

# 重组激活基因 1 shRNA 慢病毒载体的构建与鉴定

陈浩浩 周星娟 周婧 李一乔 韩曙 凌树才\*

(浙江大学医学院人体解剖与细胞生物学系, 杭州 310058)

**摘要** 构建 3 对针对大鼠海马神经元重组激活基因(*Rag1*)的 RNA 干扰重组表达载体及 1 对无关序列的载体, 分别命名为 shRNA1、shRNA2、shRNA3 及 negative。经基因测序确认后, 采用慢病毒载体系统分别包装 4 个载体, 而后分别感染体外培养的大鼠原代海马神经细胞, 收集感染后 96 h 的细胞, 通过免疫荧光观察细胞感染情况, 并且利用 RT-PCR 和 Western 印迹检测 *Rag1* mRNA 及蛋白质的表达。经测序鉴定合成的 shRNA 序列正确, 并且慢病毒感染细胞效果良好。LV-shRNA1 组、LV-shRNA2 组、LV-shRNA3 组与正常对照组相比, *Rag1* mRNA 表达都明显减少( $P < 0.01$ ), 其中 LV-shRNA3 组的抑制效率最高为(76.4±3.5)%, Western 印迹结果与其基本一致, 而 LV-negative 组对 *Rag1* mRNA 及其表达的蛋白质都无明显影响。实验结果表明, 我们成功构建了能特异性抑制大鼠海马神经元 *Rag1* 表达的 shRNA 慢病毒表达载体。

**关键词** 重组激活基因 1; 神经元; shRNA; RT-PCR; Western 印迹

重组激活基因(recombination activating genes, *Rags*)最早发现于免疫系统, 有 *Rag1* 和 *Rag2* 两种亚型<sup>[1]</sup>。它们的编码产物共同构成重组酶, 能特异地识别免疫球蛋白和 T 细胞受体的 V、DH、J 基因片段两侧的重组信号序列, 催化 DNA 双链断裂, 引起 V(D)J 重排, 因此在淋巴细胞的发育成熟过程中起关键作用, 并与免疫记忆功能有关。实验证明, 敲除动物的 *Rag1* 基因可导致免疫记忆功能缺陷<sup>[2]</sup>。但随着研究的不断深入, 人们发现 RAG1 并非只存在于免疫系统中, 在哺乳动物<sup>[3]</sup>、两栖动物<sup>[4]</sup>和硬骨鱼类<sup>[5,6]</sup>的神经系统中也都存在。并且发现 *Rag1* 表达的部位主要集中在与记忆功能有关的脑区, 如海马、小脑、杏仁复合体以及新皮质。最近研究还发现, RAG1 在斑马鱼的嗅觉神经元中有表达<sup>[7]</sup>。大鼠 *Rag1* 位于 3 号染色体 q31, RAG1 分子量为 119 kDa 左右。然而目前有关 RAG1 在脑内所起的作用尚未明了, 因此我们通过构建慢病毒包装的 shRNA 干扰片段感染体外培养原代海马神经元, 研究其对 *Rag1* 的干扰效果, 为进一步在体的 RNA 干扰实验打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料试剂

载体质粒 pRNAT-U6.2/Lenti、包装质粒 pRSV-Rev 和 pMDLg/pRRE、包膜质粒 pMD2G (含水疱性口炎病毒 G 蛋白基因, VSV-G)购自 Trono Lab 公司; 人肾胚细胞 293T 细胞、宫颈癌细胞株 HeLa 细胞由

中科院上海细胞生物学研究所惠赠; 大量质粒 DNA 提取试剂盒和基因组 DNA 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司; *Bam*HI、*Xho*I 内切酶、逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; 山羊抗 RAG1 抗体购自 Santa Cruz 公司; HRP 标记兔抗山羊二抗购自 Jackson 公司; 孕 18 天的 SD 品系孕鼠购自浙江大学医学实验动物中心。

