

• 技术与方法 •

Grp78 基因过表达慢病毒载体构建和包装及鉴定*李亚文^{1,2}, 徐世元^{1△}, 张庆国¹, 李乐¹, 赖露颖¹, 郑艇¹, 苏娇玲², 杨耐梅², 李元涛²

(1. 南方医科大学珠江医院麻醉科, 广州 510282; 2. 南方医科大学附属深圳妇幼保健院麻醉科, 广东深圳 518028)

摘要:目的 探讨 *Grp78* 基因过表达慢病毒载体的构建、包装和滴度检测。方法 采用慢病毒载体, 运用基因工程技术, 获取目的基因片段并构建重组质粒, 然后制备感受态细胞并转化, 将重组质粒导入感受态细胞; 用 PCR 技术鉴定阳性克隆和进行 DNA 序列分析及对慢病毒包装和滴度检测。结果 阳性克隆测序比对结果说明测通。熔解曲线中既没出现杂峰也没出现主峰的异常增宽, 表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增。结论 *Grp78* 基因过表达慢病毒载体构建和包装成功。

关键词: *Grp78* 基因; 慢病毒载体; 基因工程

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.028

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)15-1904-03

To constructe, package and identificate the lentiviral vector with overexpression gene *Grp78**Li Yawen^{1,2}, Xu Shiyuan^{1△}, Zhang Qingguo¹, Li Le¹, Lai Luying¹, Zheng Ting¹, Su Jiaoling², Yang Naimei², Li Yuantao²

(1. Department of Anesthesiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Department of Anesthesiology, Shenzhen Maternity and Children Hospital, Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518028, China)

Abstract: Objective To constructe, package and identificate the lentiviral vector with overexpression gene *Grp78*. **Methods** We used lentiviral vector and genetic engineering technology to obtain the aim gene fragment and to constructe recombinant plasmid. we prepared competent cells and transform the cells. Through positive clone sequencing, lentivirus was packaged and virus titer was tested. **Results** Positive cloning sequence comparison results show that the test was passed. Melt curve did not appear mixed peak, also did not appear abnormal peak broadening. It means that does not appear pollution, primer dimers and nonspecific amplification in the experiments. **Conclusion** The construction, packaging and identification of lentiviral vector with over expression gene *Grp78* are successful.

Key words: *Grp78* gene; lentiviral vector; gene engineering

长期以来, 过表达 microRNA 质粒可直接用于细胞系转染表达, 是研究基因功能的重要方法。但用真核细胞构建的表达载体在细胞转染阶段存在转染率不高且周期长等弊端, 限制其广泛应用; 而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, 它既能感染分裂细胞又能感染非分裂细胞, 安全性高并可以在体内较长期地表达。本实验所用慢病毒载体感染目的细胞后不再感染其他细胞, 也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。

本研究通过构建 *Grp78* 基因过表达慢病毒表达载体, 为下一步感染 SH-SY5Y 细胞株, 进而研究 *Grp78* 在布比卡因神经毒性所致细胞凋亡和细胞损伤中的作用奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 (1) 主要试剂: 琼脂糖、PCR 试剂盒、Taq polymerase、dNTP、限制性内切酶、质粒抽提试剂盒。台盼蓝、胰酶、DMSO、DMEM、Lipofectamine 2000、细胞株: 293T; 菌株: 大肠埃希菌菌株 DH5 α ; 病毒载体: GV 载体、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体。(2) 主要仪器: PCR 仪、稳压 DNA 电泳仪、凝胶成像仪、培养箱、高速离心机、荧光显微镜、CO₂ 培养箱。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增目的基因 (1) 载体信息: GV261; 元件顺序: Ubi-MCS-IRES-Cherry; 克隆位点: AgeI/NheI。(2) 目的基

因片段 *Grp78* 引物, 上游: 5'-CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG AAG CTC TCC CTG GTG G-3'; 下游: 5'-AGT CGC TAG CCT ACA ACT CAT CTT TTT CTG CTG TAT C-3'。

1.2.2 制备感受态细胞及转化 CaCl₂ 法制备感受态细胞进行转化实验步骤如下: (1) 各取每种感受态细胞悬液 200 μ L 转移至无菌微量离心管中, 每管加入连接液 10 μ L, 轻轻旋转以混匀, 然后置冰中放置 30 min。制备感受态细胞, 使其具有摄取外源 DNA 的能力。(2) 42 $^{\circ}$ C 热休克 90 s。快速将管转移到冰浴中冷却细胞 1~2 min。每管加入 800 μ L LB 培养基。水浴加温至 37 $^{\circ}$ C, 然后放置摇床温育 45 min 以复苏细菌。(4) 将 150 μ L 转化感受态细胞转移到 AMP(100 μ g/mL) 抗性的 LB 琼脂培养基上。把平板置于室温直至液体被吸收。然后倒置平皿, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 16 h。(5) 克隆进行后续 PCR 鉴定。

