

iRhom2 及其突变基因重组慢病毒的包装和 稳定表达细胞系的建立

游颖, 马雨楠, 曾林*, 孙兆增*

(军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 通过重组慢病毒感染, 建立 *iRhom2* 及其突变基因的 Vero 细胞稳定细胞表达系, 用于 *iRhom2* 的功能研究。方法 将 *iRhom2* 及其突变基因克隆到慢病毒载体 Lenti-OE-Flag, 构建重组慢病毒载体 Lenti-OE-*iRhom2* 和 Lenti-OE-*iRhom2mut*, 将重组质粒瞬时转染 HEK-293T 包装细胞, 获得重组慢病毒。将重组病毒感染 Vero 细胞, 利用 puromycin 进行加压筛选, 获得二者的重组表达细胞系。结果 构建了 *iRhom2* 及其突变基因的逆转录病毒载体, 并获得了重组逆转录病毒, 并利用该病毒获得了二者的稳定表达细胞系。Western-blot 实验证实, 二者能够在 Vero 细胞内稳定表达。结论 利用重组逆转录病毒感染, 成功获得了 *iRhom2* 及其突变系的 Vero 细胞稳定表达株, 为进一步研究 *iRhom2* 的生物学功能及其机制奠定了良好的基础。

【关键词】 *iRhom2*; 慢病毒载体; 包装细胞; 稳定表达

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0597-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.010

Packaging of the recombinant lentivirus of *iRhom2* and its mutant and establishment of a stable *iRhom2*-expressing cell line

YOU Ying, MA Yu-nan, ZENG Lin*, SUN Zhao-zeng*

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable transfection cell line of *iRhom2* and its mutant through recombinant lentivirus infection. **Methods** The full-length gene of *iRhom2* and its mutant were cloned into the lentivirus vector Lenti-OE-Flag, and got recombinant lentiviral vector of Lenti-OE-*iRhom2* and Lenti-OE-*iRhom2mut*. The constructed recombinant lentivirus vectors were transfected into HEK-293T packaging cells to obtain the recombinant virus. Vero cells were infected with recombinant virus. The stable expressing cell lines were obtained by pressure screening with puromycin. **Results** The recombinant lentivirus vectors were constructed and the recombinant virus was obtained. The stable expressing cell lines were obtained using virus infection and the protein expression was testified with Western blotting. **Conclusions** Stable *iRhom2*-expressing Vero cell line and its mutant are achieved by recombinant lentivirus infection. It paves the way for future study on biological functions and mechanism of *iRhom2*.

【Key words】 *iRhom2*; Lentivirus vector; Packaging cell; Vero cell line

UNCV 无毛突变系小鼠是军事医学科学院实验动物中心培育的一种自发突变动物模型^[1,2], 遗传

学研究表明该突变是单基因的常染色体半显性遗传。UNCV 的纯合突变外观表现为无毛表型, 杂合

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目(31030058); 国家科技支撑计划(2011BA115B03)。

【作者简介】 游颖(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物学, E-mail: youying0723@163.com

【通讯作者】 曾林(1965-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 实验动物科学, E-mail: zenglin1965@126.com; 孙兆增(1977-), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物分子遗传学, Email: laxszz@aliyun.com

突变表现为稀毛表型。与常见的裸鼠不同,该动物模型的免疫系统基本正常。因此,在化妆品、皮肤药物和一些皮肤真菌的研究中具有特殊的应用^[3]。

在前期的研究中,将 UNCV 无毛突变系小鼠的突变基因定位到 11 号染色体,并通过基因组扫描方式定位了突变基因 *iRhom2*^[4-6] (GeneID: 109602)。UNCV 无毛突变系小鼠的 *iRhom2* 基因的 N 端 309 bp 的缺失,导致了无毛性状的产生。文献报道 *iRhom2* 可能通过 TACE 调节 Notch1 和 Wnt 信号通路,从而影响毛囊的分化^[7,8]。课题组前期的工作也证实 *iRhom2* 能够影响 TACE 基因的成熟^[9],但最近文献报道 *iRhom2* 的基因敲除小鼠,反而具有被毛^[10]。根据这些结果推测,*iRhom2* 基因的 N 端 309 bp 的缺失,可能使突变蛋白具有了新的功能。本实验室已经克隆出小鼠 *iRhom2* 基因^[11]。故课题组拟构建 *iRhom2* 基因及其突变基因的稳定表达细胞系,为 *iRhom2* 突变基因功能的比较研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

