

## 小鼠动力蛋白激活蛋白 1-shRNA 慢病毒载体的构建及在足细胞中的敲低效应

傅 鹏<sup>1△</sup>, 原 理<sup>2△</sup>, 李金花<sup>3</sup>, 王春花<sup>1</sup>, 李 林<sup>4</sup>, 原爱红<sup>1\*</sup>, 马 骏<sup>1\*</sup>

1. 同济大学附属同济医院肾内科, 上海 200065
2. 上海市中西医结合医院急诊科, 上海 200082
3. 江西省九江市中医医院肾六科, 九江 332000
4. 第二军医大学长征医院肾内科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 构建表达小鼠动力蛋白激活蛋白 1(dynactin-1)特异性 shRNA 的慢病毒载体,并检测其对小鼠足细胞 dynactin-1 的敲低效果。**方法** 针对小鼠 dynactin-1 mRNA 序列,设计合成 3 种 shRNA,克隆到入门质粒 pENTR/pTER 中,再利用 LR 反应重组到 pLenti X2 Puro 慢病毒目的质粒,经过酶切测序鉴定后,将慢病毒质粒和包装质粒共转染 293FT 细胞,包装得到病毒颗粒。各组 shRNA 病毒载体转染小鼠足细胞后,用嘌呤霉素抗性筛选细胞,利用蛋白质印迹法检测各组细胞中 dynactin-1 蛋白的表达水平。**结果** 构建的各组 shRNA 入门质粒和慢病毒载体经酶切及测序鉴定正确;慢病毒载体与慢病毒包装质粒共转染 293FT 细胞,制备病毒颗粒,转染小鼠足细胞,经嘌呤霉素筛选获得稳定表达 shRNA 的足细胞系;蛋白质印迹检测结果表明转染 dynactin-1-shRNA 组的 dynactin-1 蛋白表达降低。**结论** 构建的小鼠 dynactin-1-shRNA 慢病毒载体能有效降低小鼠足细胞中 dynactin-1 蛋白表达,为进一步研究 dynactin-1 在足细胞中的功能奠定了基础。

**[关键词]** 动力蛋白激活蛋白 1; RNA 干扰; 慢病毒; 足细胞

**[中图分类号]** Q 782 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1077-05

### Construction of mouse dynactin-1-shRNA lentiviral vector and its knockdown efficiency in mouse podocytes

FU Peng<sup>1△</sup>, YUAN Li<sup>2△</sup>, LI Jin-hua<sup>3</sup>, WANG Chun-hua<sup>1</sup>, LI Lin<sup>4</sup>, YUAN Ai-hong<sup>1\*</sup>, MA Jun<sup>1\*</sup>

1. Department of Nephrology, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065, China
2. Department of Emergency Medicine, Shanghai TCM-integrated Hospital, Shanghai 200082, China
3. Department of Nephrology (6), Jiujiang TCM Hospital, Jiujiang 332000, Jiangxi, China
4. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To construct the lentiviral vector carrying shRNA of mouse dynactin-1 and to identify its knockdown efficiency of dynactin-1 by infecting mouse podocytes. **Methods** Three pairs of shRNA targeting mouse dynactin-1 were synthesized and subcloned into *Bgl* II-*Hind* III digested pENTR/pTER entry vectors. Then the entry vectors were transferred into pLenti X2 Puro destination vector by LR Clonase reaction. All the constructs were verified by restriction enzyme digestion and sequencing. The pLentiX2 Puro/dynactin-1-shRNA vectors and the packaging vectors were co-transfected into 293FT cells to produce dynactin-1-shRNA lentiviruses, which were used to transfect podocytes and the cells were screened by puromycin resistance. The expression of dynactin-1 protein in podocytes was analyzed by Western blotting analysis. **Results** Restriction enzyme digestion and sequencing analysis confirmed that the dynactin-1-shRNA lentivirus vector was successfully constructed. The podocyte cell lines stably expressing dynactin-1-shRNA were obtained by puromycin selection. Western blotting analysis indicated that dynactin-1 protein expression was down-regulated by dynactin-1-shRNA lentiviral vector in podocytes. **Conclusion** We have successfully constructed lentiviral vector of dynactin-1-shRNA, which can effectively down-regulate dynactin-1 protein expression, providing a basis for further studying the role of dynactin-1 in podocytes.

