

pLKO.1-ZNF703 shRNA 质粒的构建与鉴定

卢晓晴¹, 李蕊¹, 陈浩明¹, 黎锡贤¹, 王艺¹, 石现丽^{2*} (广东药科大学 1. 生命科学与生物制药学院; 2. 基础医学院, 广东广州 510006)

摘要: 目的 构建 pLKO.1-ZNF703 shRNA 质粒靶向敲低 ZNF703。方法 根据人和鼠 ZNF703 基因序列中的外显子区在 RNA 干扰平台上 (broadinstitute.org) 设计 shRNA 的靶向序列, 并根据 pLKO.1 中 *Age* I 和 *EcoR* I 酶切位点序列设计并合成 ZNF703 shRNA 的引物; 对引物进行退火; 将 pLKO.1 质粒进行酶切、胶回收; 用 T4 酶进行连接、转化、涂板, 对阳性克隆菌落 PCR 鉴定和测序鉴定; 将构建好的质粒利用慢病毒包装并转染 HCT-116 细胞系, Q-PCR 检测 ZNF703 的敲低效率。结果 成功构建 pLKO.1-ZNF703 shRNA 质粒, 并且利用病毒包装体系构建 ZNF703 shRNA HCT-116 细胞系, RT-PCR 结果显示设计并构建的 pLKO.1-ZNF703 shRNA 质粒可用于有效敲低 ZNF703。结论 成功构建可用于有效敲低人或鼠源细胞系中 ZNF703 的 pLKO.1-ZNF703 shRNA 质粒。

关键词: ZNF703; pLKO.1 质粒; shRNA; HCT-116 细胞

中图分类号: R 34

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 02-0152-05

Construction and identification of pLKO.1-ZNF703 shRNA plasmid

LU Xiao-qing¹, LI Rui¹, CHEN Hao-ming¹, LI Xi-xian¹, WANG yi¹, SHI Xian-li^{2*} (School of Life Sciences and Biopharmaceutics; 2. School of Basic Medical Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To construct pLKO.1-ZNF703 shRNA plasmid for effectively knockdown ZNF703. Methods The targeting sequences of shRNA were designed on the RNA interference platform (broadinstitute.org) based on the exon region of human and mouse ZNF703 gene sequences in human and mice. The primers of ZNF703 shRNA were designed and synthesized according to the sequences of *Age* I and *EcoR* I enzyme cleavage sites in pLKO.1. The primers were then annealed. The pLKO.1 plasmid underwent enzyme digestion and gel purification. T4 DNA ligase was used for ligation, transformation and plate coating, and the positive colonies underwent PCR identification and sequencing analysis. The plasmid successfully constructed was packed with the lenti-virus system and transfected to HCT-116 cell lines. The Q-PCR was used to detect the knockdown efficiency of ZNF703. Results The pLKO.1-ZNF703 shRNA plasmid was successfully constructed, and the ZNF703 shRNA HCT-116 cell lines was constructed with virus packaging system. The RT-PCR results showed that the pLKO.1-ZNF703 shRNA plasmid designed and constructed can be used to effectively knock down ZNF703. Conclusion The pLKO.1-ZNF703 shRNA plasmid that can be used to effectively knock down ZNF703 in human and mouse cell lines has been successfully constructed.

Key words: ZNF703; pLKO.1 plasmid; shRNA; HCT-116 cells

锌指蛋白 (zinc finger protein, ZNF) 是一种含有锌指结构的转录因子, 广泛参与转录调控, 在胚胎发育等生命过程中发挥重要功能。锌指蛋白 703 (ZNF703), 是一种含有 C₂H₂ 型锌指的蛋白调控因子, 其基因位于人类 8 号染色体 (8p11.23) 上^[1]。在有关乳腺癌的研究中, 频繁观察到 8p11.23 区域的反复扩增, 引发

ZNF703 基因的表达量升高; 同时, 乳腺癌患者中的 ZNF703 表达量增多往往与患者生存期和预后情况呈负相关^[1-3]。国内研究人员也证实 ZNF703 在结肠癌、肺癌、卵巢癌等均出现过量表达的现象, 引起不良后果^[4-7]。因此研究 ZNF703 在肿瘤中的生物学功能, 可以为肿瘤治疗提供新的思路 and 策略。pLKO.1-

收稿日期: 2023-07-26

作者简介: 卢晓晴 (1996-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: meishu-square@163.com

