

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01257

## 针对人 *NeuroD* 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建及鉴定

王洋, 高莉, 卜海激, 陈颖, 朱明华\*

第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 构建并鉴定人神经源性分化蛋白基因(*NeuroD*) RNA 干扰慢病毒表达载体。**方法** 根据已公布的 *NeuroD* 基因序列(GenBank:NM\_002500),设计并合成4对 shRNA(*NeuroD1~D4*),与载体 pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR 连接,构建 pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR-*NeuroD* 表达载体,转入人感受态细胞 DH5 $\alpha$ ; real-time PCR 技术检测 pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR-*NeuroD* 表达载体对 293T 细胞内靶基因的干扰效果。将筛选出的干扰载体 pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR-*NeuroD1* 与慢病毒载体 pLenti6.3/V5-DEST 经酶切后连接,构建慢病毒表达载体 pLenti6.3-EGFP-*NeuroD1*-miR。用构建的慢病毒表达载体和包装质粒(Packaging Mix)共转染 293T 细胞,包装病毒,收集病毒原液,超速离心浓缩,并测定滴度。采用 PCR 法对重组载体进行鉴定,利用绿色荧光蛋白作为报告基因,对病毒滴度和感染效率进行检测。**结果** 成功构建针对靶基因的4个干扰质粒,测序结果表明,4个 pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR-*NeuroD* 表达载体序列与参考序列一致,real-time PCR 检测显示以 pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR-*NeuroD1* 的沉默效应最佳( $P < 0.01$ )。将重组获得的慢病毒表达载体 pLenti6.3-EGFP-*NeuroD1*-miR 转染至 293T 细胞株,酶切鉴定及 PCR 结果与病毒载体的预期一致,病毒滴度达  $1.18 \times 10^8$  ifu/mL。**结论** 成功构建、筛选了针对人 *NeuroD* 基因的 RNA 干扰慢病毒表达载体。

**[关键词]** 慢病毒; *NeuroD* 基因; RNA 干扰; 胰腺肿瘤

**[中图分类号]** R 349.83 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)11-1257-05

### Construction and identification of RNAi lentiviral vector targeting *NeuroD*

WANG Yang, GAO Li, BU Hai-ji, CHEN Ying, ZHU Ming-hua\*

Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To construct and identify RNAi lentiviral expression vectors targeting human neurogenic differentiation gene (*NeuroD*). **Methods** The oligo DNA sequences of 4 pairs of shRNA, named as *NeuroD1*, *NeuroD2*, *NeuroD3*, and *NeuroD4*, were designed according to *NeuroD* gene sequence (GenBank:NM\_002500). The single strand of oligo DNA was annealed to form double strand DNA, and then was cloned into the empty plasmid pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR. Four interference plasmids were constructed and transformed into competent cells DH5 $\alpha$ . Interference carrier was transiently transfected into target cells and the interference effect against target genes was detected by real-time PCR. The interference plasmid pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR-*NeuroD1* was linked to lentiviral destination vector pLenti6.3/V5-DEST to form the lentiviral expression vector pLenti6.3-EGFP-*NeuroD1*-miR. Constructed lentiviral vector carrier and packaging plasmids (Packaging Mix) were cotransfected into 293T cells, and followed by packaging virus, collecting the virus stock solution, ultracentrifugating, condensing, and detecting the titer. PCR method was used to identify the recombinant vector; enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression was used to determine the titer and the infection rate of the recombinant lentivirus under fluorescent microscope. **Results** Four interference plasmids for target gene were successfully constructed. The sequences of expression vector pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR-*NeuroD1/2/3/4* were proven correct using sequencing method. miR-*NeuroD1* sequence showed the best silencing effect after transfected into 293T cells ( $P < 0.01$ ). Restriction endonuclease and PCR analysis confirmed that the pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/EmGFP-miR-*NeuroD1* was successfully inserted into the lentivirus vector. The titer of the recombinant lentivirus harboring *NeuroD1* shRNA was  $1.18 \times 10^8$  ifu/mL. **Conclusion** The recombinant lentivirus pLenti6.3-EGFP-*NeuroD1*-miR has been constructed successfully, which lays a foundation for future study of *NeuroD*

**[收稿日期]** 2013-05-01 **[接受日期]** 2013-07-09

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30770996,81172310),长海医院“1255 学科建设计划”(CH125521106). Supported by National Natural Science Foundation of China (30770996,81172310) and Changhai Hospital “1255 Discipline Construction Plan”(CH125521106).

**[作者简介]** 王洋,博士,讲师、主治医师. E-mail: docwy@sina.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162260, E-mail: mhzhu2000@hotmail.com

function.

