论　著

*hnRNPU*基因敲减小鼠preB A70细胞株的构建及鉴定

张岱权[1]，黄　黎[2]，金棕杰[3]，唐诗琪[3]，罗佳瑞[3]，李　林[3]，赵　雷[3]，曹新梅[2]
1.西南医科大学附属医院 中医科（泸州 646000）；2.西南医科大学基础医学院 重大疾病的免疫机制及治疗泸州市重点实验室（泸州 646000）；3.西南医科大学基础医学院（泸州 646000）

【摘　要】目的 构建shRNA-不均一核糖核蛋白U（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U，*hnRNPU*）慢病毒表达载体以及*hnRNPU*基因稳定敲减的小鼠preB A70细胞株。 **方法** 将靶向小鼠*hnRNPU*基因的shRNA干扰序列连接入pLKO.1-EBFP-PURO质粒中，测序检测。将构建成功的pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO和慢病毒包装质粒共转染HEK293T细胞，收集病毒上清。将病毒上清感染A70细胞，利用倒置荧光显微镜观察病毒感染情况，利用Western blot检测hnRNPU蛋白的表达。通过有限稀释方法，构建单细胞克隆，并利用Western blot筛选*hnRNPU*基因稳定敲减的A70细胞株。 **结果** 成功构建了shRNA-*hnRNPU*慢病毒表达载体。表达shRNA-*hnRNPU*的慢病毒在HEK293T细胞中完成包装。包装好的病毒感染A70细胞72 h后，细胞内可以观察到蓝色荧光。感染后的细胞经过嘌呤霉素筛选后，细胞内的hnRNPU蛋白大约减少一半。通过有限稀释方法，构建了*hnRNPU*基因稳定敲减的细胞株。 **结论** 本研究成功构建了*hnRNPU*稳定敲减的A70细胞株，为后续研究*hnRNPU*在早期B细胞发育中的作用奠定了实验基础。

【关键词】不均一核糖核蛋白U；基因敲减；细胞株；构建；鉴定
【中图分类号】 R392　　**文献标志码** A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.06.005

Construction and identification of *hnRNPU*-knockdown murine preB A70 cell line

ZHANG Daiquan[1], HUANG Li[2], JIN Zongjie[3], TANG Shiqi[3], LUO Jiarui[3], LI Lin[3], ZHAO Lei[3], CAO Xinmei[2]
1.*Department of T.C.M, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;* 2.*Immune Mechanism and Therapy of Major Diseases of Luzhou Key Laboratory, School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;* 3.*School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*

【Abstract】Objetive To construct shRNA-*hnRNPU* lentiviral expression vector and stable *hnRNPU*-knockdown (KD) murine preB A70 cell line. **Methods** shRNA against mouse *hnRNPU* gene was encapsulated in pLKO.1-EBFP-PURO vector. Identified by sequencing, pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO vector was co-transfected with lentiviral packaging plasmids into HEK293T cells to form lentiviruses, and the lentiviral supernatant was collected. The packaged lentiviruses transduced A70 cells which were observed by an inverted fluorescence microscope. Western blot was used to test hnRNPU expression. Single cell clones were constructed by limiting dilution, stable *hnRNPU*-KD A70 cell line was formed and identified by Western blot. **Results** The shRNA-*hnRNPU* lentiviral expression vector was successfully constructed, and the lentiviruses expressing shRNA-*hnRNPU* were packaged in HEK293T cells. 72 h after transduction, blue fluorescence was observed in the virus-infected A70 cells. *HnRNPU* expression in puromycin-treated cells decreased about a half. By limiting dilution, *hnRNPU*-KD cell lines were formed. **Conclusion** In this study, a stable *hnRNPU* knockdown A70 cell line was successfully constructed, which laid the experimental foundation for further study of the role of *hnRNPU* in early B cell development.

