

• 基础实验研究论著 •

应用 Gateway 技术构建 pLenti6-Akt shRNA 真核表达载体*

何 敏, 赵学芹, 李 曼, 庄俊华, 黄宪章[△]

(广东省中医院检验科, 广州 510120)

摘要:目的 应用 Gateway 技术构建靶向人 Akt 基因的 shRNA 真核表达载体, 转染肝癌细胞株 HepG2, 验证该载体能否下调 Akt 基因的 mRNA 水平。方法 以 Akt 基因为靶点设计两条具有短发卡结构的 shRNA 序列, 经退火成互补双链后克隆入 pENTR/U6 入门表达载体(pENTR/U6-Akt1, pENTR/U6-Akt2); 转化 E. coli TOP10 菌株, 挑取阳性菌落进行菌落 PCR 和测序鉴定; 利用 Gateway 技术进行 LR 位点特异性重组, 将 shRNA 导入目的表达载体 pLenti6/Block-it DEST Vector, 再行测序鉴定(pLenti6-Akt1, pLenti6-Akt2); 将重组质粒转染肝癌细胞株 HepG2, 提取 RNA, RT-PCR 检测重组质粒对 mRNA 水平的抑制效果。结果 经菌落 PCR 和 DNA 测序鉴定; pENTR/U6-Akts 入门载体和 pLenti6-Akts 目的表达载体中插入片段的序列正确, RT-PCR 结果表明将 shRNA 分别转染 HepG2 细胞后, Akt 的 mRNA 表达受到明显抑制, 其中 1# shRNA 比 2# shRNA 抑制效果明显。结论 利用 Gateway 技术成功构建了靶向人 Akt 基因的 shRNA 表达载体, 为以 Akt 基因为靶点的肝癌基因治疗方案奠定了实验基础。

关键词: Akt 基因; 短发卡 RNA; Gateway; HepG2 细胞; 遗传载体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)15-1798-03

Construction of pLenti6-Akt shRNA recombinant expression vector using Gateway technology

He Min, Zhao Xueqin, Li Man, Zhuang Junhua, Huang Xianzhang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To construct the expressing vector of small hairpin RNA (shRNA) targeting human Akt gene and detect its effectiveness of gene silencing in HepG2 cells (human hepatoma carcinoma cell line). **Methods** Complementary DNA oligonucleotides for shRNA expression, targeting Akt gene, were designed and chemically synthesized. The top and bottom strand oligos were annealed to generate a double-stranded oligonucleotide (ds oligo). The ds oligos was first cloned into pENTR/U6 entry expression vector (named pENTR/U6-Akt1, pENTR/U6-Akt2), and then cloned into pLenti6/Block-iT DEST Vector by LR recombination reaction (named pLenti6-Akt1, pLenti6-Akt2). In each step, PCR and sequencing analysis were performed to verify the constructs. After the verified plasmids were transfected into HepG2 cells, RT-PCR was performed to determine the mRNA level of Akt gene. **Results** PCR and sequencing analysis demonstrated that shRNA targeting Akt gene had been inserted at the expected site and the insertion sequence was perfectly corrected. The RT-PCR results showed that Akt expression in HepG2 was knockdown at mRNA level. The 1# shRNA had a better effect than 2# shRNA. **Conclusion** The shRNA expression vector targeting Akt gene was successfully constructed, which would facilitate further studies of Akt function and its application in gene therapy for hepatoma carcinoma.

Key words: Akt gene; short hairpin RNA; Gateway; HepG2 cell; genetic vectors

肝细胞癌(HCC)是常见的消化系统恶性肿瘤,在国内外发病率都呈上升趋势^[1]。由于其具有易复发、易转移、耐药、预后差等生物学特征,基于HCC发病机制的基因治疗成为当前研究的热点。Akt又被称为蛋白激酶B(PKB),是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,位于多条信号通路的核心部位。在半数HCC患者的肝癌组织中发现Akt信号通路的异常活化,而且其表达水平与肝癌的发生发展密切相关^[2]。Akt被磷酸化激活后,可调节多种底物蛋白的表达,从而促进肿瘤细胞生存及增殖、抑制细胞凋亡、调控肿瘤细胞的迁移和转移^[3]。RNA干扰(RNAi)是一种可高效特异地下调目标基因的表达,并在基因功能研究和基因治疗领域有着广阔应用前景的技术^[4]。本研究应用Gateway技术构建靶向人Akt基因的短发卡RNA(shRNA)载体并进行鉴定,为探讨Akt基因在肝癌中的生物

