

[文章编号] 1671-587X(2026)01-0010-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20260102

RNA 解旋酶 *DHX37* 基因不同功能结构域载体的构建及鉴定

黄立敏¹, 张春丽¹, 孙晋¹, 任松², 田红卫¹

(1. 西安交通大学第二附属医院生物诊断治疗国家地方联合工程中心, 陕西 西安 710004; 2. 西安交通大学第二附属医院普通外科四病区, 陕西 西安 710004)

[摘要] **目的:** 通过在线网站和软件预测人源 RNA 解旋酶 *DHX37* 基因的功能结构域, 构建其不同功能结构域缺失载体, 并验证构建载体的正确性。**方法:** 以人源 DEAH-box 解旋酶 37 (*hDHX37*) 质粒作为模板, 基于同源重组克隆技术, 应用 SnapGene V 6.0.2 软件设计截短体 ATP 结合结构域 (Δ ATP binding)、C 末端结构域 (CTD)、HA2 亚基 (HA2) 和 Oligos/Accharide 结合折叠域 (O/A binding fold) 的功能结构域特异性引物; 采用高保真 DNA 聚合酶 Prime STAR GXL polymerase 进行 PCR 扩增截短体目的片段 ATP binding、c-terminal-1、c-terminal-2、HA2-1、HA2-2 和 O/A binding fold; 利用重组克隆试剂盒将截短体片段定向克隆至经双酶切的 pCMV-MCS-3 \times HA-Neo 空载体; 将重组载体转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后, 通过限制性内切酶 *Hind* III 酶切、琼脂糖凝胶电泳和 DNA 测序验证功能结构域载体的正确性。**结果:** PCR 法扩增的目的片段 ATP binding (2 148 bp)、c-terminal-1 (1 326 bp)、c-terminal-2 (1 269 bp)、HA2-1 (2 205 bp)、HA2-2 (894 bp) 和 O/A binding (2 583 bp) 长度与设计一致; *Hind* III 单酶切突变质粒 Δ ATP binding、 Δ c-terminal、 Δ HA2 和 Δ O/A binding fold, 得到线性化 DNA 片段, 长度分别为 8 939、7 589、8 036、8 540 和 8 027 bp, 产物条带大小均与设计相符。DNA 测序 Blast 对比分析, Δ ATP binding 缺失 ATP binding 结构域 (1~442)、 Δ c-terminal 缺失 c-terminal 结构域 (443~735)、 Δ HA2 缺失 HA2 结构域 (736~861) 和 Δ O/A binding fold 缺失 O/A binding fold 结构域 (862~1 158), 分别缺失 1 326、879、375 和 891 bp, 各突变质粒缺失的结构域位置和长度与设计完全一致。**结论:** 成功构建 *hDHX37* 基因的 Δ ATP binding、 Δ c-terminal、 Δ HA2 和 Δ O/A binding fold 4 个不同功能结构域载体。

[关键词] DEAH-box 解旋酶 37; 功能结构域载体; 重组克隆; 限制性酶切; 聚合酶链式反应

[中图分类号] R-331 **[文献标志码]** A

Construction and identification of vectors with different functional domains of RNA helicase *DHX37* gene

HUANG Limin¹, ZHANG Chunli¹, SUN Jin¹, REN Song², TIAN Hongwei¹

(1. National and Local Joint Engineering Center for Biodiagnosis and Treatment, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Department of General Surgery, Pancreatic and Spleen Surgery, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

[收稿日期] 2025-02-14 **[录用日期]** 2025-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81802456); 陕西省科技厅自然科学基金面上项目 (2024JC-YBMS-691)

[作者简介] 黄立敏 (1992—), 女, 山东省临沂市人, 研究实习员, 医学硕士, 主要从事肝癌免疫微环境调控机制方面的研究。

[通信作者] 田红卫, 助理研究员, 博士研究生合作导师 (E-mail: hongwei_tian01@163.com)

