F1R3(图 3)。



注:Chr7:7 号染色体

图 2 *lncRNA-AC* 和 *SND1* 基因的位置关系

Fig 2 Positional relationship of *lncRNA-AC* and *SND1*

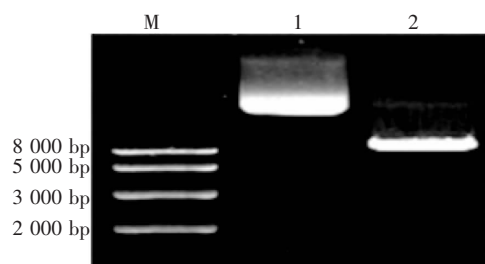


注:A:F1R1 目的片段的获取;B:F2R2 目的片段的获取;C:F2R2 目的片段的获取;D:*lncRNA-AC* 的获取;M:2K marker

图 3 *lncRNA-AC* 的目的片段

Fig 3 Target fragment of *lncRNA-AC*

2.3 载体与目的基因的体外连接及阳性克隆的鉴定 采用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切 pLVX-IRES-Puro 得到线性化的载体,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定及回收(图 4)。

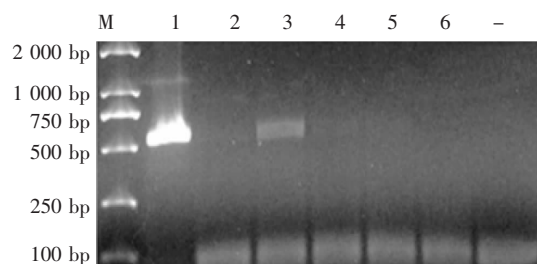


注:M:2K marker;1:pLVX-IRES-Puro 质粒;2:pLVX-IRES-Puro 质粒双酶切

图4 线性 pLVX-IRES-Puro 质粒载体的获取

Fig 4 Acquisition of linear pLVX-IRES-Puro plasmid vector

菌落 PCR 结果显示,1 号克隆含有阳性重组质粒(图 5)。测序结果显示重组质粒的序列与 *lncRNA-AC* 序列完全一致(图 6)。这些结果表明 pLVX-IRES-*lncRNA-AC* 质粒构建成功。



注: M:2K marker;1-6 单克隆菌;-:阴性对照

图5 菌落 PCR 筛选阳性重组体

Fig 5 Bacterial PCR screening for positive recombinants

2.4 HEY、HeLa 细胞 *lncRNA-AC* 稳定株的构建及 *SND1* 表达量的测定 普通 PCR 扩增 *lncRNA-AC*, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 *lncRNA-AC* 在细胞中成功转录(图 7)。

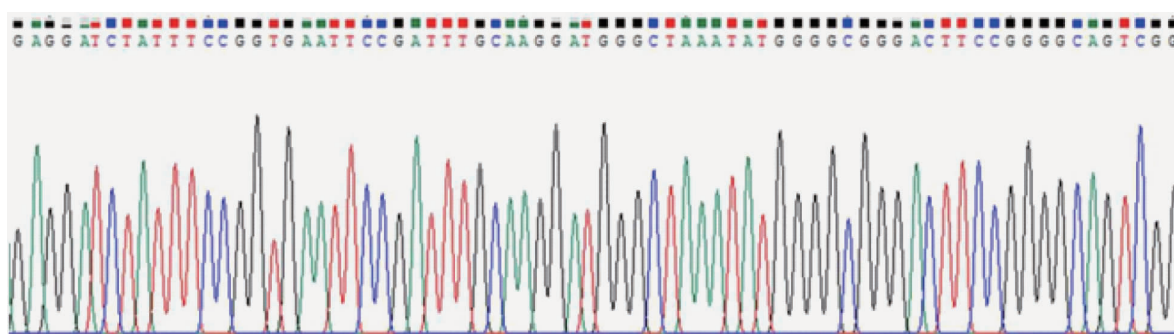
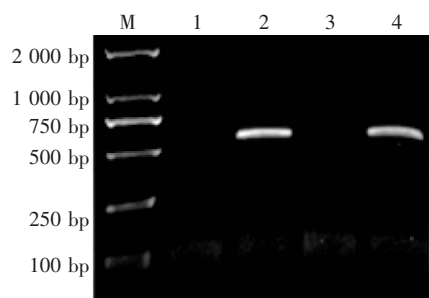


