

[文章编号] 1000-4718(2008)06-1246-03

# 人 CDK2 基因 RNAi 慢病毒载体的构建与鉴定\*

黄宪章<sup>1,2</sup>, 王前<sup>1Δ</sup>, 郑磊<sup>1</sup>, 陈晓<sup>2</sup>, 熊石龙<sup>1</sup>, 包杰<sup>1</sup>, 丁海明<sup>2</sup>, 黄妩姣<sup>2</sup>, 庄俊华<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 南方医科大学南方医院检验医学中心, 广东 广州 510515; <sup>2</sup> 广东省中医院检验科, 广东 广州 510120)

**[摘要]** 目的: 构建人细胞周期素依赖蛋白激酶 2(CDK2)基因 RNA 干扰慢病毒载体。方法: 利用 Invitrogen 公司在线软件设计人 CDK2(NM001798)shRNA 序列, 退火形成 ds oligo 后克隆到 pENTR™/U6 载体的黏性末端, 测序, 再与慢病毒载体重组, 测序鉴定, 在脂质体的介导下将慢病毒的包装混合物和 CDK2 基因重组慢病毒载体转染 293FT 细胞, 包装成病毒后, 收集细胞培养上清液, 测定病毒滴度。结果: 测序证实 pENTR™/U6 - CDK2 - shRNA 为阳性克隆, 与慢病毒载体重组后测序结果显示也为阳性克隆, CDK2 基因重组慢病毒载体转染 293FT 细胞后 48 h, 细胞培养上清液, 病毒的滴度为  $6 \times 10^8$  TU/L。结论: 成功构建人 CDK2 基因 RNAi 慢病毒载体, 为研究 CDK2 在自身免疫病中的应用提供了稳定的转染细胞载体。

**[关键词]** 基因, CDK2; RNA 干扰; 慢病毒载体

**[KEY WORDS]** Genes, CDK2; RNA interference; Lentivirus vector

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

周期素依赖性蛋白激酶 (cyclin - dependent kinase, CDKs) 对细胞分裂周期起关键作用, 其中 CDK2 基因不仅控制早 S 期 DNA 合成的起始, 而且控制 G<sub>1</sub> 期进入 S 期<sup>[1]</sup>。下调 CDK2 基因表达水平有可能阻止或延缓细胞分裂增殖, 从而达到抗纤维化的目的。RNAi (RNA interference) 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的应用前景的技术。然而, RNAi 效应与基因转移效率有密切关系, 慢病毒载体、具有既可感染分裂细胞又可感染非分裂细胞, 还可整合到宿主细胞的染色体基因组上并具有免疫原性小等优点<sup>[2]</sup>, 在基因治疗领域中具有发展前景。因此, 本研究构建 CDK2 基因的 RNAi 慢病毒载体并进行鉴定, 为研究 CDK2 在自身免疫病中的应用提供稳定的转染细胞载体。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

BLOCK - iT™ U6 RNAi entry vector 试剂盒购自 Invitrogen; CDK2 的慢病毒干扰片段利用 Invitrogen 网站上的免费软件设计由上海生工生物工程有限公司合成; Opti - MEM 培养基购自 Invitrogen; 高糖 DMEM 培养基和 RPMI 1640 培养基购自 Gibco; 胎牛血清购自杭州四季青; 质粒 Midi 抽提试剂盒购自 Qiagen; Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen; Polybrene 购自 Sigma。

### 2 方法

**2.1 人 CDK2 基因 RNAi 慢病毒载体的构建** 根据网站 (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/>) 提供的软件设计合成 3 个 CDK2 基因 (NM001798) 的特异性干扰片段 (表 1), GC 含量在 35 - 55%, 在 GenBank 数据库进行 BLAST 分析其与其

它基因的同源性。在干扰片段上游链 (Top strand) 的 5' 端加上 CACC 4 个碱基, 在下游链 (bottom strand) 的 5' 端加上 AAAA 4 个碱基, 环 (loop) 为 CGAA。室温下在 20 μL 反应体积中 ds oligo 退火, 严格按操作说明书进行 95 °C 孵育 4 min 慢慢冷却至室温形成双链寡核苷酸 (ds oligo), 进行 100 倍比稀释终浓度为 5 nmol/L, 取 500 nmol/L 的 ds oligo 于 4% 琼脂糖电泳检验退火的 ds oligo 的完整性。在 20 μL 反应体系连接 ds oligo 至 pENTR™/U6 载体上, 转化 TOP10 感受态细胞, 卡那霉素抗性 (50 mg/L) 平板筛选阳性克隆, U6 前引物测序, 序列为 5' - GGACTATCATATGCTTACCG - 3', 将阳性克隆与 plenti/BLOCK - iT™ - DEST vector 进行重组, 转化 Sbt13 感受态细胞, 氨苄青霉素 (Amp) 抗性筛选后, 进行 30 mg/L 氯霉素的 LB 平板中的药物负筛选, U6 前引物测序验证。