### 1.2 RNAi PRNAT-u6.2 (*Bam*HI/*Xho*I)重组质粒的构建

以 Ambion 公司提供的 siRNA target finder 软件设计合成三对针对 *Rag1* 基因的 shRNA, 分别命名为 shRNA1、shRNA2、shRNA3, 同时设计序列 negative 用于对照组实验, 通过 BLAST 验证该序列对任何基因无干扰效果。设计合成 negative、靶点 shRNA 干扰片段的 DNA 两对单链模板如下: shRNA1: 有义链 5'-GATCCCGGCGACAAAGCAAUUCACCA TTGATATCCGTGGTGAATTGCTTTGTCG-CTTTTTTCCAAC-3', 反义链 3'-GGCCGCTGTTTCG-TTAAGTGGTAACTATAGGCACCACTTAACGA-AACAGCGAAAAAAGGTTGAGCT-5'; shRNA2: 有义链 5'-GATCCCGCCUGCCCAAGA-GUGCAAUG TTGATATCCGCATTGCACTCTTGGGCAGGTT-TTTTCCAAC-3', 反义链 3'-GGCGGACGGGTTCT-CACGTTACA ACTATAGGCGTAACGTGAGAAC-

收稿日期: 2009-04-02 接受日期: 2009-09-04

国家自然科学基金资助项目(No.30570586)

\* 通讯作者: Tel: 0571-88208165, E-mail: lingshucai@zju.edu.cn

CCGTCCAAAAAAGGTTGAGCT-5'; shRNA3: 有义链 5'-GATCCCGUGCCUCCUCCGUAGAUGAATTGATATCCGTTTCATCTACGGAGGAGGCATTTTTTCCAAC-3', 反义链 3'-GGCACGGAGGAGGCATCTACTTAACTATAGGCAAGTAGATGCCTCCTCCGTAAAAAAGGTTGAGCT-5'; negative: 有义链 5'-GATCCCGTTC-TCCGAACGTGTACGTTTGATATCCGACGTG-ACACGTTCCGGAGAATTTTTTCCAAC-3', 反义链 3'-GGCAAGAGGCTTGACAGTGCAAACCTATAGGCTGCACTGTGCAAGCCTCTTAAAAAAGGTTGAGCT-5'.

合成的序列经退火与 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切的 pRNAT-u6.2/Lenti 连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆摇菌, 抽质粒, 送测序。

### 1.3 慢病毒载体的包装与病毒滴度的测定

用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞, 计数, 细胞密度为  $0.5 \times 10^9$  个/L 时, 重新接种于 4 个 25 ml 的 15 cm 细胞培养皿中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 待细胞密度达 60%~70%。每个培养皿中加入 20  $\mu$ g pRNAT-U6.2/Lenti、10  $\mu$ g pRsv-Rev、15  $\mu$ g pMDLg/pRRE、7.5  $\mu$ g pMD2G, 将质粒混合, 并用无菌水定容至 1.8 ml, 轻轻震荡。各培养皿中加入 200  $\mu$ l 2.5 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液, 混匀, 加入 2 ml 2 $\times$ PBS 溶液, 室温放置 20~30 min。将 DNA 磷酸钙混合液转移至含单层细胞的培养液中, 混匀, 培养 12 h。弃去含有转染混合物的培养液, 加入 15 ml PBS, 轻摇后弃去, 该步骤重复 3 次。每个培养皿中加入 15 ml 含 100 IU/ml 青链霉素、10% FCS 的 DMEM 培养基, 继续培养。收集转染 72 h 的 293T 细胞上清液, 4 °C 下 4 000 g 离心 10 min, 吸取上清液, 用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤, 将过滤的病毒上清液 4 °C 下 25 000 r/min 超速离心 20 min, 弃去上清液。用预冷的 PBS 重悬沉淀, 4 °C 过夜。次日, 以 10  $\mu$ l 每管分装, -80 °C 冰箱冻存备用。在含有 8  $\mu$ g/ml Polybrene 的 24 孔平板中用 10 倍梯度稀释的病毒转导  $5 \times 10^4$  个 / 孔 HeLa 细胞。72 h 后, 用基因组 DNA 纯化试剂盒提取病毒转导的 HeLa 细胞的基因组 DNA, 采用 RT-PCR 测定病毒转导单位滴度<sup>[8,9]</sup>。WPRE Primer F: 5'-CCGTTTCAGGCAACGTG-3'; WPRE Primer R: 5'-AGCTGACAGGTGGTGGCAAT-3'; Probes: 5'-FAM-TGCTGACGCAACCCCACTGGT-TAMRA-3'。 $\beta$ -肌动蛋白 Primer F: 5'-GCGAGAAGATGACCCAGCTC-3';  $\beta$ -肌动蛋白 Primer R: 5'-CCAGTGGTACGGCCAGAGG-3'; Probes:

