

·基础研究·

# 构建MS2-RIP方法用于鉴定lncRNA DANCR在肿瘤细胞中的相互作用分子

巫孟师, 熊敏敏, 彭丹, 韩雪, 钟小敏

(中山大学中山医学院干细胞与组织工程研究中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】为了探讨lncRNA DANCR在肿瘤细胞中的作用机制,本研究拟构建一种新的MS2-RIP方法用于鉴定DANCR的相互作用分子。【方法】利用MS2噬菌体衣壳蛋白可与噬菌体复制酶编码基因5'端一段由19个碱基组成的RNA茎环结构序列,即MS2结合位点(MS2 Binding Site, MS2 BS)高效结合的特点,构建串联表达MS2 BS和DANCR的过量表达质粒,通过MS2蛋白与MS2 BS的亲合作用,使DANCR得到富集,并且同步捕获与DANCR相互作用的分子,用于进一步分析鉴定。【结果】成功构建串联表达MS2 BS和DANCR的过量表达质粒用于MS2-RIP实验,该实验可显著富集DANCR以及作为阳性对照的DANCR结合蛋白EZH2。【结论】基于MS2蛋白与MS2结合位点的高效结合特性,我们针对lncRNA DANCR建立了MS2-RIP方法。该方法可有效富集DANCR以及与DANCR结合的生物活性分子,为研究DANCR的作用机制提供一种新的技术手段。

**关键词:** MS2; RNA结合蛋白免疫沉淀; 长链非编码RNA; DANCR

**中图分类号:** R31      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2021)01-0024-09

## MS2-RIP Assay for Identifying the Interaction Partners of lncRNA DANCR in Tumor Cells

WU Meng-shi, XIONG Min-min, PENG Dan, HAN Xue, ZHONG Xiao-min

(Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: ZHONG Xiao-min; E-mail: zhongxm23@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 To explore the functional mechanism of lncRNA DANCR in tumor cells, a MS2-RIP method was designed and conducted to identify the molecules that interact with DANCR. 【Methods】 The specific binding of MS2 bacteriophage capsid protein and MS2 binding site (MS2 BS), a 19-base RNA stem-loop structure located at the 5' terminus of the MS2 bacteriophage replicase gene, was applied to construct a plasmid for tandemly overexpressing DANCR and MS2 BS. DANCR was enriched and its associated molecules were further identified and analyzed. 【Results】 The plasmid for tandemly overexpressing DANCR and MS2 BS was successfully constructed for the MS2-RIP experiment, which could significantly enrich DANCR and DANCR-binding protein EZH2 as a positive control. 【Conclusion】 Based on the high affinity binding between MS2 protein and MS2 BS, the MS2-RIP method was established for lncRNA DANCR, which could effectively capture DANCR as well as its associated molecules, providing a new technology for studying the functional mechanism of DANCR.

**Key words:** MS2; RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP); long non-coding RNA (lncRNA); DANCR

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(1): 24-32]

收稿日期: 2020-10-13

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFA0105501); 广东省科技计划项目(2015A020212019)

作者简介: 巫孟师, 在读硕士研究生, 研究方向: 干细胞与再生医学, E-mail: wwArmy@outlook.com; 钟小敏, 通信作者, 副教授, 博士生导师, E-mail: zhongxm23@mail.sysu.edu.cn

DANCR(differentiation antagonizing non-protein coding RNA)是一个最初在人表皮祖细胞中被发现具有维持细胞未分化状态功能的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)分子<sup>[1]</sup>。近年来的研究显示,DANCR在多种肿瘤中存在异常高表达的现象,提示其在肿瘤的发生和发展中具有重要作用<sup>[2-7]</sup>。虽然DANCR在肿瘤发生发展中的重要功能逐渐被揭示,但是对于DANCR作为癌基因(oncogene)的作用机制尚未完全探讨清楚。研究结果表明,lncRNA发挥功能的主要方式之一是直接结合具有调控功能的蛋白质或核酸分子<sup>[8-11]</sup>。为了阐明DANCR在肿瘤细胞中的作用机理,本研究致力于构建一种基于MS2 RNA结合蛋白的特性,用于鉴定与DANCR相互作用的生物活性分子的新方法。MS2 RNA结合蛋白实质为RNA型噬菌体MS2外表面的衣壳蛋白,通过特异性结合噬菌体复制酶编码基因5'端由19个核苷酸组成的RNA茎环结构,即MS2结合位点(MS2 Binding Site, MS2 BS),起着保护噬菌体核酸以及抑制翻译的作用<sup>[12]</sup>。本研究计划构建表达Flag-MS2-EGFP融合蛋白以及串联表达DANCR-MS2 BS的两种载体,使用Flag抗体对MS2 RNA结合蛋白进行免疫沉淀,同时对DANCR-MS2 BS进行富集,并进一步使用已被证明为DANCR相互作用分子的EZH2蛋白作为阳性对照<sup>[11]</sup>,验证MS2-RIP方法的效果。成功构建MS2-RIP方法,对于探讨DANCR的工作机理具有重要的推动作用,也可以为鉴定其他lncRNA的相互作用分子提供技术基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株、菌株及质粒

人结肠癌HCT116细胞(购自中国科学院细胞库)及大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ (购于天根生化科技有限公司)。pPyCAGIP(由Prof. Austin Smith from University of Cambridge赠予),pSL-MS2-12X和pMS2-GFP质粒(购于Addgene公司)。