图6 重组质粒 *lncRNA-AC* 的测序结果

Fig 6 Sequencing results of recombinant plasmid *lncRNA-AC*



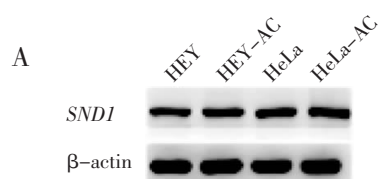
注:M:2K marker;1:HEY 细胞;2:HEY-*lncRNA-AC* 细胞;3:HeLa 细胞;4:HeLa-*lncRNA-AC* 细胞

图7 过表达 *lncRNA-AC* 稳定株的 PCR 结果

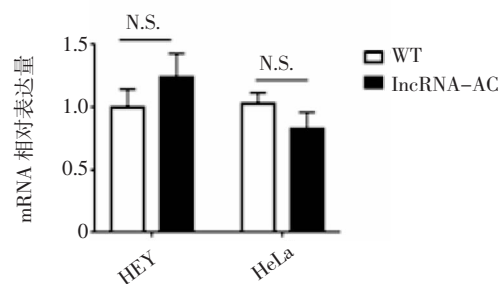
Fig 7 PCR of *lncRNA-AC* overexpressing stable strain

在 HEY 和 HeLa 细胞中,通过 Western 印迹检测, *lncRNA-AC* 的过表达几乎不影响 *SND1* 的蛋白质水平(图 8A)。同时,利用实时 PCR 检测了 HEY 和 HeLa 细胞中过表达 *lncRNA-AC* 后 *SND1* 的 mRNA 水平。在 HEY 细胞系中,WT 和过表达 *lncRNA-AC* 后 *SND1* 的 mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.14 和 1.24 ± 0.19 , 差异无统计学意义($t=1.761$, $P=0.07$); 在 HeLa 细胞系中,两者的表达量分别为 1.02 ± 0.09 和 0.83 ± 0.13 ($t=2.081$, $P=0.14$), 差异无统

计学意义(图 8B)。



B



注:HEY-AC:HEY-*lncRNA-AC* 细胞;HeLa-AC:HeLa-*lncRNA-AC* 细胞;N.S.:差异无统计学意义

图8 *lncRNA-AC* 不影响 *SND1* 的表达

Fig 8 *lncRNA-AC* does not affect the expression of *SND1*

3 讨论

本研究采用了多种 PCR 衍生技术成功构建了重组质粒 *lncRNA-AC*。为了获得特异的 F2R2, 采用了巢式 PCR。巢式 PCR 的目的是使用两对 PCR 引物扩增特异的片段。第一对 PCR 引物又称外侧引物, 扩增相对大的区域; 第二对引物称为巢式引物结合在第一次 PCR 产物内部, 从而获得特异性的目的片段。其次, 采用了重叠延伸 PCR 将 *lncRNA-AC* 的 3 个外显子片段 (F1R1、F2R2 和 F3R3) 连接起来。重叠延伸 PCR 可作为位点定向突变的手段, 为目的基因引入所需的突变^[12-13]。最终, 通过同源重组的方法把 *lncRNA-AC* 的编码片段和线性化载体连接起来。同源重组构建质粒的关键是每个 DNA 片段 (包括克隆载体) 末端需含有一个 15~40 bp 的共享同源序列作为同源臂, 含有相同同源臂的两个片段可以在重组酶的作用下特异性连接。因此, 同源重组是目前高效快速构建质粒的策略^[14-15]。在本次研究中, 通过巢式 PCR、重叠延伸 PCR 和同源重组法成功构建了 *lncRNA-AC* 的慢病毒质粒。