5'-FAM-CCAGCCATGTACGTTGCTATCCAGGC-TAMRA-3'。扩增条件为: 50 °C, 2 min; 95 °C, 10 min; 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min, 共 40 个循环。从各样品 PCR 动力学曲线中得出 Ct 值, 与标准曲线进行比较, 计算 WPRE 与  $\beta$ -肌动蛋白的 DNA 分子数, 从而计算感染滴度。

### 1.4 大鼠原代海马神经元的培养

取孕 18 天的 SD 大鼠, 0.5% 戊巴比妥钠麻醉, 打开腹腔, 取出胎鼠, 取脑, 剔除脑膜和血管, 分离出海马。剪碎后加胰蛋白酶, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中温育消化 10 min, 用 10% FCS 终止消化, 吹散组织, 通过 200 目的滤网。收集细胞悬液 4 °C 下 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用含 2% B27、1% 青链霉素、1% 谷氨酰胺的 Neurobasal 培养液重悬。接种于多聚赖氨酸包被的 6 孔培养板以及有小圆玻片的 24 孔培养板中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞接种 24 h 后换全液, 以后每隔 2 至 3 天换半液, 待细胞长到第 7 天后, 神经元突起连接成丰富的网络即可用于实验。

### 1.5 慢病毒感染海马神经元

移除全部培养液, 将含有病毒的培养液加入到培养板中, 置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 过夜培养。24 h 后用新鲜的完全培养液取代含有病毒的旧液, 仍然置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 培养, 96 h 后收集细胞做 mRNA 和蛋白质表达检测。

### 1.6 免疫荧光

在同一样本上(携带 shRNA3 干扰片段的慢病毒载体转染后的海马神经元)进行三重荧光标记观察, 即观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记细胞的分布、神经微丝蛋白(neurofilament protein, NF)免疫荧光标记海马神经元的分布以及 1% Hoechst33342 (Sigma 公司)核染色观察背景细胞。小鼠抗 GFP 抗体(1:500) 4 °C 过夜, FITC 标记山羊抗小鼠(1:50) 37 °C 温育 1 h, 兔抗 NF-M 抗体(1:1 000) 4 °C 过夜, TRITC 标记山羊抗兔(1:50) 37 °C 温育 1 h, 1% Hoechst33342 封片观察。

### 1.7 RT-PCR

按照 Axygen RNA 提取试剂盒提取细胞中总 RNA, 用 TaKaRa 逆转录试剂盒逆转录每个样本 1  $\mu$ g RNA, 得到 cDNA。Rag1 Primer F: 5'-TTTCCGAAAG-AAGGAAAAAAGAGTC-3'; Rag1 Primer R: 5'-GACG-GTGTGTGGGGGTG-3';  $\beta$ -肌动蛋白 Primer F: 5'-GAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3';  $\beta$ -肌动蛋白

Primer R: 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'。在每一反应管里加入 25  $\mu$ l SYBR Green Mix (2 $\times$ )、2.5  $\mu$ l cDNA、1  $\mu$ l Primer F、1  $\mu$ l Primer R、20.5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。扩增条件为: 50  $^{\circ}$ C, 2 min; 95  $^{\circ}$ C, 10 min; 95  $^{\circ}$ C, 15 s; 55  $^{\circ}$ C, 30 s; 72  $^{\circ}$ C, 30 s, 共 40 个循环。反应结束后, 对 RNA 产物进行解离曲线分析, 排除双峰解离曲线或异常扩增曲线的可能性, 然后从各组样品荧光定量 PCR 动力学曲线中得出 Ct 值, 与标准曲线进行比较, 计算出各组待测样品的 *Rag1* 拷贝数来检测 *Rag1* mRNA 水平。