【Key words】 hnRNPU; Gene knockdown; Cell line; Construction; Identification

体液免疫的基础是B细胞受体（B cell receptor，BCR）的多样性，BCR多样性主要由*BCR*基因V（D）J重组形成，V（D）J重组发生于B细胞发育的早期阶段，首先是proB细胞的BCR重链可变区基因发生V（D）J重组，随后preB细胞发生BCR轻链重组。V（D）J重组是由重组激活基因（recombination activating gene，*RAG*）产物RAG1和RAG2介导的。通过重组，将基因组中原本分隔的*V*、*D*和*J*基因连接在一起。*V*、*D*和*J*基因都带有一段保守的DNA序列—重组信号序列（recombination signal sequences，RSSs）。RAG1/2能够识别RSSs并且在此处切割DNA，形成一个发卡状的编码末端和一个信号末端[1]。断裂的DNA由DNA依赖性蛋白激酶、Ar-

基金项目：国家自然科学基金（81801551）；中央引导地方科技发展资金项目（2021ZYD0076）；四川省教育厅项目（17ZB0473）
第一作者简介：张岱权，主治医师，硕士。
通信作者：曹新梅，博士。E-mail：634197969@qq.com
引用本文：张岱权，黄黎，金棕杰，等. *hnRNPU*基因敲减小鼠preB A70细胞株的构建及鉴定[J]. 西南医科大学学报，2022，45（6）：484-487.DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.06.005

temis、Ku70、Ku86、X射线修复交叉互补蛋白5（X-ray repair cross-complementing protein 5，XRCC5）和XRCC4等非同源末端连接（nonhomologous end joining，NHEJ）因子进行修复[2-3]。其中，编码末端的发卡结构被打开，重新连接，形成编码连接（coding joint，CJ）；信号末端直接连接形成环状，即信号连接（signal joint，SJ），并从基因组中删除[1]。

为了保证重组后形成有功能的*BCR*基因，同时防止破坏基因组DNA，V（D）J基因重组有着严密的调控机制，如RAG表达的时空性[4]以及RAG1在细胞核的分布[5]，染色质可及性[6]，转录因子[如E2A[7]、成对盒5（paired box 5，Pax5）[8]等]，以及基因转录[9-10]在*BCR*基因V（D）J重组中发挥重要的调控功能。此外，黏连蛋白介导的DNA环挤压[11]也会影响V_H-D_HJ_H重组[12-13]。

不均一核糖核蛋白U（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U，hnRNPU），即核基质结合因子A（scaffold attachment factor A，SAFA），属于不均一核糖核蛋白亚家族成员，是核基质的主要成分之一，其结构分为：N端的DNA结合区、中间区和C端的RNA结合区[14-15]。hnRNPU具有多种生物学功能，主要包括：调控染色质结构和基因转录[16]，参与RNA代谢[17-18]，修复DNA的氧化损伤[19]，调控有丝分裂[20]和细胞增殖[21]，调控microRNA的胞外囊泡运输[22]等。Ye等[17]的研究显示，条件性敲除小鼠心脏中的*hnRNPU*基因，小鼠发生严重的扩张性心肌病，并在出生后2周死亡。国外学者发现，*hnRNPU*突变的儿童表现为发育迟缓、智力障碍、癫痫及小脑症等[23-24]。有趣的是，在小鼠模型中，淋巴细胞发育异常时，神经系统的发育也受到影响[25]。hnRNPU是否调控V（D）J重组及B细胞发育，尚未见相关报道。本研究旨在构建和鉴定*hnRNPU*-KD的preB细胞株，从而为后续研究hnRNPU对早期B细胞V（D）J重组的调控作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要材料与仪器

1.1.1 细胞株 A70细胞（v-Abl小鼠preB细胞）用含10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（BasalMedia）、β-巯基乙醇、青霉素、链霉素的RPMI 1640培养基（ATCC改良型）（BasalMedia）培养。HEK293T细胞用含10% FBS（BasalMedia）、青霉素、链霉素的DMEM培养基（BasalMedia）培养。所有细胞均培养于37 ℃、5% CO_2。