**[收稿日期]** 2012-06-15 **[接受日期]** 2012-06-27

**[基金项目]** 上海市自然科学基金(09ZR1434800). Supported by National Natural Science Foundation of Shanghai (09ZR1434800).

**[作者简介]** 傅 鹏, 博士, 副主任医师. E-mail: fupeng1966@qq.com; 原 理, 硕士, 主治医师. E-mail: theory1999@sohu.com

△共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-66111069, E-mail: aihongyuanxn00@126.com; Tel: 021-62893869, E-mail: ma-jun@medmail.com.cn

[Key words] dynactin 1; RNA interference; lentivirus; podocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10): 1077-1081]

动力蛋白激活蛋白(dynactin)是一种重要的微管相关的马达蛋白,它是由5个大小不同的亚单位构成的复合体,通过激活动力蛋白(dynein)而参与细胞核迁移、有丝分裂纺锤体定位、细胞骨架再组装以及细胞内物质输送等重要的细胞生命活动。dynactin-1(又名p150<sup>Glued</sup>)是动力蛋白激活蛋白的重要亚单位,相对分子质量为150 000<sup>[1]</sup>。我们前期研究证实糖尿病肾病中足细胞 dynactin-1 表达显著下降(待发表),提示足细胞 dynactin-1 功能紊乱与糖尿病肾病发病有关。为进一步研究 dynactin-1 在糖尿病肾病足细胞损伤中的细胞分子机制,本研究拟构建小鼠 dynactin-1 特异性 shRNA 慢病毒载体,转染小鼠足细胞,通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术<sup>[2]</sup>降低小鼠足细胞中 dynactin-1 蛋白的表达,为研究 dynactin-1 在足细胞中的功能奠定实验基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料 pENTR/pTER (# 17453) 和

pLenti X2 Puro DEST (# 17296)购自 Addgene 公司;慢病毒包装质粒(pPL1, pPL2, pLP/VSVG)和 pLenti X2/control-shRNA 质粒由日本名古屋大学医学部黄哲博士提供;感受态大肠杆菌 NEB5-alpha 购自 NEB 公司;One Shot Stbl3 购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶购自 Fermentas(Thermo) 公司;Quick Ligation Kit 购自 NEB 公司;LR Clonase 购自 Invitrogen 公司;Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 购自 Promega 公司;条件性永生化的小鼠足细胞系由复旦大学附属华山医院肾内科郝传明教授馈赠;shRNAoligo 由 Invitrogen 公司合成;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;Mouse Anti-p150 [Glued] 购自 BD 公司。

1.2 shRNA 的设计 通过小鼠 dynactin-1(NCBI Accession: NM\_007835)的敲低(knock down)实验,筛选出3条有效的小鼠 dynactin-1-siRNA 靶序列,将靶序列两端加上内切酶位点(*Bgl* II 和 *Hind* III),中间加上 loop 序列,合成 shRNA 正负链寡核苷酸(表1)。

表 1 Dynactin-1-shRNA 寡核苷酸序列  
Tab 1 Sequence of dynactin-1-shRNA oligonucleotides

Name	Target	Oligo	5'-Adapter	Sense strand	Loop	Antisense strand	3'-Adapter
shRNA-1	511-529 bp	Sense	gatccc	ggaagtatttcacatgtga	gtgtgctgtcc	tcacatgtgaaatacttcc	ttttggaaa
		Antisense	agcttttccaaaa	ggaagtatttcacatgtga	ggacagcacac	tcacatgtgaaatacttcc	gg
shRNA-2	2 317-2 335 bp	Sense	gatccc	gtgtggacgtgtataagaa	gtgtgctgtcc	ttctatacacgtccacac	ttttggaaa
		Antisense	agcttttccaaaa	gtgtggacgtgtataagaa	ggacagcacac	ttctatacacgtccacac	gg
shRNA-3	4 008-4 026 bp	Sense	gatccc	caagatgacacagctctaca	gtgtgctgtcc	tgtagactgtgtcatcttg	ttttggaaa
		Antisense	agcttttccaaaa	caagatgacacagctctaca	ggacagcacac	tgtagactgtgtcatcttg	gg