### 1.2 试剂

DNA纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒(购于天根生化科技有限公司);限制性核酸内切酶*Bgl* II、*Sac* I、*EcoR* I和*Xho* I(购于New England BioLabs公司);Infusion kit(购自Takara公司);Mil-

lipore RIP试剂盒(购自Millipore公司);RNA提取试剂TRI-Reagent(购自MRC公司);逆转录试剂盒(购自近岸蛋白质科技有限公司);TGXStain-Free丙烯酰胺免染制胶试剂盒(购自Bio-Rad公司);荧光定量PCR试剂(购于Roche公司);EZH2抗体试剂(购自Cell Signaling Technology公司);ViaFect转染试剂(购于Promega公司);ANTI-FLAG M2 Magnetic Beads试剂盒(购自Sigma公司);RNA pulldown试剂盒(购自ThermoFisher公司);IP Lysis buffer(购自ThermoFisher公司)。本文所用引物及探针由生工生物工程有限公司合成,引物序列见表1,探针序列见表2。

### 1.3 细胞培养

HCT116细胞使用DMEM高糖培养基(Gibco,美国),添加100 mL/L胎牛血清(PAN,德国)及双抗(100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素;Hyclone,美国),置于37 °C、体积分数5% CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养。

### 1.4 Flag-MS2-EGFP/pPyCAGIP质粒构建

以pMS2-GFP质粒为模板,用MS2-GFP-F和MS2-GFP-R引物扩增MS2-GFP开放阅读框。扩增条件为95 °C预变性5 min;95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,扩增35个循环;最后72 °C延伸5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,切胶回收电泳产物。然后用限制性内切酶*Bgl* II和*Sac* I酶切载体Flag/pPyCAGIP,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,切胶回收电泳产物。将回收的MS2-GFP片段和线性载体用Infusion酶连接,连接产物转化至感受态细胞DH5 $\alpha$ 中,使用氨苄抗性的LB平板筛选阳性克隆。挑取单克隆摇菌扩增,提质粒,送生工生物测序。测序正确的菌液转移至30 mL含氨苄抗性的液体LB培养基中摇菌过夜,取0.5 mL菌液与0.5 mL已灭菌的30%甘油混合保存于-80 °C,剩余菌液使用质粒小提试剂盒进行质粒提取。

### 1.5 DANCR-MS2 BS(12X)/pPyCAGIP质粒构建

以pSL-MS2-12X质粒为模板,用MS2(12X)-F和MS2(12X)-DANCR-R引物扩增MS2 BS(12X)片段。扩增条件为95 °C预变性5 min;95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,扩增35个循环;最后72 °C延伸5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,切胶回收电泳产物。以HCT116细胞提取的RNA进行逆转录后的cDNA为模板,用MS2(12X)-

表1 载体构建引物

Table 1 Primers for constructing vectors

Name	Sequence(5'→3')
MS2-GFP-F	CAAGGGTACCAGATCTCGTTAAAATGGCTTCTAACTTTACTCAG
MS2-GFP-R	CGAGGCTGATCAGCGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
MS2 (12X)-F	CGCTAGATCTGAATTCGGGGCCCTATATATGGATCC
MS2 (12X)-DANCR-R	ACTCTGGGCAAGGGCATATCGATCGCGCGCAGATCT
MS2 (12X)-DANCR-F	TGCGCGGATCGATATGCCCTTGCCAGAGTCTTCCCGGGATTGGC
DANCR-R1	GCTTAATTAACTCGAGTCAGGCCAAGTAAGTTTATTAACCTGCC

表2 RNA pulldown的探针序列

Table 2 Probe sequences for RNA pulldown

Name	Sequence
ctrl1	CCTTCAGTTACAATAGGAAAGTGCCTCTA-ATAAGG
DAN-CR1	CCTTATTAGAGGCACTTTCCTATTGTAACT-GAAGG
ctrl2	GACCTTGAGCTCCAGGAGTTCGTCTCTTAC-GTCTG
DAN-CR2	CAGACGTAAGAGACGAACCTCCTGGAGCT-CAAGGTC

DANCR-F和DANCR-R1引物扩增DANCR片段,扩增条件为95℃预变性5 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,扩增35个循环;最后72℃延伸5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,切胶回收电泳产物。然后用限制性内切酶*EcoR* I和*Xho* I酶切载体pPyCAGIP,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,切胶回收电泳产物。将回收的MS2 BS(12X)片段、DANCR片段和线性载体用Infusion酶连接,连接产物转化至感受态细胞DH5 $\alpha$ 中,使用氨苄抗性的LB平板筛选阳性克隆。挑取单克隆摇菌扩增,提质粒,送生工生物测序。测序正确的菌液转移至30 mL含氨苄抗性的液体LB培养基中摇菌过夜,取0.5 mL菌液与0.5 mL已灭菌的30%甘油混合保存于-80℃,剩余菌液使用质粒小提试剂盒进行质粒提取。

### 1.6 质粒转染与RNA结合蛋白免疫沉淀

接种50%密度的HCT116细胞于100 mm细胞培养皿,于含体积分数5% CO<sub>2</sub>的37℃培养箱培养24 h后进行转染。转染试剂( $\mu$ L)与转染质粒( $\mu$ g)

