

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00450

· 短篇论著 ·

人 MCPH1 基因 shRNA 逆转录病毒载体的构建及鉴定

Construction and identification of recombinant retroviral vector expressing shRNA targeting human MCPH1 gene

袁成福, 程 莉, 黄秀凝, 卜友泉, 刘革力, 宋方洲*

重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016

[摘要] **目的:**建立逆转录病毒介导的 MCPH1 基因 RNA 干扰表达体系并观察其在宫颈癌细胞(HeLa)中对 MCPH1 表达的影响。**方法:**将人 MCPH1 基因 RNA 干扰双链 DNA 片段重组到逆转录病毒质粒 pSilencer5.1-H1 Retro 中,构建携带人 MCPH1 基因 RNA 干扰逆转录病毒载体 pSiRNA-MCPH1,经 PT67 细胞包装后,产生的重组逆转录病毒感染宫颈癌细胞株 HeLa 细胞,并用嘌呤霉素筛选产生稳定的细胞克隆,用 RT-PCR 和 Western 印迹检测细胞中 MCPH1 mRNA 和蛋白表达的变化。**结果:**重组 pSiRNA-MCPH1 质粒经测序鉴定正确;重组逆转录病毒感染 HeLa 细胞后用嘌呤霉素筛选出稳定的细胞克隆;RT-PCR 和 Western 印迹检测人 MCPH1 mRNA 和蛋白表达水平明显低于阴性对照组和未干扰组。**结论:**携带人 MCPH1 基因 RNA 干扰双链 DNA 片段的逆转录病毒感染 HeLa 细胞后能明显抑制 MCPH1 mRNA 和蛋白表达,为进一步研究 MCPH1 在宫颈癌中的作用奠定了基础。

[关键词] MCPH1;RNA 干扰;逆转录病毒载体;宫颈肿瘤**[中图分类号]** R 737.33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0450-04

MCPH1(microcephalin)也叫 BRIT1(BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression),是以大脑体积减小及智力迟钝为特征的原发性小头畸形(primary microcephaly)的主要致病基因之一,因此该基因也称作小脑症基因。MCPH1 基因定位于 8p23.1,最初是在筛选人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase component, hTERT)阻遏物时被发现的,得到的 cDNA 长度为 2 508 bp,包含 14 个外显子。BRIT1 蛋白由 835 个氨基酸组成,相对分子质量为 93 000。MCPH1 分子中包含 3 个 BRCT 结构域(breast cancer susceptibility gene-1 carboxyl terminus),2 个位于 C 末端,1 个位于 N 末端,近 N 末端处有核定位信号^[1-3]。

MCPH1 的功能研究是国际上一个非常活跃的热点,目前的研究主要集中于 MCPH1 与原发性小头畸形的关系、MCPH1 在 DNA 损伤应答通路中的分子功能理论研究。原发性小头畸形是一种罕见的常染色体隐性遗传性神经疾病,这种疾病因大脑形成和生长的不正常从而促使患者头部异常小,研究认为 MCPH1 基因的突变是这种疾病的一个主要病因^[4]。目前 MCPH1 在 DNA 损伤应答反应中的基本功能已明确:MCPH1 在 DNA 损伤后直接与 γ -H2AX 相互作用而被招募到 DNA 双链损伤位点,并和参与 DNA 损伤后的修复和 DNA 损伤检验点信号途径中的多个蛋白相互作用,进而移位到核内,介导 DNA 损伤修复或细胞凋亡^[5-8]。鉴于 MCPH1 在 DNA 损伤应答通路中的重要作用,部分研究者推测 MCPH1 可能在肿瘤发生中具有作用,但具体作用及机