### 1.8 Western 印迹

提取细胞总蛋白, Bradford 比色法测定蛋白质浓度。取等量蛋白进行 SDS-PAGE, 90 V 20 min, 直至所有样品压成一线, 120 V 100 min。冰盒转膜, 100 V 120 min。5% 脱脂奶粉室温封闭 60 min; 一抗 4  $^{\circ}$ C

温育过夜; HRP 标记二抗 37  $^{\circ}$ C 温育 2 h; ECL 法显色; 拍照。

### 1.9 统计学处理

数值以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组之间采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒测序结果

测序结果(图 1)显示, negative、shRNA1、shRNA 2、shRNA3 均为鉴定正确的阳性克隆。

### 2.2 病毒滴度测定

LV-negative 组的滴度为  $(1.0 \pm 0.5) \times 10^8$  TU/ml, LV-shRNA1 组的滴度为  $(1.5 \pm 0.4) \times 10^8$  TU/ml, LV-shRNA2 组的滴度为  $(1.7 \pm 0.6) \times 10^8$  TU/ml, LV-shRNA3

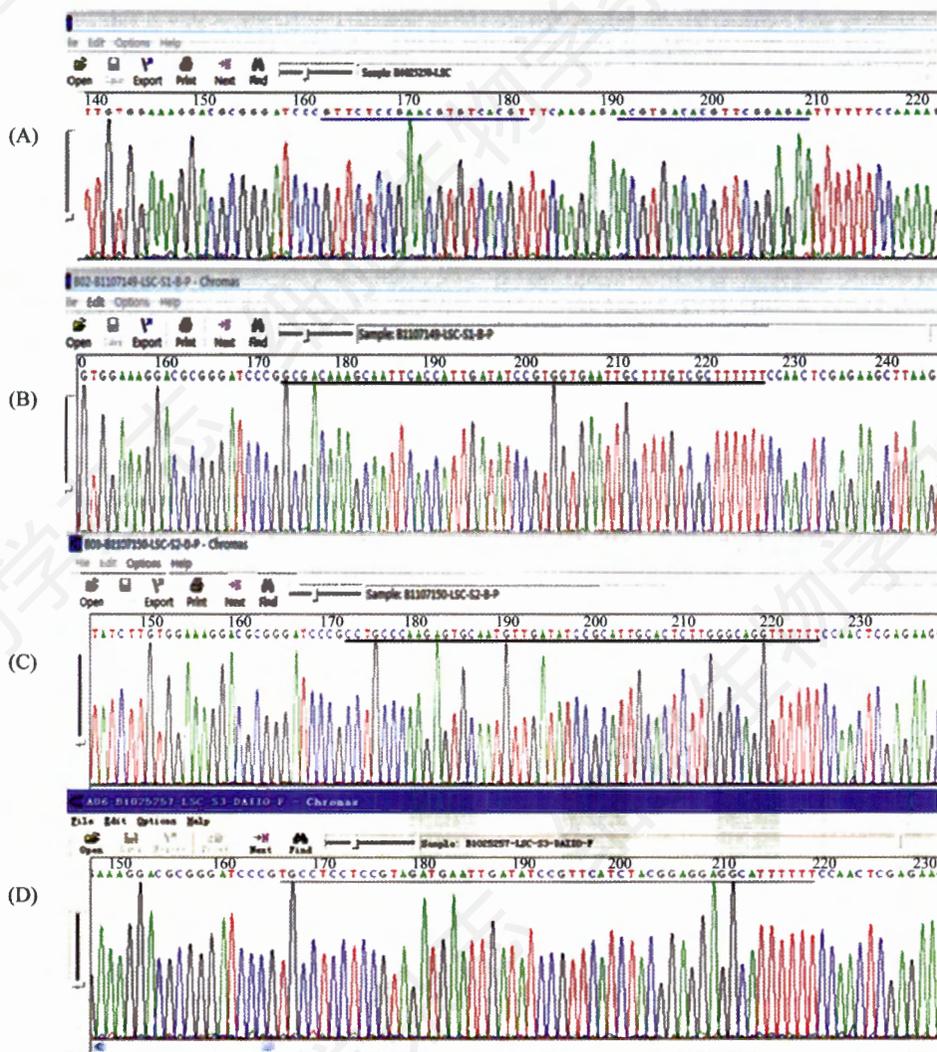


Fig.1 Four lentiviral vectors confirmed by sequencing analysis

A: sequence of negative; B: sequence of shRNA1; C: sequence of shRNA2; D: sequence of shRNA3.