的比例是3:1,用1 mL Opti-MEM稀释质粒。质粒用量和组合分别为12  $\mu$ g Flag-MS2-EGFP/pPyCAGIP和8  $\mu$ g DANCR-MS2 BS(12 $\times$ )/pPyCAGIP、12  $\mu$ g Flag-MS2-EGFP/pPyCAGIP和8  $\mu$ g DANCR/pPyCAGIP、12  $\mu$ g pPyCAGIP和8  $\mu$ g DANCR-MS2 BS(12 $\times$ )/pPyCAGIP。室温放置5 min,分别加入60  $\mu$ L ViaFect转染试剂,轻轻混匀室温放置15 min。将细胞培养皿中的完全培养基换成无血清的DMEM高糖培养基,然后将混合液加入到细胞培养皿中。24 h后更换为新鲜完全培养基,转染48 h后用2.5 g/L胰酶消化后,用细胞计数仪确定细胞数量。取 $1\times 10^7$ 个细胞至1.5 mL干净EP管中,用预冷的PBS洗两遍后加入50  $\mu$ L lysis buffer裂解细胞,放置于-80℃过夜。将细胞裂解液从-80℃取出于冰上解冻,每个样品各取出5  $\mu$ L input(RNA)和5  $\mu$ L input(蛋白),然后分别加入430  $\mu$ L wash buffer,17.5  $\mu$ L 0.5 mol/L EDTA,2.5  $\mu$ L RNase Inhibitor,吹打混匀,于4℃10 000  $\times g$ 离心10 min。取30  $\mu$ L ANTI-FLAG M2 Magnetic Beads悬液,用RIP kit里的wash buffer洗两遍。取离心后的上清于准备好的磁珠中,4℃孵育过夜。用wash buffer洗磁珠5次,然后将磁珠分成两份,分别用于RNA和蛋白质提取。

### 1.7 RNA pulldown

使用Primer3网站设计探针序列,并由生工生物合成5'端带生物素标记的探针。取1 pmol探针和50  $\mu$ L Pierce Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads常温结合30 min。取 $1\times 10^7$ 个HCT116细胞至1.5 mL干净EP管中,加入120  $\mu$ L IP Lysis Buffer裂解细胞,冰上放置5 min后,加入20  $\mu$ L Protein-RNA Binding Buffer(10 $\times$ )、60  $\mu$ L 50%甘油,吹打混匀,于4℃10 000  $\times g$ 离心10 min。

分别取20 $\mu$ L上清作为RNA input和总蛋白input,将剩下的上清加入结合探针的磁珠中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。用1 $\times$  wash buffer洗磁珠2次,然后将磁珠分成两份,分别用于RNA和蛋白质提取。

### 1.8 实时荧光定量PCR分析

加入500 $\mu$ L Trizol到用于RNA提取的磁珠中,颠倒混匀,室温放置15 min,加入200 $\mu$ L DEPC水,颠倒混匀后室温放置15 min,4 $^{\circ}$ C,12 000 $\times$ g离心15 min,取600 $\mu$ L上清至新的1.5 mL离心管中,加入等体积的异丙醇和5 $\mu$ g糖原后充分混匀,室温放置10 min,4 $^{\circ}$ C,10 000 $\times$ g离心15 min,管底可见白色沉淀。弃上清,每管加入400 $\mu$ L 75%乙醇漂洗,4 min,5 000 $\times$ g,弃上清后,重复一遍漂洗过程,晾干RNA沉淀至边缘透明时加入适量DEPC水溶解,提取的RNA全部按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录。设计实时荧光定量PCR引物,q-DANCR-F:GCCACTATGTAGCGGGTTTC;q-DANCR-R:GCCTGTAGTTGTCAACCTGC;q-U1-F:TTTCCCAGGGCGAGGCTTAT;q-U1-R:TGCAGTCGAGTTTCCCACATT,荧光定量PCR每孔体系为:cDNA 1 $\mu$ L、SYBR 5 $\mu$ L、引物2 $\mu$ L、水2 $\mu$ L,总体系10 $\mu$ L,荧光定量PCR仪检测,数据分析。

### 1.9 蛋白免疫印迹

加入适量的1 $\times$  loading buffer到用于蛋白提取的磁珠中,95 $^{\circ}$ C处理10 min,于磁力架上取含蛋白的上清至新的EP管中备用。Western blot 10%预混胶配制,①分离胶:3 mL Resolver A,3 mL Resolver B,30 $\mu$ L 10% APS (Ammonium persulfate,过硫酸铵),3 $\mu$ L TEMED。②浓缩胶:1 mL Stacker A,1 mL Stacker B,10 $\mu$ L 10% APS (Ammonium persulfate,过硫酸铵),2 $\mu$ L TEMED。取准备好的样品进行垂直电泳,200 V,30 min。电泳结束后,将分离的蛋白质转膜到0.45 $\mu$ m聚偏二氟乙烯(PVDF)上,200 mA 60 min。转膜结束后,取出PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭1 h。用5% BSA配制EZH2一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。取出室温摇床上再继续孵育30 min后,用TBS/T洗3次,5 min/次;加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育1 h。用TBS/T洗3次,5 min/次,加入化学发光底物ECL,使用Bio-Rad成像系统检测条带。

### 1.10 统计学分析

统计分析采用SPSS 26.0完成。两组计量资料的比较采用独立样本 $t$ 检验,多组计量资料的比

较进行单因素方差分析,方差分析有统计学意义时多重比较采用LSD、Dunnett's  $t$ 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