**2.2 慢病毒的包装和滴度测定** 用 Opti - MEM 培养基稀释 ViraPower™ 包装质粒混合物和重组 CDK2 基因慢病毒表达质粒, 在脂质体 Lipofectamine™ 2000 的介导下, 感染 293FT 细胞悬液 (共  $6 \times 10^6$  个细胞), 轻轻混匀, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。第 2 d 更换成含丙酮酸钠的完全培养基, 转染 48 h 后, 收获含病毒的上清液, 4 °C, 3 000 r/min 离心 5 min, 分装病毒上清液, -80 °C 保存备用。以  $2 \times 10^5$  cells/well 的密度将细胞接种在 6 孔板中, 第 2 d, 将慢病毒贮液梯度稀释从  $10^{-6}$  -  $10^{-2}$ , 去除细胞的培养基, 将梯度稀释的含病毒培养基分别加入 6 孔板各孔中, 病毒感染的同时加入工作液浓度为 6 mg/L 的 Polybrene 以增加感染效率, 第 2 d 去除含病毒的培养基更换为 2 mL 的完全培养基, 感染后 48 h 加入含杀稻瘟菌素 (浓度为 10 mg/L) 的培养液, 进行药物筛选, 筛选 10 d 后, 未感染的细胞全部死亡, 感染的细胞形成肉眼可见的克隆, 在显微镜下计数克隆数 ( $\geq 50$  个细胞为一个克隆), 确定病毒的滴度 (transducing unit,  $10^3$  U/L)。

[收稿日期] 2008 - 01 - 18 [修回日期] 2008 - 03 - 20

\* [基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (No. 07004832); 广东省科学计划课题资助项目 (No. 2006B36003006)

Δ 通讯作者 E - mail: lmjpla@fimmu.com

表1 CDK2 特异性的干扰序列  
Tab 1 CDK2 specific interfering sequence

Site	Start	Target sequence
R1	382	5' - CACCGAGAGATCTCTCTGCTTAAGGCCAACCTTAAGCAGAGAGATCTCTC - 3'(Top strand)
		5' - AAAAGAGAGATCTCTCTGCTTAAGGTTGCGCTTAAGCAGAGAGATCTCTC - 3'(Bottom strand)
R2	482	5' - CACCGCACCAAGATCTCAAGAAATTCGAAAATTTCTTGAGATCTTGGTGC - 3'(Top strand)
		5' - AAAAGCACCAAGATCTCAAGAAATTTTCGAAATTTCTTGAGATCTTGGTGC - 3'(Bottom strand)
R3	1 012	5' - CACCGGAGCTTGTATATCGCAAATGCCGAAGCATTTCGCGATAACAAGCTCC - 3'(Top strand)
		5' - AAAAGGAGCTTGTATATCGCAAATGCTTCGGCATTTCGCGATAACAAGCTCC - 3'(Bottom strand)

## 结 果

### 1 ds oligo 的合成

将针对 *CDK2* 基因特异性的干扰单核苷酸下进行退火处理,得到 ds oligo 产物(图1)。

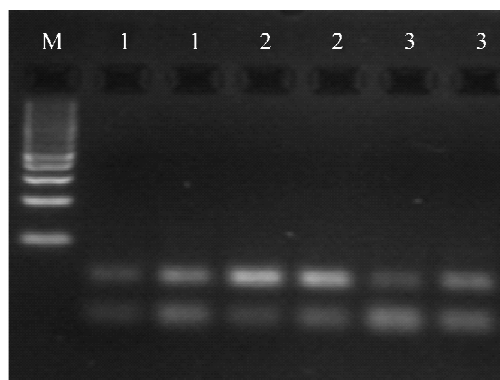


Fig 1 *CDK2* gene interference fragment ds oligo electrophoretogram. Lane 1: R1 interference fragment of *CDK2*; Lane 2: R2 interference fragment of *CDK2*; Lane 3: R3 interference fragment of *CDK2*; M: DL2000 marker.

