

◇基础医学研究◇

OPTN 基因 shRNA 真核表达载体的构建及干扰效应的检测

顾 彧, 范礼斌, 刘晓颖

摘要 目的 通过构建针对视神经病变诱导基因(OPTN)的 shRNA 的真核表达载体,并转染 HEK293FT 细胞,实现对 OPTN 基因表达的抑制,为进一步研究 OPTN 蛋白的分子机制奠定基础。方法 根据 Origene 中 OPTN 基因序列设计并合成能转录 shRNA 的双链 DNA 序列,插入真核表达载体 pRFP-C-RS 中,构建重组载体 pRFP-C-RS-shOPTN。经鉴定正确后转染 HEK293FT 细胞,荧光显微镜下观察 shRNA 转染情况,Western blot 法检测 OPTN 蛋白表达,检测其干扰效率;沙门菌感染实验检测沙门菌在细胞内的增殖,进一步检测 OPTN 蛋白干扰后对 OPTN 蛋白作为自噬受体功能的影响。结果 成功构建了针对 OPTN 基因的 shRNA 表达载体,转入 HEK293FT 细胞 72 h 之后,pRFP-C-RS-shOPTN 表达增强,OPTN 蛋白表达受到明显抑制;细胞内的沙门菌感染实验证明 OPTN 蛋白可以显著抑制沙门菌的增殖。结论 靶向 OPTN 基因的特异性 shRNA 转染 HEK293FT 细胞后可抑制 OPTN 蛋白表达效率达 80% 以上,可用于 OPTN 调控自噬的进一步研究,同时自噬调节蛋白 OPTN 可以显著抑制沙门菌在细胞内的增殖。

关键词 RNA 干扰; OPTN; 沙门菌

中图分类号 R 378.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)01-0001-04

Optineurin(OPTN)基因即视神经病变诱导基因,又名 FIP-2、GLC1E、NRP、HIP7、HYPL、TFIIIA-INTP,包括 13 个编码外显子和 3 个位于 5' UTR 的非翻译外显子,共有 16 个外显子,开放阅读框共有 2 077 bp,共编码 577 个氨基酸,位于 10p15-p14^[1-3]。其在心脏、脑、胎盘、骨骼肌、肾脏、肝脏、眼睛等组织器官中广泛表达,在眼睛中主要分布在小梁网状细胞、无色素睫状上皮和视网膜,与人类多种疾病有关^[4-5]。OPTN 的突变会导致青光眼和神经退行性疾病。该基因最早在原发性开角型青光眼与

共济失调(primary open angle glaucoma and ataxia, POAG)患者中发现,后来在家族性肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)家系和散发性 ALS 亲属的纯合子图谱中发现了 OPTN 基因突变。该研究通过构建针对 OPTN 的 shRNA 的真核表达载体,并转染 HEK293FT 细胞,实现对 OPTN 基因表达的抑制,为进一步研究 OPTN 分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株与载体 HEK293T 细胞为本实验室保存,pRFP-C-RS 真核表达载体(Origene 公司);DH5 α 感受态为本实验自制,-80℃保存。

1.1.2 主要试剂 T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 BamH I、Hind III、Bgl II、Xho I(美国 NEB 公司);质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒(美国 Ax-ygen 公司);转染试剂 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);DMEM 高糖培养基与胎牛血清(美国 Gibco 公司);OPTN 抗体(美国 Santa Cruz 公司); β -actin 抗体(美国 Sigma 公司);增强化学发光(ECL)显色试剂盒(美国 Pierce 公司)。

1.2 方法

1.2.1 shRNA 的设计 shRNA 的构建基于 pRFP-C-RS 载体,见图 1。同时包含阴性对照组 scramble 质粒(Origene 公司提供)。设计针对 OPTN 的 3 组干扰序列 shOPTN1、shOPTN2、shOPTN3。3 组干扰序列见表 1。构建 3 组 shRNA 片段(6 条),每条片段序列设计为 shRNA 序列(29 nt)紧接着一段茎(TCAAGAG)结构再接一段 shRNA 反向互补序列,分别合成正义链和反义链,5'端加 Bgl II 酶切黏性末端,3'端加 Hind III 酶切黏性末端,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成寡核苷酸单链。将合成的两条片段通过变性、退火(95℃ 5 min,55℃ 30,72℃ 10 min)形成带黏性末端的双链 DNA 分子,将双链 DNA 作为片段,进一步构建到 pRFP-C-RS 载体中。载体用 BamH I 和 Hind III 双酶切,BamH I 和 Bgl II 产生相同的黏性末端,通过连接酶相连,但产物中不再含有 BamH I 和 Bgl II 酶识别位点。