© 《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

ABSTRACT Objective: To discuss the functional domains of the human RNA helicase *DHX37* gene predicted by online websites and software, to construct its different functional domain deletion vectors, and to verify the correctness of the constructed vectors. **Methods:** Using the human DEAH-box helicase 37 (h*DHX37*) plasmid as a template, based on homologous recombination cloning technology, SnapGene V 6.0.2 software was used to design functional domain-specific primers for the truncations ATP binding domain (ATP binding), C-terminal domain (CTD), HA2 subunit (HA2), and Oligos/Accharide binding fold domain (O/A binding fold); prime STAR GXL polymerase, a high-fidelity DNA polymerase, was used to perform PCR amplification of the truncated target fragments ATP binding, c-terminal-1, c-terminal-2, HA2-1, HA2-2, and O/A binding; a recombination cloning kit was used to directionally clone the truncated fragments into the double-digested pCMV-MCS-3×HA-Neo empty vector; after transforming the recombinant vectors into *E. coli* DH5 α competent cells, the correctness of the functional domain vectors was verified by restriction enzyme *Hind* III digestion, agarose nucleic acid gel electrophoresis, and DNA sequencing. **Results:** The lengths of the target fragments amplified by PCR, ATP binding (2 148 bp), c-terminal-1 (1 326 bp), c-terminal-2 (1 269 bp), HA2-1 (2 205 bp), HA2-2 (894 bp), and O/A binding fold (2 583 bp), were consistent with the design; *Hind* III single enzyme digestion of the mutant plasmids Δ ATP binding, Δ c-terminal, Δ HA2, and Δ O/A binding fold yielded linearized DNA fragments with lengths of 8 939, 7 589, 8 036, 8 540, and 8 027 bp, respectively, and the product band sizes all matched the design. The DNA sequencing Blast comparative analysis results showed that Δ ATP binding lacked the ATP binding domain (1–442), Δ c-terminal lacked the c-terminal domain (443–735), Δ HA2 lacked the HA2 domain (736–861), and Δ O/A binding fold lacked the O/A binding fold domain (862–1 158), with deletions of 1 326, 879, 375, and 891 bp, respectively; the positions and lengths of the deleted domains in each mutant plasmid were completely consistent with the design. **Conclusion:** The four different functional domain vectors of human *DHX37* gene, Δ ATP binding, Δ c-terminal, Δ HA2, and Δ O/A binding fold, are successfully constructed.

KEYWORDS DEAH-box helicase 37; Functional domain vector; Recombinant clone; Restriction enzyme digestion; Polymerase chain reaction

RNA解旋酶作为一种重要的分子伴侣, 通过调控转录、翻译和RNA剪接及转运等生物过程, 广泛参与先天性免疫反应、肿瘤发生和炎症调控等一系列重要的生理过程^[1-3]。人源DEAH-box解旋酶37 (human DEAH-box helicase 37, h*DHX37*) 属于DEAH-box RNA解旋酶家族成员之一, 其结构高度保守, 具有特定的三维结构和功能域。DEAH-box RNA解旋酶家族由串联的RecA样结构域、C-末端结构域 (C-terminal domain, CTD) 和柔性连接子组成。串联的RecA样结构域是*DHX37*的核心结构, 通常包含2个相似的亚结构域, 亚结构域相互靠近形成一个整体, 是发挥解旋酶活性的关键区域。该结构域中含有能与ATP特异性结合的氨基酸残基, ATP结合后在特定酶活性位点水解, 释放能量供*DHX37*执行解旋等功能。CTD包括翼状螺旋 (winged helix, WH)、螺旋束 (helical-bundle, HB) 和寡糖结合折叠 (oligosaccharide binding, OB) 子结构域。WH子

结构域可与特定的RNA序列或结构特异性结合, *DHX37*精准定位到需要解旋的RNA区域。HB子结构域有助于维持*DHX37*整体结构的稳定性, 并可能参与其他蛋白质或RNA分子的相互作用。OB子结构域能够与寡糖分子或其他小分子配体结合, 调节*DHX37*的活性和其他分子的相互作用^[4-6]。上述结构域赋予*DHX37*动态参与RNA代谢的功能。细胞周期蛋白D1 (cyclin D1, CCND1) 是由人类*CCND1*基因编码的一种蛋白质, 位于人类染色体11q13.3区域。*CCND1*是细胞周期中的关键调节因子, 主要功能是促进细胞从G₁期进入S期, 从而调控细胞增殖。研究^[7]表明:*DHX37*与多效调控因子1 (pleiotropic regulator 1, PLRG1) 相互作用, 通过其启动子和超级增强子元件的共占用, 转录激活*CCND1*的表达, 促进肝癌细胞增殖, 并与肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者不良预后有关。*DHX37*还参与核糖体的生物合成^[8-9]、抗病毒应答和免疫调控^[10]。在T淋巴细胞

中敲除 *DHX37* 增强了抗体特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CD8⁺T) 细胞对体内三阴性乳腺癌的抗肿瘤活性。*DHX37* 与核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 和程序性死亡 11 (programmed cell death 11, PDCD11) 相互作用, 并调节 CD8⁺T 细胞中 NF- κ B 通路的活性, 抑制 CD8⁺T 细胞在抗原刺激下的活性^[11]。生物信息学分析进一步揭示 *DHX37* 在肝癌等恶性肿瘤中呈现高表达特征, 且与肿瘤免疫微环境重塑存在密切关联^[12-13], 证实了其作为治疗靶点的潜在价值。然而, 目前对于 *DHX37* 在影响肿瘤的发生和免疫调节中的结构域基础及分子机制的研究尚未完全阐明。本课题组前期研究^[14]显示: *DHX37* 的高表达是导致 HCC 预后不良的独立危险因素, 且靶向 *DHX37* 可提高化疗药物对 HCC 的敏感性, 因此 *DHX37* 有望成为抑制肿瘤发展的潜在靶点, 有助于提高抗肿瘤免疫治疗效果。为深入探讨 *DHX37* 功能结构域与其肿瘤调控活性的因果关系, 本研究通过同源重组技术构建其 ATP 结合结构域 (ATP binding domain, ATP binding)、CTD (包括 c-terminal-1 和 c-terminal-2)、HA2 亚基 (HA2 subunit, HA2) 和 Oligos/Accharide 结合折叠域 (O/A binding fold domain, O/A binding fold) 载体, 为进一步阐明 *DHX37* 的生物学功能并在后续实验中探讨其调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

