

Smurf1 基因靶向 RNAi 慢病毒载体的构建及转染

Construction of recombinant lentiviral vector of RNAi targeting Smurf1 gene and its expression in U20S cells

袁恒锋, 何崇儒, 高金巍, 徐卫东*

第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

[摘要] **目的** 构建 Smad 泛素调节因子 1 (Smurf1) 基因的 RNA 干扰 (RNAi) 慢病毒表达载体, 观察其转染骨肉瘤 U20S 细胞后对 Smurf1 基因表达的抑制作用, 为后续研究奠定基础。**方法** 构建 Smurf1 基因过表达质粒, 同时针对 Smurf1 基因序列设计合成 4 条 RNAi 片段并构建 RNAi 慢病毒载体。过表达质粒和 RNAi 质粒共转染 293T 细胞后应用 Western 印迹法进行外源筛选, 筛选出成功的干扰质粒 PSC2939。用慢病毒包装 PSC2939 后感染 U20S 细胞, 进行内源验证, 荧光定量 PCR 和 Western 印迹检测 U20S 细胞中 Smurf1 mRNA 及蛋白的表达。**结果** 经 PCR 及测序证实, Smurf1 基因过表达载体及 4 种干扰载体均成功构建; Western 印迹外源筛选显示, PSC2939 干扰载体能有效敲减目的基因的表达; 慢病毒包装后的 PSC2939 干扰载体能有效抑制 U20S 细胞中 Smurf1 蛋白的表达, 对 Smurf1 mRNA 的抑制率达到 60% 以上。**结论** 成功构建可供感染的 Smurf1 基因 RNAi 慢病毒载体, 为进一步研究 Smurf1 基因在骨肉瘤细胞中的作用提供了有效的实验工具。

[关键词] RNA 干扰; Smurf1; 骨肉瘤; 慢病毒属

[中图分类号] R 349.64

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2011)10-1147-04

Smurf1, 即 Smad 泛素调节因子 1 (Smad ubiquitin regulatory factor 1), 在骨形态发生蛋白诱导骨生成中起着重要作用^[1]。近年来, 有研究发现 Smurf1 对于调节肿瘤细胞的可塑性与运动性方面也有重要作用^[2], 同时, 基于阵列的比较基因组杂交分析显示 Smurf1 很可能是一种肿瘤相关基因^[3]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术作为基因功能研究的一种重要手段, 能特异性地下调细胞内目的基因的表达, 已被广泛应用于内源性基因功能和信号转导途径等的研究^[4]。慢病毒属载体具有在细胞中稳定转染的特性, 这使得 RNAi 慢病毒载体能够持续敲减目的基因, 继而实现长期沉默细胞内基因表达的效应^[5]。因此, 本研究构建人 Smurf1 基因靶向 RNAi 慢病毒载体, 并转染骨肉瘤 U20S 细胞, 观察其对 Smurf1 基因表达的影响, 为后期研究 Smurf1 基因在肿瘤细胞中的作用机制及可能的基因治疗手段提供前期实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 人骨肉瘤 U20S 细胞株购于中国科学院上海细胞库, 大肠杆菌菌株 DH5 α 、pGCL-GFP 载体、pFU-GW-RNAi 载体、pEGFP-N1-3FLAG 载体、pGC-LV 重组载体、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体购自上海吉凯基因技术有限公司, *Hpa*I、*Xho*I (NEB), ECL-PLUS/Kit (Amersham), BCA Protein Assay Kit (HyClone-Pierce), 转染试剂 Lipofectamine 2000、TRIzol、Opti-MEM (Invitrogen), M-MLV 反转录酶 (Promega), Rabbit anti-SMURF1 (Abcam), Mouse anti-GAPDH、Goat anti-Rabbit IgG、Goat anti-Mouse IgG (Santa Cruz), oligo dT [生工生物工程 (上海) 有限公司], dsDNA oligo