2013-08-30 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学重点科研项目(编号:KJ2010A187);安徽省自然科学基金(编号:11040606M170、11040606M164)

作者单位:安徽医科大学生命科学院生物学教研室,合肥 230032

作者简介:顾 彧 男 硕士研究生;

范礼斌 男 教授 硕士生导师,责任作者 E-mail: fan_libin@hotmail.com;

刘晓颖 女 副教授,责任作者 E-mail: xyz2848@sohu.com

表1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')
shOPTN1	F: TTTGAGGAGCTTTCGGCCTGGACAGAGAA
	R: TTCTCTGTCCAGGCCGAAAGCTCCTCAAA
shOPTN2	F: AGCACTGAACCTCCAGGTGACATCTCTGT
	R: ACAGAGATGTCACCTGGAGGTTCACTGCT
shOPTN3	F: CAACTGTGGAGAGGTTCTGCCTGACATAG
	R: CTATGTCAGGCAGAACCTCTCCACACTTG

1.2.2 pRFP-C-RS-shOPTN 真核表达载体的构建
 取 800 ng pRFP-C-RS 载体,以限制性核酸内切酶 BamH I、Hind III 水浴 37 °C 酶切 3 h,经 1% 琼脂糖凝胶电泳后纯化回收。取 200 ng 回收纯化后的载体 pRFP-C-RS 与 1 μg 退火后的双链 DNA 片段,加 1 μl 10 × T4 连接 buffer,在 1 μl T4 DNA 连接酶作用下,16 °C 水浴过夜连接,转化至 DH5α 感受态中,铺 LB/Amp 板,37 °C 孵箱培养过夜,挑取单克隆,摇菌抽质粒,酶切鉴定后并送测序鉴定。

1.2.3 细胞培养和转染 HEK293FT 细胞在含 10% 胎牛血清、0.1% 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基中培养。待细胞生长状况良好时,胰酶消化并接种于 6 cm 培养皿中,当细胞密度生长至约 70% 时,换成无双抗的 Opti-DMEM 培养基培养 40 min,并用无双抗的 Opti-DMEM 培养基将 Lipofectamine 2000(4 μl) 以及质粒(2 μg) 以 2 : 1 的比例混匀,室温孵育 20 min,再均匀加入相应培养皿中,转染 4 ~ 6 h 后换为含 10% 胎牛血清、0.1% 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基继续培养。转染 72 h 后荧光显微镜下观察 RFP 表达。

1.2.4 Western blot 检测 OPTN 的表达 转染 72 h 后收集细胞,经裂解液冰上裂解后低温 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,获得细胞总蛋白。加 5 × 上样缓冲液,100 °C 变性 10 min,经 SDS-PAGE 电泳分离,转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h。依次加入一抗 Anti-β-actin(工作浓度 1 : 1 000) 或一抗 Anti-OPTN(1 : 2 000) 以及相应二抗(1 : 2 000),ECL 显色,X 线片曝光、显影、定影。

1.2.5 沙门菌感染实验 取少量沙门菌菌液于无抗 LB 培养基中培养过夜,经稀释,各取 2 ml 已感染沙门菌无抗培养基并均匀加入已转染 OPTN 及 shOPTN2 稳定表达的 HEK293T 细胞内,感染 30 min,吸干培养基,1 × PBS 洗 3 次,各加入 2 ml 含 0.1% 庆大霉素培养基,培养 6 h 后收细胞。500 μl 裂解液冰上裂解 30 min,1 : 6 稀释后,各取 100 μl 裂解液均匀涂于无抗 LB 板,每组样品均涂 3 块无