1.3 shRNA 入门(Entry)载体的构建及鉴定 将互补的 shRNA 寡核苷酸进行退火,合成双链 DNA 片段;pENTR/pTER 用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 回收和纯化质粒片段;用 Quick Ligation Kit 把 shRNA 片段克隆到 pENTR/pTER,转化感受态大肠杆菌 NEB5-alpha,得到3种 shRNA 质粒载体;取阳性克隆菌落抽提质粒,*Eco*R I 酶切鉴定,CEQ8000 DNA Analysis System (Beckman Coulter)测序(测序用 pENTR-R 引物为 5'-ATG GCT CAT AAC ACC CCT TG-3')。

#### 1.4 慢病毒载体的构建及鉴定 pENTR/pTER-

shRNA Entry 质粒 100 ng, pLenti X2 Puro 150 ng, 用 TE buffer 调到 8 μl 体积,最后加 LR Clonase 2 μl, 25℃ 反应 2 h,加蛋白酶 K 1 μl, 37℃ 反应 10 min 后,取反应液 1 μl 转化感受态大肠杆菌 One Shot Stbl3,得到阳性克隆,提取质粒后得到 pLenti X2 Puro/dynactin-1-shRNA 慢病毒载体,用 *Eco*R V 酶切鉴定。

1.5 慢病毒包装及浓缩 取对数生长期的 293FT 细胞,按每皿 4×10<sup>6</sup> 个细胞接种于 10 cm 培养皿;第 2 天将慢病毒包装质粒 pPL1 7.5 μg, pPL2 3.0 μg, pLP/VSVG 1.0 μg 和 shRNA 慢病毒载体质粒 5.0 μg 溶于 1.6 ml Opti-MEM 中, Lipofectamine 2000

转染试剂 40  $\mu$ l 溶于 1.6 ml Opti-MEM 中, 室温下温育 5 min 后, 将质粒稀释液和 Lipofectamine 2000 稀释液混匀, 室温下温育 20 min, 然后将混合液移到 293FT 细胞培养液中, 混匀, 培养过夜后换新鲜培养液; 48 h 后回收上清, 3 500 $\times g$  离心 15 min, 去细胞碎片, 上清液超离心 (15 000 $\times g$  离心 1.5 h), 浓缩成 1/10 体积, 用于转染细胞。

**1.6 病毒的转染及细胞的筛选** 小鼠足细胞培养于 RPMI 1640+10% FBS+100 U/ml 青霉素+100  $\mu$ g/ml 链霉素+10 U/ml 干扰素  $\gamma$ , 在 33 $^{\circ}$ C 条件下培养。将对数生长期的足细胞以每孔  $1.5\times 10^5$  的密度接种于 6 孔培养板, 第 2 天每孔加 2 ml 病毒培养液, 继续培养 24 h, 换新鲜培养液培养 24 h, 然后用含 1  $\mu$ g/ml 嘌呤霉素的培养液进行抗性筛选, 大约培养 3 d 后, 可以筛选出阳性细胞, 传代保存。

**1.7 敲低效果的检测** 病毒转染阳性的足细胞培养 4 d 后, 收集细胞, 提取总蛋白, 进行蛋白质印迹检测, 用小鼠抗 dynactin-1 单克隆抗体 (1:500) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, HRP 二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 然后用 ECL-prime 化学发光试剂进行显色, X 线胶片曝光, 检测各组蛋白表达; dynactin-1-shRNA-1 细胞培养 4 d 后, 用甲醇-丙酮 (1:1) 在 -20 $^{\circ}$ C 固定 20 min, 5% BSA 溶液封闭 40 min, 用小鼠抗 dynactin-1 单克隆抗体 (1:500) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, Alexa Fluor 488 Donkey Anti-mouse IgG (1:1 000) 二抗室温孵育 1 h, 封片后在荧光显微镜下观察。

## 2 结果

**2.1 Dynactin-1-shRNA 入门载体的构建及鉴定** pENTR/pTER 入门质粒 (Entry vector) 用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 连入退火后的 shRNA 双链 DNA, 构建 pENTR/pTER-shRNA 质粒。pENTR/pTER 质粒多克隆位点两侧有 2 个 *Eco*RI 酶切位点, 酶切后得到 260 bp 片段, 插入 shRNA (65 bp) 序列后则为 327 bp, 所以用 *Eco*RI 酶切可以判断克隆成功与否。本研究 3 种 shRNA 序列克隆, 经 *Eco*RI 酶切后 1% 琼脂糖电泳均得到 327 bp 片段 (图 1), 表明 shRNA 序列成功插入到载体。各载体用 pENTR-R 测序引物进行测序, 结果提示各插入序列与设计的序列完全一致 (图 2)。说明成功构建了 dynactin-1-shRNA 入门载体。