学功能和基因治疗提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂 BLOCK-iTTM U6 RNAi Entry Vector 试剂盒、BLOCK-iTTM Lentiviral RNAi Expression System 试剂盒、Trizol、lipofectamineTM 2000 以及 DMEM 培养液均购自 Invitrogen 公司; DL2000 DNA Marker、质粒小量提取试剂盒、ReverTra Ace 反转录试剂盒和 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 胎牛血清购自 TBD 公司; Akt shRNA 和引物由上海英骏生物工程有限公司合成; 肝癌细胞株 HepG2 由中山大学生命科学学院实验室馈赠; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法 Akt shRNA 序列的设计与合成: 在 NCBI 上获取人 Akt 基因不同亚型 (Akt1: NM_005163, Akt2: NM_001014432) 的序列, 根据其共同保守序列, 利用 Invitrogen 公

司在线免费软件 (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/rnaiDesign.jsp>), 设计了 2 对针对 Akt 基因的 shRNA 和 1 对阴性对照^[5], 并在 Genebank 数据库进行 BLAST 分析, 确定与其他基因无互补性。在干扰片段上游链的 5' 端加上 CACCG 5 个碱基, 在下游链的 5' 端加上 AAAA 4 个碱基, 环的结构为 CGAA^[6]。设计的 shRNA 序列如下: 1 # shRNA-top5'-CAC CGT GCC CTT CTA CAA CCA GGA CGA ATC CTG GTT GTA GAA GGG CA-3', 1 # shRNA-bot5'-AAA ATG CCC TTC TAC AAC CAG GAT TCG TCC TGG TTG TAG AAG GGC AC-3'; 2 # shRNA-top5'-CAC CGC CTT CTA CAA CCA GGA CCA CGA ATG GTC CTG GTT GTA GAA GG-3', 2 # shRNA-bot5'-AAA ACC TTC TAC AAC CAG GAC CAT TCG TGG TCC TGG TTG TAG AAG GC-3'; NC-shRNA-top5'-CAC CGT CAC AAC CTC CTA GAA AGA GTA GAC GAA TCT ACT CTT TCT AGG AGG TTG TGA-3', NC-shRNA-bot5'-AAA ATC ACA ACC TCC TAG AAA GAG TAG ATT CGT CTA CTC TTT CTA GGA GGT TGT GAC-3'。

1.3 Akt 基因 shRNA 入门载体的构建 (1) 双链寡核苷酸的合成: 将单链寡核苷酸(ss oligo)加入 20 mL 反应体系, 95 °C 孵育 4 min, 冷却至室温使之退火形成双链寡核苷酸(ds oligo), 稀释后取 500 nmol/L ds oligo 于 4% 琼脂糖电泳检验退火的 ds oligo 的完整性。(2) 连接: 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 室温孵育 30 min 将 ds oligo 连接至 pENTR/U6 载体上。(3) 转化: 将连接产物转化 One Shota TOP10 E. coli 感受态细胞, 卡那霉素抗性(50 mg/mL)平板筛选, 挑取阳性克隆做菌落 PCR 鉴定, 阳性菌株保种并外送测序。U6 前引物测序, 序列为 5'-GGA CTA TCA TAT GCT TAC CG-3'。根据测序结果选择正确的转化体, 载体命名为 pENTR/U6-Akt1, pENTR/U6-Akt2 和 pENTR/U6-NC。

1.4 目的表达载体的构建 (1) 重组: 按 Invitrogen 公司 Gateway LR clonase™ II Enzyme Mix™ 试剂盒的方法, 将测序正确的 pENTR/U6-Akts 及 pENTR/U6-NC 与目的载体 pLenti6/Block-iT DEST Vector 进行重组。(2) 转化: 反应产物转化 One Shota Stb13™ E. coli 感受态细胞, 100 mg/mL 氨苄青霉素抗性筛选后, 将菌液平铺在含 30 mg/mL 氯霉素的 LB 平板中进行药物负筛选。挑取克隆, 菌落 PCR 鉴定后保种并外送测序。V5 反向引物测序验证, 引物序列为 5'-ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT-3'。根据测序结果选择正确的转化体, 载体分别命名为 pLenti6-Akt1, pLenti6-Akt2 和 pLenti6-NC。

1.5 细胞转染 HepG2 细胞置于含 10% 胎牛血清, 1% 谷氨酰胺, 0.1% 青、链霉素的 DMEM 高糖培养液中, 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养至对数生长期。当 HepG2 细胞生长达到 60%~70% 的细胞融合时, 更换无血清培养液, 应用 Lipofectamine™ 2000 将重组质粒转染细胞。4 h 后, 更换含血清培养液继续培养 24 h, 收集细胞, 提取 RNA 进行后续实验。