人胚肾细胞 HEK293T 细胞系购于美国模式菌种收集中心。pCMV-h*DHX37*-3×HA-Neo 质粒购于武汉森灵生物科技有限公司, 大肠杆菌 DH5 α 购于北京全式金生物技术有限公司, 单片段重组克隆试剂盒、快速克隆试剂盒、DNA 凝胶纯化回收试剂盒和质粒抽提试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); 预混型高保真 PCR 酶 (PrimeSTAR[®] GXL Premix)、Quick Cut *Hind* III、Quick Cut *Xho* I 和 Marker (北京宝日医生物技术有限公司), GelRed 核酸染料 (苏州优逸兰迪生物科技有限公司), *BsmB* I (北京纽英伦生物技术有限公司)。Nano Drop 2000 超微量分光光度计 (美国赛默飞世尔科技公司), T100[™] PCR 仪 (美国伯乐公司), Bio-Rad 凝胶成像仪 (美国伯乐公司)。

1.2 引物设计及 DNA 片段制备

应用 SnapGene V 6.0.2 软件设计特异性引物, 使插入 DNA 片段

5'端和 3'端带有载体两端 15~25 bp 的重叠序列, 引物序列见表 1。以 h*DHX37* 为模板, PCR 法扩增各目的 DNA 片段。PCR 法反应体系总体积 50 μ L: h*DHX37* 质粒 1 μ L、GXL Buffer 10 μ L、上游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 1 μ L、下游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 1 μ L、dNTP Mix 4 μ L、Prime STAR GXL polymerase 1 μ L 和 ddH₂O 32 μ L。反应条件: 变性 98 $^{\circ}$ C、10 s; 70 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C、梯度退火; 68 $^{\circ}$ C、1 min/kb 延伸, 共 30 个循环, 产物 4 $^{\circ}$ C 暂存。将扩增的目的产物利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物条带长度是否与设计相符。切取带有目的条带的胶, 加入 PC 溶液, 水浴至胶融化。将液体转入吸附柱中, 放置 3 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 60 s, 弃掉管底的液体; 吸附柱中加入漂洗液 600 μ L, 12 000 r·min⁻¹ 离心 60 s, 弃掉管底液体; 用漂洗液重复漂洗 1 次, 弃掉管底液体; 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 将吸附柱转至新离心管中, 静置 10 min; 吸附柱中加入 50 μ L ddH₂O, 放置 2 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min; 将离心管底部的溶液重新加到吸附柱中, 放置 2 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min。离心管底部溶液即高纯度的 DNA 溶液, Nano Drop 2000 超微量分光光度计检测 DNA 浓度。

1.3 酶切及线性化载体的制备

h*DHX37* 质粒经 Quick Cut *Hind* III/Quick cut *Xho* I 双酶切。酶切反应体系: 10×Quick Cut Buffer 5 μ L、h*DHX37* 5 μ L (约 5 μ g)、Quick Cut *Hind* III 5 μ L、Quick cut *Xho* I 5 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。将体系混匀后瞬离, 30 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中反应 15 min。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 经胶回收, 获得 h*DHX37* 的线性化载体 pCMV-h*DHX37*-3×HA-Neo (vector)。

1.4 载体与目的片段的重组克隆

为将片段定向克隆至 pCMV-MCS-3×HA-Neo (vector) 空载体中, 利用 Easy Geno 快速重组试剂盒构建 h*DHX37* 基因的 4 个不同功能结构域缺失的载体。构建过程见图 1。重组克隆实验体系: vector 1 μ L、插入片段 (表 2)、2×EasyGeno 组装混合液 (2×EasyGeno Assembly Mix) 5 μ L、ddH₂O 补至 10 μ L。共 4 个重组克隆实验体系, 其中 ATP binding 和 O/A binding 是单片段克隆重组体系, 是 2 个重组克隆体系, c-terminal-1 和 c-terminal-2; HA2-1 和 HA2-2 是多片段重组克隆体系, 是 2 个重组体系。DNA 与 vector 摩尔比为 3:1, vector 50 ng, 各 DNA 加入量见表 2, 共 4 个重组克隆样品; 50 $^{\circ}$ C 恒温水浴