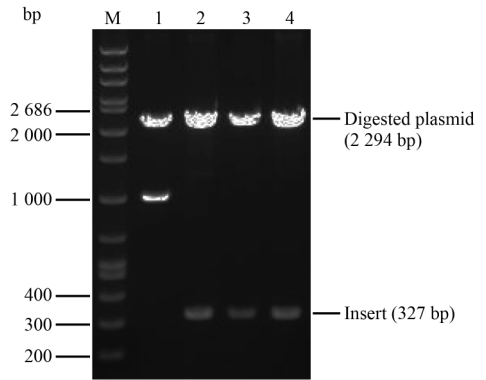


图 1 Dynactin-1-shRNA 入门载体的酶切鉴定

### Fig 1 Digestion of dynactin-1-shRNA entry vector by *Eco*RI

M: Marker; 1: pENTR/pTER; 2: shRNA-1; 3: shRNA-2; 4: shRNA-3. Insertion of the shRNA oligonucleotides resulting in a band around 327 bp as opposed to 1 019 bp for the pENTR/pTER vector

**2.2 Dynactin-1-shRNA 慢病毒载体的构建及鉴定** 将 dynactin-1-shRNA 入门载体通过 LR 反应转入到 pLenti X2 Puro 构建 dynactin-1-shRNA 慢病毒载体, 提取质粒后用 *Eco*RV 酶切来验证转入情况, 各阳性克隆酶切后电泳结果表明均得到预期相应大小的 3 个片段 (分别为 5 434、1 924、415 bp, 图 3)。表明成功构建了 dynactin-1-shRNA 慢病毒载体。

**2.3 Dynactin-1 敲低效果的检测** 将 pLentiX2 Puro/control-shRNA 和 pLentiX2 Puro/dynactin-1-shRNA 慢病毒颗粒转染小鼠足细胞后, 换成含有嘌呤霉素的培养液培养 3 d, 筛选并收集抗性转染的细胞, 用蛋白质印迹法检测 dynactin-1 的表达水平, 结果表明, 3 种 shRNA 均能下调 dynactin-1 的蛋白水平, 其中 shRNA-1 的敲低效果最好, 其次是 shRNA-3, 而 shRNA-2 效果最差 (图 4A)。免疫荧光染色结果表明 shRNA-1 转染细胞的 dynactin-1 的表达比对照组下降 (图 4B), 说明敲低成功。

## 3 讨论

足细胞 (podocyte) 即肾小球脏层上皮细胞, 分为细胞体、主足突和足突, 相邻足突交叉形成滤过裂隙膜, 又通过足突附着在肾小球基底膜 (GBM) 的外侧而支撑 GBM, 并同 GBM 和毛细血管内皮共同构成了肾小球血液滤过屏障<sup>[3]</sup>。关于足细胞的细胞生物学研究起步较晚, 因为足细胞是一种终末分化细胞, 具有非常特殊的形态即足突, 所以在建立具有足突结构的足细胞体外模型中遇到了很多困难, 直到 1997 年 Mundel 等<sup>[4]</sup>建立了温度调节诱导分化的小鼠足细胞

株(conditionally immortalized cell lines of podocyte), 这个细胞株在从 33℃ 培养改为 37℃ 培养时,细胞会停止分裂而开始分化,进而形成足突,是研究足突的理想细胞模型。Saleem 等<sup>[5]</sup>用同样的方法建立了人

