

hsa_circ_0006411 慢病毒载体的构建及验证

卢 韬 董学君

摘要 **目的** 构建环状 RNA hsa_circ_0006411 慢病毒载体,作为研究其在肺癌细胞的功能学实验的基础。**方法** 以人细胞混合样本 cDNA 为模板扩增环状 RNA circ_0006411, EcoR I 和 BamH I 双酶切连接到 pLC5 - ciR 载体中,转化感受态细胞,并测序阳性菌落产物;将得到的 pLC5 - circ_0006411 - GFP 载体转染 293T 细胞,40h 后观测 GFP 的表达,并收集细胞 PCR 扩增 circ_0006411 基因,以 pLC5 - ciR 空载体和空白组做对照。**结果** 测序结果与 hsa_circ_0006411 序列一致,且环化接头位点也与 circbase 中的位点一致;pLC5 - circ_0006411 - GFP 载体转染 293T 细胞组 circ_0006411 相对表达量明显增高于另外两组,且绿色荧光蛋白表达。**结论** 成功构建了环状 hsa_circ_0006411 载体,能稳定转染 293T 细胞,可用于后续细胞实验。

关键词 环状 RNA circ_0006411 慢病毒载体

中图分类号 R446 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.10.020

Construction and Validation of hsa_circ_0006411 Lentivirus Vector. Lu Tao, Dong Xuejun. Shaoxing People's Hospital, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To study the function of a human circular RNA (hsa_circ_0006411) through constructing a circular RNA hsa_circ_0006411 lentivirus vector. **Methods** Hsa_circ_0006411 were amplified from human cell mixed sample cDNA by PCR, and then linked to the PLC5 - CIR vector, transformed into the receptive cells. The 293T cells were transfected with hsa_circ_0006411 - GFP vector, and the expression of GFP was observed 40 hours later. The hsa_circ_0006411 gene was amplified by PCR and compared with the blank control group. **Results** The results of sequencing were consistent with sequence of hsa_circ_0006411 in circbank website. The relative expression of hsa_circ_0006411 in the group of 293T cells transfected with PLC5 - hsa_circ_0006411 was significantly higher than that in the other two groups, and the expression of green fluorescent protein was also significant. **Conclusion** The hsa_circ_0006411 vector was successfully constructed, which can stably transfect 293T cells and can be used in subsequent cell experiments.

Key words Circular RNA; circ_0006411; Lentivirus vector

非编码 RNA 是指一类不能编码蛋白质的 RNA 类型(近年来发现有些非编码 RNA 也具有编码肽功能),包括微小 RNA、长链非编码 RNA 和环状 RNA 等类型^[1,2]。环状 RNA 是由 mRNA 前体反向剪接产生的闭合环状结构,虽然大多数不能编码蛋白质,但却可以通过一系列机制调节相关基因的表达,来发挥细胞学功能,在癌症中也具有重要的调控作用^[3]。PIK₃R1 基因可编码 p85a 蛋白,作为磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 - kinase, PI₃K)通路中 PI₃K 的调节亚基,在诸如乳腺癌,宫颈癌等实体瘤中显著低表达,其可与 PTEN 结合,从而增强 PTEN 的脂质磷酸酶活性,发挥抑癌作用^[4~6]。本研究发现,来源于 PIK₃R1 母基因的环状 RNA (hsa_circ_0006411) 在多种实体瘤组织中低表达,为了研究其功能,拟构建其

慢病毒载体,并验证实用性后,用于后续的细胞实验。

对象与方法

1. 试剂与仪器:In - Fusion[®] HD 克隆试剂盒(日本 TaKaRa 公司),胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒(美国 Omega 公司),pLC5 - ciR 载体(广州吉赛公司),RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 ExCell Bio 公司),脂质体 2000(美国 Invitrogen 公司);仪器主要有 PCR 仪(德国罗氏公司),电泳仪(美国 Bio - Rad 公司)和冷冻离心机等。