[Key words] lentivirus; *NeuroD* gene; RNA interference; pancreatic neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(11): 1257-1261]

神经源性分化蛋白(neurogenic differentiation, *NeuroD*)最早是通过酵母双杂交分析系统克隆出的一个碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)家族成员<sup>[1]</sup>,其基因位于2q32,在神经分化和发育过程中起着重要作用,还参与胰腺的发育和胰岛B细胞的分化<sup>[2]</sup>,是一种含bHLH结构域的结合E-box的转录调控因子。我们的前期研究发现,胰腺癌中*NeuroD*高表达,并且与增殖细胞核抗原(PCNA)、p53蛋白的表达及胰腺癌神经浸润(PNI)之间明显相关<sup>[3]</sup>。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术具有高度的特异性及稳定性等特点,有广阔的应用前景<sup>[4]</sup>。慢病毒载体具有目的基因可整合到染色体组上、稳定表达时间较长、不易引发宿主免疫反应等诸多优点,在美国已经开展了临床研究<sup>[5]</sup>,初见成效<sup>[6]</sup>。因此,本研究拟构建含增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因的*NeuroD* shRNA重组慢病毒表达载体,为后续研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 293T细胞株购于中国科学院上海细胞所,PANC-1胰腺癌细胞系由第二军医大学长海医院病理科保存,pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-microRNA(miR)载体、pLenti6.3-MCS/V5 DEST慢病毒表达载体、POLOdeliverer<sup>TM</sup>3000 Transfection Reagent购于上海锐赛生物技术有限公司,大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 、慢病毒包装质粒Mix、Lipofectamine<sup>TM</sup>2000购于美国Invitrogen公司,Asc I、Pme I、Bsa I限制性内切酶购自美国NEB公司,Annexin V-PE单染法细胞凋亡检测试剂盒(Cat. No. C1065)及CCK-8检测试剂盒(Cat. No. C0038)购于碧云天公司。

1.2 RNAi靶点设计、合成及构建 根据人*NeuroD*(GenBank NM\_002500)基因序列,设计、合成4对针对*NeuroD*的shRNA用于筛选,分别简称为NeuroD1、NeuroD2、NeuroD3、NeuroD4(表1)。将设计好的4对shRNA与microRNA(miR)表达载体pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR连接,并转化感受态大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,经抗性筛选后,抽提质粒,进行测序鉴定。

表1 针对人*NeuroD*基因的shRNA序列

名称	序列
NeuroD1-F	5'-TGCTGAGAATAGCAAGGCACCACCTTGTTTTGGCCACTGACTGACAAGGTGGTCTTGTATTCT-3'
NeuroD1-R	5'-CCTGAGAATAGCAAGACCACCTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAAGGTGGTGCCTTGTATTCTC-3'
NeuroD2-F	5'-TGCTGAGAAGTTGCCATTGATGCTGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCAGCATCTGGCAACTTCT-3'
NeuroD2-R	5'-CCTGAGAAGTTGCCAGATGCTGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCAGCATCAATGGCAACTTCTC-3'
NeuroD3-F	5'-TGCTGAAATATGGCATTGAGCTGGGCGTTTTGGCCACTGACTGACGCCAGCTATGCCATATTT-3'
NeuroD3-R	5'-CCTGAAATATGGCATAGCTGGGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCCAGCTCAATGCCATATTTTC-3'
NeuroD4-F	5'-TGCTGTAACGTGGAAGACATGGGAGCGTTTTGGCCACTGACTGACGCTCCCATCTTCCACGTTA-3'
NeuroD4-R	5'-CCTGTAACGTGGAAGATGGGAGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCTCCCATGTCTTCCACGTTAC-3'

1.3 外源筛靶 根据目的基因*NeuroD*序列信息设计并合成PCR引物(表2)。设阴性对照pcDNA6.2-EGFP-miR-NC。以293T细胞cDNA为模板,用上述引物对目的基因*NeuroD*进行PCR扩增,分析目的基因在293T中的表达。从转染干扰质粒的293T细胞中抽提总RNA,应用qPCR技术检测目的基因的表达情况,用 $\Delta\Delta C_t$ 法进行各基因表

达的相对定量,判断干扰效果。

表2 *NeuroD*基因qPCR检测引物

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度
<i>NeuroD</i> -F	CCT TCC TTT GAT GGA CCC C	153 bp
<i>NeuroD</i> -R	GAT TGA TCC GTG GCT TTG G	
<i>hACTB</i> -F	TCC TTC CTG GGC ATG GAG T	208 bp
<i>hACTB</i> -R	CAG GAG GAG CAA TGA TCT TGA T	

