doi:10.11659/jjssx.04E018161

·基础研究·

PRIM1 干扰慢病毒载体构建

卢 海[1],江金群[2],孟 镔[3] (1.粤北人民医院普通外科,广东 韶关 512026;2 粤北人民医院检验科,广东 韶关 512026;3.安徽理工大学医学院临床应用解剖教研室,安徽 淮南 232001)

[摘 要] **目的** 构建 PRIM1 基因的干扰慢病毒载体,供后续深入研究 PRIM1 基因在肿瘤形成中的机制。**方法** 以 PRIM1 基因为模板,按照 RNA 序列设计原则,完成 RNA 干扰靶点设计后,构建 RPIM1 基因 RNA 干扰慢病毒成含干扰序列的单链 DNA oligo,退火配对产生双链 DNA;随后通过其两端酶切位点直接连入酶切后的慢病毒载体;将连接产物转入制备好的大肠杆菌感受态细胞,PCR 鉴定阳性重组子,送测序验证,对测序结果比对正确的克隆进行质粒抽提。**结果** 对 RNA 序列设计软件评估后选取的干扰靶点序列,经过退火配对得到具有带黏性末端的双链的 DNA;AgeI 和 EcoRI 双酶切使 GV115 载体线性化;双链 DNA oligo 与线性化的载体连接的产物经 PCR 扩增后的序列与目标序列完全一致,获得测序结果正确的阳性克隆质粒。**结论** 以 PRIM1 基因为模板,按照载体设计构建常规方法成功构建 PRIM1 干扰慢病毒载体。

[关键词] 载体;慢病毒;干扰;PRIM1 基因;肿瘤

[中图分类号] R34 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-04-26

Construction of lentiviral vector for PRIM1 interference

LU Hai[1], JIANG Jin-qun[2], MENG Bin[3] (1. Department of General Surgery, Yuebei People's Hospital, Shaoguan Guangdong 512026, China; 2. Department of Laboratory, Yuebei People's Hospital, Shaoguan Guangdong 512026, China; 3. Department of Clinical Surgery and Applied Anatomy, Medical College of Anhui University of Science and Technology, Huainan Anhui 232001, China)

Abstract: Objective To construct the interference lentiviral vector of RPIM1 gene for further reseach of mechanism of PRIM1 gene in tumour. **Methods** Using the PRIM1 gene as a template and following RNA sequence design principles to complete RNA interference target design, single-stranded DNA oligo containing interfering sequences was synthesized and paired by annealing to generate double-stranded DNA. Subsequently, the enzyme-ligated sites were directly connected. After the enzyme-cut lentivirus vector was transferred, the ligation product was transferred into E. coli competent cell, a positive recombinant was identified by PCR, and was submitted to sequencing for verification. The sequencing result was compared with the correct clone for plasmid extraction. **Results** RNA sequence design software was used to evaluate the selected interference target sequences, and after annealing, double-stranded DNA with cohesive ends was obtained; double digestion of AgeI and EcoRI linearized the GV115 vector; double-stranded DNA oligo and linearized the PCR-amplified sequence of the vector-ligated product was identical to the target sequence, and the positive cloned plasmid obtained by the sequencing result was correct. **Conclusion** Using the PRIM1 gene as a template, a PRIM1 interference lentiviral vector is successfully constructed according to the conventional design of vector design.

Keyword: vector; lentivirus; interference; PRIM1 gene; tumor

DNA 合成酶的主要作用是开始细胞(包括肿瘤细胞)DNA 的合成[1-3]。真核细胞核 DNA 引物合成酶含有 2 个亚基,即 PRIM1 和 PRIM2。PRIM1 是单独携带有酶的催化作用和引物的延伸作用[4-9],然而 PRIM2 没有这些酶的活性作用[10]。在整个细胞(包括肿瘤细胞)DNA 合成的周期,PRIM1 mRNA 的表达丰度是随着 DNA 的复制进程不断调整的,没有 PRIM1 酶催化和引物的延伸作用,细胞 DNA 的启动点复制无法顺利进行,所以目的基因 PRIM1 在细胞(包括肿瘤细胞)的整个形成过程中扮演非常重要的角色[11]。目前已有 PRIM1 基因在膀胱癌、乳腺癌、骨肉瘤等肿瘤细胞中的报道[12],但至今尚未有 PRIM1 在肿瘤形成中具体作用机制的报道,本实验拟以 PRIM1 基因为模板,构建其 RNA 干扰慢病毒载体,供后续深入的研究 PRIM1 基因在肿瘤形成中具体的作用机制。