lncRNA-AC 与 *SND1* 的转录起始位点只相差 168 bp, 且转录方向相反, 它们共用了一段转录启动序列。但是, 在 HEY 和 HeLa 细胞中过表达 *lncRNA-AC* 并不影响 *SND1* 的表达。提示在卵巢癌细胞系中 *lncRNA-AC* 可能不会形成二级结构招募蛋白并结合至 *SND1* 的启动子去影响 *SND1* 的表达。*lncRNA-AC* 在 HEY 细胞和 HeLa 细胞中几乎不表达, 但 *SND1* 的表达量均比较高。这可能是由于 *lncRNA-AC* 与 *SND1* 的转录方向相反, 发生转录碰撞, 随后 *SND1* 的转录活性占主导所致。然而有趣的是, 在数据库中发现 *lncRNA-AC* 和 *SND1* 均在肝、垂体和睾丸等中高表达。提示在肝、垂体和睾丸中可能存在着不同于细胞系中的组织特异性的表达调控机制。但是, 目前还没有在小鼠基因组中找到人源 *lncRNA-AC* 的同系转录本或者转录类似物。因此需要继续在人源的肝细胞系中探讨 *lncRNA-AC* 与 *SND1* 的表达关系。

参考文献:

- [1] Barangi S, Hayes A, Reiter R, et al. The therapeutic role of long non-coding RNAs in human diseases: a focus on the recent insights into autophagy[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142:22
- [2] Wang K, Liu F, Zhou L, et al. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489[J]. *Circ Res*, 2014, 114(9):1377
- [3] Archer K, Broskova Z, Bayoumi A, et al. Long non-coding RNAs as master regulators in cardiovascular diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10):23651
- [4] Liang L, Zhang Z, Qin X, et al. Long noncoding RNA ZFAS1 promotes tumorigenesis through regulation of miR-150-5p/RAB9A in melanoma[J]. *Melanoma Res*, 2019, 29(6):569
- [5] Cabianca D, Casa V, Gabellini D. A novel molecular mechanism in human genetic disease: a DNA repeat-derived lncRNA [J]. *RNA Biol*, 2012, 9(10):1211
- [6] Azais H, Mordon S, Collinet P. Intraperitoneal photodynamic therapy for peritoneal metastasis of epithelial ovarian cancer. Limits and future prospects[J]. *Gynecol Obstet Fertil Senol*, 2017, 45(4):249
- [7] Su C, Zhang C, Tecle A, et al. Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN), a novel regulator facilitating G1/S phase transition, acting as a co-activator of E2F-1 in cell cycle regulation[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(11):7208
- [8] Yang J, Valineva T, Hong J, et al. Transcriptional co-activator protein p100 interacts with snRNP proteins and facilitates the assembly of the spliceosome[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(13):4485
- [9] Cui X, Zhao C, Yao X, et al. SND1 acts as an anti-apoptotic factor via regulating the expression of lncRNA UCA1 in hepatocellular carcinoma[J]. *RNA Biol*, 2018, 15(10):1364
- [10] Gutierrez E, Denisenko T, Zhivotovsky B, et al. Tudor staphylococcal nuclease: biochemistry and functions[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(11):1739
- [11] Xin L, Zhao R, Lei J, et al. SND1 acts upstream of SLUG to regulate the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in SKOV3 cells[J]. *FASEB J*, 2019, 33(3):3795
- [12] 哈传博, 赵然, 雷静, 等. 同义突变 SND1 慢病毒质粒的构建及回复表达[J]. *生物技术*, 2018, 28(4):329
- [13] Heckman K, Pease L. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(4):924
- [14] 马凯, 胡红霞, 于婧, 等. 双酶切和同源重组方法构建 pMIR-reporter 载体的比较[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(6):495
- [15] 邱翊婷, 袁定阳, 李莉, 等. 一种载体构建的新方法: 重组融合 PCR 法[J]. *基因组学与应用生物学*, 2012, 31(6):634

(2020-05-21 收稿)