表1 扩增目的DNA片段的引物序列
Tab. 1 Sequences of primers needed for amplifying targeted fragments of DNA

Name		Primer sequences (5'-3')
ATP	F	CCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGTTCAACAAGCGGACACCGC
ATP	R	AATCAGGTACGTCGTATGGGTACTCGAGGTGGACAGTGGT
<i>c-terminal-1</i>	F	CCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGGGGAAGCTG
<i>c-terminal-1</i>	R	CTCGGCGGCATGCACAGTCACTGGGAACTG
<i>c-terminal-2</i>	F	CTGTGCATGCCGCCGAGGAGC
<i>c-terminal-2</i>	R	AATCAGGTACGTCGTATGGGTACTCGAGGTGGACAGTGGT
HA2-1	F	CCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGGGGAAGCTG
HA2-1	R	TCCCACGGCAAGAAGGGCTTCCAC
HA2-2	F	GCCCTTCTTGCCGTGGGAGCCTGTG
HA2-2	R	AATCAGGTACGTCGTATGGGTACTCGAGGTGGACAGTGGT
O/A bind ATP	F	CCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGGGGAAGCTG
O/A bind ATP	R	AATCAGGTACGTCGTATGGGTACTCGAGGGCGCCAGCAGC

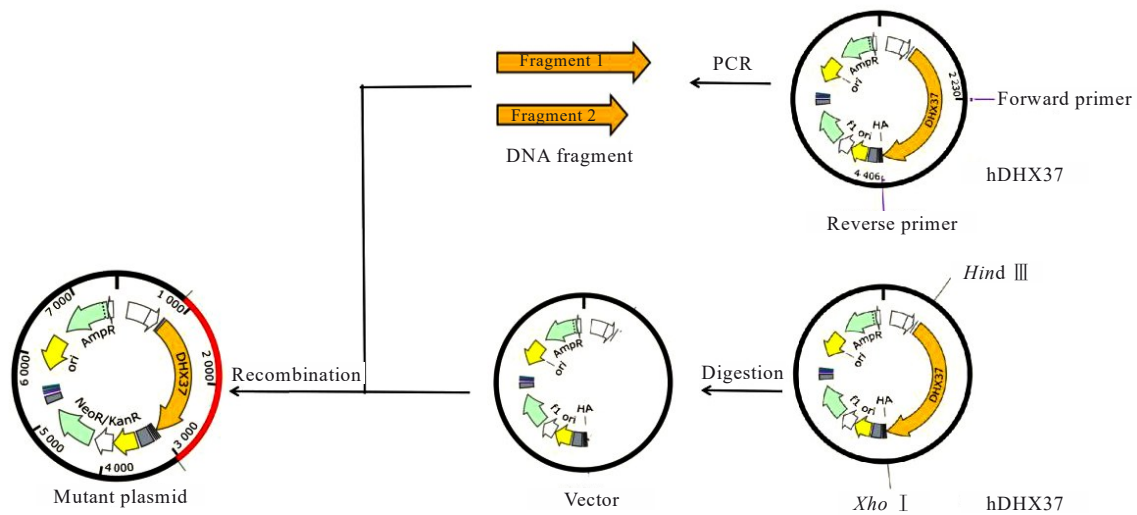


图1 *hDHX37* 突变质粒构建流程图

Fig. 1 Construction flowchart of *hDHX37* mutant plasmid

锅, 反应 15 min。瞬时离心, 用于后续实验。

表2 重组克隆实验中各DNA片段的用量

Tab. 2 Amount of each DNA fragment in recombinant cloning experiment

Name of DNA	DNA concentration [$\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$]	Volume added ($V / \mu\text{L}$)
ATP binding	229.6	1.0
O/A binding	199.3	1.0
<i>c-terminal-1</i>	120.0	0.4
<i>c-terminal-2</i>	214.1	0.2
HA2-1	158.4	0.4
HA2-2	220.3	0.2

1.5 突变载体的转化 取-80℃保存的DH5 α 感受态细胞冰上融化, 将“1.4”的产物分别吸取5 μL 加入到DH5 α 中。混合均匀, 冰上放置30 min; 42℃恒温水浴锅中热击90 s; 冰浴2 min; 加入0.9 mL溶菌肉汤(Luria-Bertani, LB) (不含氨苄青霉素)培养基; 将离心管置于37℃恒温摇床, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇菌1 h。3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心2 min, 留100 μL 悬液混匀, 涂布棒分别将样品涂布至LB固体培养基(含100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素), 将平板倒置于37℃恒温培养箱中过夜。挑选单克隆, 置于含50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的LB培养基中, 置于37℃恒温摇床, 180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡12 h, 过夜扩大