制仍不清楚。本文建立逆转录病毒介导的 MCPH1 基因 RNA 干扰体系,并观察其在 HeLa 细胞中对 MCPH1 基因表达的抑制作用,为进一步研究 MCPH1 在宫颈癌中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *Hind* III、*Bam* H I、T₄ DNA 连接酶购自大连宝生物公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;puromycin 购自 Sigma 公司;MCPH1 一抗购自 Abcam 公司;HRP 标记的 IgG 二抗购自北京鼎国生物技术公司;RNA 抽提液购自德国 Roche 公司。包装细胞 PT67、大肠杆菌 DH5 α 为本室保存;pSilencer5.1-H1 Retro 系 Ambion 公司产品。

1.2 shRNA 靶序列的设计 根据 shRNA 设计原则及 MCPH1(基因号 NM_024596)mRNA 序列,使用 Dharmacon 公司在线设计工具针对 MCPH1 基因编码区设计特异性序列共 2 对 4 条。分别命名为 MCPH1-干扰 1、MCPH1-干扰 2,另设计 1 条阴性对照序列。经过 BLASTN 比对分析与人类其他基因编码序列无同源性。按如下结构设计:*Bam* H I + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + *Hind* III。中间环结构为 9 个核苷酸,其序列为 TTCAAGAGA。将所选择的片段呈反向互补加到环序列的两端,在正义链和反义链的 5' 端分别加上限制酶 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切位点,3' 端酶切位点之前加入 pol III 启动子终止信号 TTT

[收稿日期] 2008-11-06 **[接受日期]** 2009-02-10**[基金项目]** 国家自然科学基金(30800410), Supported by National Natural Science Foundation of China(30800410)。**[作者简介]** 袁成福, 讲师。E-mail: yuancf46@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-68485958, E-mail: fzsongcq@163.com

TTT。具体序列见表1。序列经上海生工生物工程技术有限公司合成。

表1 shRNA 干扰序列

MCPH1-干扰1	5'-gat cca gga agt tgg aag gat cca ttc aag aga tgg atc ctt cca act tcc ttt ttt tgg aaa-3' 3'-gtc ctt caa cct tcc tag gta agt tct cta cct agg aag gtt gaa gga aaa aaa cct ttt cga-5'
MCPH1-干扰2	5'-gat ccg cgc aat gga gaa gag att ttc aag aga aat ctc ttc tcc att gcg ctt ttt tgg aaa-3' 3'-gcg cgtt acc tct tct cta aaa gtt ctc ttt aga gaa gag gta acg cga aaa aac ctt tt ga-5'
阴性对照	5'-gat cct tct ccg aac gtg tca cgt ttc aag aga acg tga cac gtt cgg aga att ttt tgg aaa-3' 3'-gaa gag gct tgc aca gtg caa agt tct ctt gca ctg tgc aag cct ctt aaa aaa cct ttt cga-5'

1.3 重组逆转录病毒质粒的构建 取合成的单链正义和反义 shRNA 模板分别溶解,取等量正义和反义模板寡核苷酸及 $1 \times$ DNA 退火缓冲液,混匀后 95°C 加热 2 min,缓慢冷却至室温,形成 5'端和 3'端分别为 *Bam*H I 和 *Hind*III 粘性末端的双链 DNA。取 pSilencer5.1-H1 Retro 空质粒用 *Bam*H I 和 *Hind*III 于 37°C 水浴酶切 4 h,酶切后进行载体胶回收。将退火后的双链 shRNA 模板与线性化载体于 16°C 连接过夜,以连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌,涂布于含 Amp 抗性的 LB 平板上, 37°C 恒温培养箱培养过夜,挑取单克隆菌落接种于含 Amp 抗性的 LB 培养液中, 37°C 恒温摇床培养过夜,收集菌液,小量快速抽提重组质粒,送上海生工生物工程技术有限公司测序鉴定插入模板是否正确。测序鉴定正确的质粒分别命名为 pSiRNA-MCPH1-1、pSiRNA-MCPH1-2 及阴性对照质粒。