由上海吉凯基因技术有限公司合成。

1.2 Smurf1 基因过表达载体构建 在 cDNA 文库中, 利用 PCR 方法钓取 Smurf1 基因, 将 Smurf1 基因与 pEGFP-N1-3FLAG 载体分别进行酶切。酶切产物电泳回收后进行定向连接, 转化细菌感受态细胞。对长出的克隆先进行菌落 PCR 鉴定, 再对 PCR 鉴定阳性的克隆进行测序分析, 正确的克隆即为构建成功的目的质粒, 测序委托上海吉凯基因技术有限公司完成。

1.3 Smurf1 基因 RNA 干扰慢病毒载体制备 根据 Smurf1 基因 (NM_020429) 信息, 按照 RNA 干扰序列设计原则, 设计 4 条 RNA 干扰靶点序列 (5'-3'), PSC-1: GAG ATA CGA AAG AGA TCT A (GC% = 36.84%); PSC-2: GGT TAC ACC ACA TCA TGA A (GC% = 42.10%); PSC-3: CTC AAC CGA CAC TGT GAA A (GC% = 47.36%); PSC-4: CCT GAT AGA CGC GAA CAC A (GC% = 52.63%)。据上述 4 条序列设计 4 对互补的单链 DNA (表 1), 两端为限制性内切酶 *Hpa*I 和 *Xho*I 酶切位点的黏性末端, 引物退火形成带黏性末端的双链。*Hpa*I 和 *Xho*I 双酶切 pFU-GW-RNAi 质粒使其线性化。将双链 DNA 和酶切回收的载体 DNA 连接, 将连接好的产物转入制备好的大肠杆菌感受态细胞, 对长出的克隆先进行 PCR 鉴定, 再进行测序, 鉴定阳性的克隆即为构建成功的 Smurf1 基因 RNA 干扰慢病毒载体。

1.4 外源筛选 将构建好的 Smurf1 基因表达质粒和针对 Smurf1 基因不同干扰靶点的 RNAi 病毒载体质粒, 共转染 293T 细胞。实验分成以下几组, NC1 组: 共转染过表达质粒和空载质粒细胞组; NC2 组: 共转染过表达质粒和阴性对照

[收稿日期] 2011-02-08

[接受日期] 2011-07-25

[基金项目] 上海市基础研究重点项目 (08JC1406700)。Supported by Shanghai Key Basic Research Project (08JC1406700)。

[作者简介] 袁恒锋, 硕士生。E-mail: yuanhengfengggg@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81873393, E-mail: xuwdshanghai@126.com

病毒载体质粒细胞组;CON组:不转染任何质粒的293T细胞组;KD组:共转染过表达质粒和RNAi靶点病毒载体质粒细胞组,其中KD1、2、3、4为含有针对目的基因的不同干扰靶

点序列的RNAi病毒载体质粒序号。转染24h荧光显微镜下观测转染效果,转染36h收集细胞抽提蛋白,采用Western印迹法检测目的蛋白的表达情况,判断不同靶点的干扰效果。

表1 病毒载体构建框架

No.	5'	Stemp	Loop	Stemp	3'
PSC2939-1	T	CAGAGATACGAAAGAGATCTA	TTCAAGAGA	TAGATCTCTTTTCGTATCTCTG	TTTTTTC
PSC2939-2	TCGAGAAAAAA	CAGAGATACGAAAGAGATCTA	TCTCTTGAA	TAGATCTCTTTTCGTATCTCTG	A
PSC2940-1	T	AAGGTTACACCACATCATGAA	TTCAAGAGA	TTCATGATGTGGTGTAACCTT	TTTTTTC
PSC2940-2	TCGAGAAAAAA	AAGGTTACACCACATCATGAA	TCTCTTGAA	TTCATGATGTGGTGTAACCTT	A
PSC2941-1	T	CACTCAACCGACACTGTGAAA	TTCAAGAGA	TTTCACAGTGTGGTGTGAGTG	TTTTTTC
PSC2941-2	TCGAGAAAAAA	CACTCAACCGACACTGTGAAA	TCTCTTGAA	TTTCACAGTGTGGTGTGAGTG	A
PSC2942-1	T	CACCTGATAGACGCGAACACA	TTCAAGAGA	TGTGTTTCGCGTCTATCAGGTG	TTTTTTC
PSC2942-2	TCGAGAAAAAA	CACCTGATAGACGCGAACACA	TCTCTTGAA	TGTGTTTCGCGTCTATCAGGTG	A