培养。

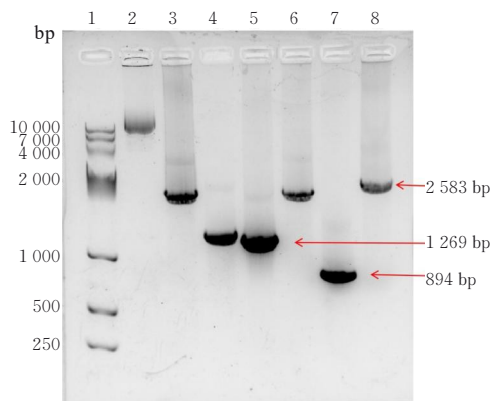
1.6 突变载体的抽提和测序 将过夜培养的菌液 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 60 s, 尽量吸除上清; 向沉淀菌体中加入 250 μL 的溶液 P1, 涡旋振荡使沉淀悬浮; 加入 250 μL 的溶液 P2, 温和翻转 6 次, 室温放置 2 min, 使菌体充分裂解; 加入 350 μL 溶液 P3, 温和和上下翻转离心管 6 次, 可见白色絮状沉淀; $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 将上清吸至过滤柱内, 过滤柱放入收集管中, 室温放置 2 min, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 60 s, 弃除底部液体; 在过滤柱内加入 750 μL 漂洗液, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 60 s, 弃除底部液体, 在过滤柱内加入 750 μL 漂洗液再漂洗 1 次; $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 室温静置 10 min; 将过滤柱转至新的离心管中, 向过滤柱中加入 50 μL ddH₂O, 放置 2 min, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min; 将底部溶液重新加到过滤柱中, 放置 2 min, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 离心管底部溶液即突变载体溶液。分别取 5 μL 样品送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2 结果

2.1 获得的目的DNA片段 以 *hDHX37* (8 939 bp) 为模板, 采用特异性的引物通过 PCR 法分别扩增 6 个 DNA 片段(图 2)。分别为 ATP binding (2 148 bp)、c-terminal-1 (1 326 bp)、c-terminal-2 (1 269 bp)、HA2-1 (2 205 bp)、HA2-2 (894 bp) 和 O/A binding fold (2 583 bp)。各目的片段长度与设计一致, 成功制备了 6 个 *DHX37* 基因不同功能结构域的片段。

2.2 核酸电泳法鉴定不同结构域的载体

hDHX37 及各突变载体模式见图 3。根据 *hDHX37* 功能结构域缺失的位置, 突变载体分别命名为 $\Delta\text{ATP binding}$ 、 $\Delta\text{c-terminal}$ 、 ΔHA2 和 $\Delta\text{O/A binding fold}$, 其中 $\Delta\text{ATP binding}$ 和 $\Delta\text{O/A binding fold}$ 为单片段重组克隆实验构建, $\Delta\text{c-terminal}$ 和 ΔHA2 为多片段重组克隆实验构建。*hDHX37* 及各突变质粒 $\Delta\text{ATP binding}$ 、 $\Delta\text{c-terminal}$ 、 ΔHA2 和 $\Delta\text{O/A binding fold}$ 经 *Hind* III 单酶切, 得到线性化 DNA 片段, 长度分别为 8 939、7 589、8 036、8 540 和 8 027 bp。琼脂糖凝胶电泳结果(图 4)显示: *hDHX37* 各突变载体 $\Delta\text{ATP binding}$ 、 $\Delta\text{c-terminal}$ 、 ΔHA2 和 $\Delta\text{O/A binding fold}$ 的片段长度与 NCBI 设计一致, 表明目的片段与载体连接成功, *hDHX37* 的 4 个突变载体构建成功。



Lane 1: Marker; Lane 2: *hDHX37*; Lane 3: ATP binding; Lane 4: c-terminal-1; Lane 5: c-terminal-2; Lane 6: HA2-1; Lane 7: HA2-2; Lane 8: O/A binding fold.