1.1.2 主要材料 pLKO.1-EBFP-PURO质粒和感受态细胞DH5α购于中国擎科生物公司。*Age I*、*EcoR I*购于上海宝生物公司。T4 DNA ligase购自美国NEB公司。针对小鼠*hnRNPU*基因的shRNA序列（gaccggtCCGGCCTGGGAAATACAACATTCTTTTCAAGAGAAAGAATGTTGTATTTCCCAGGTTTTTGgaattcc）由擎科生物公司合成。rabbit anti-hnRNPU购自abcam公司，mouse anti-GAPDH购自proteintech公司，goat anti-rabbit IgG和goat anti-mouse IgG购自Thermo公司。包装慢病毒的质粒pMDL、VSVG和pRSV-Rev，由本课题组保存。

1.1.3 主要仪器 PCR仪、高速冷冻离心机（美国Thermo公司）、荧光倒置显微镜（德国莱卡公司）、凝胶成像仪（美国Biorad公司）。

1.2 方法

1.2.1 *hnRNPU* shRNA表达质粒的构建 利用*Age I*、*EcoR I*双酶切pLKO.1-EBFP-PURO质粒和靶向*hnRNPU*基因的shRNA干扰序列。酶切的质粒经电泳检测酶切成功后，回收纯化。纯化的质粒和插入片段，经T4 DNA ligase，室温连接10 min。连接产物转化感受态细胞，接菌，37 ℃培养过夜。挑取单克隆、摇菌，测序检测。测序正确的单克隆（命名为pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO）用于后续实验。

1.2.2 表达*hnRNPU* shRNA的慢病毒的包装 HEK293T细胞接种于10 cm培养皿。当细胞融合度达到70%左右，用聚醚酰亚胺（polyetherimide，PEI）进行转染，其中质粒（μg）：PEI（μg）=1∶2，每一皿细胞转染的质粒为pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO或者pLKO.1-EBFP-PURO（μg）∶pMDL（μg）∶pRSV-Rev（μg）∶VSVG（μg）=8∶4∶4∶4。转染4～6 h后，弃去转染试剂，补充含10% FBS的DMEM的完全培养基。细胞培养48 h后，收集含病毒的培养基，将其置于4 ℃，以500 g离心4 min。吸出上清，用0.45 μm的过滤器过滤后分装，冻于-80 ℃。

1.2.3 *hnRNPU*-KD的A70细胞株的构建 收集A70细胞2管，每管1×10^6。取冻存的表达*hnRNPU* shRNA和空载的病毒上清各1 mL，在冰上融化后，加入polybrene至终浓度5 μg/mL，混匀。吸出病毒混悬液，分别加入到两管A70细胞，混匀，将其吸出至6孔板。将其置于室温，以1 800 rpm离心90 min。随后，细胞培养于37 ℃、5% CO_2。第2 d换成完全培养基，继续培养72 h。用倒置荧光显微镜观察细胞是否有蓝色荧光，判断感染效果。将细胞培养基换成含2 μg/mL嘌呤霉素的培养基，继续培养7 d左右（每2 d换1次液），直至阴性细胞全部死亡。Western blot检测hnRNPU表达的情况。将细胞进行有限稀释，接种于96孔板，每孔1个细胞，用含2 μg/mL嘌呤霉素的培养基继续培养，直至形成单细胞克隆。每个单细胞克隆取一部分进行Western blot检测，其余的冻存于-80 ℃。*hnRNPU*-KD的细胞克隆则继续培养扩增，并用于后续实验。

1.2.4 Western blot检测hnRNPU蛋白的表达 用1×蛋白上样缓冲液裂解细胞，100 ℃煮10 min。再将其置于4 ℃，以13 000 rpm离心20 min。吸取上清，进行十二

烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)。随后转PVDF膜,室温快速封闭15 min,加入一抗(rabbit anti- hnRNPU、mouse anti-GAPDH)4 ℃孵育过夜。TBST洗3次后,加入二抗(goat anti-rabbit IgG、goat anti-mouse IgG)室温孵育1 h。TBST洗3次。膜上滴加显影液后,利用凝胶成像仪曝光。