通信作者: 石现丽 (1986-), 女, 博士, 讲师, E-mail: shixl@gdpu.edu.cn

TRC-shRNA 质粒(addgene:10878)体系可以在真核细胞中稳定过表达shRNA,进而依赖RNA干扰(RNA interfere, RNAi)过程促进靶基因mRNA水平的降解,目前已经广泛应用于真核细胞中稳定敲低靶基因的表达^[8]。本实验拟构建pLKO.1-ZNF703 shRNA质粒,有望敲低人或鼠源细胞系中的ZNF703基因,为研究ZNF703的生物学作用打下基础。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

人结肠癌细胞系HCT-116由广东药科大学生命科学院与生物制药学院免疫炎症实验室提供。pLKO.1-puro-TRC购买于addgene(plasmid#10878)。DNA Marker、rTaq酶(货号:RR901)购买于TaKaRa公司。T4连接酶(EL0013)及其Buffer购买于Thermo Scientific公司。核酸染色剂(BS354A)购买于biosharp公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ZNF703 shRNA双链寡核苷酸片段的制备 利用RNA干扰平台(broadinstitute.org)设计ZNF703的shRNA靶向序列,并根据pLKO.1-TRC cloning vector质粒构建要求设计并加上酶切的粘性末端合成ZNF703 shRNA F和R引物。在1.5 mL的EP管中配置50 μ L退火体系:5 μ L ZNF703F引物(20 μ mol/L)、5 μ L ZNF703R引物(20 μ mol/L)、5 μ L 10 $\times$ NEB buffer 1.1、35 μ L ddH₂O,放置沸水中自然冷却,得到ZNF703 shRNA双链寡核苷酸片段。

1.2.2 pLKO.1-TRC克隆质粒酶切回收 对pLKO.1-TRC克隆质粒(ddgene:10878)进行Age I和EcoR I连续双酶切,首先在1.5 mL离心管中配置Age I酶切体系:44 μ L pLKO.1-TRC质粒(2.83×10^5 mg/L)、5 μ L NEB Buffer 1.1、1 μ L Age I酶,置于37 $^{\circ}$ C水浴1 h;1 h后,继续行EcoR I酶切:继续加入5.5 μ L 0.5 mol/L NaCl、1 μ L EcoR I酶,37 $^{\circ}$ C水浴1 h;用0.8%琼脂糖凝胶分离酶切产物,取6 μ L DL10000 Marker、50 μ L酶切体系分别加入适量的核酸染料(BS354A, Biosharp)和6 $\times$ loading buffer,混匀上样,电泳,紫外凝胶成像仪照胶拍照,切取质粒双酶切的片段(7 026 bp)进行胶回收(天根, DP214)。

1.2.3 连接、转化 在1.5 mL离心管中配制连接体系:0.5 μ L pLKO.1-TRC酶切回收片段(7 026 bp)、1.5 μ L Oligo双链(退火产物)、1 μ L T4 Buffer、0.8 μ L T4 ligase、6.2 μ L ddH₂O,室温静置连接过夜。连接体系中

加入100 μ L DH5 α 感受态细胞,冰上放置15 min,42 $^{\circ}$ C水浴热击90 s,再冰浴10 min;加入200 μ L LB液体培养基,220 r/min,37 $^{\circ}$ C摇床中培养1 h;离心收集菌液(4 000 r/min,3 min);将菌液均匀涂布在含氨苄LB琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C,培养过夜。

1.2.4 单克隆PCR鉴定和测序鉴定 挑取阳性单克隆,加入500 μ L含氨苄LB培养基中,220 r/min 37 $^{\circ}$ C摇床中培养1 h,进行PCR鉴定:12.5 μ L rTaq聚合酶、3 μ L单克隆培养得到的菌液、1 μ L上游引物(hU6-F)、1 μ L下游引物(pLKO.1-shR)、7.5 μ L dd H₂O;PCR条件:95 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30个循环;用2%琼脂糖凝胶鉴定,在6 μ L DNA marker、25 μ L PCR体系中分别加入适量的核酸染料和6 $\times$ loading buffer,混匀上样,电泳,紫外凝胶成像仪拍照。

取上述菌落PCR鉴定阳性的菌液100 μ L直接送至生工生物工程公司进行双向测序。测序上游引物是hU6F,测序的下游引物是pLKO.1-shR引物。同时对剩余菌液进行甘油保菌(100 μ L菌液:100 μ L 40%甘油),-80 $^{\circ}$ C存放。