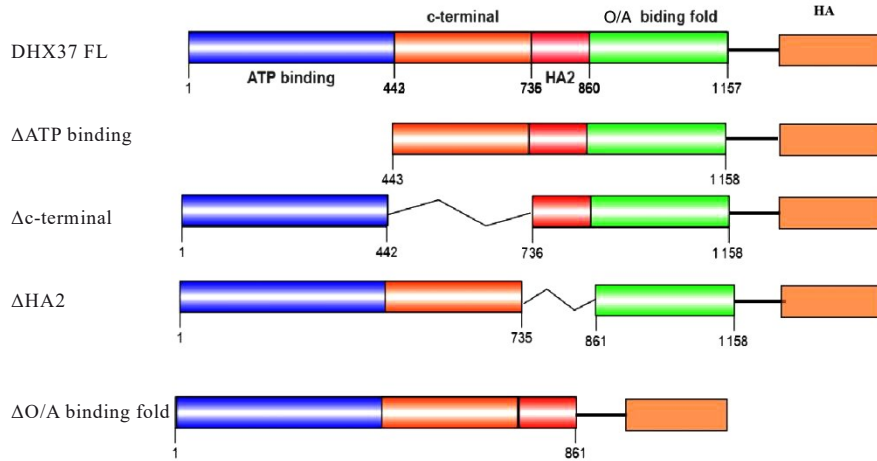
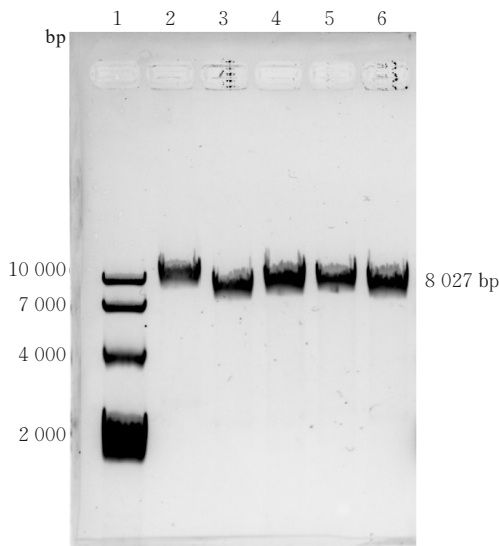
图 2 *hDHX37* 基因不同 DNA 扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of different DNA amplification of *hDHX37* gene

2.3 DNA 测序鉴定不同结构域载体 经核酸电泳初步验证的 4 个突变载体 ($\Delta\text{ATP binding}$ 、 $\Delta\text{c-terminal}$ 、 ΔHA2 和 $\Delta\text{O/A binding fold}$), 分别取 5 μL 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 DNA 测序。应用 SnapGene V 6.0.2 软件分析 DNA 序列, DNA 测序 Blast 对比分析结果显示: $\Delta\text{ATP binding}$ 缺失 ATP binding 结构域 (1~442)、 $\Delta\text{c-terminal}$ 缺失 c-terminal 结构域 (443~735)、 ΔHA2 缺失 HA2 结构域 (736~861) 和 $\Delta\text{O/A binding fold}$ 缺失 O/A binding fold 结构域 (862~1 158), 分别缺失 1 326、879、375 和 891 bp (图 5), 表明 *hDHX37* 各突变载体缺失结构域位置和长度与 NCBI 设计一致, 再次验证 *hDHX37* 的 4 个突变载体构建成功。

3 讨论

DHX37 作为高度保守的 DEAH-box RNA 解旋酶家族中至关重要的一员, 在众多不同的 RNA 代谢过程中发挥关键的调控功能^[15]。研究^[4, 16]显示: *DHX37* 不仅参与转录调控、翻译过程、翻译后修饰和 RNA 剪接以及转运等一系列基本的生物过程, 还可能通过影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等对肿瘤的发展起到促进或抑制作用^[17]。通过对癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)中肝细胞性肝癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)数据集的分析, 同时结合已有文献报道, 发现 *DHX37* 在肝癌组织中呈显著高表达, 且其表达水平与患者预后情况呈明显负相关关

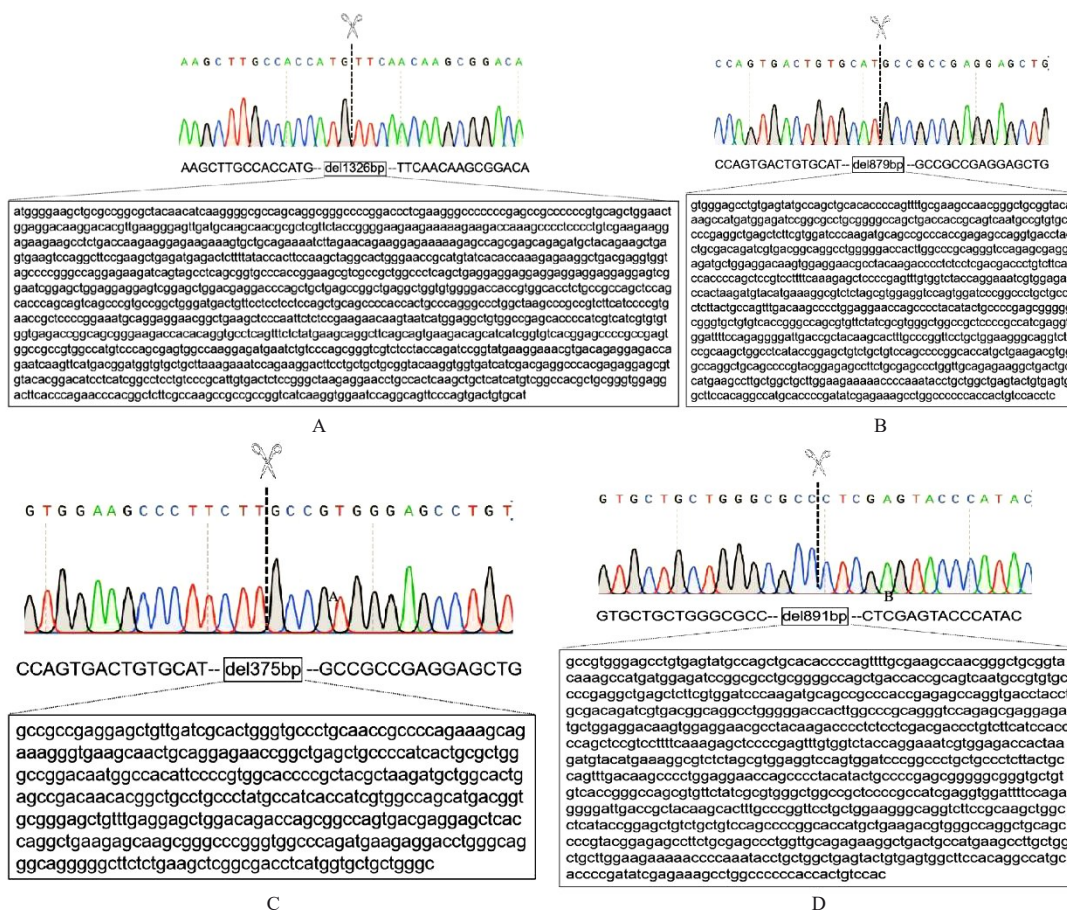
图3 *hDHX37*及各突变质粒模式图Fig. 3 Schematic diagram of *hDHX37* and various mutant plasmidsLane 1: Marker; Lane 2: *hDHX37*; Lane 3: Δ ATP binding; Lane 4: c-terminal; Lane 5: Δ HA; Lane 6: Δ O/A binding fold.图4 *hDHX37*及各突变质粒电泳图Fig. 4 Electrophoregram of *hDHX37* and various mutant plasmids