1 材料与方法

1.1 RNA 干扰靶点设计及双链 DNA oligo 制备

根据 RNA 干扰序列设计原则,以 PRIM1 基因为模板,设计多个 19-21nt RNA 干扰靶点序列,经设计软件评估测定后,选取一定的序列作为干扰靶点。根据已选靶点序列设计 shRNA 干扰序列,并在两端添加合适的限制性内切酶酶切位点以完成载体构建。除此之外,在正链 3'端添加 TTTTT 终止信号,而反链 5'端添加终止信号

[基金项目] 韶关卫生计生科研项目(Y18041)

互补序列。设计完成后合成单链 DNA oligo,将合成的单链 DNA oligo 干粉溶解于退火缓冲液中,90 ℃水浴 15 min,自然冷却至室温后,形成带黏性末端的双链。

1.2 线性化载体制备

按照 NEB 说明书配制 50 μL 反应体系,使用 AgeI 和 EcoRI 双酶切 GV115 载体使其线性化。37 ℃(最适温度)反应 1 h,之后切胶回收目的片段。

1.3 RNA 干扰慢病毒载体构建及质粒抽提

按照 Fermentas T4 DNA Ligase 说明书配制 20 μL 反应体系,将双链 DNA oligo 与线性化的载体相连(于 16 ℃反应 1 ~3 h,连接产物命名为 psc45862,之后进行转化实验)。将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,用无菌枪头挑取单个菌落为模板进行 PCR 扩增后行 1% 琼脂糖凝胶电泳获得阳性克隆,以鉴定引物-F(5'-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3')为模板进行阳性克隆测序。将测序正确的菌液转接于 150 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃摇床震荡培养过夜。按照 EndoFree Maxi Plasmid Kit 说明书提取质粒。

2 结果

2.1 合成双链 DNA oligo

设计出的靶点序列经过设计软件评估,选取 5'-CCTTGTTCCTGAAACAATT-3'序列作为干扰靶点序列行 shRNA 干扰序列设计,合成单链 DNA oligo(表 1)。将合成的单链 DNA oligo 干粉溶解于退火缓冲液中,合成含黏性末端的双链(图 1)。

表 1 合成单链 DNA oligo

内部编号	5'附加碱基	STEM	Loop	STEM	3'附加碱基
psc45862-1	CCGG	GCCCTTGTTCCTGAAACAATT	CTCGAG	AATTGTTTCAGGAACAAGGGC	TTTTTG
psc45862-2	AATTCAAAAA	GCCCTTGTTCCTGAAACAATT	CTCGAG	AATTGTTTCAGGAACAAGGGC	

CCGG:AgeI 酶切位点;AATTC:EcoRI 酶切位点;G:EcoRI 酶切位点互补序列;TTTTT:是终止信号

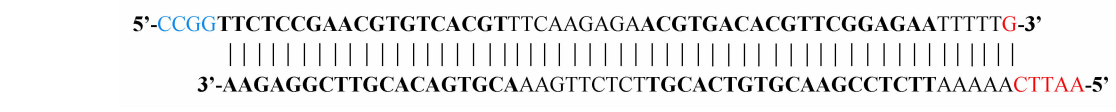
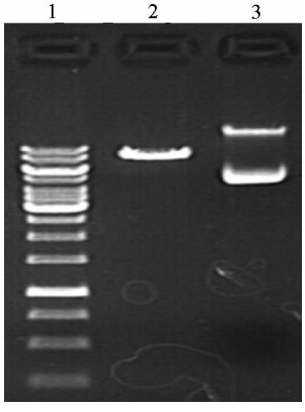


图 1 合成的双链 DNA

2.2 GV-115 载体线性化

GV-115 载体按照 NEB 说明书经过 AgeI 和 EcoRI 双酶切后,经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收获得线性化的载体质粒(图 2)。