1.2.3 重组质粒构建 PCR 产物接入线性化表达载体反应体系见表 1, 反应条件: 25 $^{\circ}$ C 30 min; 42 $^{\circ}$ C 15 min。

1.2.4 Lentivirus 病毒包装 消化 293T 细胞, 调整其密度为每 20 mL 有 1.2×10^7 个细胞, 接种细胞于培养皿中, 放置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 待细胞密度达 70%~80% 时可用于细胞转染。细胞状态对于病毒包装至关重要, 需要保证良好的细胞状态和较少的传代次数。转染前 2 h 将含胎牛血

清培养基更换为无血清培养基。向一离心管中加入制备的各 DNA 溶液 (pGC-LV 载体 20 μg 、pHelper 1.0 载体 15 μg 、pHelper 2.0 载体 10 μg) 与相应体积培养基混合均匀,调整总体积为 2.5 mL,室温下温育 5 min。将 Lipofectamine 2000 试剂轻柔摇匀,取 100 μL Lipofectamine 2000 试剂在另一管中与 2.4 mL Opti-MEM 培养基混合,室温下温育 5 min。把稀释后的 DNA 与稀释后的 Lipofectamine 2000 进行混合,轻颠混匀,避免振荡,且须 5 min 内混合。混合后室温下温育 20 min,然后将混合液转移至 293T 细胞培养液中,混合均匀,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。培养 8 h 后倒去培养基,每瓶细胞加入 20 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS),以洗涤残余混合液,移去混合液。每瓶细胞中加入含 10% 胎牛血清培养基 25 mL,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内继续培养 2 d。

表 1 PCR 反应体系

试剂	阳性对照	自连对照	实验组
ddH ₂ O(μL)	17.5-X-Y	17.5-X	17.5-X-Y
10 \times In-Fusion 交换酶缓冲液(μL)	2	2	2
In-Fusion 交换酶(μL)	0.5	0.5	0.5
线性化载体 DNA(μL)	X	X	X
纯化后 PCR 产物片段(μL)	Y	0	Y
总体积(μL)	20	20	20

X:线性化载体 DNA 的体积数;Y:纯化后 PCR 产物片段体积数。

1.2.5 Lentivirus 滴度测定

1.2.5.1 样品制备 293T 细胞传代,24 孔中每个孔加入 1×10^5 个细胞,体积为 500 μL ;次日准备 10 个无菌 Ep 管,每管中加 90 μL 培养基;取待测病毒原液 10 μL 加入到第一个管中,混合均匀,取混合均匀的第一管液 10 μL 加入到第二个管中继续相同的操作直到最后一管;选取所需细胞孔,吸去 90 μL 培养基。加稀释好的病毒溶液,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养;1 d 后,加入新鲜培养基 500 μL 。小心操作;4 d 后抽提 RNA。

1.2.5.2 总 RNA 抽提 去细胞上清液,每孔加入 1 mL Trizol,吹打,室温静置 5 min,转移至另一新 1.5 mL Ep 管中。每管加 200 μL 氯仿,用力震荡 15 s,室温下静置 15 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 15 min。从每管中吸取上清液至另一新 1.5 mL Ep 管中。加入等体积 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇,混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min,移去上清液。加入 1 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75% 乙醇,洗涤沉淀及离心管壁。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 r/min 离心 5 min,移弃上清液。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 r/min 再次离心 5 min,吸去残液,室温下干燥,不需完全干燥。加 20 μL 无 RNA 酶 (RNase) 水至完全溶解,紫外分析测定所抽提 RNA 浓度。

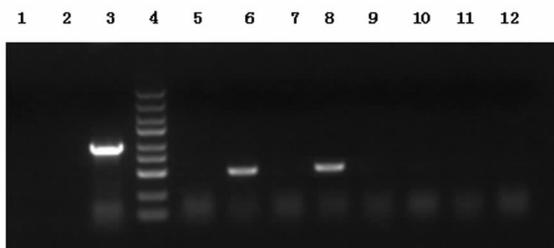
1.2.5.3 RNA 逆转录获 cDNA 将 1 μL Oligo dT (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 和 2.0 μg 总 RNA 加入 PCR 小管,补焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水至 9 μL 。混合均匀、离心,70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min。紧接着插入到 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰水浴中。按下表比例,根据反应管数算出所需试剂量。将 M-MLV 酶等在冰上混匀得到逆转录反应液。在每个反应管中加 11 μL 逆转录反应液,混合均匀后离心。其中,11 μL 逆转录反应液含 5 \times 逆转录缓冲液 4 μL 、10 mmol/L dNTPs 2 μL 、RNA 抑制剂 0.5 μL 、M-MLV-RTase 1 μL 、DEPC 水 3.5 μL 。在 42 $^{\circ}\text{C}$ 进行 1 h 完成逆转录反应,后用 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 使逆转录酶失活。逆转录反应产物 cDNA 可用