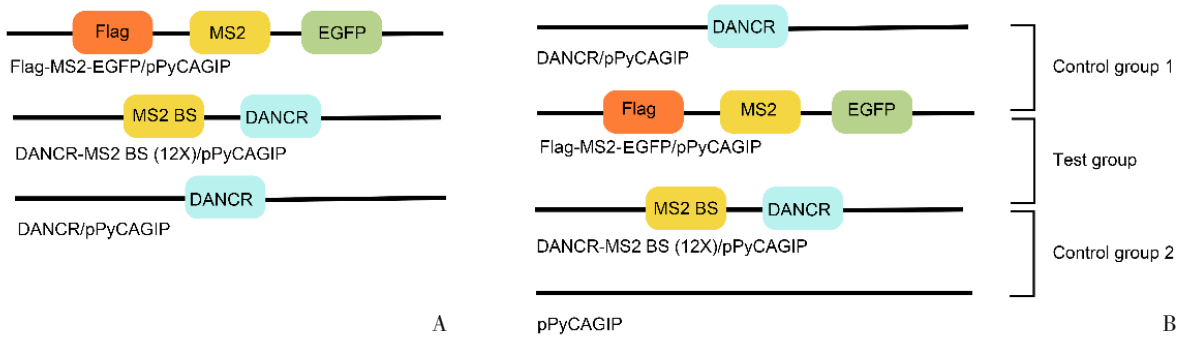
### 2.1 构建重组载体Flag-MS2-EGFP/pPyCAGIP和DANCR-MS2 BS(12 $\times$ )/pPyCAGIP

本研究构建了两个重组载体Flag-MS2-EGFP/pPyCAGIP和DANCR-MS2 BS(12 $\times$ )/pPyCAGIP,用于下游MS2-RIP实验。Flag-MS2-EGFP/pPyCAGIP载体用于外源过量表达带有Flag标签和GFP荧光蛋白的MS2 RNA结合蛋白。Flag标签由于其氨基酸序列较短,一般不会干扰融合蛋白(本研究中为MS2蛋白)的天然构象。另外,耦联高特异性Flag抗体的磁珠,较容易从商品化渠道购买获得,可保证不同批次的RIP实验结果的稳定性。因此,我们在构建重组载体时,引入Flag标签至MS2蛋白的N端,用于高效捕获MS2蛋白。另外,MS2蛋白的C端还带有融合表达的EGFP蛋白,便于直接观察融合蛋白Flag-MS2-EGFP的表达效率。DANCR-MS2 BS(12 $\times$ )/pPyCAGIP载体用于过量表达5'端带有MS2 BS(12个拷贝)的重组型DANCR转录本。带有MS2 BS的DANCR,可有效地被MS2蛋白识别及捕获,并且不受DANCR本身序列性质的影响。该策略的另一个优势是,MS2蛋白的作用位点独立于DANCR转录本,因此不会干扰其他与DANCR相互作用的分子的结合。另外,我们还构建了不带有MS2 BS的DANCR重组载体DANCR/pPyCAGIP作为对照,用于评估系统性的非特异结合背景。以上质粒的构造见示意图1。

### 2.2 检测重组载体的表达效率

将下列三组质粒分别转染HCT116细胞:(Test group) Flag-MS2-EGFP/pPyCAGIP和DANCR-MS2 BS(12 $\times$ )/pPyCAGIP;(Control group 1) Flag-MS2-EGFP/pPyCAGIP和DANCR/pPyCAGIP;(Control group 2) pPyCAGIP和DANCR-MS2 BS(12 $\times$ )/pPyCAGIP。转染后48h,检测细胞荧光强度和DANCR的表达水平。转染后的HCT116细胞荧光和明场合成图如图所示(图2A),Test group和Control group 1的荧光强度相近,绿色荧光蛋白成功表达。随后,提取HCT116细胞的总RNA检测DANCR的过表达水平。结果如图2B所示,Test group, Control group 1





A: Diagram of Flag-MS2-EGFP/ pPyCAGIP, DANCR-MS2 BS (12X)/ pPyCAGIP and DANCR/ pPyCAGIP. B: Plasmid combinations of Test group, Control group 1 and Control group 2.

图1 质粒构建及实验分组示意图

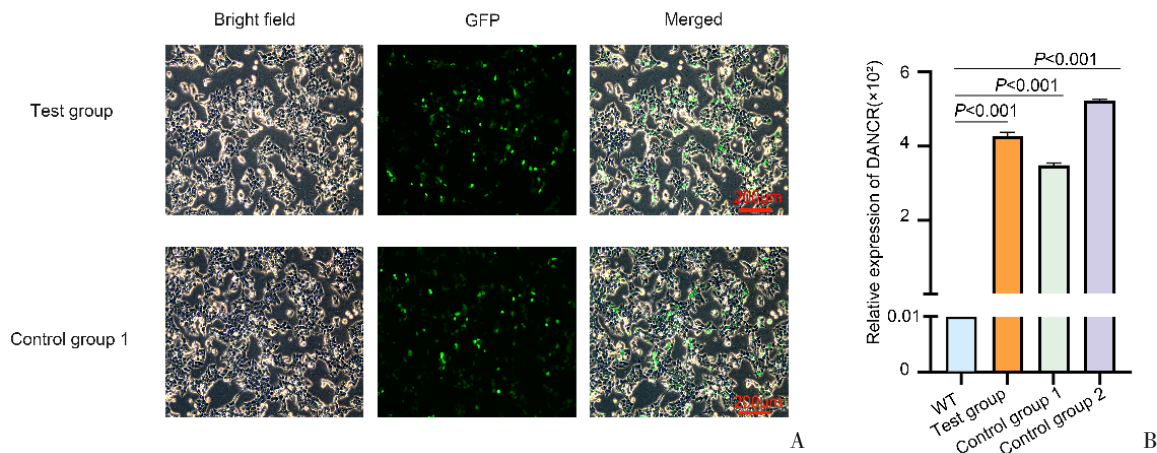
Fig.1 Diagram of plasmid construction and plasmid combinations of groups