取10 μ L测序结果正确的菌液加入100 mL含有氨苄的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C 220 r/min摇床中培养过夜,利用天根无内毒素质粒大提试剂盒(DP117)抽提质粒,用于后续的病毒包装和ZNF703 shRNA HCT-116细胞系构建。

1.2.5 构建ZNF703 shRNA HCT-116细胞系 用含10%胎牛血清(FBS, Invitrogen, 10270106)和100 U/mL青霉素/链霉素(Invitrogen, 15140122)的DMEM(Invitrogen, 12800017)培养液,细胞培养箱(5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C)培养HEK293T和HCT-116细胞。将构建成功的pLKO.1-ZNF703 shRNA质粒和慢病毒包装质粒pSPAX2、pMD2.G一起利用脂质体(lipofectamine 2000, Invitrogen公司, 11668)转染293T细胞,生产慢病毒,分别在转染48 h和72 h收集病毒,进行浓缩。提前1 d将HCT-116细胞按 5×10^6 个接种到10 cm细胞培养皿中,培养过夜。将病毒、含有终质量浓度为8 mg/L聚凝胺的培养基一起加到HCT-116细胞中进行感染。感染24 h后,用含5 mg/L嘌呤霉素新鲜培养基进行筛选,筛选1周后,对活细胞进行RT-qPCR鉴定。

1.2.6 利用RT-qPCR验证ZNF703 shRNA HCT-116的敲低效率 提前1 d将对照和上述嘌呤霉素筛选阳性的HCT-116细胞分别种到六孔板中(3×10^5 个/孔,分别设置3个重复)。采用Trizol法提取总RNA:用1 $\times$ PBS洗2次后,用300 μ L/孔Trizol(Invitrogen,

15596-018) 裂解细胞,并用刮子收集细胞于 1.5 mL 离心管中;加入 60 μ L 氯仿,混匀,静置待分层后,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min;取上清,再加入与上清等体积的异丙醇,静置室温 10 min 后,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min;弃上清,用 70% 酒精清洗沉淀两次,用 30 μ L DEPC 水溶解沉淀(总 RNA);使用 nanodrop 对 RNA 溶液测定浓度后,取 1 μ g 总 RNA 用于反转录,使用 SYBR PrimeScriptTM RT-PCR 试剂盒(RR066A, Takara 公司)对总 RNA 进行反转录:总 RNA 1 μ g, 随机引物(Random 6 mers) 1 μ L, DTT 1 μ L, dNTP mixture 1 μ L, 5 $\times$ GoldenstarTM Buffer 4 μ L, RNase free ddH₂O 补齐体积至 20 μ L;PCR 设置 25 $^{\circ}$ C, 10 min; 50 $^{\circ}$ C, 15 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 min。之后进行荧光定量 PCR,配置 PCR 反应体系(20 μ L): 2 $\times$ TSINGKE[®] Master qPCR Mix 10 μ L, ROX I 0.4 μ L, RT-PCR 前引物 0.8 μ L, RT-PCR 后引物 0.8 μ L, CDNA 1 μ L, RNase free ddH₂O 补齐体积至 20 μ L;RT-PCR 仪参数设置为 95 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 60 $^{\circ}$ C, 10 s; 72 $^{\circ}$ C, 10 s(收集荧光);40 个循环。所用引物序列如下:ZNF703 前引物 5'-TTGGGCCTAAGCCGGTACCAC-3';ZNF703 后引物 5'-AGGCTGAAGCTAGTCTCTGTCCA-3';GAPDH 前引物 5'-CCATGT TTGTGATGGGTGTGAA CCA-3';GAPDH 后引物 5'-ACCAGTGGATGCAGG GATGATGTTC-3';实验设置 3 个重复。由 PCR 反应曲线得到阈值循环数(CT)值,以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 ZNF703 mRNA 的相对表达量。对结果进行统计学处理(Student's *t* 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZNF703 shRNA 靶向序列的设计

在 NCBI 上搜索到目的基因 ZNF703 的 DNA 序列,分析其中的外显子和内含子以及 CDS 序列,再利用 GFP Web Portal-Home (broadinstitute.org) 页中的 CRISPick 工具设计同时靶向人源与鼠源 ZNF703 shRNA 靶序列,通过比较不同的 shRNA 靶序列的特异性和切割效率,然后选择特异性和切割效率得分高的 shRNA 靶序列;再根据 pLKO.1-TRC cloning vector 的操作要求加上酶切的粘性末端得到 ZNF703 shRNA 的引物:前引物(F):5'-CCGGTATTTCGCCATACGC GC TGTATCTCGAGATACAGCGCGTATGGCGAATATTT TTG-3';后引物(R):5'-AATTCAAAAATATTCGCC ATACGCGCTGTATCTCGAGATACAGCGCGTATGG