组的滴度为 $(0.8\pm 0.5)\times 10^8$  TU/ml。

### 2.3 免疫荧光结果

NF 标记的神经元同时被 GFP 标记, 说明大部分的海马神经元均能被病毒载体转染。而有一些小型的细胞被 GFP 标记, 但 NF 为阴性, 则表明它们有可能是神经胶质细胞(图 2)。

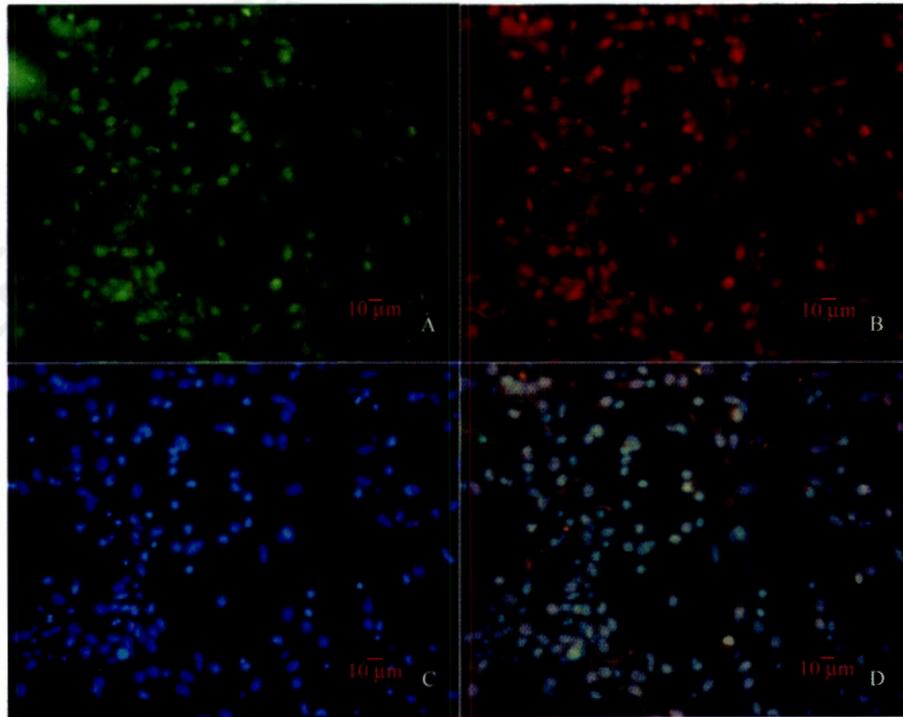
### 2.4 RT-PCR 结果

RT-PCR 结果显示 LV-shRNA1 组、LV-shRNA2

组、LV-shRNA3 组与对照组相比, *Rag1* mRNA 的表达明显减少( $P<0.01$ ), LV-shRNA2 组、LV-shRNA3 组与 LV-shRNA1 组相比有显著性差异( $P<0.01$ ), 而 LV-shRNA3 组比 LV-shRNA2 组的抑制效果更好( $P<0.05$ ), 抑制效率为 $(76.4\pm 3.5)\%$ , LV-negative 组和对照组相比无显著性差异(图 3)。