肾小球足细胞系,为研究足细胞相关疾病提供了坚实的细胞学基础。我们采用条件性永生化的小鼠足细胞进行相关研究。

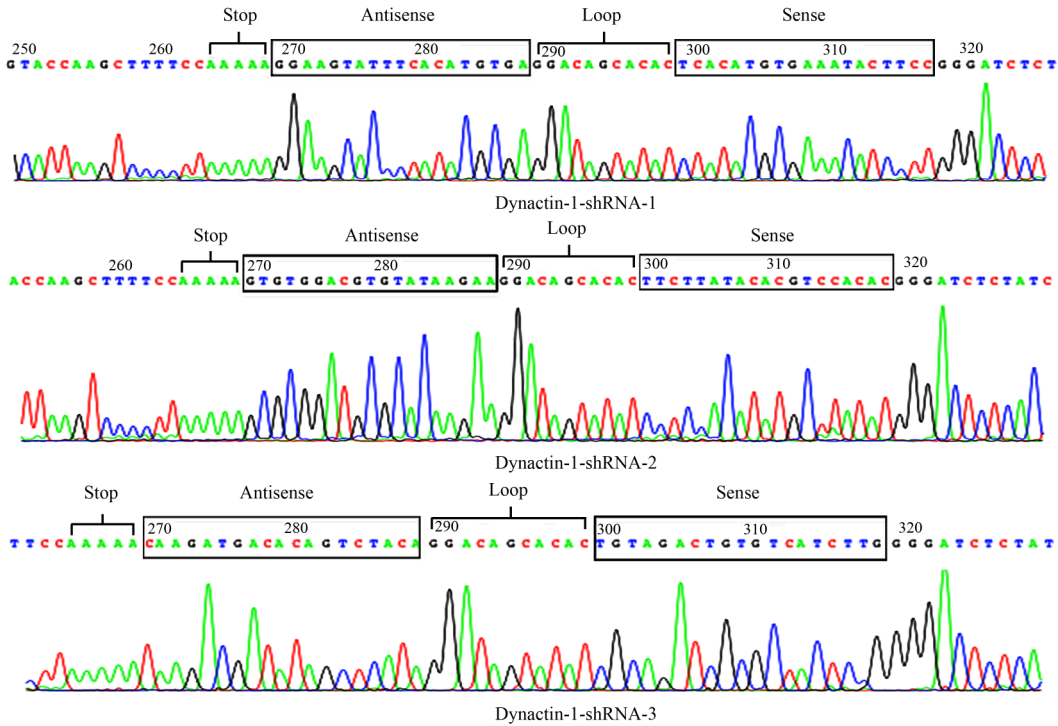


图 2 Dynactin-1-shRNA 入门载体的测序结果

Fig 2 Sequencing of dynactin-1-shRNA entry vector with the pENTR-R primer

The position of the sense and antisense recognition sequence for the shRNA against the mus dynactin-1, the miRNA loop and termination signal for RNA polymerase III are shown

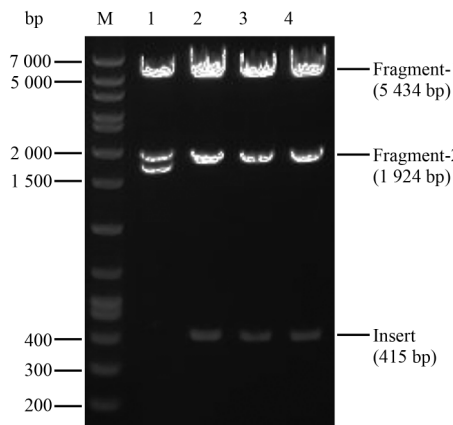


图 3 Dynactin-1-shRNA 慢病毒载体的酶切鉴定

Fig 3 Digestion of pLenti X2 Puro/pTER Dynactin-1-shRNA with EcoRV

M: Marker; 1: pLenti X2 Puro; 2: shRNA-1; 3: shRNA-2; 4: shRNA-3. Three clones encoding different shRNA in the pLenti X2 Puro destination vector were digested with EcoRV and analyzed by agarose gel electrophoresis. EcoRV cuts four times in the vector generating discrete band with correct size (5 434, 1 924, 415 and 35 bp). The three largest fragments confirmed that all clones are correct