抗 LB,37 °C 过夜培养后计数培养板上克隆生长数。

2 结果

2.1 重组载体 pRFP-C-RS-shOPTN 的构建与鉴定 载体 pRFP-C-RS 以 TCAAGAG 作为茎环结构,分别设计 3 组不同的干扰序列,5' 端加 Bgl II 酶切粘性末端,3' 端加 Hind III 酶切粘性末端,载体用 BamH I 和 Hind III 双酶切。BamH I 和 Bgl II 产生相同的粘性末端,通过连接酶相连,但产物中不再含有 BamH I 和 Bgl II 酶识别位点,如图 1 所示。所以酶切鉴定选用 BamH I 和 Xho I,若空载会切出一条特异性条带,约 3 kbp,若连接成功,则无法切开载体。如图 2 所示,shOPTN1、shOPTN2、shOPTN3 均成功接入载体,进一步测序,提示插入干扰序列正确,无碱基变异突变移码,说明载体构建成功。

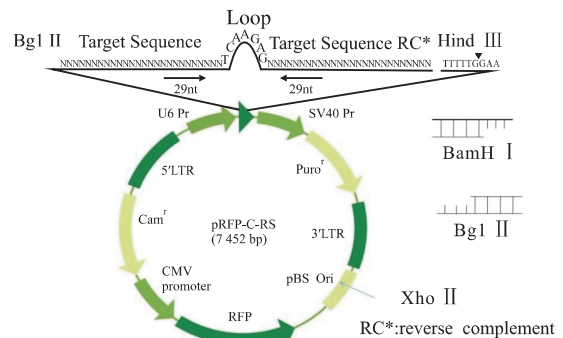


图1 载体构建示意图

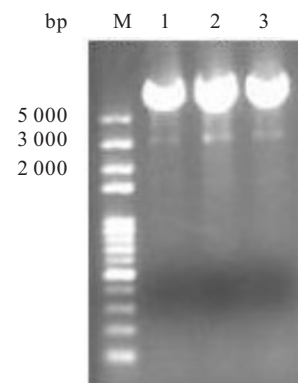


图2 重组载体 pRFP-C-RS-shOPTN 酶切鉴定结果
M: Marker; 1: shOPTN1; 2: shOPTN2; 3: shOPTN3

2.2 重组载体 pRFP-C-RS-shOPTN 的转染 分别将空载 vector、阴性对照质粒 scramble、shOPTN1、shOPTN2、shOPTN3 转染至 HEK293FT 细胞,72 h 后荧光显微镜下观察,各组 RFP 表达明显良好,说明转染效率很高,见图 3。

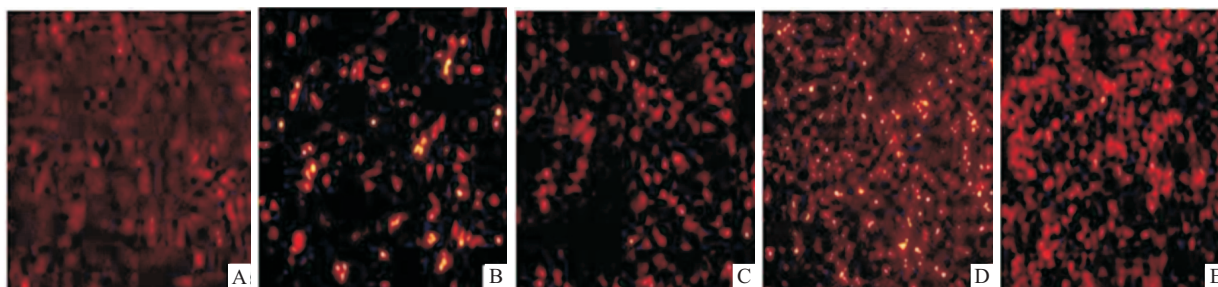


图3 重组载体转入 HEK293FT 细胞后 RFP 表达 ×40

A: 空载 vector; B: scramble; C: shOPTN1; D: shOPTN2; E: shOPTN3

2.3 Western blot 法检测 OPTN 的表达 空载 vector、阴性对照质粒 scramble、shOPTN1、shOPTN2、shOPTN3 转染 HEK293FT 细胞 72 h 后, 收细胞并做 Western blot 检测 HEK293FT 细胞内 OPTN 蛋白表达情况, 如图 4 显示, 构建的 3 组 shRNA 中 shOPTN2、shOPTN3 的 OPTN 表达水平明显低于 scramble 组, shOPTN 干扰效果明显。