2 结果

2.1 电泳检测pLKO.1-EBFP-PURO质粒双酶切产物

pLKO.1-EBFP-PURO质粒经*Age I*、*EcoR I*双酶切后电泳。结果显示质粒已被切开,见图1,可以用于后续实验。

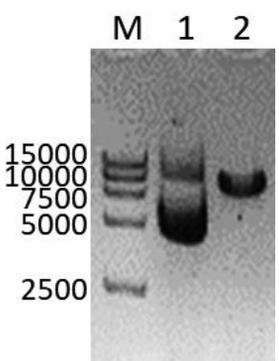


图1 pLKO.1-EBFP-PURO质粒双酶切产物的鉴定

Figure 1 Identification of double digested production of pLKO.1-EBFP-PURO

注:M为marker,泳道1为未经酶切的pLKO.1-EBFP-PURO质粒,泳道2为双酶切的pLKO.1-EBFP-PURO质粒

2.2 测序鉴定重构的pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO质粒

重构的pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO质粒转化感受态细胞,涂板,培养过夜。挑取细菌单克隆测序。结果显示目的片段已经插入到质粒中,见图2,提示pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO构建成功,可以用于包装病毒。

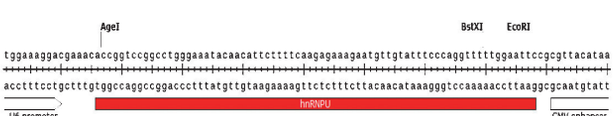


图2 pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO质粒的测序结果

Figure 2 The sequencing result of pLKO.1-*hnRNPU* shRNA-EBFP-PURO

注:红色部分是插入的序列

2.3 荧光显微镜检测感染病毒的A70细胞

慢病毒感染A70细胞72 h后,细胞内可以观察到蓝色荧光,见图3,说明病毒已经成功感染细胞。

2.4 hnRNPU蛋白的检测

病毒感染A70细胞72 h后,用嘌呤霉素筛选阳性细胞,提取总蛋白,利用Western blot检测hnRNPU的表达。如图4A、B所示,虽然各组间hnRNPU表达的差异性未达到统计学意义($P > 0.05$),但与对照组相比,实验组的hnRNPU减少了大约一半。将实验组的细胞进行有限稀释,培养成单细胞克隆,利用Western blot检测hnRNPU的表达。结果显示,细胞克隆1和克隆2的hnRNPU抑制率达到60% ~ 70%,见图5A、B,可以用于后续实验。

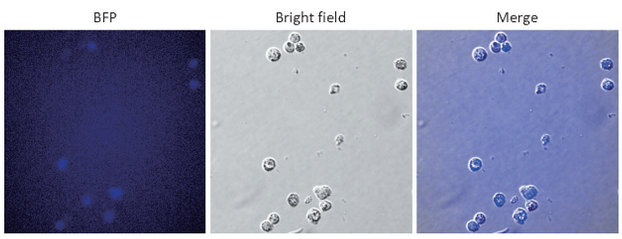


图3 感染病毒的A70细胞的检测(×400)

Figure 3 Identification of A70 cells infected by viruses(×400)

注:A70细胞感染病毒72 h后,观察荧光

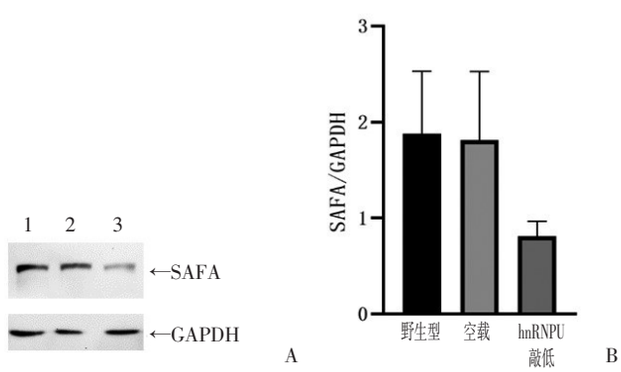


图4 hnRNPU蛋白表达的检测

Figure 4 Identification of hnRNPU expression

注:A:Western blot检测各组SAFA蛋白表达。泳道1为野生型A70细胞组,泳道2为感染病毒空载体组,泳道3为*hnRNPU*敲低组。B:Western blot蛋白条带灰度分析SAFA的相对表达量(n=3,P>0.05)