慢病毒载体 Lenti-OE (图 1) 购自北京普瑞金科技有限公司, *iRhom2* 及其突变基因质粒由本室保存。感受态购自北京博迈德生物科技有限公司。慢病毒包装细胞 293T, Vero 细胞购自中国科学院上海细胞库。限制性内切酶 *Xba*I、*Bgl*II 购自 NEB 公司, T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。无内毒素质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Biomiga 公司。

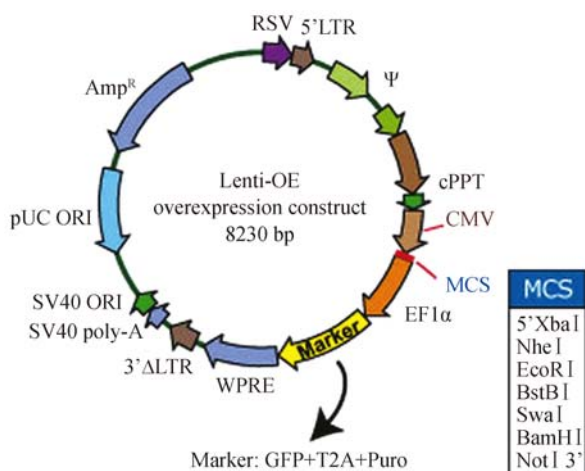


图 1 Lenti-OE 载体示意图

Fig. 1 The diagram of Lenti-OE vector

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 *iRhom2* 及其突变基因的全长基因序列,结合 Lenti-OE 载体的读框、多克隆位点,设计引物。*Rhbd2*-F: GCTCTAGAGCCACCATGGCCTCAGCTGACAAAGATG; *Rhbd2*-R: GCGCATAGATCTTTAGTG-TAGCACCTGGTCTAG。

1.2.2 *Rhbd2* 慢病毒表达载体的构建

用 *Xba*I 和 *Bgl*II 双酶切 *iRhom2* 质粒。1.0% 琼脂糖凝胶电泳回收 *iRhom2* 的 DNA 片段(野生型约 2500 bp, 突变型约 2300 bp), 将这些片段用 T4 DNA 连接酶连接到同样用 *Xba*I 和 *Bgl*II 酶切的 Lenti-OE 质粒, 16℃ 过夜, 将连接产物转化感受态细胞, 涂氨苄平板, 挑克隆, 摇菌。

1.2.3 重组质粒的鉴定

利用 *Xba*I 和 *Bgl*II 双酶切及 PCR 的方法鉴定重组质粒。PCR 反应条件为 94℃ 变性 2 min, 50℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 3 min 30 s, 循环 5 次; 然后 98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 3.5 min, 循环 30 次, 最后 68℃ 终止延伸 10 min。

1.2.4 病毒包装

包装病毒前 1 d, 取 7×10^5 HEK-293T 细胞种植于 60 mm 平皿。第 2 天, 观察细胞密度约为 60% ~ 70% 时, 使用 lipofectamine 2000 转染试剂转染质粒 (Lenti-OE control 或 Lenti-OE-*iRhom2*、Lenti-OE-*iRhom2*mut 质粒各 1 μg, 加 pMD2.0G 和 psPAX2 质粒各 1 μg), 第 2 天换用新鲜培养基 2.5 mL, 继续培养 3 d, 收获细胞培养上清 2 mL, 分装, -80℃ 保存。