2. 载体构建及测序鉴定:(1)目的片段扩增:设计带有 EcoR I 和 BamH I 酶切位点的引物,序列见表 1,以人细胞混合样本 cDNA 为模板扩增环状 RNA hsa_circ_0006411,目的片段在 1.5% 的琼脂糖凝胶中进行电泳后,按照胶回收试剂盒操作说明回收纯化目的片段。(2)目的片段与载体连接:分别向目的片段和载体 pLC5 - ciR 中加入 EcoR I 和 BamH I 酶,得到的产物连接成携带 circ_0006411 的 pLC5 - ciR 表达

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2020RC130);绍兴市人民医院青年基金资助项目(2018YB02)

作者单位:312000 绍兴市人民医院

载体。该表达载体转化感受态细胞,阳性菌落扩增后行 PCR 测序,与 BLAST 序列比对,看是否为目的 hsa_circ_0006411 RNA 序列;并比对测序得到的环化接头位点与 circbase 中的环化位点序列,看是否完全一致,测序引物列见表 1。

3. hsa_circ_0006411 载体的验证:293T 细胞接种

于 6 孔板中,当细胞 80% 汇合时转染,分成 hsa_circ_0006411 载体、PLC5 - ciR 空载体及对照组分别转染 293T 细胞,培养 6h 后换液,更换为完全培养基,40h 以后观察细胞 GFP 的表达,并收集细胞,PCR 扩增检测 circ_0006411 的表达情况,以 GAPDH 为管家基因, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示 circ_0006411 的相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 各基因引物表

扩增产物	序列(5'→3')	产物长度(bp)
circ_0006411 酶切引物	上游:CATTAATATTTCTTCTTTTCGAATTCTAATACTTTTCAGGTGAAGCTCGTGTGTGGAGTGC	720
	下游:AGTATGGAGTTGTTAGCTAGGATCCAGTTGTTCTTACCTTGTGTGTTCAACATCTGCTT	
circ_0006411 测序引物	上游:AAAAATCTCGCCTCCACAC	203
	下游:TTGAATCCAGGCTGACTCTC	
circ_0006411PCR 引物	上游:AGATGTTGAACAACAAGGTGAAC	125
	下游:TTGAATCCAGGCTGACTCTC	
GAPDH 引物	上游:AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	140
	下游:GCAGGAGGCATTGCTGATGAT	

结 果

1. 载体测序结果:构建的 PLC - hsa_circ_0006411 载体经转化感受态细胞后,可在 LA 平板上检测出阳性菌落,该菌落 PCR 产物测序结果如图 1,经 BLAST 序列比对后发现,与 GenBank 上的人 hsa_circ_0006411 序列完全一致,测序后得到的环化接头位点与 circbase 中的环化位点序列也完全一致(图 1),载体构建成功。

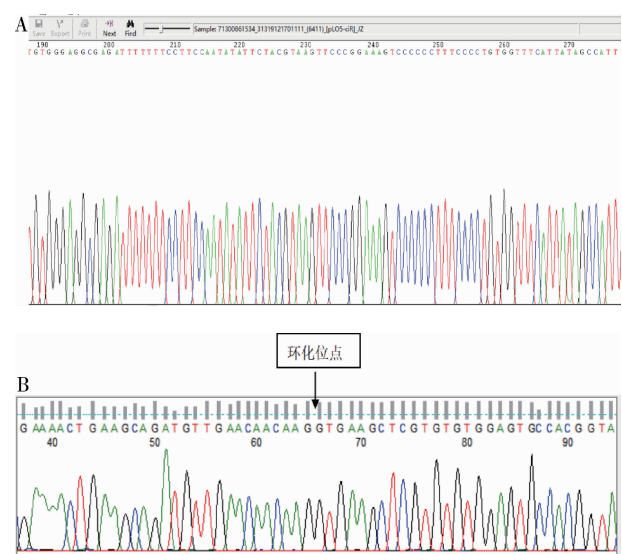


图 1 hsa_circ_0006411 部分测序图及环状位点测序图
A. hsa_circ_0006411 测序结果部分显示的图谱;
B. hsa_circ_0006411 环化位点处的显示图