1.4 逆转录病毒质粒的转染及有效干扰序列筛选 将测序正确的 pSiRNA-MCPH1-1、pSiRNA-MCPH1-2 及阴性对照质粒经 Lipofectamine 2000 转染到 HeLa 细胞中,具体操作按说明书进行。48 h 后,提取细胞总 RNA,紫外分光光度计定量,以随机引物在 MMLV 逆转录酶作用下进行逆转录合成 cDNA,反应体系为 $20 \mu\text{l}$,反应条件为 30°C 10 min, 42°C 20 min, 99°C 5 min。产物 20 倍稀释后以 GAPDH 为内参照进行 PCR 扩增,反应体系 $20 \mu\text{l}$,反应条件为: 95°C 预变性 2 min; 95°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 20 s(30 个循环); 72°C 7 min。PCR 引物序列如下:MCPH1(产物长度 240 bp)引物正义链:5'-CAC CAT CTT TCA CTC ACC TC-3',反义链:5'-CTT TAC TGA GGA ACT CCT GG -3';GAPDH(产物长度 467 bp)引物正义链:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',反义链:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG T-3'。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳并照像。同一实验重复 3 次,筛选有效的干扰序列。

1.5 逆转录病毒的制备及感染 HeLa 细胞 将 PT67 细胞种植于 10 cm 细胞培养盘中(约 1×10^7 个细胞),培养过夜后,将筛选有效的干扰质粒及阴性对照质粒各 $10 \mu\text{g}$ 经 Lipofectamine 2000 转染到 PT67 细胞中,具体操作按说明书进行。72 h 后,收集病毒上清并用 $0.45 \mu\text{m}$ 孔径的滤器(Millipore)过滤,滤液按 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 质量浓度加入 polybrene(Sigma),混匀后将滤液加入到提前 1 d 种植到 6 孔细胞培养板中的 HeLa 细胞(4×10^5 /孔),每隔 12 h 更换一次滤液,重复感染 3~4 次后,用不含病毒上清的正常培养基培养细胞,24 h 后用含 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素的培养基培养细胞,每隔 3 d 更换 1

次培养基,直到没有转染质粒的孔中细胞死亡,表明抗生素筛选完成。收集存活的细胞并扩增培养。

1.6 RT-PCR 检测 MCPH1 mRNA 表达水平的变化 将上述扩增培养的细胞按试剂盒说明书提取总 RNA,紫外分光光度计定量,进行 RT-PCR 反应,具体步骤及引物序列同 1.4。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳并照像。用 Quantity One 软件测定 MCPH1、GAPDH 光密度值,用 MCPH1/GAPDH 进行半定量分析。同一实验重复 3 次,取其平均值。

1.7 Western 印迹检测 MCPH1 蛋白水平的表达 细胞用 PBS 清洗后加入裂解液提取蛋白,用 Bradford 法定量后,取 $30 \mu\text{g}$ 处理的蛋白样品进行 SDS-PAGE 并电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温振荡封闭 1 h,与 1:200 稀释的 MCPH1 一抗 4°C 孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,再与 HRP 标记的 IgG(1:10 000)二抗室温孵育 2 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,用 DAB 法检测蛋白表达。以 β -actin 作为参照,用 Image Master VDS 软件分析各组蛋白的积分光密度(integral optical density,IOD)值。各组 MCPH1 与 β -actin 的积分光密度比值作为各组实验数据,同一实验重复 3 次,取其平均值。

1.8 统计学处理 采用统计软件 SPSS 11.5 分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间参数采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 pSiRNA-MCPH1 重组逆转录病毒质粒的构建及测序鉴定 构建的 pSiRNA-MCPH1 重组逆转录病毒质粒,经转化感受态大肠杆菌 DH5 α 扩增后送上海生工生物工程技术有限公司测序鉴定,结果证实插入的碱基序列与设计的 DNA 序列完全一致,无碱基突变。测序结果见图 1。