1.4 干扰慢病毒表达载体 pLenti6.3-EGFP-NeuroD1-miR 的构建及包装 根据干扰载体结构设计引物,在目的片段上下游分别添加酶切位点 *Asc* I 和 *Pme* I。有效靶点序列:5'-AAG GTG GTG CCT TGC TAT TCT-3'。引物序列:Lenti-*Asc* I-F 为 5'-TAC TGG CGC GCC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA-3', Lenti-*Pme* I-R 为 5'-ACT AGT TTA AAC TGC GGC CAG ATC TGG GC-3'。以构建好的 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR-NeuroD1 为模板,Lenti-*Asc* I-F/Lenti-*Pme* I-R 为引物,PCR 扩增 EGFP-NeuroD1-miR 片段,使目的片段两末端分别带上酶切位点 *Asc* I 和 *Pme* I,PCR 扩增后与目的载体用 *Asc* I 和 *Pme* I 分别进行酶切,电泳分离酶切片段,切胶回收目的片段并连接。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布于含氨苄西林(Amp)抗性的 LB 平皿,37℃ 培养过夜,挑取单菌落进行菌落 PCR。鉴定呈阳性的克隆接到 LB 培养液中扩增,抽提纯化质粒进行酶切鉴定及测序。将测序正确的 Lenti6.3-EGFP-NeuroD1-miR 菌液划线培养,挑单克隆接入含 Amp 的 LB 培养液中扩大培养,大量抽提和纯化质粒。转染当天,观察 293T 细胞状态良好,贴壁牢,密度在 70%。向无菌离心管中加入 22.5 mL Opti-MEM,加入表达质粒 90  $\mu$ g 和包装质粒 Packaging Mix 90  $\mu$ g,混匀,室温下温育 5 min。向另一无菌离心管中加入 22.5 mL Opti-MEM,加入 POLOdeliverer™ 3000 Transfection Reagent 360  $\mu$ L,轻轻混匀,室温下温育 5 min。把稀释后的 DNA 与稀释后的 POLOdeliverer™ 3000 Transfection Reagent 混合,轻轻颠倒混匀,室温下孵育 20 min,以形成 DNA 与 POLOdeliverer™ 3000 Transfection Reagent 复合物。取 3 mL 上述混合液均匀地滴加在 293T 细胞的培养液中,前后左右摇匀,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

1.5 病毒收获、浓缩与滴度测定 转染后 48 h,荧光显微镜下观察转染效率,收集 293T 细胞上清液(第 1 次收液),4℃ 暂存。细胞更换新鲜的完全培养液,继续培养至 72~80 h,收集病毒上清,与第 1 次收液混合,共约 300 mL。于 4℃、3 000 r/min (离心半径为 10 cm)离心 10 min,除去细胞碎片。

用 0.45  $\mu$ m 醋酸纤维素膜滤器过滤上清液于 Beckman SW28 离心管中。4℃ 22 000 r/min (离心半径为 10 cm)离心 2 h。离心完毕后,小心取出离心管,弃上清,每管用预冷的 PBS 溶解沉淀。待病毒沉淀溶解完全后收集至 1.5 mL EP 管内,每管 100  $\mu$ L 分装,-80℃ 保存。滴度测定采用荧光显微镜观察法。

1.6 慢病毒感染 PANC-1 细胞及 qPCR 检测 PANC-1 细胞用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养。将处于对数生长期的目的细胞进行胰酶消化,制成细胞悬液。将细胞悬液(细胞数约为 5 $\times$ 10<sup>5</sup>)接种于 6 孔培养板中,待细胞融合度达到约 80%,根据病毒滴度各孔中分别加入适量的目的病毒和阴性对照病毒,同时加入终浓度为 4~8  $\mu$ g/mL 的 Polybrene 增强感染。感染 72 h 后观察慢病毒中报告基因 *GFP* 的表达情况。抽提总 RNA,应用 qPCR 检测慢病毒对内源性 *NeuroD* 基因表达的抑制效率。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 用 EP 管分别收集各孔中的培养上清,1 000 r/min (离心半径为 8 cm)离心 5 min,收集培养上清中的细胞。同时用胰酶消化底面贴壁的细胞,1 000 r/min (离心半径为 8 cm)离心 5 min,收集细胞,与上清中的的细胞混合。PBS 洗涤细胞 2 次,1 000 r/min (离心半径为 8 cm)离心 5 min,收集细胞。每个样品加入 400  $\mu$ L Annexin V-PE 结合液重悬细胞,轻轻吹匀。加入 5  $\mu$ L Annexin V-PE,轻轻混匀。20℃ 左右孵育 10 min,注意避光。上流式细胞仪检测。