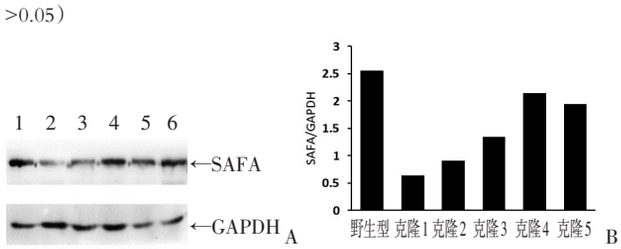


图5 *hnRNPU*基因稳定敲低的细胞株的筛选

Figure 5 Selection of stable *hnRNPU-KD* cell lines

注:A:Western blot检测各组SAFA蛋白表达。泳道1为感染病毒空载体组,泳道2-6为细胞克隆1-5。B: Western blot蛋白条带灰度分析SAFA的相对表达量

3 讨论

早期研究表明,在proB细胞中,增强子Eμ可以引导D_HJ_H基因群的转录[9]。Eμ引导的基因转录,可能对于D_HJ_H区域染色质的开放至关重要[26]。OSIPOVICH等[10]发现,转换/蔗糖不发酵复合物(switching/sucrose nonfermenting,SWI/SNF)是启动整个*Igh*基因反义转录的基础,当proB细胞缺失SWI/SNF时,*Igh*基因不发生

转录，V_H、D_H和J_H基因片段也不能重组。以上研究均提示，V(D)J重组与基因转录息息相关。*hnRNPU*能够结合actin和Pol II等，在转录的起始和延伸阶段发挥调控作用[16,27]。因此，我们假设*hnRNPU*可能调控V(D)J重组。

本研究成功构建了靶向小鼠*hnRNPU*基因的shRNA的表达载体及慢病毒。但由于*hnRNPU*具有多种生物学功能[14,16,20,28]，对于细胞的生存至关重要[29]，在用嘌呤霉素筛选稳定细胞株时，我们没有获得*hnRNPU*-knockout的单细胞克隆，只筛选到*hnRNPU*-KD的克隆。

4 结论

本研究成功构建了*hnRNPU*基因稳定敲减的A70细胞株，为探讨*hnRNPU*在V(D)J重组及早期B细胞发育中的调控奠定了实验基础。

（利益冲突：无）

参 考 文 献

[1] CHI XY, LI Y, QIU XY. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation[J]. Immunology, 2020, 160(3): 233-247.

[2] CHEN SY, LEE L, NAILA T, *et al*. Structural basis of long-range to short-range synaptic transition in NHEJ[J]. Nature, 2021, 593(7858): 294-298.

[3] GHOSH D, RAGHAVAN SC. Nonhomologous end joining: new accessory factors fine tune the machinery[J]. Trends Genet, 2021, 37(6): 582-599.

[4] NAGAOKA H, YU W, NUSSENZWEIG MC. Regulation of RAG expression in developing lymphocytes[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(2): 187-190.

[5] BRECHT RM, LIU CC, BEILINSON HA, *et al*. Nucleolar localization of RAG1 modulates V(D)J recombination activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(8): 4300-4309.

[6] KWON J, MORSHEAD KB, GUYON JR, *et al*. Histone acetylation and hSWI/SNF remodeling act in concert to stimulate V(D)J cleavage of nucleosomal DNA[J]. Mol Cell, 2000, 6(5): 1037-1048.

[7] KEE BL, QUONG MW, MURRE C. E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development[J]. Immunol Rev, 2000, 175(1): 138-149.

[8] ZHANG ZX, ESPINOZA CR, YU ZH, *et al*. Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V_H-to-DJ_H rearrangement of immunoglobulin genes[J]. Nat Immunol, 2006, 7(6): 616-624.

[9] BOLLAND DJ, WOOD AL, AFSHAR R, *et al*. Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer E_μ[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(15): 5523-5533.

[10] OSIPOVICH OA, SUBRAHMANYAM R, PIERCE S, *et al*. Cutting edge: SWI/SNF mediates antisense Igh transcription and locus-wide accessibility in B cell precursors[J]. J Immunol, 2009, 183(3): 1509-1513.

[11] DAVIDSON IF, BAUER B, GOETZ D, *et al*. DNA loop extrusion by human cohesin[J]. Science, 2019, 366(6471): 1338-1345.