2. 转染 293T 细胞后 hsa_circ_0006411 表达量及测序结果:转染 293T 细胞后 hsa_circ_0006411 载体

组、PLC5 - ciR 空载体及对照组相对表达量分别为 9947.08 ± 514.42 、 3.71 ± 0.71 和 1.00 ± 0.10 ,差异有统计学意义(图 2),其扩增曲线见图 3;显微镜下可见在 293T 细胞中的绿色荧光蛋白的表达,表明 hsa_circ_0006411 载体可在 293T 细胞中稳定表达 circ_0006411 环状基因。

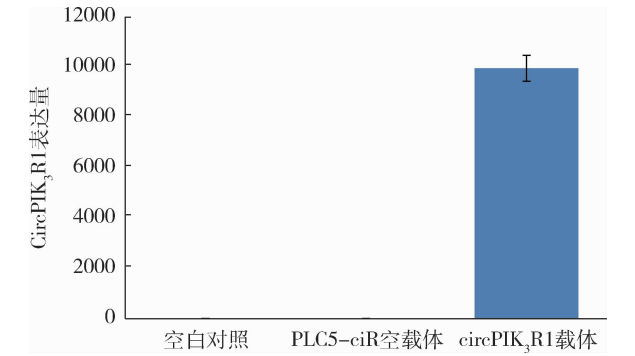


图 2 转染 293T 细胞后基因表达情况

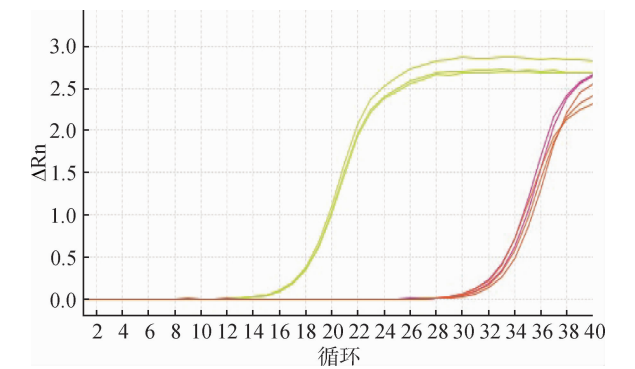


图 3 hsa_circ_0006411 PCR 扩增曲线
黄色为 GAPDH 基因,其他为 circ_0006411 基因

讨 论

环状 RNA 在 1976 年首次在病毒中被发现^[7]。作为非编码 RNA 群体的一个重要组成部分,其形成机制为线状 mRNA 前体物质反向剪接形成的环状结构,其 5' 和 3' 末端通过磷酸二酯键连接,而不形成悬空的自由末端,相对于线性结构而言,其环状结构使其能够更加稳定的表达存在于组织、血液及其他体液中^[8,9]。由于其非编码特性,在生物体生命活动,疾病发展过程中的作用一直以来都被忽视。直到近年来发现很多非编码 RNA 的重要调控基因表达的功能被提出,才对 circRNA 的研究重新引起重视。加上现代生物技术和研究工具的发展,越来越多的研究表明,circRNA 在人类生命活动过程中的重要作用,目前而言主要体现在以下几个方面:①作为竞争性内源 RNA (ceRNA 机制,即竞争性结合 miRNA,从而解除与其结合的靶基因的抑制作用,来提高 miRNA 靶基因表达)来调控特异性基因的表达^[10,11];②与 RNA 结合蛋白相互作用来抑制或调控该蛋白的活性^[12,13];③通过顺式/反式作用与 RNA 直接结合来调控 RNA 的水平^[14,15];④可以作为模板翻译成多肽^[16~18]。上述 circRNA 的稳定性特征及诸多功能,赋予其作为肿瘤发生、发展、诊断和治疗等多种路径分子的可能性,科学家的确发现其与肺癌、乳腺癌、泌尿生殖系统和消化系统等几乎所有癌种的密切关系。