泳道 1:1 kb Marker,从上至下依次为 10 kb,8 kb,6 kb,5 kb,4 kb,3.5 kb,3 kb,2.5 kb,2 kb,1.5 kb,1 kb,750 bp,500 bp,250 bp;泳道 2:AgeⅠ和 EcoRⅠ双酶切线性化后的载体质粒;泳道 3:没有酶切的载体质粒

图 2 GV-115 载体经过 AgeI 和 EcoRI 双酶切后

2.3 获得阳性克隆并测序

双链 DNA oligo 与线性化的载体相连后的产物,转化实验后获得的菌落 PCR 扩增后行 1% 琼脂糖凝胶电泳获得 3 个阳性克隆,挑取阳性克隆行进行测序,测序结果与 PRIM1 基因序列进行比对(图 3)。

3 讨论

肿瘤细胞的 DNA 启动点的研究是目前肿瘤研究的热点区域,DNA 合成酶主要作用是开始细胞(包括肿瘤细胞)DNA 的合成[1-3]。PRIM1 是异四倍体真核生物多醚菌素 α/引物酶合成物最小亚基,其单独携带有酶的催化作用和引物的延伸作用[4-9],然而 PRIM2 没有这些酶的活性作用[10]。在整个细胞周期,PRIM1 基因的 mRNA 的表达水平是随着催化的进程不断调整的,没有 PRIM1 的催化作用,DNA 的复制是无法进行的,PRIM1 基因突变影响细胞循环周期 G1 到 S 期过渡[8]。

目前科学研究中常用的病毒载体有腺病毒、逆转录病毒和慢病毒[11-13]。逆转录病毒载体一般只能感染分裂期细胞,而且逆转录病毒的感染容量有限,腺病毒一般不能顺利地整合到染色体上,在科研领域一般腺病毒只能被用于瞬时感染[9]。与其他病毒包装系统相比较,慢病毒包装系统是目前较为常用的病毒转染体系,慢病毒可以高效感染分裂或非分裂的细胞。慢病毒载体是指以人类免疫缺陷病毒-1 来源的一种慢病毒载体,慢病毒载体包含了包装、转染和稳定整合所需要的遗传信息,是慢病毒载体包装系统主要的组成部

ACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAA
ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCT
TGTGGAAAGGACGAAACACCGGGCCCTTGTTCCTGAAACAATTCTCGAGAATTGTTTC
AGGAACAAGGGCTTTTTGAATTCGGATCCATTAGGCGGCCGCGTGGATAACCGTATTAC
CGCCATGCATTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGAC
CCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCA

红色字体:shRNA 干扰序列插入片段

图 3 合成慢病毒载体的测序结果

分[14]。携带有外源性基因的慢病毒载体在慢病毒包装质粒、包装细胞系的辅助下,经过慢病毒包装成为有感染力的病毒颗粒,通过感染细胞或活体组织,实现外源基因在体细胞或活体组织中长久的表达[14]。与逆转录病毒相比,慢病毒载体含有 3 个结构基因(gag、pol、erv)分别编码核心蛋白、病毒复制所需要的酶及包膜蛋白。除此之外还有 4 个辅助基因(vif、nef、vpu、vpr)也参与病毒的复制、包装及基因整合[15]。载体构建的原理是将病理基因组中的顺式作用元件与编码反式蛋白的序列进行分离,慢病毒载体中除了留下必须的反式作用元件和包装信号,其余病毒序列均被外源基因替代[15]。本实验构建的 PRIM1 慢病毒载体也是通过对载体的双酶切去除顺式作用元件与编码反式蛋白,留下反式作用元件和包装信号。鉴于慢病毒载体的高转染效率、高效整合、高效转录及转染安全等特点,20 世纪,慢病毒载体广泛用于基础研究与临床研究,已经成为真核系统基于转移的有力工具,常用于人类疾病的基因治疗、癌变模型等研究[13]。