2.2 pSiRNA-MCPH1-1、pSiRNA-MCPH1-2 及阴性对照质粒转染 HeLa 细胞 48 h 后,提取总 RNA 进行 RT-PCR 反应,其结果见图 2,可见 pSiRNA-MCPH1-1 组干扰效果最好,pSiRNA-MCPH1-2 组几乎没有干扰效果。后续可选择有干扰效果的 pSiRNA-MCPH1-1 质粒进行实验。

2.3 逆转录病毒感染 HeLa 细胞 pSiRNA-MCPH1-1 及阴性对照质粒转染 PT67 包装细胞,收集病毒上清滤液感染 HeLa 细胞后,均出现嘌呤霉素抗性克隆,而没有感染的 HeLa 细胞完全死亡。

2.4 RNAi 逆转录病毒作用后 HeLa 细胞中 MCPH1 mRNA 表达变化 HeLa 细胞经 pSiRNA-MCPH1-1 及阴性对照重组逆转录病毒作用后生成的细胞克隆,用特异性引物行 RT-

PCR 扩增,均能检测到 MCPH1(240 bp)和 GAPDH(467 bp)产物。采用 Quantity One 软件对条带进行光密度分析,各组间 GAPDH 表达量无明显差别($P>0.05$);pSiRNA-MCPH1-

1 组 MCPH1 mRNA 表达水平(0.166 ± 0.031)较阴性对照组(0.712 ± 0.041)明显下降($P<0.01$),见图 3。

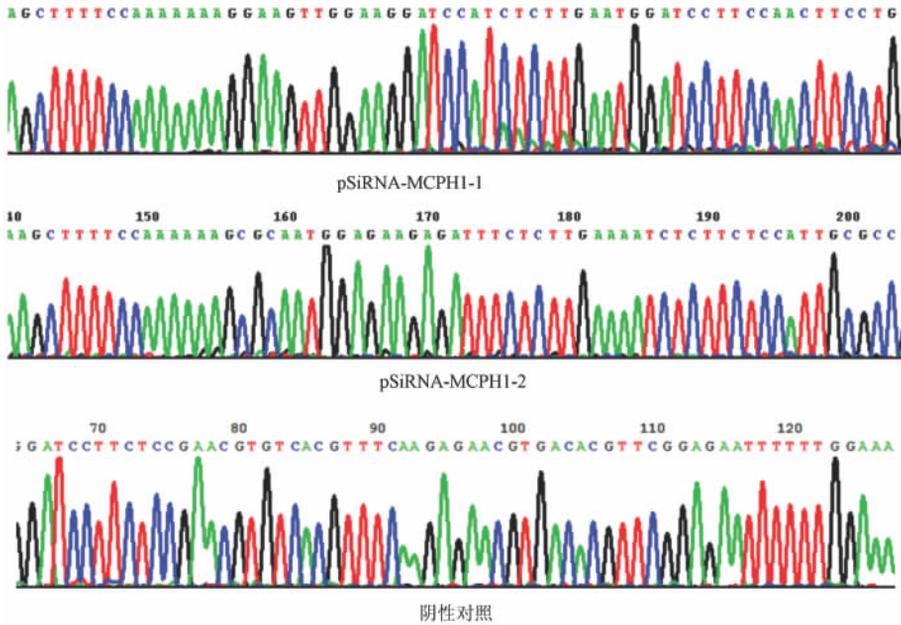


图 1 重组逆转录病毒质粒 pSiRNA-MCPH1 测序结果

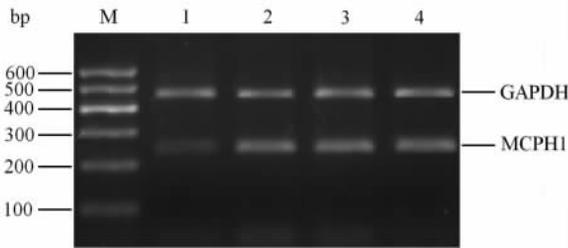


图 2 重组逆转录病毒质粒 pSiRNA-MCPH1 转染 HeLa 细胞的 RT-PCR 结果

M: 标记物 I; 1: pSiRNA-MCPH1-1 组; 2: pSiRNA-MCPH1-2 组; 3: 阴性对照组; 4: 正常组

0.031)较阴性对照组(0.517 ± 0.011)及未干扰组(0.567 ± 0.041)明显下降($P<0.05$),而阴性对照组与未干扰组 MCPH1 蛋白表达水平无明显差别($P>0.05$),见图 4。