于 PCR,也可 -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

1.2.5.4 实时定量 PCR 检测 实时定量 PCR 在 Takara 的 TP800 PCR 仪上完成。配置反应体系:每管加入 SYBR premix ex Taq 10 μL 、上游引物 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1.0 μL 、下游引物 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1.0 μL 、cDNA 1.0 μL 、ddH₂O 7.5 μL 。设定程序为两步法实时定量 PCR。预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s;变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值,用于制作熔解曲线。PCR 结束后,在 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min。然后冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$,使 DNA 双链充分聚合。从 55 $^{\circ}\text{C}$ 开始到 95 $^{\circ}\text{C}$,每一步增加 0.5 $^{\circ}\text{C}$,保持 30 s,同时读取吸光值。两个循环后将调定点升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果

2.1 重组质粒构建结果 阳性转化子 PCR 产物大小:510 bp,见图 1。

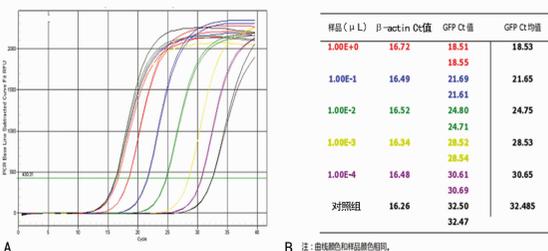


1:ddH₂O 阴性对照;2:空载自连阴性对照;3:阳性对照 (GAPDH);4:DNA 分子标记物自上而下依次为 5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp。5~12:Grp78 1~8 号转化子。

图 1 PCR 鉴定转化结果电泳图

2.2 病毒的收获及浓缩 收集转染后 2 d 的 293T 细胞上清液。4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 \times g 离心 10 min,以除去细胞碎片。用 0.45 μm 过滤器过滤上清液到 40 mL 超速离心管中。把病毒粗提液样品加入过滤杯中。将过滤杯插到滤过液收集管中,再 4 000 \times g 离心至所需病毒浓缩体积,时间 15 min。离心结束后取出离心装置,将过滤杯和滤过液收集杯分开。将过滤杯倒扣在样品收集杯上,离心力不超过 1 000 \times g,时间 2 min。过高转速会使样品损失。把过滤杯从样品收集杯上移开。样品收集杯中即为病毒浓缩液。将病毒浓缩液移出,进行分装;取其中一支进行滴度测定,其余置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

2.3 实时定量 PCR 法测定绿色荧光蛋白标记的慢病毒滴度



A:实时定量 PCR 曲线图;B:实时定量 PCR 具体数值。

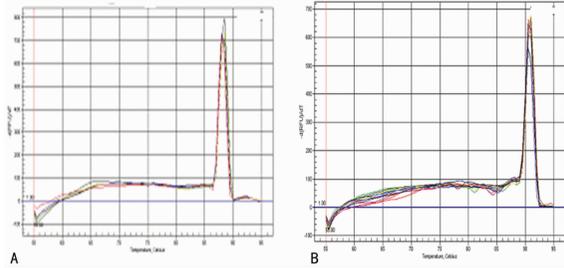
图 2 实时定量 PCR 曲线图

2.3.1 引物信息 绿色荧光蛋白 (GFP) 引物:被扩增的片段位于 211~496 bp 之间,其上游引物序列为 5'-TGC TTC AGC CGC TAC CC-3',熔点 T_m 为 57.4 $^{\circ}\text{C}$,GC 百分含量为 64.7%。下游引物序列为 5'-AGT TCA CCT TGA TGC CGT TC-3',熔点 T_m 为 57.3 $^{\circ}\text{C}$,GC 百分含量为 50.0%。 β -actin 被扩增的片段位置位于 932~1 233 bp 之间,其上游引物序列为 5'-GTG GAC ATC CGC AAA GAC-3',熔点 T_m 为 52.6 $^{\circ}\text{C}$,GC 百分

含量为 55.6%。下游引物序列为 5'-AAA GGG TGT AAC GCA ACT A-3', 熔点 T_m 为 51.0 °C, GC 百分含量为 42.1%。

2.3.2 实时定量 PCR 结果 在该次病毒滴度检测中, 1.00E-03 μ L 组样品与对照组样品的 Ct 值差异大于 3 以上, 故认定病毒颗粒存在于 1.00E-03 μ L 组样品中。见图 2。