1.5 慢病毒包装与内源验证 将编码慢病毒颗粒的pGC-LV-Smurfl重组载体及其2种辅助包装元件载体质粒(pHelper 1.0,pHelper 2.0)共3种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提,共转染293T细胞,转染后8h更换为完全培养液,培养48h后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,在293T细胞中使用逐孔稀释滴度测定法测定并标定病毒滴度。培养生长状态良好的U20S细胞,病毒感染前1d将U20S细胞分入6孔板培养,感染当天按实验设计的组别加入慢病毒颗粒进行目的细胞的感染实验。实验分成3个组别,CON组:正常目的细胞、未感染任何病毒的细胞组;NC组:正常目的细胞+阴性对照病毒感染的细胞组;KD组:正常目的细胞+RNAi靶点病毒感染的细胞组。感染3d后荧光显微镜下观察GFP表达情况,计算荧光率。待细胞长满培养板收集细胞检测。收集生长状态良好的目的细胞,提取RNA,并反转录成cDNA,采用real-time PCR法检测目的基因的表达情况。收集生长状态良好的目的细胞,提取蛋白,采用Western印迹法检测目的基因蛋白的表达情况。

1.6 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,两组间比较使用t检验,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 Smurfl基因过表达载体及RNAi慢病毒载体的构建 电泳鉴定PCR产物,阳性转化子得到402bp的条带(图1),阳性克隆测序结果分析,与目标序列完全一致。退火得到的vRNAi双链DNA与载体连接后,阳性克隆片段为343bp,为载体构建成功的阳性菌落(图2);挑选阳性克隆测序,4种序列慢病毒质粒载体测序结果证明重组慢病毒质粒载体的插入序列与设计序列一致,提示慢病毒质粒构建成功。

2.2 RNAi有效靶点的筛选 Western印迹法检测Smurfl蛋白的表达水平,从两次实验的结果可以看到,KD1即PSC2939靶点对Smurfl基因有明显敲减作用,敲减效应在两个质粒浓度下保持一致。当干扰质粒量从0.25 μ g增加到0.5 μ g时,Smurfl的表达量普遍下降,可能是由于转染干扰质粒总量增加而过表达质粒的比例相对减少导致的。结果提示KD1为筛选出的有效靶点(图3)。