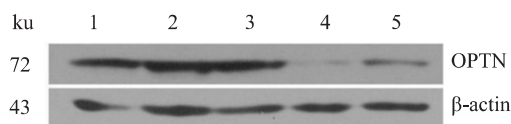


图4 OPTN 蛋白的表达

1: 空载 vector; 2: scramble; 3: shOPTN1; 4: shOPTN2; 5: shOPTN3

2.4 沙门菌感染法检测干扰效应 分别统计转入 OPTN、shOPTN2 并稳定表达以及未转入质粒的 CTRL 组平板上的克隆生长数, 平均每个平板克隆数为: CTRL 5 393 个(标准差 50.7); OPTN 2 798 个(标准差 54.8); shOPTN 9 688 个(标准差 46.3)。由图 5 可知, 在外源性 OPTN 的干扰下, 沙门菌生长受到抑制, 而转入 shOPTN2 之后, 内源性 OPTN 表达受到抑制, 促使沙门菌增殖迅速, 进一步证明 shOPTN 对 OPTN 的干扰效应。

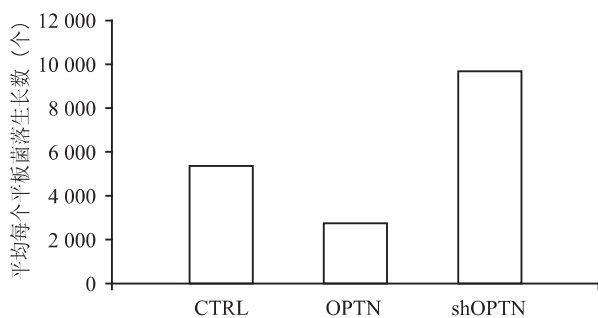


图5 shOPTN 对沙门菌增殖的影响

3 讨论

OPTN 蛋白含有多个结构域, 包括 LIR、UBAN、

NEMO-like domain、coiled-coil motif、锌指结构域等。可以通过 UBAN 结构域结合泛素通过蛋白酶体途径降解。OPTN(FIP-2) 单独不会导致人胚胎肾 293 细胞系凋亡, 但 OPTN(FIP-2) 基因表达可在肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 作用下上调。在 TNF- α 介导的杀伤作用中, OPTN 可以阻断 E3-44.7K 的保护性作用, 逆转 E3-44.7K 的抗凋亡作用, 因此被认为可能是 TNF- α 信号转导途径中的一员, 并将平衡引向诱导凋亡^[6-7]。有研究^[8]表明, ALS 以及其他一系列的神经退行性疾病发生与 OPTN 的突变密切相关, OPTN 突变或者蛋白调控失衡会导致这些疾病的发生, 但具体机制尚不清楚。

本研究构建特异性 shRNA 真核表达载体, 在细胞体内可持续生成大量 siRNA, 其抑制目的基因的效果和合成 siRNA 相似, 可以较长时间沉默靶基因的表达, 而且更加稳定。因为针对同一基因不同靶序列的 shRNA 对基因表达的抑制能力差别很大, 而且 shRNA 的抑制能力和转染效率、转染细胞类型等有关, 所以本研究利用 RNAi 技术首先成功构建了 3 组不同序列的特异性 shRNA 真核表达载体, 并选取了易于培养、对转染试剂毒性耐受性好的 HEK293FT 细胞做转染实验。同时本课题组也构建了对照 scramble 质粒用于检测抑制效果。转染 HEK293FT 细胞 72 h 后, 荧光显微镜鉴定转染成功, 且各组 RFP 表达明显良好, 说明转染效率很高。而稳定高效的转染效率可以为后续实验打下良好的基础。同时通过 Western blot 结果显示在转入 3 组不同序列的特异 shRNA 真核表达载体之后, OPTN 蛋白表达降低并且 shOPTN2 的抑制效果最为明显, 从而证实重组载体 pRFP-C-RS-shOPTN 在蛋白水平能明显抑制 OPTN 基因的表达, 并且使我们能筛选出抑制能力较强的一组 shOPTN。因为自噬受体 OPTN177 位 Ser 在 TBK1 介导下会被磷酸化^[9], 从而促进 OPTN 与 LC3 的结合, 增强 LC3 的亲合力,