和 Control group 2 中, DANCR 的表达水平分别为 WT HCT116 细胞的 ( $427.35 \pm 10.13$ ) 倍, ( $348.60 \pm 6.14$ ) 倍, 以及 ( $523.37 \pm 3.76$ ) 倍。(4 组样本量分别为 3, 做单因素方差分析  $F=4019.50, P<0.001$ ; Dunnett's  $t$  检验中, Test group 与 WT 相比较,  $P<0.001$ ; Control group 1 与 WT 相比较,  $P<0.001$ ; Control group 2 与 WT 相比较,  $P<0.001$ )

### 2.3 MS2-RIP 方法的富集效果

如上所述, 将 Test group, Control group 1 和 Control group 2 三组质粒分别转染 HCT116 细胞。48 h 后收集  $1 \times 10^7$  细胞进行 MS2-RIP 实验(图 3)。从 MS2-RIP 获得的免疫沉淀复合物提取 RNA, 用于检测 DANCR 的富集效果, 并以 U1 作为参照。荧光定量 PCR 结果如图 4A 所示, 与 Control group 1、2

比较, Test group 中 DANCR 有明显的富集效果。Test group 富集的 DANCR 占相应 input 的比例为 ( $0.0835 \pm 0.0048$ )%, 而两个 Control group 分别为 ( $0.0077 \pm 0.0072$ )% 及 ( $0.0043 \pm 0.0034$ )%, Test group 与两组 Control group 的差异都具有统计意义(3 组样本量分别为 3, 单因素方差分析结果显示,  $F=203.665$ , 3 组 DANCR 的富集水平有差异; LSD 检验结果表明, Test group 与 Control group 1 相比较,  $P<0.001$ ; Test group 与 Control group 2 相比较,  $P<0.001$ ; Control group 1 与 Control group 2 相比较,  $P=0.475$ ; 图 4A, 左)。然而, Test group 对非编码 RNA U1 的富集量为 ( $0.0819 \pm 0.0218$ )%, 与两个 Control group 的富集量 ( $0.0875 \pm 0.0106$ )% 和 ( $0.0600 \pm 0.0029$ )% 相比, 差异没有统计意义(3 组



A: Green fluorescence of HCT116 post-transfection with the indicated plasmid combinations. B: The expression level of DANCR in transfected HCT116 cells.

图2 重组质粒表达效率检测

Fig.2 Expression efficiency of recombinant vectors

样本量分别为3,单因素方差分析结果显示, $F=3.17, P=0.115$ ;图4A,中)。同时,我们用Western blot方法检测了免疫沉淀复合物中与DANCR相结合的蛋白质,即阳性对照EZH2蛋白。如图4A结果显示,Test group的免疫沉淀样品可显著检测到EZH2蛋白,而Control group 1和Control group 2中EZH2信号均为阴性(图4A,右)。