本研究主要为肺癌相关的环状 RNA 的研究。前期研究发现,在肺癌组织中相对于癌旁组织低表达的 circ_0006411,其母基因为编码 PI₃K 信号通道中调节亚基 P85a 的基因 PIK₃R1,该基因在不同肿瘤中的表达高低具有明显的组织特异性,在乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌和非小细胞肺癌中明显低表达,其可能主要是发挥抑制 PI₃K/AKT 下游的动物雷帕素靶蛋白 (mTOR) 信号转导通路来抑制肿瘤的增殖,促进凋亡的作用^[19,20]。今后拟进一步研究 circ_0006411 在非小细胞肺癌中的作用机制,需先构建该环状 RNA 的载体。本研究以慢病毒载体 PLC5-ciR 为工具,通过基因工程的手段,成功构建了携带该环状基因的慢病毒载体,并在 293T 细胞中能显著高表达,可以用于后续实验。

参考文献

- 1 刘名倬,朱峰. 长链非编码 RNA 的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(4): 285-288
- 2 脱磊,姜宁宁,沙莎. 长链非编码 RNA 及其与肺癌研究进展[J]. 中华生物医学工程杂志, 2018, 24(2): 146-148
- 3 李景林,郑汪洋,李鑫恒,等. 环状 RNA 在肿瘤中调控作用的

- 研究进展[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(8): 578-581
- 4 Ai XJ, Xiang L, Huang Z, *et al.* Overexpression of PIK₃R1 promotes hepatocellular carcinoma progression[J]. *Biolo Rese*, 2018, 51(1): 52
- 5 David A, Dymment, Amanda C, *et al.* Mutations in PIK₃R1 cause SHORT syndrome [J]. *Ame J Human Genet*, 2013, 93(1): 158-66
- 6 Jesús, Vallejo-Díaz, Monica, *et al.* The opposing roles of PIK₃R1/p85α and PIK₃R2/p85β in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(4): 233-244
- 7 Sanger HL, Klotz G, Riesner D, *et al.* Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(11): 3852-3856
- 8 Tao Y, Li Y, Wang Y, *et al.* CircRNAs in cancer metabolism: a review[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 90
- 9 Jia JH, Li W, Wang XQ, *et al.* A novel strategy of identifying circRNA biomarkers in cardiovascular disease by meta-analysis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21601-21612
- 10 李乐, 吴金亮, 徐明, 等. 环状 RNA 的生物特征及其功能研究进展[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(2): 10-13, 62
- 11 Katherine L, Harper E, McDonnell J, *et al.* CircRNAs: from anonymity to novel regulators of gene expression in cancer (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(6): 1183-1193
- 12 金正, 崔京钦, 曾一平, 等. 环状 RNA circ_0002052 在骨肉瘤组织中的表达及临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(1): 32-34
- 13 Afzali F, Salimi M. Unearthing regulatory axes of breast cancer circRNAs networks to find novel targets and fathom pivotal mechanisms [J]. *Interdiscipl Sci, Compu Life Sci*, 2019, 11(4): 711-722
- 14 陈国林, 王见雪, 贾世奇, 等. 环状 RNA 的研究现状及其与糖尿病的相关性[J]. 中华肥胖与代谢病电子杂志, 2018, 4(3): 173-176
- 15 Esther J, Arnaiz M, Carla M, *et al.* CircRNAs and cancer: Biomarkers and master regulators[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 58: 90-99
- 16 汪桂华, 浦江, 沈蕾, 等. 循环非编码 RNA 作为乳腺癌标志物的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(1): 63-66
- 17 Chen L, Zhang S, Wu J, *et al.* Retraction note: circRNA_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR-29 family[J]. *Oncogene*, 2019, 38(28): 5750
- 18 彭洪, 彭明沙, 冯雪雅, 等. 环状 RNA circ000601 通过 miR-31-5p 调控 NUMB 抑制结直肠癌细胞增殖[J]. 中华内分泌外科杂志, 2019, 13(5): 429-434
- 19 Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, *et al.* High frequency of mutations of the PIK₃CA gene in human cancers [J]. *Science*, 2004, 304: 554
- 20 邹晨, 杨田, 龚丹丹, 等. 环状 RNA circ_0076704 下调对人胃癌细胞迁移和侵袭的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(11): 2008-2010

(收稿日期: 2020-03-27)

(修回日期: 2020-05-05)