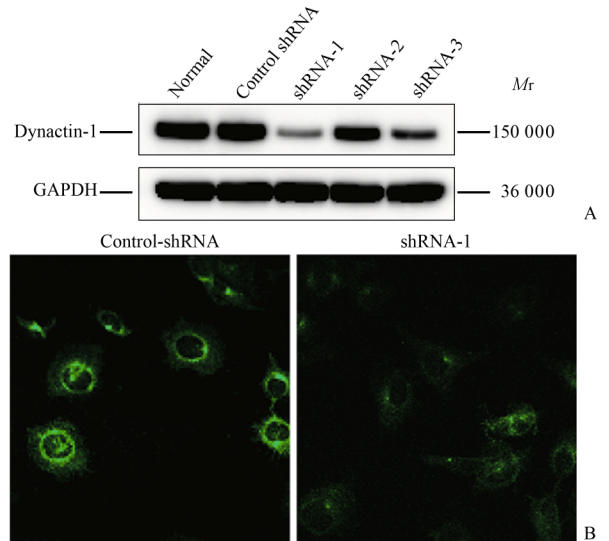


图 4 Dynactin-1 在小鼠足细胞中的表达

Fig 4 Dynactin-1 expression in mouse podocytes

A: The cells were transfected with shRNA vectors and collected for Western blotting analysis; B: Immunofluorescent detection of dynactin-1 knock-down. Dynactin-1 protein was detected using a dynactin-1 antibody and an Alexa488-labeled secondary antibody

目前较常用的 RNAi 有 siRNA 法和 shRNA 法。siRNA 法是化学合成 21 个碱基序列的双链 RNA, 用转染试剂直接转入细胞内, 达到基因沉默效果, 非常简便、有效, 但是基因沉默维持时间较短, 一般转染 4~6 d 后或细胞分裂十几次以后很快失效<sup>[6]</sup>, 所以不适合较长时间的基因沉默研究。shRNA 包括两个短反向重复序列, 中间由一茎环(loop)序列分隔, 组成发夹结构, 在 U6 或 H1 启动子的作用下表达并在 Dicer 酶的作用下分解成双链 siRNA<sup>[7]</sup>, 这种 shRNA 载体可以传代, 在体内长期稳定地抑制 mRNA, 适合长时间的基因沉默研究。

利用小鼠足细胞系的研究, 采用分化态细胞, 也就是无干扰素情况下 37℃ 培养 7~10 d 后细胞停止分裂后用于实验<sup>[8-9]</sup>, 因此用 siRNA 方法达不到有效的基因敲低效果; 另一个问题是在细胞停止分裂开始分化时, 用转染试剂转染 siRNA 或质粒的效率非常低。因此我们采用了慢病毒 shRNA 载体方法, 弥补上述缺点。慢病毒载体(lentiviral vector)是人类免疫缺陷病毒 1(HIV-1)来源的一种病毒载体, 能将目的基因(或 RNAi)导入到动物和各种细胞, 使 DNA 整合到宿主细胞的基因组中, 并随细胞基因组的分裂而分裂, 因此慢病毒载体介导的基因表达或 RNAi 干扰作用持续且稳定。慢病毒载体不仅分裂细胞, 还能有效感染并整合到非分裂细胞中如神经细胞和足细胞。这点与其他病毒载体相比更适合足细胞的转染。

本研究采用了 Dr. Eric Campeau 开发的慢病毒 Gateway 系统<sup>[10]</sup>, 病毒包装采用第 3 代包装系统<sup>[11]</sup>, 将携带 shRNA 的慢病毒载体转染小鼠足细胞后, 通过蛋白质印迹法检测了 dynactin-1 的敲低效果, 结果表明 3 种靶序列均有不同程度的敲低作用, 其中 shRNA-1 序列效果最强, 其次是 shRNA-3 序列, 可以用于 dynactin-1 在足细胞中的功能研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Schroer T A. Dynactin[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 759-779.
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [3] Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes[J]. *Annu Rev Physiol*, 2012, 74: 299-323.
- [4] Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson G R, Kriz W, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines[J]. *Exp Cell Res*, 1997, 236: 248-258.
- [5] Saleem M A, O'Hare M J, Reiser J, Coward R J, Inward C D, Farren T, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 630-638.
- [6] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411: 494-498.
- [7] Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, Hannon G J, Conklin D S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 948-958.
- [8] Mundel P, Reiser J, Kriz W. Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8: 697-705.
- [9] Shankland S J, Pippin J W, Reiser J, Mundel P. Podocytes in culture: past, present, and future[J]. *Kidney Int*, 2007, 72: 26-36.
- [10] Campeau E, Ruhl V E, Rodier F, Smith C L, Rahmberg B L, Fuss J O, et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells[J]. *PLoS One*, 2009, 4: e6529.
- [11] Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel R J, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system[J]. *J Virol*, 1998, 72: 8463-8471.

[本文编辑] 孙 岩