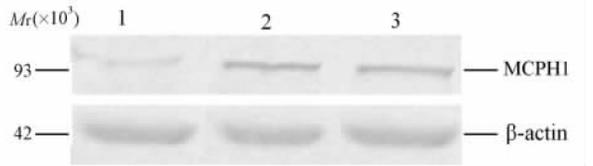


图 4 Western 印迹检测 RNAi 逆转录病毒感染 HeLa 细胞中人 MCPH1 蛋白的表达
1: pSiRNA-MCPH1-1 组; 2: 阴性对照组; 3: 正常组

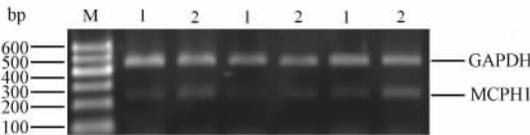


图 3 RT-PCR 检测 RNAi 逆转录病毒感染的 HeLa 细胞中人 MCPH1 mRNA 的表达

M: 标记物 I; 1: pSiRNA-MCPH1-1 组; 2: 阴性对照组

2.5 RNAi 逆转录病毒作用后 HeLa 细胞中 MCPH1 蛋白表达变化 HeLa 细胞经 pSiRNA-MCPH1-1 及阴性对照组逆转录病毒作用后生成的细胞克隆扩增培养后,提取细胞总蛋白进行常规 SDS-PAGE 后行 Western 印迹检测,结果各组均能检测到 MCPH1 和 β -actin 蛋白。对条带进行积分光密度分析表明:各组间 β -actin 表达量无明显差异($P>0.05$);pSiRNA-MCPH1-1 组 MCPH1 蛋白表达水平($0.091\pm$

3 讨论

MCPH1 是近年来 DNA 损伤应答领域一个新的研究热点^[5-8]。“DNA 损伤应答是机体早期抵抗肿瘤发生的重要防线”的观点已被广泛接受,例如在 DNA 损伤应答过程中起着重要作用的 P53 是经典的肿瘤抑制基因^[9]。鉴于 MCPH1 在 DNA 损伤应答中发挥重要作用,不少研究者推测其在肿瘤发生发展中亦发挥重要作用。Rai 等^[7]研究发现在 87 例卵巢癌标本中有 35 例(40%)MCPH1 的 DNA 拷贝数下降,30 例卵巢癌标本中有 19 例 MCPH1 的 mRNA 表达下降;用免疫组化法检测前列腺癌标本,结果显示:相对于正常前列腺标本而言,MCPH1 在部分良性前列腺肥大标本中表达下降,而在部分前列腺癌标本中的表达进一步下降。这些研究结果表明 MCPH1 可能在肿瘤发生中具有肿瘤抑制基因的作用。然而,部分学者提出 MCPH1 在肿瘤中的作用可能和