[12] DAI HQ, HU HL, LOU JM, *et al*. Loop extrusion mediates physiological Igh locus contraction for RAG scanning[J]. Nature, 2021, 590(7845): 338-343.

[13] PETERS JM. How DNA loop extrusion mediated by cohesin enables V(D)J recombination[J]. Curr Opin Cell Biol, 2021, 70: 75-83.

[14] NOZAWA RS, BOTEVA L, SOARES DC, *et al*. SAF-A regulates interphase chromosome structure through oligomerization with chromatin-associated RNAs[J]. Cell, 2017, 169(7): 1214-1227.e18.

[15] CAO LL, LIU SD, LI YF, *et al*. The nuclear matrix protein SAFA surveils viral RNA and facilitates immunity by activating antiviral enhancers and super-enhancers[J]. Cell Host Microbe, 2019, 26(3): 369-384.e8.

[16] BI HS, YANG XY, YUAN JH, *et al*. H19 inhibits RNA polymerase II-mediated transcription by disrupting the hnRNP U-actin complex[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(10): 4899-4906.

[17] YE JQ, BEETZ N, O'KEEFFE S, *et al*. hnRNP U protein is required for normal pre-mRNA splicing and postnatal heart development and function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(23): E3020-E3029.

[18] YUGAMI M, OKANO H, NAKANISHI A, *et al*. Analysis of the nucleocytoplasmic shuttling RNA-binding protein HNRNPU using optimized HITS-CLIP method[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0231450.

[19] DUTTA A, YANG CY, SENGUPTA S, *et al*. New paradigms in the repair of oxidative damage in human genome: mechanisms ensuring repair of mutagenic base lesions during replication and involvement of accessory proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(9): 1679-1698.

[20] SHARP JA, PEREA-RESA C, WANG W, *et al*. Cell division requires RNA eviction from condensing chromosomes[J]. J Cell Biol, 2020, 219(11): e201910148.

[21] NIU ZY, WANG FL, LV SH, *et al*. HNRNPU-AS1 regulates cell proliferation and apoptosis via the MicroRNA 205-5p/AXIN2 axis and Wnt/β-catenin signaling pathway in cervical cancer[J]. Mol Cell Biol, 2021, 41(10): e0011521.

[22] ZIETZER A, HOSEN MR, WANG H, *et al*. The RNA-binding protein hnRNPU regulates the sorting of microRNA-30c-5p into large extracellular vesicles[J]. J Extracell Vesicles, 2020, 9(1): 1786967.

[23] WANG TY, HOEKZEMA K, VECCHIO D, *et al*. Large-scale targeted sequencing identifies risk genes for neurodevelopmental disorders[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4932.

[24] TAYLOR J, SPILLER M, RANGUIN K, *et al*. Expanding the phenotype of HNRNPU-related neurodevelopmental disorder with emphasis on seizure phenotype and review of literature[J]. Am J Med Genet A, 2022, 188(5): 1497-1514.

[25] CHU SH, CHABON JR, MATOVINA CN, *et al*. Loss of H3K36 methyltransferase SETD2 impairs V(D)J recombination during lymphoid development[J]. iScience, 2020, 23(3): 100941.

[26] BOLLAND DJ, WOOD AL, JOHNSTON CM, *et al*. Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination[J]. Nat Immunol, 2004, 5(6): 630-637.

[27] OBRDLIK A, KUKALEV A, LOUVET E, *et al*. The histone acetyltransferase PCAF associates with actin and hnRNP U for RNA polymerase II transcription[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(20): 6342-6357.

[28] FAN H, LV P, HUO XR, *et al*. The nuclear matrix protein HNRNPU maintains 3D genome architecture globally in mouse hepatocytes[J]. Genome Res, 2018, 28(2): 192-202.

[29] BRITTON S, FROMENT C, FRIT P, *et al*. Cell nonhomologous end joining capacity controls SAF-A phosphorylation by DNA-PK in response to DNA double-strand breaks inducers[J]. Cell Cycle, 2009, 8(22): 3717-3722.

（2021-10-12 收稿，2022-03-07 修回）