1.2.5 病毒感染

感染前 1 d, 胰蛋白酶消化 Vero 细胞, 接种于细胞培养板上, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。种植 Vero 细胞 2×10^5 于 6 孔板; 过夜培养, 细胞贴壁后移去旧培养基, 换用含病毒培养基 (1.5 mL 培养基含 polybrene 10 μg/mL + 病毒液 200 μL), 混匀, 加至细胞, 感染过夜, 第 2 天, 移去含病毒培养基, 换新鲜培养基, 待 48 ~ 72 h 后, puromycin 加药筛选。

1.2.6 稳定细胞系的建立

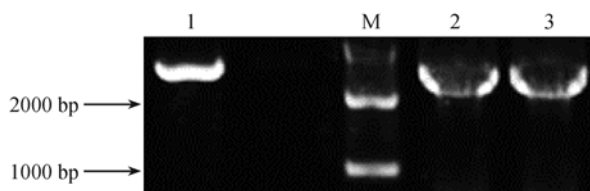
用 puromycin 筛选 (预先摸索 puromycin 有效浓度, 一般选用 2 ~ 3 d 可以杀死全部细胞的浓度为最优浓度, Vero 细胞的 puromycin 有效浓度为 3 μg/mL)。细胞在 6 孔板内长满后, 加药筛选, 传代培养至 10 cm 平皿, 继续加入 puromycin, 待长满后, 传为 2 个 10 cm 平皿, 长满后, 冻存对照、wt、

mut 过表达的细胞各 2 支,留取部分细胞 WB 鉴定过表达效果。

2 结果

2.1 重组质粒鉴定

利用 PCR 的方法,鉴定 Lenti-OE-*iRhom2* 和 Lenti-OE-*iRhom2mut* 重组质粒,分别在特定区域出现条带(wt 约 2500 bp, Mut 约 2300 bp),见图 2。



注:1. 野生型菌液 PCR 结果;2,3. 突变型菌液 PCR 结果。

图 2 菌液 PCR 鉴定阳性克隆结果

Note. 1: Identification results of Wt bacterial liquid by PCR. 2,3: Identification results of Mut bacterial liquid by PCR.

Fig. 2 Identification results of the bacterial liquid by PCR

2.2 重组慢病毒的包装结果

将 Lenti-OE-*irhom2* 转入 293T 包装细胞以后,在荧光显微镜下观察,发现视野内荧光强度达到 80% 左右,证实病毒包装成功。结果如图 3 所示。

2.3 病毒滴度测定结果

病毒包装后,取加病毒原液的细胞,在荧光显微镜下观察结果,并数出最后两个有荧光的荧光细胞克隆数。假设为 X 和 Y,则滴度(cfu/mL) = $(X + Y \times 10) \times 1000 / 2 / X$ 孔的病毒液的含量(μL)。其结果两种慢病毒 Lenti-OE-Null、Lenti-OE-*irhom2*、Lenti-OE-*irhom2mut* 的病毒滴度分别为 $4.8 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ 、 $1.3 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ 、 $1.3 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ 。见图 4。

2.4 病毒感染 Vero 细胞的观察结果

病毒感染细胞经药物筛选后,在荧光显微镜下观察到 GFP 的表达(见图 5)。

2.5 Flag-*iRhom2* 蛋白表达的检测

Western blot 结果显示, Lenti-OE-Flag-*iRhom2* 编码蛋白质(大小约为 49×10^3) 在 Vero 细胞中有表达(图 6)。