2.4 β -actin、GFP 熔解曲线 见图 3。



A: β -actin; B: GFP。

图 3 β -actin、GFP 熔解曲线

3 讨论

通过慢病毒载体的构建、包装, 得到稳定表达的质粒; 该质粒能有效应用于研究 *Grp78* 基因过表达来减少细胞内质网应激反应^[1]。该质粒较采用真核细胞转染得到的质粒感染细胞的成功率高^[2-3]。观察 GFP 表达情况^[4-5], 在加入 1E-5 μ L 病毒原液的孔中观察到 3 个细胞存活, 说明该孔中至少有 3 病毒颗粒感染细胞, 且认为该病毒的滴度等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量。在加入 1E-6 μ L 病毒原液的孔中观察到 2 个带有荧光的细胞, 说明该孔中至少有 2 个病毒颗粒感染细胞, 且认为该病毒的滴度等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量, 即 $2/(1E-6) = 2E+6$, 单位为 TU/ μ L, 也就等于 2E+9 TU/mL。

加入不同病毒量的细胞样品, 通过提取总 RNA 后反转录为 cDNA, 然后进行定量 PCR 检测, 通过对照组与实验组的 Ct 值差异来判断滴度值。通常情况下认为 Ct 值差异 2 以上存在显著差异^[6]。反转录反应所获得 20 μ L cDNA 中只取 1 μ L 用于实时定量 PCR 检测, 该结果仅表示 1/20 样品的情况, 所以在滴度计算时乘以系数 20。

退火温度偏低, 可引起非特异性扩增。适当提高退火温度可降低非特异性扩增。故通过测量升高温度后荧光的变化可以帮助降低非特异产物的影响。非特异性条带的出现, 原因诸多, 引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体、退火温度过低、PCR 循环次数过多等。针对解决措施有降低引物量、减少循环次数、适当提高退火温度或采用二温度点法 (93 °C 变性, 65 °C 左右退火与延伸)。熔解曲线中, 由于 SYBR Green I 与所有双链 DNA 相结合, 引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量精确性。故由熔解曲线来分析产物的均一性更有助于准确分析 SYBR Green 实时定量 PCR 结果^[7-13]。

设立适当的阳性对照和阴性对照, 阳性对照以能出现扩增条带的最低量标准病原体核酸为宜, 注意交叉污染可能。每次反应都应有一管不加模板的试剂对照及相应不含有被扩增核酸的样品作阴性对照。PCR 结束后, 根据发生过程中荧光值变化绘出每个样品的熔解曲线。熔解曲线是扩增反应的质控途径, 图中没有出现杂峰, 也未出现主峰的异常增宽, 表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增。不同的扩增产物因为其长度和 GC 含量不同而在不一样的温度下解链, 当产物

解链时, SYBR Green I 的荧光值将降低并被仪器所监测。绘制熔解曲线时, 需实时定量 PCR 仪连续监测每个样品在从双链完全配对到完全解链的升温过程中荧光值的变化, 由此绘制出荧光强度随温度变化的负一次倒数图。荧光强度变化的拐点 (熔点, T_m) 即为熔解峰值。*Grp78* 过表达病毒载体的构建和包装成功, 为今后研究 *Grp78* 基因在布比卡因所致神经细胞损伤中的作用奠定基础, 进而为布比卡因神经毒性的防治打开一扇科学之门。

参考文献:

- [1] 李亚文, 徐世元, 张庆国, 等. 高糖环境诱导 SH-SY5Y 细胞 ROS 爆发-内质网应激增强布比卡因神经毒性[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [2] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors[J]. Nature, 2011, 475(7356): 386-389.
- [3] Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(4): 376-388.
- [4] Wang L, Zhou GB, Liu P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(12): 4826-4831.
- [5] Zheng J, Shen WH, Lu TJ, et al. Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth[J]. J Biol Chem, 2008, 283(19): 13280-13288.
- [6] Zhang H, Feng W, Liao W, et al. The gp130/STAT3 signaling pathway mediates beta-adrenergic receptor-induced atrial natriuretic factor expression in cardiomyocytes[J]. FEBS J, 2008, 275(14): 3590-3597.
- [7] Sun Y, Liu M, Yang B, et al. Role of siRNA silencing of MMP-2 gene on invasion and growth of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008, 265(11): 1385-1391.
- [8] Zhang L, Liu HJ, Li TJ, et al. Lentiviral vector-mediated siRNA knockdown of SR-PSOX inhibits foam cell formation in vitro[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(7): 847-852.
- [9] Federico M. Lentivirus gene engineering protocols[J]. Methods Mol Biol, 2003, 30(4): 458-460.
- [10] Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 241-245.
- [11] Sena-Esteves M, Tebbets JC, Steffens S, et al. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes[J]. J Virol Methods, 2004, 122(2): 131-139.
- [12] Reiser J. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors[J]. Gene Ther, 2000, 7(11): 910-913.