图1 *CDK2* 基因干扰片段双链寡核苷酸电泳图

### 2 pENTRTM/U6 -shRNA/ CDK2 克隆测序

将入门载体克隆 pENTR<sup>TM</sup>/U6 - shRNA/ *CDK2* 送由上海

生物工程有限公司测序, R1 和 R2 均为阳性克隆, R3 测序不成功。R1 和 R2 部分测序结果见图2。

### 3 CDK2 慢病毒重组质粒克隆测序

将 pENTRTM/U6 - shRNA/ *CDK2* 与 pLenti6/DEST 载体进行同源重组,转化 One Shot Stb13TM Competent *E. coli*, 挑出阳性克隆, R1 和 R2 测序结果均为阳性。

### 4 慢病毒颗粒的包装和滴度测定

将慢病毒包装质粒混合物和重组 *CDK2* 基因慢病毒载体经 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 质脂体导入 293FT 中包装慢病毒, 收集病毒上清液, 测定慢病毒的病毒滴度, 病毒浓度从  $10^{-2}$  -  $10^{-6}$  稀释, 并设立空白对照, 病毒感染 48h 后加入杀稻瘟菌素进行抗性筛选, 计数克隆, 测定的病毒滴度为  $6 \times 10^8$  TU/L。

## 讨 论

人 *CDK2* 是一个细胞周期蛋白依赖性激酶, 其 cDNA 全长 897 个碱基, 编码 298 个氨基酸的蛋白质 *CDK2* 是细胞周期过程关键的限速步骤, *CDKs* 对细胞分裂周期起关键作用, 其中 *CDK2* 基因不仅控制早 S 期 DNA 合成的起始, 而且控制 G<sub>1</sub> 期进入 S 期<sup>[3]</sup>。周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 (*CDKIs*) 是抑制 *CDKs* 的核蛋白, *CDKI* 基因表达上调可引起细胞周期停滞, 迄今为止发现的 *CDKIs* 分为两类, *Cip/Kip* 家族: p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>; *INK4* 家族: p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup> 和 p19<sup>INK4d</sup>。各 *CDKIs* 的表达独立调节, 在控制细胞分裂周期中

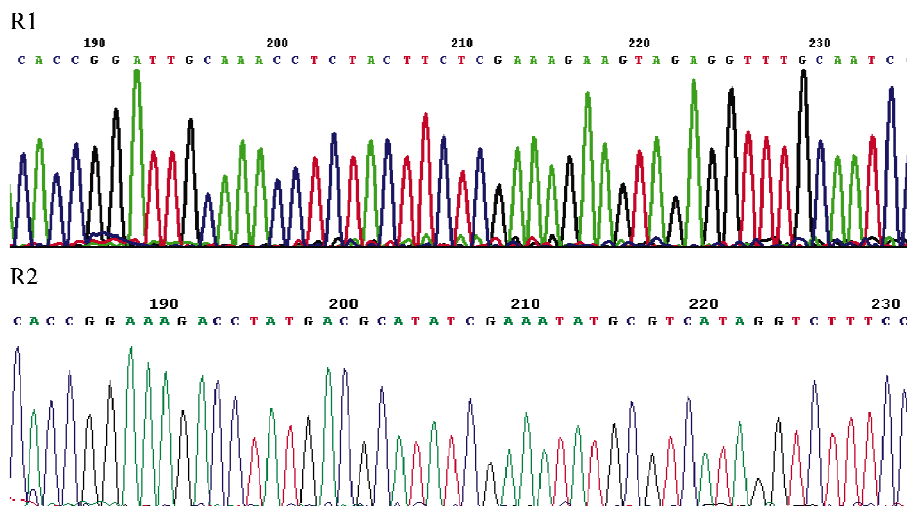


Fig 2 Sequencing results of two lentivirus interference vectors.

图2 两个慢病毒干扰载体的测序结果

各自独立发挥作用。p21<sup>Cip1</sup>通过抑制细胞周期蛋白 E/CDK2 复合物来抑制细胞周期,已有资料显示通过增加 p21<sup>Cip1</sup> 的表达间接降低 CDK2 水平,对类风湿性关节炎(RA)有很好的疗效,能明显阻止骨质破坏,减少致残,改善患者的生活质量,不良反应少。因此,选择抑制 CDK2 活性来抑制滑膜成纤维细胞(synovial fibroblast, SF)的活化增殖,通过抑制细胞分裂周期及多重调节,有可能最终达到 RA 基因治疗的目的<sup>[4,5]</sup>。