系 ($P < 0.01$), 证实了 *DHX37* 在 HCC 中的促癌功能^[13, 18], 最新研究^[14] 也揭示了 *DHX37* 在调节先天性免疫反应和炎症过程中的重要作用, 提示其可能作为肿瘤免疫治疗的潜在靶点。尽管 *DHX37* 在肿瘤发生和免疫调控中的重要性已得到初步证实, 但其具体分子调控机制, 特别是功能结构域与靶蛋白的相互作用网络^[13-14] 仍未完全阐明, 限制了研究者对其生物学功能的全面理解。

为了系统解析 *DHX37* 不同功能结构域在蛋白质相互作用网络中的具体作用, 首先基于 UniProt

蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 的预测信息和相关文献^[19-20] 报道, 确定了 *DHX37* 蛋白的 4 个进化保守的关键功能结构域: ① ATP binding, 包含 Walker A/B 基序, 负责 ATP 结合和水解功能; ② CTD, 由 WH、HB 和 OB 亚基组成, 参与 RNA 识别与分子互作; ③ HA2 结构域, 介导蛋白质复合物组装; ④ O/A binding fold, 决定底物特异性识别。本文作者以 NCBI 数据库中的 *hDHX37* 基因序列 (NM_032656.4) 为模板, 通过高保真 PCR 扩增获得编码区全长片段, 将其克隆至 pCMV-MCS-3 \times HA-Neo 载体中, 经测序和酶切验证成功构建了 *hDHX37* 野生型过表达载体^[21]。本文作者采用结构域特异性缺失策略, 针对每个功能结构域设计特异性扩增引物, 通过 PCR 扩增获得相应的缺失突变体片段。使用 Quick Cut *Hind* III 和 Quick Cut *Xho* I 双酶切系统处理空载体, 并通过快速重组克隆技术将扩增的片段插入载体中, 经转化、筛选和质粒提取后, 通过 Sanger 测序和酶切验证, 成功构建了 Δ ATP binding、 Δ c-terminal、 Δ HA2 和 Δ O/A-binding fold 4 个结构域缺失突变体^[22-23]。

本研究的创新之处在于系统构建了 *DHX37* 不同关键功能结构域的载体, 为深入解析 *DHX37* 与靶蛋白相互作用的分子机制提供了重要的实验工具。上述载体的成功构建不仅有助于阐明 *DHX37* 各功能结构域在 RNA 代谢和信号转导中的具体作用, 还将为揭示 *DHX37* 在肿瘤发生、免疫调控和炎症反应中的分子机制提供新的研究思路。在后



A: Sequencing map of ΔATP binding; B: Sequencing map of Δc-terminal; C: Sequencing map of ΔHA2; D: Sequencing map of ΔO/A binding fold.