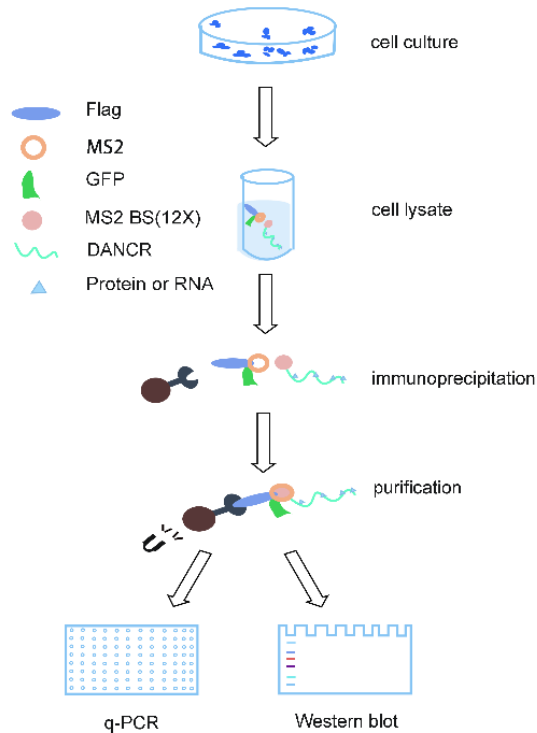


图3 MS2-RIP流程示意图

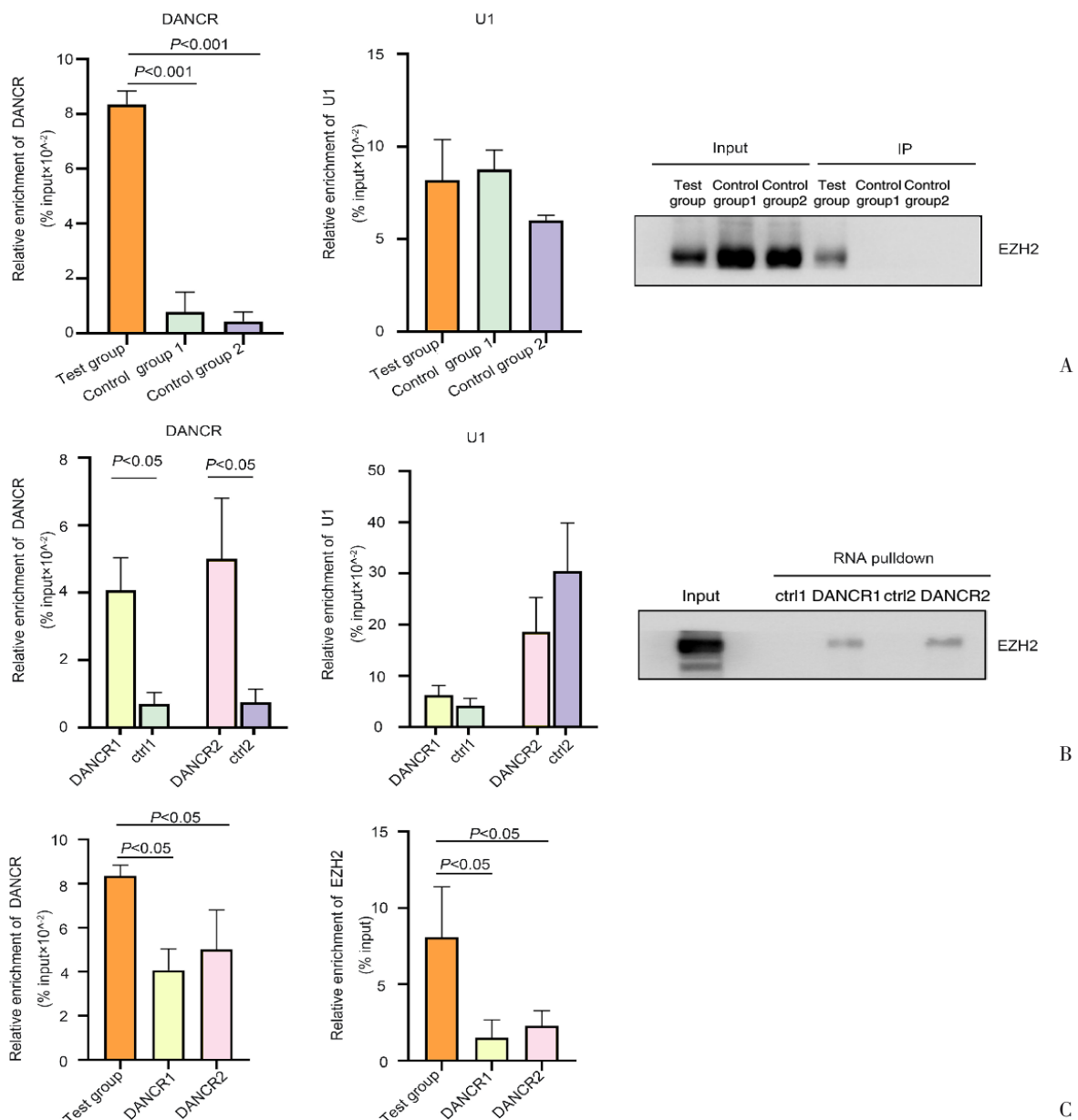
Fig.3 A schematic diagram of the MS2-RIP strategy

为了更好地验证MS2-RIP方法的有效性,我们还与广泛使用的RNA pulldown方法进行了比较。RNA pulldown方法,通过设计两种不同的可与DANCR的序列进行碱基反向互补的DNA探针(DANCR1和DANCR2),达到对DANCR及其相互作用分子的捕获。如图4B所示,两种探针均对DANCR有一定的富集效果,DANCR1为 $(0.0406 \pm 0.0096)\%$ ,DANCR2为 $(0.0501 \pm 0.0178)\%$ ,相应的对照ctrl1和ctrl2分别为 $(0.0070 \pm 0.0034)\%$ 及 $(0.0076 \pm 0.0038)\%$ 。DANCR1与ctrl1、DANCR与ctrl2的差异都具有统计意义(ctrl1和DANCR1的样本量均为6,独立样本 $t$ 检验结果显示, $t=8.033, P<0.05$ ,显示两组DANCR的富集水平有差异;ctrl2和DANCR2的样本量均为3,独立样本 $t$ 检验结果显示, $t=-4.022, P<0.05$ ,显示两组DANCR的富集水

平有差异;图4B,左)。DANCR1、DANCR2对非编码RNA U1的富集量为分别为 $(0.0413 \pm 0.0146)\%$ 和 $(0.186 \pm 0.0671)\%$ ,与ctrl1、ctrl2的富集量 $(0.0628 \pm 0.0186)\%$ 和 $(0.305 \pm 0.094)\%$ 分别相比,差异没有统计意义(ctrl1和DANCR1的样本量均为6,ctrl1和DANCR1的独立样本 $t$ 检验结果显示, $t=-2.22, P=0.51$ ;ctrl2和DANCR2的样本量均为3,ctrl2和DANCR2的独立样本 $t$ 检验结果显示, $t=1.78, P=0.15$ )(图4B,中)。同时,Western blot结果显示,DANCR1和DANCR2的免疫沉淀样品均能检测到EZH2蛋白,而ctrl1及ctrl2中EZH2信号均为阴性(图4B,右)。