1.6 总 RNA 提取 提取细胞总 RNA, 操作严格按照 Trizol 试剂说明书操作, 提取后的 RNA 于 -80 °C 冰箱中保存。分别通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪, 检测所得总 RNA 的质量和浓度。

1.7 RT-PCR 检测基因 mRNA 表达水平 RT-PCR 使用

TaKaRa 公司的逆转录试剂盒, 按其说明书用随机引物进行, 逆转录合成的 cDNA 在 -20 °C 保存备用。可用 cDNA 为模板, 以特异引物进行 PCR, 检测目标基因 mRNA 的表达水平。PCR 按照标准反应体系进行, 30 个反应循环。产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统分析成像, 分析目标基因的表达水平时均用 GAPDH 为内源对照。引物序列如下: 1、Akt 前向引物: 5'-ATG AGC GAC GTG GCT ATT GTG AAG-3'; 反向引物: 5'-GAG GCC GTC AGC CAC AGT CTG GAT G-3', 扩增片段长度为 330 bp。GAPDH 前向引物: 5'-CAC CAT CTT CCA GGA GCG AG-3'; 反向引物: 5'-GGG GCC ATC CAC AGT CTT C-3', 扩增片段长度为 352 bp。

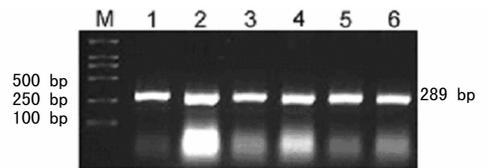
1.8 统计学方法 数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 均值的比较采用 *t* 检验; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ds oligo 的合成 将合成的 ss oligo 进行退火处理, 退火产物稀释后经 4% 的琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像图清晰可见两条条带。其中一条较大分子量的条带, 为退火形成的 ds oligo; 另一条较小分子量的条带, 为未能退火的 ss oligo。

2.2 连接和转化结果 连接入干扰片段的 U6 入门载体转化 One Shota TOP10 E. coli 感受态细胞, 于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 琼脂糖平板上平铺 150 μL 的转化菌液, 37 °C 孵育过夜。次日, 可见平板上长出了若干菌落。

2.3 U6 入门载体的筛选与鉴定 挑取阳性克隆, 用载体通用引物 U6 和 M13 做菌落 PCR, 琼脂糖凝胶电泳所显示的条带约为 289 bp, 符合目的条带大小, 初步证明 shRNA 片段已插入到载体中, 见图 1。

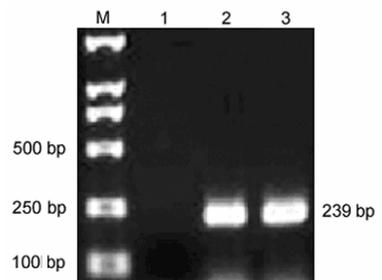


M: DL2000 DNA Maker; 1-3: 1# shRNA; 4-6: 2# shRNA。

图 1 U6 入门载体菌落 PCR 电泳图

DNA 序列鉴定: 经菌落 PCR 鉴定的单克隆, 送上海英潍捷基公司检测序列, 测序所得序列与设计序列完全相同。

2.4 目的表达载体阳性克隆的筛选与鉴定 LR 重组体转化 One Shota Stb13™ E. coli 感受态细胞, 用 U6 和 V5 载体通用引物做菌落 PCR, 琼脂糖凝胶电泳结果与预期片段大小一致, 见图 2。



M: DL2000 DNA Maker; 1: NC (不加菌落); 2: 1# shRNA; 3: 2# shRNA。

图 2 pLenti6 目的表达载体菌落 PCR 电泳图

DNA 序列鉴定:经菌落 PCR 鉴定的单克隆,送上海英潍捷基公司检测序列,测序所得序列与设计序列完全相同。pLenti6-Akt1, pLenti6-Akt2 和 pLenti6-NC 克隆测序结果显示克隆内生成正确的含 U6 启动子、靶序列和 PolⅢ 终止子的表达框,表达载体构建成功。

2.5 目的载体沉默效率的鉴定 提取质粒,用 Lipofectamine 2000 转染 HepG2 细胞,于 24 h 后收集细胞,提取 RNA。以每个样品的反转录产物为模板,扩增 Akt 基因和内参 GAPDH。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后,在伯乐 Quantity One 软件中进行灰度分析,检测 shRNA 的抑制效果。结果显示 pLenti6-Akt1、2 表达载体对 HepG2 细胞中 Akt 基因表达抑制率分别为 85.1% 和 11.3% (图 3),且 pLenti6-Akt1 转染组跟阴性对照组相比,Akt 的 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