由于 CDK2 基因是调节人体细胞繁殖正常生理活动的因素之一,需要维持一定的水平保证细胞的正常新成代谢,因此,不宜采用基因敲除技术完全抑制 CDK2 基因的表达<sup>[6]</sup>。至于 RNAi 技术,采用化学合成 siRNA 分子、体外转录合成 siRNA 分子、RNase III 制备 siRNA 分子,通过直接显微注射或脂质体包裹注射的方式均存在 siRNA 分子在体外易被 RNase 降解、不易达到靶细胞、缺乏足够 siRNA 分子浓度、需要多次注射、成本高等缺点;人工合成或体外转录的 siRNA 分子在细胞内的作用是瞬时性的,不适合用于进行靶基因的表达受到抑制后细胞表型的长期变化观察,也不适于进行文库的筛选;质粒介导 RNAi 也存在局限性,如在不同的宿主细胞质粒的转染效率差别很大,转染效率低的细胞中,siRNA 不能有效表达,抑制基因表达的作用较弱,而且持续时间短;腺病毒载体既能转导分裂细胞,亦可转导静止细胞,转导效率也较高,但目的基因不整合至靶细胞基因组,仅能短暂表达;腺相关病毒(AAVs)能感染多种类型细胞,包括分裂期细胞和静止期细胞,它含有非编码的病毒序列,具有最小的免疫原性,但它整合目的基因是随机的,且代谢不是很稳定<sup>[7,8]</sup>。因此,能同时提供高效的基因转移、长期稳定的基因表达及具有生物安全性的病毒载体成为人们寻求的目标。

逆转录病毒载体虽可使目的基因整合至靶细胞基因组、实现稳定表达,但只能转导分裂细胞,主要用于基因治疗的离体方案;慢病毒载体是一种复制缺陷型逆转录病毒载体,以 HIV-1 为基础发展而得,具有许多优点,能够转染非分裂期细胞和分裂期细胞,而且病毒的遗传物质能够整合到宿主的基因组,慢病毒载体 RNAi 作用持久,免疫反应小,同时扩大了载体感染细胞的范围,适于体内基因治疗,因此慢病毒载体是很有前途的基因治疗载体<sup>[9-11]</sup>。在本研究中,我们以复制缺陷型慢病毒(HIV-1)作为载体,构建出 CDK2 的 RNAi 慢病毒载体,目前国内外尚未见类似报道。研究发现,慢病毒滴度达  $6 \times 10^8$  TU/L,且长期干扰目标基因的表达,因此,慢病毒载体有望成为基因转移的理想载体。CDK2 的

RNAi 慢病毒载体的构建将为 RA 的基因治疗带来希望。

【参 考 文 献】

[1] Scatizzi JC, Hutcheson J, Bickel E, et al. p21Cip1 is required for the development of monocytes and their response to serum transfer - induced arthritis [J]. Am J Pathol, 2006, 168(5):1531 - 1541.

[2] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, et al. Lentivirus - delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells [J]. RNA, 2003, 9(4):493 - 501.

[3] Tsai LH, Harlow E, Meyerson M. Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A and p33 - kinase [J]. Nature, 1991, 353(6340): 174 - 177.

[4] Giordano A, Bellacchio E, Bagella L, et al. Interaction between the Cdk2/cyclin A complex and a small molecule derived from the pRb2/p130 spacer domain: a theoretical model [J]. Cell Cycle, 2007, 6(21):2591 - 2593.

[5] Hampton T. Arthritis gene therapy trial resumes [J]. JAMA, 2008, 299(1):28.

[6] Manis JP. Knock out, knock in, knock down - genetically manipulated mice and the Nobel Prize [J]. N Engl J Med, 2007, 357(24):2426 - 2429.

[7] 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.

[8] Howard KA, Kjemis J. Polycation - based nanoparticle delivery for improved RNA interference therapeutics [J]. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7(12):1811 - 1822.

[9] Neschadim A, McCart JA, Keating A, et al. A roadmap to safe, efficient, and stable lentivirus - mediated gene therapy with hematopoietic cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13(12):1407 - 1416.

[10] 张 斌, 单志新, 林秋雄, 等. 人微 RNA-133a(miR-133a)重组腺病毒的构建和鉴定 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(7):1402 - 1407.

[11] 郭海霞, 李文益, 徐 令, 等. 慢病毒载体携带的 VEGF1 - shRNA 对 HL60 的体外杀伤作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(6):1053 - 1057.

(上接第 1245 页)

[2] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone - marrow cell transfer after myocardial infarction; the BOOST randomised controlled clinical trial [J]. Lancet, 2004, 364(9429):141 - 148.

[3] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts [J]. Nature, 2004, 428(6983):664 - 668.

[4] Nagya N, Kangawa K, Itoh T, et al. Transplantation of mes-

enchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy [J]. Circulation, 2005, 112(8):1128 - 1135.

[5] 陈 茂, 范忠才, 刘小菁, 等. 慢性心功能不全时经主动脉移植干细胞的可行性研究 [J]. 生物医学工程杂志, 2005, 22(2):280 - 282.

[6] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium [J]. Circulation, 2005, 111(17):2198 - 2202.