对MS2-RIP和RNA pulldown方法的结果进行比较,如图4C所示,RNA pulldown方法的阳性探针组(DANCR1和DANCR2)对DANCR的富集效率(分别为 $(0.0406 \pm 0.0096)\%$ 和 $(0.0501 \pm 0.0178)\%$ ),低于MS2-RIP方法的Test group $(0.0835 \pm 0.0048)\%$ (DANCR1组样本量为6,DANCR2和Test group组样本量分别为3,单因素方差分析结果显示, $F=14.492, P<0.05$ ,3组DANCR的富集水平有差异;Dunnett's  $t$ 检验结果表明,Test group与DANCR1相比较, $P<0.05$ ;Test group与DANCR2相比较, $P<0.05$ )。另外,对上述两种方法捕获的EZH2蛋白的Western Blot条带进行光密度定量分析(图4C,右),结果显示MS2-RIP方法对EZH2蛋白的富集效果优于RNA pulldown方法。MS2-RIP的Test group富集的EZH2蛋白占其input的比例为 $(8.09 \pm 3.29)\%$ ,而DANCR1和DANCR2富集的EZH2蛋白占相应input的比例分别为 $(1.5 \pm 1.1)\%$ 及 $(2.28 \pm 0.99)\%$ 。Test group与DANCR1、Test group与DANCR2的差异都具有统计意义(3组样本量分别为3,单因素方差分析结果显示, $F=10.204, P<0.05$ ,3组EZH2的富集水平有差异;Dunnett's  $t$ 检验结果表明,Test group与DANCR1相比较, $P<0.05$ ;Test group与DANCR2相比较, $P<0.05$ )。

以上结果说明,MS2-RIP方法可以高度特异性地富集目标RNA DANCR,而对非特异性RNA U1分子没有显著的富集作用,因此可用于下游进一步检测共同被捕获的DANCR相互作用分子。同时,对比广泛使用的RNA pulldown方法,MS2-RIP方法富集DANCR和捕获EZH2蛋白的效率明显更高,说明MS2-RIP方法将来可用于有效鉴定更多未知的DANCR相互作用分子。



A: Relative enrichment level of DANCR and U1 detected by qPCR (left and middle), and enrichment of EZH2 protein detected by Western Blot (right) from the MS2-RIP assay. B: Relative enrichment level of DANCR and U1 detected by qPCR (left and middle), and enrichment of EZH2 protein detected by Western Blot (right) from the RNA pull-down assay. C: Comparison of the enrichment efficiency of DANCR (left) and EZH2 protein (right) from the MS2-RIP to that from the RNA pull-down assay.

图4 MS2-RIP 方法的富集效率

Fig.4 The enrichment efficiency of MS2-RIP strategy

### 3 讨论

长链非编码 RNA 作为一类长度大于 200 个核苷酸、通常不具有蛋白质编码能力的内源性 RNA,能够在表观遗传、转录及转录后水平上对基因表达进行调节,从而广泛地参与包括细胞分化、个体发育在内的重要生命过程,其异常表达还与多

种人类重大疾病(如肿瘤)的发生发展密切相关。近年来关于 lncRNA 的研究进展迅猛,但是绝大部分 lncRNA 的作用机制仍不清楚。lncRNA DANCR 基因是一个位于人类染色体 4 号,长度为 915 bp 的长链非编码 RNA,最初在人表皮祖细胞中被发现具有维持细胞未分化状态的功能<sup>[1]</sup>。广泛的研究数据表明,DANCR 可以作为肿瘤的标志物,

其在多种肿瘤中的异常表达与肿瘤的发生、转移、浸润以及肿瘤血管新生等有密切关联<sup>[13-16]</sup>,可作为靶向性治疗肿瘤的新靶标。然而,目前对于 lncRNA DANCR 功能和机制的研究尚未完善。

以往的研究报道,lncRNA行使功能的机制大部分体现在从不同的水平对基因表达进行调控,包括染色质的表观遗传修饰水平,转录调控水平,mRNA稳定性水平,以及翻译调控水平。而且,lncRNA常以与蛋白质、RNA或DNA相结合的方式,参与调控基因表达。例如,在间充质干细胞中,DANCR可与表观遗传修饰因子EZH2蛋白结合,影响RUNX2基因表达,抑制成骨分化<sup>[11]</sup>。lncRNA HOTAIR既可结合蛋白质又可结合DNA,通过招募沉默复合物PRC2和LSD1/CoREST/REST复合物至特定DNA区域,使组蛋白H3K27和H3K4分别进行甲基化和去甲基化修饰,从而使其调控的一系列基因表达下调<sup>[10]</sup>。另外,一些lncRNA的序列中含有microRNA的结合位点,可以行使海绵(sponge)作用对调节性microRNA进行吸附,从而使被microRNA调控的mRNA分子得到释放,表达增加<sup>[8-9]</sup>。因此,鉴定与lncRNA相互作用的生物活性分子,有助于准确阐明lncRNA的作用机制。

为了探讨DANCR在肿瘤细胞中的作用机理,本研究致力于构建一种用于鉴定与DANCR相互作用的生物活性分子的新方法。常见的鉴定lncRNA相互作用分子的方法包括RNA pulldown和RNA结合蛋白免疫沉淀(RNA-binding protein immunoprecipitation, RIP)。RNA pulldown方法通过使用人工合成的序列互补性探针富集lncRNA,间接捕获结合lncRNA的生物活性分子。该方法受限于探针与靶标的亲和力,探针序列的特异性,以及探针与靶标的结合位点可能覆盖相互作用分子的结合序列等因素,因此其捕获效率因不同lncRNA分子而异。RIP方法则使用lncRNA的候选结合蛋白的特异性抗体,通过免疫共沉淀富集lncRNA-蛋白复合物,进一步检测lncRNA在免疫沉淀复合物中的含量判断二者结合的可能性或效率。然而,该方法要求lncRNA结合蛋白已知,