CGAATA-3';将引物送至生工生物公司合成,并进行退火,得到可以直接用于连接的 ZNF703 shRNA 双链寡核苷酸片段。见图 1。

A Design the oligos to clone pLKO.1-shRNA plasmid:

Forward oligo: 5'CCGG- 21bp sense -CTCGAG- 21bp antisense -TTTTT 3'

Reverse oligo: 5'AATTCAAAA- 21bp sense -CTCGAG- 21bp antisense 3'

B 人源 ZNF703 Coding Sequence:

shRNA 靶序列
1-1711 1712-----1732 1733-----1773
TATTCGCCATACGCGCTGTAT

ZNF703 shRNA F: 5'-CCGGTATTTCGCCATACGCGCTGTATCTCGAGATACAGCGCGTATGGCGAATATTTT-3'

ZNF703 shRNA R: 3'-ATAAGCGGTATGCGCGACATAGAGCTCTATGTCGCGCATACCGCTTATAAAACCTAA-5'

A.pLKO.1-TRC 操作说明中的 shRNA 引物设计示范;B.设计的 ZNF703 shRNA 引物,选择的靶序列在人源 ZNF703 编码序列 1712~1732

图 1 ZNF703 shRNA 引物设计

2.2 pLKO.1-TRC 质粒酶切回收

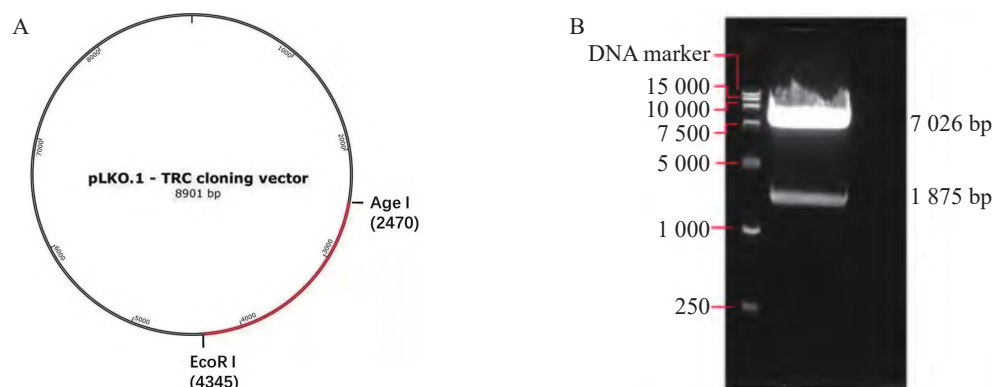
参照 pLKO.1-TRC 质粒的操作说明,pLKO.1-TRC 质粒(addgene:10878) 的构建需要使用 *EcoR* I 和 *Age* I 进行双酶切,考虑到 *Age* I 酶和 *EcoR* I 酶最适 NaCl 浓度要求不一样,我们采用顺序双酶切的方法。先用 *Age* I 酶进行酶切,酶切后及时增加 NaCl 浓度,再进行 *EcoR* I 酶切,最后进行胶回收。pLKO.1-shRNA 质粒全长 8 901 bp, *Age* I 酶切位点位于质粒的第 2 470 个核苷酸处, *EcoR* I 酶切位点位于质粒的第 4 345 个核苷酸处,双酶切将会产生 2 个条带 1 个为 1 875 bp,另 1 个为 7 026 bp(回收片段)。pLKO.1-TRC 质粒双酶切后,在 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定,如图 2,可以清晰的见到 2 个条带(1 875 bp 和 7 026 bp),对 70 26 bp 的条带进行切胶回收。

2.3 连接、转化、涂板

用切胶回收的 pLKO.1 骨架(7 026 bp) 和退火得到的 ZNF703shRNA 双链寡核苷酸片段通过 T4 连接酶连接并转化 DH5 α 感受态细胞,涂板于 LB 培养基、培养过夜,得到单菌落克隆图,见图 3。