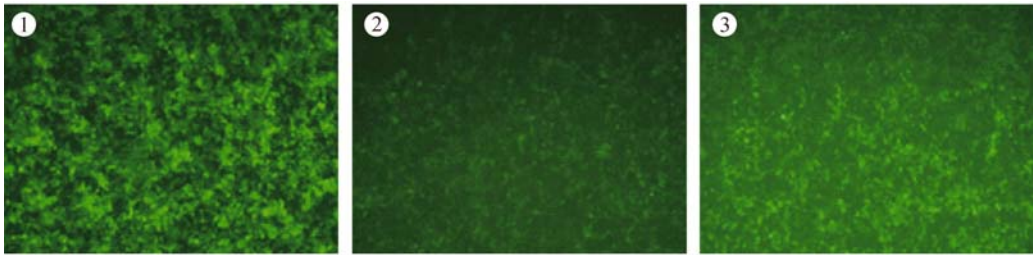
3 讨论

慢病毒载体是以 HIV-1 (人类免疫缺陷 I 型病

毒)为基础发展起来的基因治疗载体,目前在基因治疗中研究较多。区别一般的逆转录病毒载体,它的优点在于能够感染多种难感染的细胞,对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。且慢病毒能够将外源基因插入细胞基因组内,实现目的基因的稳态表达。与此同时,慢病毒安全性很高,不产生任何有效的细胞免疫应答^[12]。本实验所采用的慢病毒载体 Lenti-OE,在宿主细胞内,能以病毒 RNA 为模板在自身反转录酶的作用下合成 cDNA,再以此 cDNA 为模板合成双链 DNA,经环化后通过病毒整合酶作用整合在宿主细胞的染色体上并长期表达。

病毒包装是一个病毒载体与包装细胞间的相互作用过程。因此,293T 包装细胞的密度是一个重要的限制因素。充分利用培养基所构成的立体空间,在一定范围内可以大量地增加细胞数量,这样就提高了与外源 DNA 结合的机会,增加了进入细胞的质粒数量,获得更高的病毒滴度。重组慢病毒载体经包装细胞包装后,能用于基因转染的有效病毒滴度一般需达到 $10^5 \sim 10^7 \text{ cfu/mL}$ ^[13]。在本实验中,HEK-293T 产生的重组慢病毒 Lenti-OE-Null、Lenti-OE-*irhom2*、Lenti-OE-*irhom2* 的滴度分别为 4.8×10^6 、 1.3×10^6 、 $1.3 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ 。提示我们重组的慢病毒载体经 NIH/3T3 细胞包装,能够获得有效的病毒滴度和较高的转效率,可用于后续 *iRhom2* 基因转染实验。Vero 细胞是一种异倍体细胞,用途广泛。Vero 细胞系是连续的非正倍体细胞,连续细胞系可以经过许多分裂周期而不衰老。在本研究中,采用的是病毒感染和加入 puromycin 的方法获得能够稳定表达 *iRhom2* 的 Vero 细胞,相对于脂质体转染,病毒感染效率更高,这种细胞系更利于获得可靠的实验结果。

实验将 *irhom2* 基因克隆至慢病毒表达载体 Lenti-OE,包装后筛选出一株感染性重组病毒产生细胞系,对其细胞及其上清感染的 vero 细胞基因组 DNA 进行 *irhom2* 基因 PCR 分析,flag 标签的蛋白检测,结果表明外源基因已整合到转染细胞 DNA 中,证实了重组病毒的活性及其转导靶细胞的可行性,为进一步应用 *irhom2* 基因、阐明 *irhom2* 分子的功能奠定了基础。

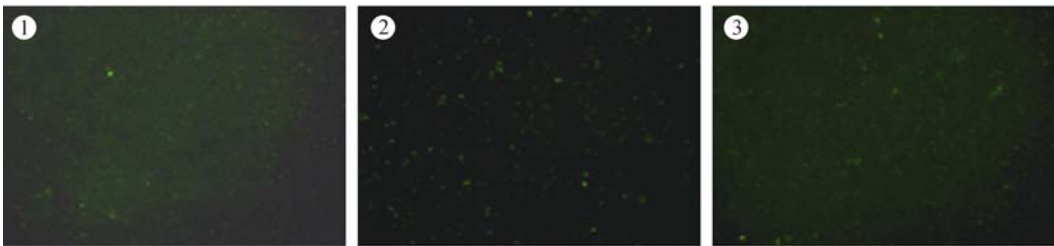


注:1. 对照质粒;2. 野生型 *Rhbdf2* 质粒;3. 突变型 *Rhbdf2* 质粒。

图 3 重组慢病毒包装结果

Note. 1: Plasmid of control group. 2: Plasmid of Wt *Rhbdf2*. 3: Plasmid of Mut *Rhbdf2*.