并且可获得高特异性的抗体。因此,一般的RIP方法不适用于探讨未知的lncRNA结合蛋白,以及与lncRNA结合的RNA/DNA分子。为了解决上述问题,本研究构建了一种基于MS2 RNA结合蛋白特性,以DANCR为诱饵捕获相互作用分子的新方法。我们设计使DANCR与多个拷贝的MS2 BS形成串联转录本,通过将带有Flag标签的MS2 RNA结合蛋白进行免疫沉淀,即可高效捕获DANCR及其相互作用分子。该方法的优势在于以下几方面:①MS2 RNA结合蛋白与MS2 BS的结合力强,通过人为增加MS2 BS拷贝数,可使DANCR的富集效率达到最优化;②富集DANCR的关键作用位点为MS2 BS,该位点不属于DANCR转录本中的天然序列,可避免干扰DANCR与其相互作用分子的结合;③商品化的Flag抗体具有高度亲和性和特异性,可使MS2 RNA结合蛋白的免疫沉淀效率得到保证;④单独使用MS2-RIP方法,即可同时检测与DANCR相互作用的蛋白质或RNA分子,节省实验时间和成本。

本文的研究结果初步表明,与RNA pulldown方法相比较,MS2-RIP方法由于利用了MS2蛋白与其特异性结合位点的亲和力作为基础,得以高效地富集DANCR;同时,MS2-RIP实验要求外源性过量表达DANCR(形成DANCR-MS2 BS(12X)重组转录本),因此可增加被富集的DANCR转录本的拷贝数,从而提高捕获DANCR结合蛋白EZH2的效果(图4)。而且,与RNA pulldown方法中探针结合序列可能覆盖未知相互作用分子的结合位点的情况不同,MS2-RIP方法对DANCR的富集不依赖于DANCR本身序列,可避免与潜在的相互作用分子发生竞争性结合,因此可提高捕获DANCR相互作用分子的效率。所以从理论上来说,MS2-RIP方法可针对任意一种lncRNA展开相互作用分子的鉴定及其作用机制探讨,具有广泛的适用性。

综上所述,MS2-RIP方法可以达到特异性高效富集目的lncRNA DANCR及其相互作用分子的目的。该方法为探讨lncRNA DANCR的作用机制,以及鉴定其他lncRNA的相互作用分子提供了一种新的策略。



## 参考文献

- [1] Kretz M, Webster DE, Flockhart RJ, et al. Suppression of progenitor differentiation requires the long noncoding RNA ANCR [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(4):338-343.
- [2] Chen ZY, Chen X, Xie RH, et al. DANCR promotes metastasis and proliferation in bladder cancer cells by enhancing IL-11-STAT3 signaling and CCD1 expression[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(2):326-341.
- [3] Li ZW, Hou PF, Fan DM, et al. The degradation of EZH2 mediated by lncRNA ANCR attenuated the invasion and metastasis of breast cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(1):59-71.
- [4] Lu YQ, Hu ZY, Mangala LS, et al. MYC targeted long noncoding RNA DANCR promotes cancer in part by reducing p21 levels[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(1):64-74.
- [5] Wen X, Liu X, Mao YP, et al. Long non-coding RNA DANCR stabilizes HIF-1 $\alpha$  and promotes metastasis by interacting with NF90/NF45 complex in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Theranostics*, 2018, 8(20):5676-5689.
- [6] Yuan SX, Wang J, Yang F, et al. Long noncoding RNA DANCR increases stemness features of hepatocellular carcinoma by derepression of CTNNB1 [J]. *Hepatology*, 2016, 63(2):499-511.
- [7] Zhan YH, Chen ZC, Li YF, et al. Long non-coding rna dancr promotes malignant phenotypes of bladder cancer cells by modulating the miR-149/MSI2 axis as a ceRNA [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):273-284.
- [8] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Cell*, 2011, 147(2):358-369.
- [9] Poliseno L, Salmena L, Zhang J, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology [J]. *Nature*, 2010, 465(7301):1033-1038.
- [10] Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes[J]. *Science*, 2010, 329(5992):689-693.
- [11] Zhu L, Xu PC. Downregulated lncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating RUNX2 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(4):612-617.
- [12] Witherell GW, Gott JM, Uhlenbeck OC. Specific interaction between RNA phage coat proteins and RNA [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1991, 40:185-220. Doi: 10.1016/s0079-6603(08)60842-9
- [13] Li J, Zhou L. Overexpression of lncRNA DANCR positively affects progression of glioma via activating WNT/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102:602-607. Doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.116
- [14] Lin XJ, Yang F, Qi XR, et al. LncRNA DANCR promotes tumor growth and angiogenesis in ovarian cancer through direct targeting of miR-145 [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(12):2286-2296.
- [15] Yao ZC, Chen QY, Ni ZL, et al. Long non-coding RNA differentiation antagonizing nonprotein coding RNA (DANCR) promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer by sponging miR-214-5p to regulate E2F2 expression [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:4544-4552. Doi: 10.12659/MSM.916960
- [16] 胡建兰, 安玉玲. 长链非编码RNA与肝癌[J]. *器官移植*, 2017, 8(3):242-245.
- Hu JL, An YL. Long non coding RNA and hepatocellular carcinoma [J]. *Organ Transplan*, 2017, 8(3):242-245.

(编辑 孙慧兰)