1.8 CCK-8 检测细胞增殖 将处于对数生长期的 PANC-1 细胞进行胰酶消化,计数、制成细胞悬液,接种于 96 孔板中(细胞数约为 5 000~10 000/孔),使细胞置于 100  $\mu$ L 培养液中,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。感染 8~12 h 后,弃含病毒的培养液,换成完全培养液。感染 24 h 后,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8,混匀后培养箱中孵育 3 h,测定 450 nm 处的光密度 (*D*)值。每天检测 1 份,连续检测 6 d。酶标仪读取待测样品和空白对照在 450 nm 处的 *D* 值,将各待测样本 *D* 值记为测量值,空白对照 *D* 值记为空白值,终值=测量值-空白值。

1.9 统计学处理 采用 SAS 9.13 统计软件进行数

据分析, 检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 pcDNA<sup>TM</sup> 6. 2-GW/EmGFP-miR-NeuroD 表达质粒的测序鉴定 构建的重组质粒的测序及 Blast 比对分析结果与预期一致, 说明针对 *NeuroD* 基因的 shRNA 与表达载体连接成功。

2.2 293T 细胞中目的基因 *NeuroD* 的表达 结果显示: *NeuroD* 基因在 293T 细胞中的表达丰度高; pcDNA<sup>TM</sup> 6. 2-GW/EmGFP-miR-NeuroD1、NeuroD2、NeuroD3、NeuroD4 的干扰效率分别为  $(89 \pm 4)\%$ 、 $(74 \pm 6)\%$ 、 $(78 \pm 9)\%$ 、 $(66 \pm 7)\%$ , 其中以 NeuroD1 的干扰效应最明显 ( $P < 0.01$ )。Lenti6. 3-EGFP-NeuroD1-miR 重组克隆测序及 Blast 比对分析与预期序列完全一致。

2.3 病毒滴度及感染效率的测定 感染后 48 h, 细胞表达 GFP, 证实成功构建了 Lenti-EGFP-NeuroD1-miR 慢病毒载体。慢病毒滴度测定为  $1.18 \times 10^8$  ifu/mL。慢病毒液感染 PANC-1 细胞 72 h 后, 倒置荧光显微镜下均可观察到绿色荧光(图 1), 感染效率在 90% 以上。Lenti-EGFP-NeuroD1-miR 感染的 PANC-1 细胞 *NeuroD* 的表达量比空载体感染的细胞下降了  $(81 \pm 8)\%$  ( $P < 0.05$ ), 说明目的基因干扰效果明显。

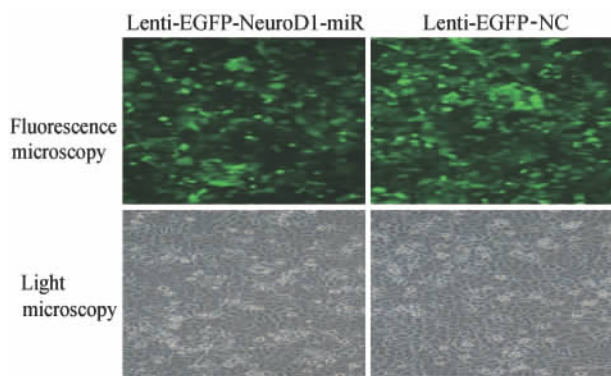


图 1 慢病毒对 PANC-1 细胞的感染效率

2.4 慢病毒感染对 PANC-1 细胞凋亡及增殖的影响 结果表明: Lenti-EGFP-NeuroD1-miR 病毒感染 PANC-1 细胞后凋亡率较对照有所增加 [ $(6.88 \pm 1.56)\%$  vs  $(4.98 \pm 0.57)\%$ ], 但差异无统计学意义 ( $P = 0.1187$ ); 细胞增殖速度及趋势均明显减缓(图 2,  $P < 0.0001$ )。

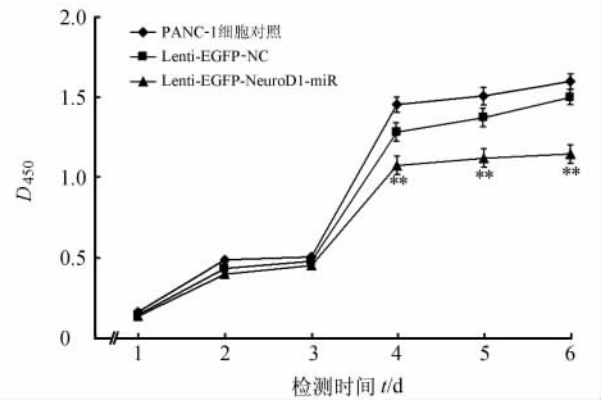


图 2 各组细胞的生长曲线比较图

\*\*  $P < 0.0001$  vs PANC-1 细胞对照组.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