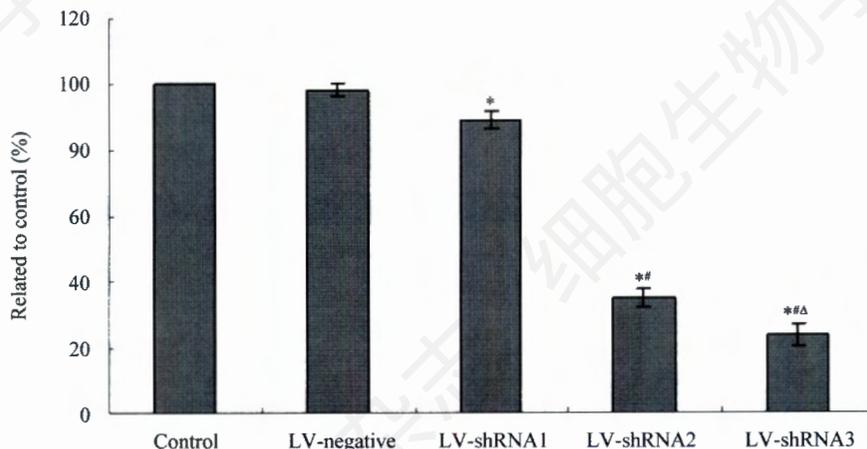
### 2.5 Western 印迹结果

Western 印迹结果表明 LV-shRNA3 组的干扰效



**Fig.2 Immunofluorescence of cultural cells 96 h after lentivirus transduction**

A: cultural cells expressed GFP (FITC conjugated, green); B: hippocampus neurons were stained by neurofilament-M (rhodamine conjugated, red); C: the nuclei of all cells stained by Hoechst33342 (blue); D: the three pictures were overlapped. Bar=10  $\mu$ m.



**Fig.3 *Rag1* mRNA expression in different groups analyzed by RT-PCR**

\* $P<0.01$  vs control; \*\* $P<0.01$  vs LV-shRNA1; Δ $P<0.05$  vs LV-shRNA2.

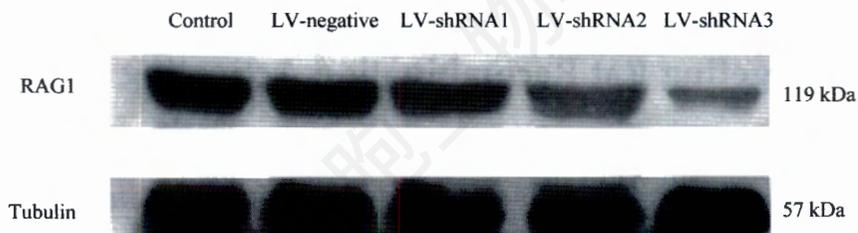


Fig.4 RAG1 expression in different groups analyzed by Western blot

率最高(图4), 与 RT-PCR 结果基本一致。

### 3 讨论

自从上个世纪 80 年代 Schatz 等<sup>[10]</sup>发现重组激活基因后, 人们对它的研究就没有停止过。Chun 等<sup>[3]</sup>利用 PCR、原位杂交和 Northern 印迹分析检测到在鼠的中枢神经系统中 *Rag1* 的低水平转录, 转录产物广泛分布于胚胎和生后鼠的神经元内, 转录最明显发生于神经细胞分布密集的脑区。但人们并不明确脑内是否也存在与免疫系统类似的 DNA 重组机制, *Rag1* 是否与大脑的学习和记忆功能存在某种必然的联系。Cushman 等<sup>[11]</sup>证明了 *Rag1* 敲除小鼠的神经行为表现发生变化, 他们发现在水迷宫中 *Rag1* 敲除小鼠并没有显示空间学习异常; 在可见平台测试中, *Rag1* 敲除小鼠的游泳路径距离和到达逃生平台的潜伏期明显比对照组长。然而利用基因敲除技术来研究 *Rag1* 在中枢神经系统中的功能显然也存在一定的缺陷, 动物从胚胎期就开始缺失 *Rag1* 基因会造成免疫缺陷, 对发育过程也会产生干扰, 从而影响后续实验的结果。而我们使用的慢病毒载体能感染包括神经元在内的非分裂期细胞, 感染效率高、容纳外源目的基因片段大、免疫反应性低, 最主要的是能在体稳定转染, 与宿主基因组发生整合而实现长期稳定表达<sup>[12]</sup>, 用它来探讨 *Rag1* 在中枢神经系统中的功能应该更加合适。本实验构建的慢病毒载体, 在感染大鼠原代海马神经元后, 经 RT-PCR 和 Western 印迹检测, 能有效的抑制 *Rag1* mRNA 以及所表达的蛋白质, 为进一步探讨在体抑制 RAG1 的表达对脑功能的影响提供了一个有效工具, 具有十分重要的价值。