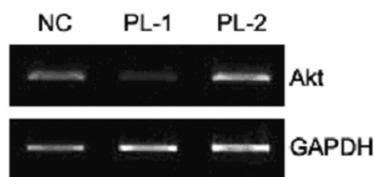


图 3 pLenti6 目的载体转染 HepG2 细胞 24 h 后 mRNA 表达水平

3 讨 论

目前,HCC 主要采取手术切除、化疗等传统方法进行治疗,可出现多种毒副作用和不良反应。随着肿瘤分子生物学的不断发展,基因治疗已成为当前肿瘤防治的新领域。Akt 是原癌基因 c-akt 表达的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,处于 PI3K/Akt 信号转导通路的核心。Akt 通过磷酸化下游的多种作用底物调控肿瘤细胞的增殖和凋亡,与肿瘤的侵袭转移行为也密切相关,以该通路为靶点的肿瘤治疗策略正成为当前的研究热点^[7-8]。Fang 等^[9]发现 miR-7 能够调控 PI3K/Akt 信号通路中的成员,从而抑制 HCC 的生长和转移;Chen 等^[10]报道重组蛋白 rVP1 (口蹄疫病毒的 4 种衣壳蛋白之一)也能通过调控 Akt 的磷酸化诱导肝癌细胞的凋亡,抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。这些结果提示如果能抑制肿瘤内异常活化的 Akt 的表达,则能影响其生物学效应,有望缓解疾病症状甚至逆转疾病。

RNAi 可以特异性的剔除或者关闭目的基因的表达,近年来已经成为一种研究基因功能的重要手段,在肿瘤基因治疗方面也显示出较好的应用前景。Schulze-Bergkamen 等^[11]用 RNAi 技术沉默肝癌细胞中 Mcl-1 的表达,结果转染 Mcl-1 siRNA 后,肝癌细胞对多种化疗药物的耐药性明显降低,凋亡率升高。shRNA 表达载体和 siRNA 均可用于干扰目的基因的表达。虽然人工合成 siRNA 操作较为简便,但是 shRNA 表达质粒可在宿主细胞内不断的转录复制,抑制效果更加长久;此外,shRNA 可更有效地进入 RNAi 途径,效价和特异性比 siRNA 更高^[12]。因此,本实验设计并合成了靶向 Akt 的 shRNA 序列,首先成功构建表达 Akt shRNA 的 U6 入门载体,再采用 Gateway 技术将 Akt-shRNA 快速、正确的重组进入 pLenti6/BLOCK-iTTM 目的表达载体,获得了更高效和稳定的重组表达系统,1# shRNA 的抑制效率达到 85.1%。该重组载体可利用 U6 基因的启动子元件在细胞内稳定表达 shRNA,更长效的抑制基因表达^[13],此外,目的载体系统可以

进一步进行慢病毒包装,将 shRNA 整合进宿主基因内,降低病理条件造成的 Akt 基因的过度活化,为体内治疗奠定基础。

总之,本研究应用 RNA 干扰技术合成了针对 Akt 的两条 shRNA,并构建其 shRNA U6 入门载体和 pLenti6 目的表达载体,从中筛选出最有效的短链片段,初步验证了其干扰表达效果。在后续实验中,拟将该载体进行慢病毒包装,验证其体内功能。此外,由于肿瘤发生是多种基因异常所引起,下一步将应用 RNAi 联合抑制多个基因,进一步探讨肝癌基因治疗的新途径。

参考文献

- [1] Villanueva A, Minguez B, Forner A, et al. Hepatocellular carcinoma: novel molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2010, 61(2): 317-328.
- [2] Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2010, 29(36): 4989-5005.
- [3] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7): 489-501.
- [4] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553.
- [5] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 497-500.
- [6] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3): 326-330.
- [7] Franke TF. PI3K/Akt; getting it right matters[J]. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6473-6488.
- [8] Dillon RL, Muller WJ. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4260-4264.
- [9] Fang YX, Xue JL, Shen Q, et al. miR-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the PI3K/AKT pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1852-1862.
- [10] Chen TA, Wang JL, Hung SW, et al. Recombinant VP1, an Akt inhibitor, suppresses progression of hepatocellular carcinoma by inducing apoptosis and modulation of CCL2 production[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23317.
- [11] Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schuchmann M, et al. Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6(1): 232.
- [12] Sui G, Soohoo C, Affar EL B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(8): 5515-5520.
- [13] Malik I, Garrido M, Bahr M, et al. Comparison of test systems for RNA interference[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(1): 245-253.

(收稿日期:2012-01-09)