## 3 讨论

RNAi 广泛存在于自然界, 具有高特异性、高效性、高稳定性等特点, 是近年来新兴的用于阻断基因表达的技术, 成为干扰特定基因表达和进行大规模基因功能筛选的有力工具<sup>[7]</sup>。RNAi 指真核细胞中的双链 RNA 诱导同源 mRNA 降解导致基因表达抑制的现象, 是一种转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS) 现象<sup>[8]</sup>, 已被应用于多种基因功能的研究<sup>[9]</sup>。但如何将外源基因高效导入靶细胞或机体, 载体的选择是一个关键环节。

肿瘤基因治疗载体主要有病毒载体和非病毒载体。非病毒载体的基因转移效率较低, 腺病毒载体的转移效率虽较高, 但目的基因不整合至靶细胞基因组, 仅能短暂表达, 同时腺病毒本身某些抗原的表达可引起人体免疫反应和炎症反应, 影响基因治疗的效果<sup>[10]</sup>。慢病毒是一类重组反转录病毒载体, 由人类免疫缺陷病毒 HIV 改建而来, 具有以下优点: (1)既可以感染分裂期细胞, 又可以感染分裂缓慢或非分裂期的细胞; (2)可以兼容多个转录启动子; (3)由慢病毒载体携带导入的目的基因可以在宿主细胞中得到长期稳定的表达, 免疫反应很小。

慢病毒表达载体包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息。慢病毒包装质粒可提供所有的转录并包装 RNA 到重组的假病毒载体所需要的所有辅助蛋白。为产生高滴度的病毒颗粒, 需要利用表达载体和包装质粒同时共转染细胞, 在细胞中进行病毒的包装, 包装好的假病毒颗粒分泌到细胞外的

培养液中,离心取得上清液后,可以直接用于宿主细胞的感染,目的基因进入到宿主细胞之后,经过反转录,整合到基因组,从而高水平地表达效应分子。慢病毒载体介导 RNAi 就是将慢病毒载体高效感染和整合的特性与 RNAi 特异性抑制同源基因表达的作用相结合<sup>[11]</sup>。应用慢病毒载体介导 RNAi 技术在感染和肿瘤等疾病中有广阔的前景<sup>[12]</sup>。

本研究成功构建并包装了靶向人 *NeuroD* 基因的 RNA 干扰慢病毒表达载体 pLenti6.3-EGFP-*NeuroD1*-miR,感染胰腺癌 PANC-1 细胞株后使其凋亡增加,增殖受到抑制,为进一步应用 RNA 干扰技术研究 *NeuroD* 基因的相关功能奠定了基础。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Lee J E, Hollenberg S M, Snider L, Turner D L, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by *NeuroD*, a basic helix-loop-helix protein[J]. *Science*, 1995, 268: 836-844.
- [2] Naya F J, Stellrecht C M, Tsai M J. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor[J]. *Genes Dev*, 1995, 9: 1009-1019.
- [3] 王洋,陈颖,高莉,朱明华. 神经源性分化蛋白在胰腺癌中的表达和意义[J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41: 23-27.
- [4] Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97: 689-696.
- [5] Hu B, Tai A, Wang P. Immunization delivered by lentiviral vectors for cancer and infectious diseases[J]. *Immunol Rev*, 2011, 239: 45-61.
- [6] Balaggan K S, Ali R R. Ocular gene delivery using lentiviral vectors[J]. *Gene Ther*, 2012, 19: 145-153.
- [7] Lee S K, Kumar P. Conditional RNAi: towards a silent gene therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 650-664.
- [8] Jin H, Vacic V, Girke T, Lonardi S, Zhu J K. Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis*[J]. *BMC Mol Biol*, 2008, 9: 6.
- [9] Angaji S A, Hedayati S S, Poor R H, Madani S, Poor S S, Panahi S. Application of RNA interference in treating human diseases[J]. *J Genet*, 2010, 89: 527-537.
- [10] Thaci B, Ulasov I V, Wainwright D A, Lesniak M S. The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses[J]. *Oncotarget*, 2011, 2: 113-121.
- [11] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, Ohashi T, Kannagi M, Masuda T. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6: 76-85.
- [12] Sumimoto H, Kawakami Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research[J]. *Future Oncol*, 2007, 3: 655-664.

[本文编辑] 贾泽军