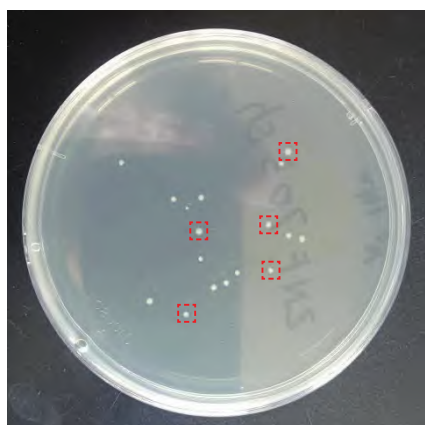
2.4 阳性克隆 PCR 扩增电泳鉴定

根据构建质粒 pLKO.1-ZNF703 shRNA 的 ZNF703 shRNA 序列的上、下游设计菌落 PCR 的引物[hU6-F: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCTTCA-3'; pLKO.1-shR: 5'-TGGATGAATACTGCCATT-3'(图 4A)];用 hU6-F 和 pLKO.1-shR 引物对 pLKO.1-ZNF703 shRNA 质粒扩增将得到 342 bp 条带。随机挑取 5 个阳性克隆,进行菌落 PCR 扩增,用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示只有其中 1 号克隆在 342 bp 处出现阳性条带(图 4B),初步确认 1 号阳性克隆的大肠杆菌中 pLKO.1-ZNF703 shRNA。



A. pLKO.1-TRC质粒中 *EcoR* I 和 *Age* I 酶切位点说明; B. pLKO.1-TRC 质粒用 *EcoR* I 和 *Age* I 酶双酶切后得到 7 026 bp 和 1 875 bp 的条带

图2 pLKO.1-TRC 的 *EcoR* I 和 *Age* I 双酶切



pLKO.1-TRC (7 026 bp) 骨架和 ZNF703 shRNA 双链寡核苷酸片段连接, 转化后得到的大肠杆菌阳性克隆

图3 单菌落克隆图

2.5 阳性克隆测序鉴定

将上述阳性 1 号克隆进行过夜培养, 提取质粒, 并将质粒送至生工生物公司进行测序鉴定, 利用 hU6-F 和 pLKO.1-shR 作为引物进行双向测序 (引物位置如图 5)。测序结果显示 ZNF703 shRNA 靶序列已经成功插入了 pLKO.1-TRC 质粒的 *Age* I 和 *EcoR* I 酶切位点中间, 表

明成功构建了 pLKO.1-ZNF703 shRNA 重组质粒。

2.6 利用 pLKO.1-ZNF703 shRNA 重组质粒, 构建 ZNF703 敲低的 HCT-116 细胞系

利用慢病毒包装体系包装 pLKO.1-ZNF703 shRNA 重组质粒, 并感染 HCT-116 细胞, 再利用嘌呤霉素进行筛选, 构建 ZNF703 敲低的 HCT-116 细胞系, 并利用 RT-q PCR 检测敲低效率。RT-PCR 结果显示, pLKO.1-ZNF703 shRNA 重组质粒能成功敲低 HCT-116 细胞内 65% 左右的 ZNF703。结果表明, 所构建的 pLKO.1-ZNF703 shRNA 重组质粒可以有效敲低 ZNF703。见图 6。

3 讨论

ZNF703 高表达于结肠癌、肺癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中, 但其目前在肿瘤组织中的生物学功能尚未明了。shRNA (short hairpin RNA) 也称为短发夹 RNA, 在细胞中可以通过其茎环结构被 Drosha 酶、核糖核酸酶等加工产生小干扰 RNA (small interfering RNA)。小干扰 RNA 可以特异性地结合靶标 mRNA,



A. pLKO.1-ZNF703 shRNA 菌落 PCR 的引物设计和 PCR 产物的预期大小 (342 bp); B. 挑选 5 个阳性克隆进行克隆 PCR 验证, 电泳结果显示只有 1 个克隆 (1 号克隆) 菌落 PCR 验证出现阳性条带 (342 bp), 初步判定 1 号菌落为 pLKO.1-ZNF703 shRNA 的阳性菌落

图4 pLKO.1-ZNF703 shRNA 菌落鉴定

ZNF703 shRNA:

CCGGTATTCGCCATACGCGCTGTATCTCGAGATACAGCGCGTATGGCGAATATTTTG

G A C G A A A C C C G G T T T C G C C A T A C G C G C T G T A T C T C G A G A T A C A G C G C G T A T G G C G A A T A T T T T T G