慢病毒载体在转基因动物、基因治疗等基础或临床研究中逐渐被广泛的利用[16-17],但是目前最为常用的慢病毒载体依然是在原有的 HIV 上面改造而成,因此对于其安全性依然有待进一步的强化。本实验使用的慢病毒载体也是 HIV 改造而来,病毒大部分已经敲除,尽管对于慢病毒载体的安全性依然存有争论,但是目前对于以 HIV 为载体的体内外动物实验中并未有出现病毒复制的报道,所以我们认为本研究构建的 PRIM1 基因干扰慢病毒载体可以用于进一步的体内外干扰实验,以更深层次地研究肿瘤的发生机制。

[参考文献]

[1] Tong MJ, Rosinski AA, huynh CT, et al. Long-term survival after surveillance and treatment in patients withch ronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Commun, 2017, 1(7): 595 – 608. doi. org/10. 1002/hep4. 1047.

[2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87 – 108. doi: 10. 3322/caac. 21262.

[3] Tomkova M, McClellan M, Kriaucionis S, et al. DNA Replication and associated repair pathways are involved in the mutagenesis of methylated cytosine[J]. DNA Repair (Amst), 2018, 62: 1 – 7. doi: 10. 1016/j. dnarep. 2017. 11. 005.

[4] Wang W, Cheng L, Zhang J, et al. Variation analysis of PRIM1 gene in Chinese patients with primary ovarian insufficiency[J]. Reprod Biomed Online, 2016, 33(5): 587 – 591. doi:10. 1016/j. rbmo. 2016. 08. 017.

[5] Baranovskiy AG, Zhang Y, Suwa Y, et al. Insight into the human DNA primase interaction with template-primer[J]. J Biol Chem, 2016, 291(9): 4793 – 4802. doi: 10. 1074/jbc. M115. 704064.

[6] Homer MV, Charo LM, Natarajan L, et al. Genetic variants of age at menopause are not related to timing of ovarian failure in breast cancer survivors[J]. Menopause, 2017, 24(6): 663 – 668. doi: 10. 1097/GME. 0000000000000817.

[7] Sincennes MC, Humbert M, Grondin B, et al. The LMO2 oncogene regulates DNA replication in hematopoietic cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(5): 1393 – 1398. doi: 10. 1073/pnas. 1515071113.

[8] Chen CT, Liu CT, Chen GK, et al. Meta-analysis of loci associated with age at natural menopause in African-American women[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(12): 3327 – 3342. doi: 10. 1093/hmg/ddu041.

[9] Liu D, Zhang XX, Xi BX, et al. Sine oculis homeobox homolog 1 promotes DNA replication and cell proliferation in cervical cancer[J]. Int J Oncol, 2014, 45(3): 1232 – 1240. doi: 10. 3892/ijo. 2014. 2510.

[10] Edwards L, Gupta R, Filipp FV. Hypermutation of DPYD deregulates pyrimidine metabolism and promotes malignant progression[J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(2): 196 – 206. doi: 10. 1158/1541 – 7786. MCR – 15 – 0403.

[11] 杨思园,于凤婷,王凌航. 人腺病毒感染进展[J]. 国际病毒学杂志, 2017, 24(5): 351 – 355. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 1673 – 4092. 2017. 05. 015.

[12] 吕爱民,吴朝辉. 逆转录病毒和逆转录酶简介[J]. 生物学教学, 2016, 59(3): 69 – 70.

[13] 张 阳. 慢病毒载体的研究进展[J]. 福建医科大学学报, 2014, 48(6): 407 – 410.

[14] Liu D, Zhang XX, Xi BX, et al. Sine oculis homeobox homolog 1 promotes DNA replication and cell proliferation in cervical cancer[J]. Int J Oncol, 2014, 45(3): 1232 – 1240. doi: 10. 3892/ijo. 2014. 2510.

[15] 孟凡荣,陈 琛,万海粟,等. 慢病毒载体及其研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(12): 870 – 876. doi:10. 3779/j. issn. 1009 – 3419. 2014. 12. 09.

[16] 孙克宁,朱化彬,林 峰. 慢病毒载体的构建及其应用于转基因动物的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8): 116 – 120.

[17] 孙文静,秦 波. 慢病毒载体及其在基因治疗中的研究进展[J]. 中华传染病杂志, 2008, 26(9): 570 – 572. doi: 10. 3321/j. issn: 1000 – 6680. 2008. 09. 018.

(编辑:魏 源)