肿瘤的类型有关^[10]。MCPH1 在宫颈癌中的作用目前未见报道,这需要进一步在体内和体外的实验研究来说明。

由于逆转录病毒载体能将外源基因有效地整合到宿主细胞基因组中,并随细胞分裂而传给后代,而且未经包装时为缺陷性病毒,不具有完整功能,只有经包装细胞系为其提供结构蛋白组分,二者相互补偿后才能包装成具有完整功能的病毒颗粒,因此仅能在包装细胞系中扩增,感染靶细胞后不能扩增,具有很高的安全性^[11],是目前基因转移中应用较为广泛的一类载体。本研究采用 pSilencer5.1-H1 Retro 载体体系 Ambion 公司近年新推出的能携带 siRNA 片段的逆转录病毒载体,全长 6 253 bp,由 H1 启动子启动,两端分别带有 *Bam*HI、*Hind*III 酶切位点,能将目的 siRNA 片段有效转入哺乳动物细胞并整合到宿主细胞基因组中,由于带有嘌呤霉素抗性,因此能对表达重组 DNA 的细胞进行有效筛选,使用比较方便。本研究中成功构建针对人 MCPH1 基因特异的 RNAi 逆转录病毒载体 pSiRNA-MCPH1,经 PT67 细胞包装成具有完整功能的病毒颗粒后,感染 HeLa 细胞,建立稳定表达 siRNA 的 HeLa 细胞。结果能有效抑制细胞中 MCPH1 mRNA 和蛋白的表达,为进一步在体外和体内研究 MCPH1 在宫颈癌中作用奠定了良好的基础。

[参考文献]

- [1] Lin S Y, Rai R, Li K, Xu Z X, Elledge S J. BRIT1-MCPH1 is a DNA damage responsive protein that regulates the Brca1-Chk1 pathway, implicating checkpoint dysfunction in microcephaly[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005,102:15105-15109.
- [2] O'Driscoll M, Jackson A P, Jeggo P A. Microcephalin: a causal link between impaired damage response signalling and microcephaly[J]. Cell Cycle, 2006, 5: 2339-2344.
- [3] Trimborn M, Schindler D, Neitzel H, Hirano T. Misregulated chromosome condensation in MCPH1 primary microcephaly is mediated by condensin II [J]. Cell Cycle, 2006, 5: 322-326.
- [4] Jackson A P, Eastwood H, Bell S M, Adu J, Toomes C, Carr I M, et al. Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of human brain[J]. Am J Hum Genet, 2002,71:136-142.
- [5] Trimborn M, Bell S M, Felix C, Rashid Y, Jafri H, Griffiths P D, et al. Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation[J]. Am J Hum Genet, 2004,75: 261-266.
- [6] Xu X, Lee J, Stern D F. Microcephalin is a DNA damage response protein involved in regulation of CHK1 and BRCA1[J]. J Biol Chem, 2004,279:34091-34094.
- [7] Rai R, Dai H, Multani A S, Li K, Chin K, Gray J, et al. BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity and cancer[J]. Cancer Cell, 2006,10:145-157.
- [8] Wood J L, Singh N, Mer G, Chen J. MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage[J]. J Biol Chem, 2007,282:35416-35423.
- [9] Bartkova J, Horejši Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis[J]. Nature, 2005,434:864-870.
- [10] Bartkova J, Horej Sbrevé Í Z, Sehested M, Nesland J M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek N E, et al. DNA damage response mediators MDC1 and 53BP1: constitutive activation and aberrant loss in breast and lung cancer, but not in testicular germ cell tumours[J]. Oncogene, 2007, 26: 7414-7422.
- [11] Franceschini I A, Feigenbaum-Lacombe V, Casanova P, Lopez-Lastra M, Darlix J L, Dalcq M D. Efficient gene transfer in mouse neural precursors with a bicistronic retroviral vector[J]. J Neurosci Res, 2001, 65: 208-219.

[本文编辑] 尹 茶

• 更正启事 •

2009年3月20日出版的《第二军医大学学报》(第30卷,第3期)《性别差异对脓毒症大鼠血小板活化的影响》一文中,第250页,右栏,表2第1列第3行,“Mal(PLT/E2)”应为“Male(PLT/E2)”;《普卢利沙星片治疗呼吸和泌尿系统急性细菌性感染的多中心随机对照研究》一文中,第333页,右栏,表1第1列倒数第5行,“病程”应为“病程 t/d”。

特此更正,并向读者致歉!

《第二军医大学学报》编辑部