### 参考文献(References)

- [1] Van Gent DC, McBlane JF, Ramsden DA, *et al.* Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system, *Cell*, 1995, 81(6): 925-934
- [2] Oettinger MA, Sehzat DG, Gorke C, *et al.* RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination, *Science*, 1990, 248(4962): 1517-1523
- [3] Chun JJ, Schatz DG, Oettinger MA, *et al.* The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system, *Cell*, 1991, 64(1): 189-200
- [4] Wang X, Su H, Bradley A. Molecular mechanisms governing Pcdh-gamma gene expression: evidence for a multiple promoter and cis-alternative splicing model, *Genes Dev*, 2002, 16(15): 1890-1905
- [5] Jessen JR, Willett CE, Lin S. Artificial chromosome transgenesis reveals long-distance negative regulation of *rag1* in zebrafish, *Nat Genet*, 1999, 23(1): 15-16
- [6] Peixoto BR, Mikawa Y, Brenner S. Characterization of the recombinase activating gene-1 and 2 locus in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, *Gene*, 2000, 246(1-2): 275-283
- [7] Feng B, Bulchand S, Yaksi E, *et al.* The recombination activation gene 1 (*Rag1*) is expressed in a subset of zebrafish olfactory neurons but is not essential for axon targeting or amino acid detection, *BMC Neurosci*, 2005, 6: 46
- [8] Geraerts M, Willems S, Baekelandt V, *et al.* Comparison of lentiviral vector titration methods, *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 34
- [9] Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, *et al.* Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and maker expression methods, *Gene Ther*, 2002, 9(17): 1155-1162
- [10] Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene (*Rag1*), *Cell*, 1989, 59(6): 1035-1048
- [11] Cushman J, Lo J, Huang Z, *et al.* Neurobehavioral changes resulting from recombinase activation gene 1 deletion, *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(1): 13-18
- [12] Lai Z, Brady RO. Gene transfer into the central nervous system *in vivo* using a recombinant lentivirus vector, *J Neurosci Res*, 2002, 67(3): 363-371

## Construction and Identification of RNAi Lentiviral Vector Targeting Rat Recombination Activating Gene 1

Hao-Hao Chen, Xing-Juan Zhou, Jing Zhou, Yi-Qiao Li, Shu Han, Shu-Cai Ling\*

(Department of Anatomy and Cell Biology, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** Three-pair shRNA (named as shRNA1, shRNA2 and shRNA3) targeting rat recombination activating gene 1 (*Rag1*) and one-pair independent sequence (negative) were chemically synthesized and confirmed by sequencing analysis. The four different pRNAT-U6.2/Lenti vectors were packaged with lentiviral vector system, and were transferred into the cultured rat hippocampal neuron cells *in vitro* respectively. After being harvested for 96 h, cells were observed by immunofluorescence, then assayed for expression of Rag1 by RT-PCR and Western blot. The results indicated that four lentiviral vectors were correct by sequencing analysis and could be infected into most hippocampal neuron cells *in vitro*. The expression of Rag1 mRNA could be down-regulated by LV-shRNA1, LV-shRNA2 and LV-shRNA3 groups respectively compared with the control group ( $P < 0.01$ ), and LV-shRNA3 group got the highest efficiency, with the inhibition rate of  $(76.4 \pm 3.5)\%$ . The results of Western blot were similar with that of RT-PCR. The negative lentiviral vector had no such inhibitory effects. In conclusion, the lentiviral vectors that can specifically inhibit the expression of Rag1 have been constructed successfully.

**Key words** recombination activating gene 1; neurons; shRNA; RT-PCR; Western blot

Received: April 2, 2009

Accepted: September 4, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570586)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88208165, E-mail: lingshucui@zju.edu.cn