并能促使胞内泛素化的沙门菌自噬,进而可以抑制沙门菌的增殖。所以进一步做了沙门菌感染实验,在转入 OPTN 后沙门菌生长明显受到抑制,而转入 shOPTN 后,沙门菌增殖增加,从而证明重组载体 pRFP-C-RS-shOPTN 对目的基因有特异性干扰作用,而且推测在 shRNA 成功的抑制了 OPTN 基因的表达之后,被 TBK1 磷酸化的 OPTN 会大大降低,进而减少结合 LC3/GABARAP,从而促进沙门菌感染的细胞内菌的清除也同时减弱,这也进一步表明 shRNA 对 OPTN 基因功能发挥着重要的影响。

参考文献

- [1] Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, et al. Localization of the fourth locus(GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-14 region[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(3): 641-52.
- [2] Rezaie T, Child A, Hitchings R, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin [J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1077-9.
- [3] Alward W L, Kwon Y H, Kawase K, et al. Evaluation of optineurin sequence variations in 1 048 patients with open-angle glaucoma[J]. *Am J Ophthalmol* 2003, 136(5): 904-10.
- [4] Kroeber M, Ohlmann A, Russell P, et al. Transgenic studies on the role of optineurin in the mouse eye [J]. *Exp Eye Res* 2006, 82(6): 1075-85.
- [5] Shen X, Ying H, Qiu Y, et al. Processing of optineurin in neuronal cells [J]. *J Biol Chem* 2011, 286(5): 3618-29.
- [6] Gauthier L R, Charrin B C, Borrell-Pages M, et al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules [J]. *Cell* 2004, 118(1): 127-38.
- [7] Anborgh P H, Godin C, Pampillo M, et al. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin [J]. *J Biol Chem* 2005, 280(41): 34840-8.
- [8] Li Y, Kang J, Horwitz M S. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha inducible cellular protein containing leucine zipper domains [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(3): 1601-10.
- [9] Wild P, Farhan H, McEwan D G, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth [J]. *Science* 2011, 333(6039): 228-33.

Construction of shRNA eukaryotic expression vector targeting OPTN gene and detection of interference effect

Gu Yu, Fan Libin, Liu Xiaoyin

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct shRNA against optineurin (OPTN) clone and transfect the construction into HEK293FT cells for inhibiting the expression of OPTN, which is laid the foundation for further research of molecular mechanism OPTN protein. **Methods** The insert of this clone was a double-strained DNA sequence against OPTN which would be transcribed into shRNA and it was synthesized according to the sequence in Origene. Expression vector pRFP-C-RS was employed to fuse the insert to get the construction and finally confirmed by sequencing. HEK293FT cells were transfected with the very clone pRFP-C-RS-shOPTN and RFP signals could be detected using fluorescence microscope. Western blot was further employed to check the protein level of OPTN. HEK293FT cells were transfected with the very clone pRFP-C-RS-shOPTN was then obtained to investigate the functional study of OPTN which was measured by *Salmonella* infection experiment. **Results** shRNA eukaryotic expression vector targeting OPTN gene was successfully constructed. HEK293FT cells were transfected with pRFP-C-RS-shOPTN and 72 hours later we observed strong RFP signals showing that shOPTN expressed. Western blot was further employed to check the protein level of OPTN which showed that OPTN expression was indeed interfered. *Salmonella* infection assays was then performed and showed that OPTN could inhibit the proliferation of *Salmonella* that has invaded HEK293FT cells. **Conclusion** HEK293FT cell line which expresses shRNA against OPTN show a sharp inhibition of OPTN protein expression by 80%. So this cell line can be further used to investigate how OPTN regulates autophagy as an autophagy receptor. Meanwhile we find that OPTN can be as a autophagy regulator and strongly suppress the proliferation of invasive *Salmonella in vivo*.

Key words RNAi; OPTN; *Salmonella*