210 220 230 240 250 260 270

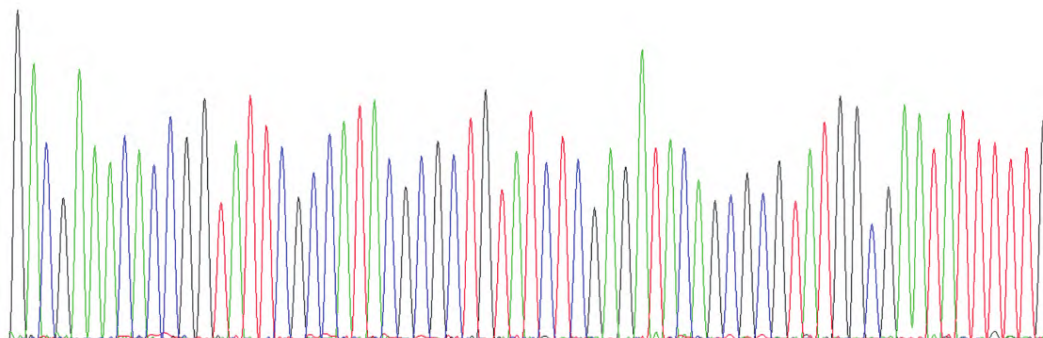
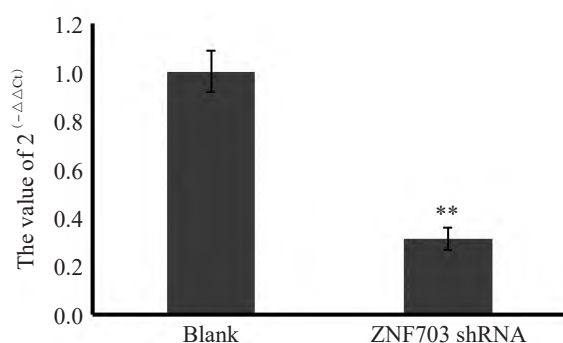


图5 pLKO.1-ZNF703 shRNA的质粒测序

图6 构建的ZNF703 shRNA HCT-116细胞系中ZNF703的表达水平 (** $P < 0.01$)

从而引起mRNA的降解,进而敲低靶基因的表达。pLKO.1-TRC-shRNA是一个非常成熟、广泛用于真核细胞中表达靶基因特异性shRNA的质粒载体,构建成功的质粒可以用于直接包装慢病毒、感染真核细胞、构建稳定敲低的细胞系。因此本研究通过成功构建pLKO.1-ZNF703 shRNA质粒,有效敲低人或鼠源细胞系中的ZNF703基因,为研究ZNF703在肿瘤中的生物学功能打下基础。

参考文献:

[1] SIRCOULOMB F, NICOLAS N, FERRARI A, et al. ZNF703 gene amplification at 8p12 specifies luminal B breast cancer[J].

EMBO Mol Med, 2011, 3(3): 153-166.

[2] HOLLAND D G, BURLEIGH A, GIT A, et al. ZNF703 is a common luminal B breast cancer oncogene that differentially regulates luminal and basal progenitors in human mammary epithelium[J]. EMBO Mol Med, 2011, 3(3): 167-180.

[3] REYNISDOTTIR I, ARASON A, EINARSDOTTIR B O, et al. High expression of ZNF703 independent of amplification indicates worse prognosis in patients with luminal B breast cancer[J]. Cancer Med, 2013, 2(4): 437-446.

[4] YANG G, MA F, ZHONG M, et al. ZNF703 acts as an oncogene that promotes progression in gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 31(4): 1877-1882.

[5] YANG H, JIANG W Q, CAO Y, et al. Elevated ZNF703 protein expression is an independent unfavorable prognostic factor for survival of the patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. Dis Markers, 2015, 2015: 640263.

[6] 毕丽红, 马锋, 杨公利, 等. 锌指蛋白703的研究进展[J]. 现代消化及介入诊疗, 2014, 19(2): 97-100.

[7] 王爽汪, 李潇, 刘鸥萱, 等. 锌指蛋白703在卵巢上皮性浆液性肿瘤中的表达及临床意义[J]. 中国医科大学学报, 2022, 51(1): 1-5.

[8] MOFFAT J, GRUENEBERG D A, YANG X, et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen [J]. Cell, 2006, 124(6): 1283-1298.

(责任编辑: 刘建滔)