Fig.3 The packaging results of the recombinant lentivirus

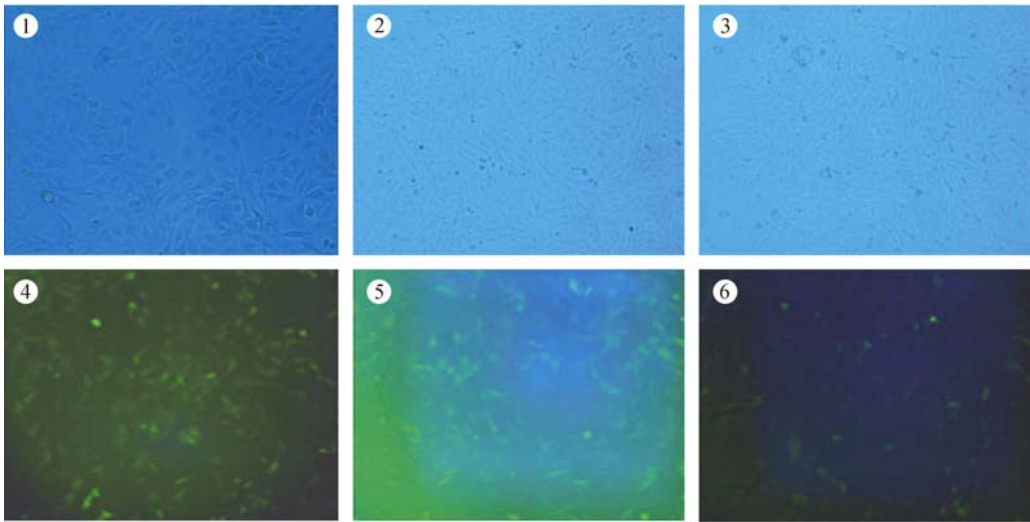


注:1:阴性对照病毒;2:野生型 *Rhbdf2* 病毒;3:突变型 *Rhbdf2* 病毒。

图 4 病毒滴度测定时图

Note. 1: Virus of control group. 2: Virus of Wt *Rhbdf2*. 3: Virus of Mut *Rhbdf2*.

Fig.4 Results of virus titration

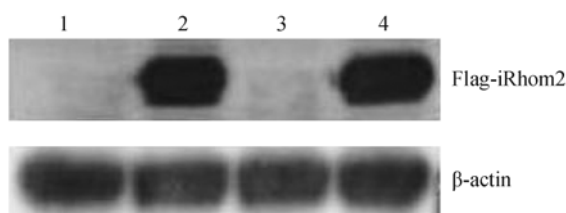


注:1,2:阴性对照 vero 细胞; 3,4:野生型 *Rhbdf2* 感染 vero 细胞; 5,6:突变型 *Rhbdf2* 感染 vero 细胞。

图 5 病毒感染 Vero 细胞后的观察结果

Note. 1,2: Vero cells of the negative control group. 3,4: Wt *Rhbdf2* virus-infected Vero cells. 5,6: Mut *Rhbdf2* virus-infected Vero cells

Fig.5 Fluorescence images of the virus-infected Vero cells



注:1;Lenti-OE 对照组;2;Lenti-OE 野生型 Rhbdf2;3;Lenti-OE 对照组;4;Lenti-OE 突变型 Rhbdf2。

图 6 目的蛋白表达的鉴定

Note. 1; Lenti-OE control. 2; Lenti-OE WT Rhbdf2 virus. 3; Lenti-OE control. 4; Lenti-OE Mut Rhbdf2 virus.