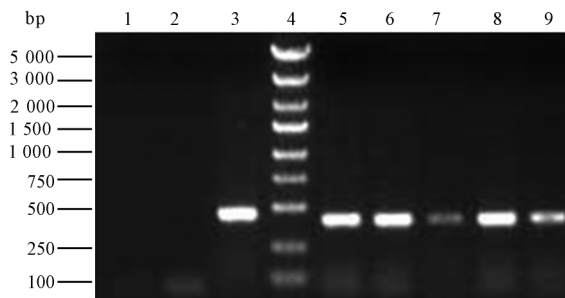


图1 PCR阳性克隆鉴定图

1: 阴性对照(ddH₂O); 2: 阴性对照(Vector); 3: 阳性对照(GAP-DH); 4: Marker; 5~9: Smurfl阳性转化子

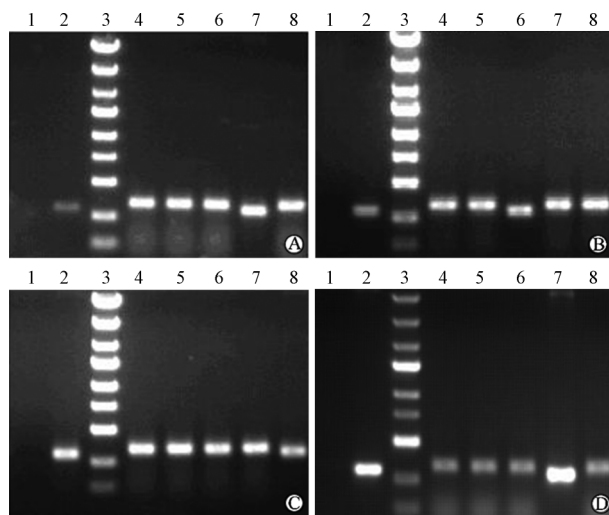


图2 4种Smurfl基因干扰质粒的PCR鉴定图

A: PSC-1; B: PSC-2; C: PSC-3; D: PSC-4. 1: 阴性对照(ddH₂O); 2: 阴性对照(Vector); 3: Marker(5 kb,3 kb,2 kb,1.5 kb,1 kb,750 bp,500 bp,250 bp,100 bp); 4~8: Smurfl基因干扰质粒

2.3 慢病毒包装与内源验证 慢病毒包装后48h后的293T细胞生长状态好,荧光显微镜下显示绿色荧光强度高,表明慢病毒包装成功。浓缩后得到慢病毒浓缩液,滴度测定为4 \times 10⁹ TU/ml,符合后续实验的要求。成功包装后的慢病毒载体,其干扰目的细胞U20S细胞的感染效率达到80%以

上(图 4)。KD 对 Smurf1 基因在 mRNA 和蛋白质水平上都有显著的敲减效果,相对 NC,KD 对 Smurf1 基因抑制率达到 60%以上($P < 0.01$,图 5)。

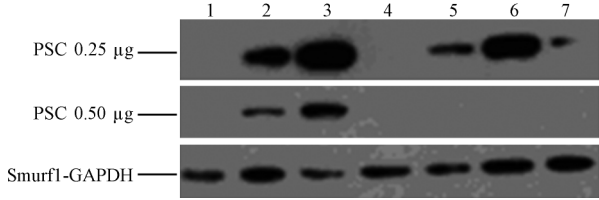


图 3 有效靶点的筛选

1: CON; 2: NC1; 3: NC2; 4~7: KD1,2,3,4

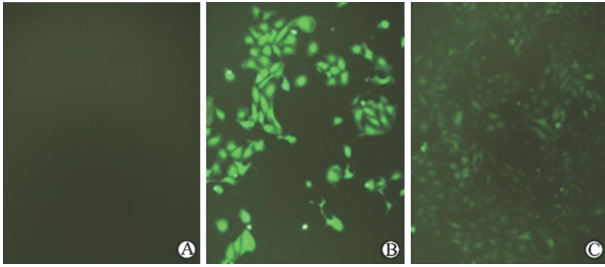


图 4 Smurf1-RNAi 转染 U2OS 细胞 72 h 后
荧光显微镜下观察各组 GFP 表达情况

A: CON; B: KD; C: NC. Original magnification: $\times 100$

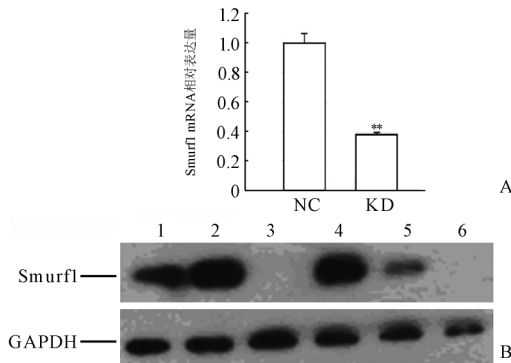


图 5 内源验证结果

A: Smurf1 mRNA 定量 PCR 结果。* * $P < 0.01$ 与 NC 组相比, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$; B: Smurf1 蛋白 Western 印迹结果。1,4: CON 组; 2,5: NC 组; 3,6: KD 组

3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由内源性或外源性双链 RNA 引发的转录后基因沉默,产生相应的功能表型缺失的现象,该技术已成为研究特定基因功能的最有效工具。慢病毒属于反转录病毒科,慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载体,是目前基因治疗中常见的目的基因转移工具。该载体对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染的能力,并且在体内表达时间长、免疫反应小、安全性较高等优点。本研究所使用的慢病毒具有“自杀性”,即病毒感染目的细胞后无法再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。从荧光观察结果