图5 hDHX37各突变载体测序分析图

Fig. 5 Sequencing analysis diagrams of various mutant vectors of hDHX37

续研究中,本课题组将利用上述突变体开展蛋白质相互作用组学分析,以期全面解析DHX37的功能网络,为开发基于DHX37的肿瘤治疗策略提供理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

黄立敏参与实验操作和论文撰写,张春丽、孙晋和任松参与实验操作,田红卫参与研究设计、论文修改和指导。

[参考文献]

[1] ANDRISANI O, LIU Q, KEHN P, et al. Biological functions of DEAD/DEAH-box RNA helicases in health and disease[J]. Nat Immunol, 2022, 23(3): 354-357.

[2] ZHENG B, CHEN X, LING Q, et al. Role and therapeutic potential of DEAD-box RNA helicase family in colorectal cancer [J]. Front Oncol, 2023, 13:

1278282.

[3] ORSOLIC I, CARRIER A, ESTELLER M. Genetic and epigenetic defects of the RNA modification machinery in cancer[J]. Trends Genet, 2023, 39(1): 74-88.

[4] BECKER R A, HUB J S. Molecular simulations of DEAH-box helicases reveal control of domain flexibility by ligands: RNA, ATP, ADP, and G-patch proteins[J]. Biol Chem, 2023, 404(8/9): 867-879.

[5] DE BORTOLI F, ESPINOSA S, ZHAO R. DEAH-Box RNA helicases in pre-mRNA splicing [J]. Trends Biochem Sci, 2021, 46(3): 225-238.

[6] Bohnsack K E, FICNER R, BOHNSACK M T, et al. Regulation of DEAH-box RNA helicases by G-patch proteins[J]. Biol Chem, 2021, 402(5): 561-579.

[7] LIU Z, YE Y Q, LIU Y Z, et al. RNA helicase DHX37 facilitates liver cancer progression by cooperating with PLRG1 to drive superenhancer-mediated transcription of cyclin D1[J]. Cancer Res, 2022, 82(10): 1937-1952.

- [8] BONEBERG F M, BRANDMANN T, KOBEL L, et al. Molecular mechanism of the RNA helicase DHX37 and its activation by UTP14A in ribosome biogenesis[J]. RNA, 2019, 25(6): 685-701.
- [9] McELREAVEY K, PAILHOUX E, BASHAMBOO A. DHX37 and 46, XY DSD: a new ribosomopathy? [J]. Sex Dev, 2022, 16(2/3): 194-206.
- [10] RAHMAN M M, BAGDASSARIAN E, ALI M A M, et al. Identification of host DEAD-box RNA helicases that regulate cellular tropism of oncolytic myxoma virus in human cancer cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15710.
- [11] DONG M B, WANG G C, CHOW R D, et al. Systematic immunotherapy target discovery using genome-scale *in vivo* CRISPR screens in CD8 T cells[J]. Cell, 2019, 178(5): 1189-1204.
- [12] XU Y N, JIANG Q C, LIU H J, et al. DHX37 impacts prognosis of hepatocellular carcinoma and lung adenocarcinoma through immune infiltration [J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 8835393.
- [13] HUANG K, PANG T, TONG C, et al. Integrative expression and prognosis analysis of DHX37 in human cancers by data mining[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6576210.
- [14] LIU N B, ZHANG H L, ZHANG C L, et al. DHX37 is a promising prognostic biomarker and a therapeutic target for immunotherapy and chemotherapy in HCC[J]. Cancers, 2023, 15(21): 5228.
- [15] ZHANG L, LI X G. DEAD-box RNA helicases in cell cycle control and clinical therapy[J]. Cells, 2021, 10(6): 1540.
- [16] ENDERS M, NEUMANN P, DICKMANN S A, et al. Structure and function of spliceosomal DEAH-box ATPases[J]. Biol Chem, 2023, 404(8/9): 851-866.
- [17] CHEN H X, JIANG Z J, YANG B S, et al. Exploring prognostic signatures of hepatocellular carcinoma and the potential implications in tumor immune microenvironment [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2022, 25(6): 998-1004.
- [18] ARNA A B, PATEL H, SINGH R S, et al. Synthetic lethal interactions of DEAD/H-box helicases as targets for cancer therapy[J]. Front Oncol, 2023, 12: 1087989.
- [19] UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023 [J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(D1): D523-D531 .
- [20] LEE Y T, SICKMIER E A, GRIGORIU S, et al. Crystal structures of the DExH-box RNA helicase DHX9[J]. Acta Crystallogr D Struct Biol, 2023, 79(Pt 11): 980-991.
- [21] WASSEF M, LUSCAN A, BATTISTELLA A, et al. Versatile and precise gene-targeting strategies for functional studies in mammalian cell lines[J]. Methods, 2017, 121/122: 45-54.
- [22] CHEN W, SHE W, LI A, et al. Site-directed mutagenesis method mediated by cas9[J]. Methods Mol Biol, 2022, 2461: 165-174.
- [23] KNICKMANN J, STALIUNAITE L, PUHACH O, et al. A simple method for rapid cloning of complete herpesvirus genomes[J]. Cell Rep Methods, 2024, 4(2): 100696.