Fig. 6 Identification of the target protein expression

参 考 文 献

- [1] 李善如, 仇志华, 王冬平. 一种新的被毛突变小鼠及其生物学特性的初步研究 [J]. 军事医学科学院院刊, 1995, 19: 26-28.
- [2] 李善如, 王冬平, 史燕燕, 等. 一种新的被毛突变小鼠遗传特性研究 [J]. 中国兽医学报, 1995, 15: 287-290.
- [3] 刘冰. iRhom2 突变导致小鼠毛囊分化障碍 [D]. 军事医学科学院, 2014.
- [4] Jones JM, Elder JT, Simin K, et al. Insertional mutation of the hairless locus on mouse chromosome 14 [J]. Mamm Genome, 1993, 4(11): 639-643.
- [5] 李善如, 王冬平, 兰宏, 等. 一种新的小鼠被毛突变基因定位 [J]. 科学通报, 1999, 44(7): 750-755.
- [6] 藤晓坤. 导致小鼠无毛突变的关键基因的定位和克隆以及在小鼠毛发发育中作用的研究 [D]. 上海交通大学, 2008.
- [7] Stern CD. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions [J]. Development, 2005, 132(9): 2007-2021.
- [8] Fuchs E. Scratching the surface of skin development [J]. Nature, 2007, 445(130): 834-842.
- [9] Yang L, Liu B, Li Y, et al. iRhom2 mutation leads to aberrant hair follicle differentiation in mice [J]. Plos ONE, 2014, 9(12): e115114.
- [10] Siggs OM, Grieve A, Xu H, et al. Genetic interaction implicates iRhom2 in the regulation of EGF receptor signalling in mice [J]. Biol Open, 2014, 3(12): 1151-1157.
- [11] 徐嫒, 刘冰, 李文龙, 等. 小鼠 Uncv 基因克隆及真核表达 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(1): 81-83.
- [12] 跃萍, 宋丽萍, 邱曙东, 等. 慢病毒载体在肿瘤基因治疗中的应用 [J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(12): 1615-1617.
- [13] 张蕊, 龚道清. 慢病毒载体的研究进展及应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(6): 227-231.

[收稿日期] 2015-06-23

· 会 讯 ·

认仕医生重构医疗生态, 改善医生生活 ——未来医生·新生活·发布会

2015 年 10 月 22 日, 一场以打造互联网新医疗生态圈, 改善医生生活为探讨主题的“未来医生·新生活·发布会”在北京隆重召开。原卫生部副部长孙隆椿, 军事科学院微生物流行病学研究所政委唐明山, 解放军第 306 医院院长顾建文, 中华医学会杂志社副社长刘冰, 急诊科女超人于莺, 九州通医药集团业务总裁耿鸿武, 中国医疗器械商学院创始人朱明, 万方医学专家委员会秘书长王光跃等嘉宾都做了主题发言, 他们在畅想互联网+医疗各种可能的同时, 也充分肯定了认仕医生平台打造互联网新医疗生态圈对于中国医疗发展的积极意义。

认仕医生董事长、CEO 万马, 万马表示他和他的团队一直在寻找可以真正帮助到医生, 打破行业封闭, 让医生获得应有回报与职业尊严的方法。CEO 万马表示: 连接的彼此需要信息, 而医疗当中大量存在的信息都在医院当中, 如何让医院中的信息发挥出价值, 帮助更多患者找到好的医生, 求得好药, 快速看对病。2014 年 12 月中国首个互联网+医生轻职业生活平台——认仕医生, 正式上线。到目前为止已覆盖 280 万执业医师数据, 20 余万家医疗企业数据, 数十个医学分会, 并与网易、民生银行、三大运营商、国家密码局建立深度合作。截至到今天, 认仕医生平台已签约北京、上海、广州、深圳、浙江、四川、湖北、湖南等地, 签约多家顶级医院的医疗专家上千位。