可见,本实验 U2OS 细胞干扰后未出现明显异常,生长状态良好,且感染效率达到 80% 以上,real-time PCR 及 Western 印迹检测证实,构建的慢病毒载体对 U2OS 细胞中 Smurf1 基因有显著的敲减效果。这说明本实验构建的慢病毒载体可以满足后续实验的进一步研究。

Smurf1 属于 E3 泛素连接酶家族一员,主要功能为特异性识别靶蛋白底物。泛素的作用是标记需要被降解的蛋白质,继而能够使这些被标记的蛋白在蛋白酶体中被降解。Smurf1 含有 1 个 HECT 结构域,在该结构域的羧基端有 1 个高度保守的半胱氨酸残基,该半胱氨酸与泛素之间可形成硫脂键,一旦将这个高度保守的半胱氨酸残基突变为丙氨酸或甘氨酸后,Smurf1 便完全丧失其泛素化和降解特定蛋白质的活性^[6]。目前关于 Smurf1 研究报道较多的主要是其通过与 Smad1 和 Smad5 作用,从而引发这些 Smad 蛋白及其相互作用蛋白质的泛素化和降解^[7]。

近年来,有研究指出,Smurf1 基因的功能可能有所拓展,主要表现为控制细胞运动时的极化、延伸及迁移活动^[8]。研究发现 Smurf1 主要是通过降解 RhoA 来实现细胞的上述变化^[2]。肿瘤细胞的转移是引起癌症患者治疗失败和死亡的首要原因,是一个涉及多基因参与的复杂过程。目前关于 Smurf1 基因与肿瘤转移方面的认识还处于初步阶段。有研究^[3,9]通过比较基因组学分析得出 Smurf1 基因可能为胰腺癌发生的新候选基因。Fukunaga 等^[10]发现 Smurf2 可通过诱导 Smurf1 的降解来阻止乳腺癌的迁移。因此,可以说 Smurf1 与肿瘤转移关系密切,然而 Smurf1 介导肿瘤细胞迁移和侵袭的机制及其参与的信号通路并不清楚。因此,本研究运用 RNA 干扰技术,成功构建了特异性干扰 Smurf1 基因的慢病毒载体,并在 mRNA 和蛋白水平得到了验证,这为进一步研究 Smurf1 基因在肿瘤转移发生发展中的作用机制提供了有效的实验工具。

[参考文献]

- [1] Zhao M, Qiao M, Harris S E, Oyajobi B O, Mundy G R, Chen D. Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 12854-12859.
- [2] Sahai E, Garcia-Medina R, Pouyssegur J, Vial E. Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility [J]. *J Cell Biol*, 2007, 176: 35-42.
- [3] Suzuki A, Shibata T, Shimada Y, Murakami Y, Horii A, Shiratori K, et al. Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99: 986-994.
- [4] Hannon G J. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- [5] Singer O, Verma I M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis [J]. *Curr Gene Ther*, 2008, 8: 483-488.
- [6] Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana J L, Thomsen G H. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation [J]. *Nature*, 1999, 400: 687-693.
- [7] Sangadala S, Metpally R P, Reddy B V. Molecular interaction

- between Smurf1 WW2 domain and PPXY motifs of Smad1, Smad5, and Smad6—modeling and analysis[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2007, 25: 11-23.
- [8] Zhang Y, Wang H R, Wrana J L. Smurf1; a link between cell polarity and ubiquitination[J]. *Cell Cycle*, 2004, 3: 391-392.
- [9] Bashyam M D, Bair R, Kim Y H, Wang P, Hernandez-Boussard T, Karikari C A, et al. Array-based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer[J]. *Neoplasia*, 2005, 7: 556-562.
- [10] Fukunaga E, Inoue Y, Komiya S, Horiguchi K, Goto K, Saitoh M, et al. Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 35660-35667.

[本文编辑] 周燕娟, 贾泽军