

## 用慢病毒转染技术实现 Gnaq 基因在 SH-SY5Y 细胞中持续稳定高表达

陈绍春<sup>1)</sup>, 邹智荣<sup>1)</sup>, 李国萍<sup>2)</sup>, 叶 频<sup>1)</sup>, 范 艳<sup>1)</sup>, 李跃敏<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学人体解剖学与组织胚胎学系, 云南昆明 650500; 2) 第三附属医院头颈外科, 云南昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 探讨用慢病毒转染技术实现 Gnaq 基因在人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 中持续稳定高表达的可行性, 为深入研究 Gnaq 在脑衰老及相关疾病中的作用及分子机制奠定基础. **方法** 通过 NCBI 网站查询 Gnaq 的编码序列并设计相应的克隆引物, 以高表达 Gnaq 的 HepG2 细胞的 cDNA 为模板, PCR 扩增得到带适宜酶切位点的目的基因, 将目的基因连接入慢病毒载体 PLIG, 转染感受态细胞, 筛选阳性克隆, 测序鉴定后包装慢病毒, 转染 SH-SY5Y 细胞; 于转染后 24 h、第 5 代时检测 GFP 荧光表达率; 检测第 3 代、第 5 代 PLIG-Gnaq-SH-SY5Y 细胞内 Gnaq 的转录水平. **结果** 荧光检测显示 SH-SY5Y 细胞的转染效率接近 100%, 此表达效率可持续至转染后第 5 代; RT-PCR 检测显示转染后第 3 代、第 5 代的 PLIG-Gnaq-SH-SY5Y 细胞内 Gnaq 呈明显的高转录水平, 未明显受冻存的影响. **结论** 利用慢病毒转染技术实现 Gnaq 基因在 SH-SY5Y 细胞内长期稳定高表达具有可行性, 可用 PLIG-Gnaq-SH-SY5Y 作为模型细胞深入研究 Gnaq 基因在神经细胞中扮演的角色及相关机制.

**[关键词]** 慢病毒载体; Gnaq 基因; SH-SY5Y 细胞; 过表达

**[中图分类号]** Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 07 - 0004 - 04

## Persistent and Stable Over-Expression of Gnaq in SH-SY5Y Cell Line by Means of Lentivector Transfection Technique

CHEN Shao - chun, ZOU Zhi - rong, LI Guo - ping, YE Pin, FAN Yan, LI Yue - min

(1) Dept. of Anatomy and Histoembryology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Head and Neck Surgery, The 3rd Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118, China)

**[Abstract]** **Objective** To probe the feasibility of overexpression of Gnaq in SH-SY5Y cell line by means of lentivector transfection technique so as to accumulate the necessary basis for further studies of the roles and molecular mechanisms of Gnaq in brain aging and related diseases. **Methods** The CDS of Gnaq in NCBI website were searched and corresponding cloning primers were designed. The target gene which was obtained by PCR amplifying the cDNA of HepG2 cell was cloned into lentivector PLIG. Recombinant plasmid PLIG-Gnaq was transfected into competent cells and positive clones were selected. After being verified by means of sequence, lentivirus were generated to transfect SH-SY5Y cell. GFP was measured at 24 hours after transfection and the 5th subculture. Transcription level of Gnaq was detected at the 3rd and 5th subculture respectively. **Results** The efficient rate of transfection of Gnaq gene into SH-SY5Y cell was about 100%. GFP expressed that almost all of the cells continuously went on to the 5th subculture. The transcription level of Gnaq was significantly enhanced both in the 3rd and 5th subcultures of PLIG-Gnaq-SH-SY5Y cells. **Conclusion** It is feasible to reach the persistent and stable overexpression of Gnaq in SH-SY5Y cell line by means of lentivector transfection technique. The

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81260195), 云南省自然科学基金资助项目 (2010ZC110)

**[作者简介]** 陈绍春 (1976~), 男, 云南云县人, 医学博士, 副教授, 主要从事神经解剖学及神经分子生物学相关研究工作. 陈绍春和邹智荣对本文有同等贡献.

**[通讯作者]** 李跃敏. E-mail: liyuemin1981@126.com

PLIG-Gnaq-SH-SY5Y cells can be used as model cells for further studies of the roles and underlying mechanisms of Gnaq in neurons.

[**Key words**] Lentivector; Gnaq gene; SH-SY5Y cell line; Over-expression

Gnaq (Guanine nucleotide binding protein alpha q polypeptide) 是 G 蛋白  $\alpha$  亚单位多基因家族的一员<sup>[1]</sup>, 笔者前期研究发现, Gnaq 在 SAMP8 小鼠及人额叶内的表达水平随衰老明显下降<sup>[2]</sup>, 因此有必要对 Gnaq 影响脑衰老的分子机制深入研究. 人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞系被广泛应用于神经系统疾病发病机制和药物作用机制方面的研究<sup>[3]</sup>. 慢病毒载体具有“可感染非分裂期细胞”、“可将目的基因整合至靶细胞基因组而长期表达”、“免疫反应小”等优点<sup>[4]</sup>. 本研究旨在探索利用慢病毒载体在 SH-SY5Y 细胞中过表达 Gnaq 基因的可行性及相关技术参数, 为深入研究 Gnaq 在脑衰老及相关疾病中所发挥的作用及分子机制奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、质粒和主要试剂

人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 香港中文大学姚大卫教授惠赠; 慢病毒载体 PLIG 及包装质粒 pMDLg/pRRE、pRSV-REV 和 pCMV-VSVG 由香港中文大学孔祥复教授惠赠; 用于慢病毒包装的 293T 细胞株购自 ATCC 公司 (USA), Trizol RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司 (USA), ImProm-II™ 逆转录试剂盒购自 Promega 公司 (USA), 胎牛血清及各种培养液分别购自 Gibco 公司 (USA) 和 Sigma 公司 (USA), 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成 (表 1).

表 1 Gnaq 和 GAPDH 的 RT-PCR 引物序列  
Tab. 1 The primer sequences of Gnaq and GAPDH used in RT-PCR

Gene		sequences	Amplified size/bp
Gnaq	Forward	5'-AGAAGTTGATGTGGAGAAGG-3'	212
	Reverse	5'-GGACTCGAACTCTAAGCACA-3'	
GAPDH	Forward	5'-TGCCTCCTGCACCACCAACT-3'	232
	Reverse	5'-CCCCTTCAGCTCAGGGATGA-3'	

### 1.2 细胞培养

人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 培养于 EMEM (Sigma, St Louis, MO, USA) 与 F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 组成的混合培养基中, 两种培养基按 1:1 的比例混合, 加入 10% 小牛血清 (Gibco, USA). 细胞均常规培养于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱内.

### 1.3 慢病毒表达载体 PLIG-Gnaq 构建

查询 Gnaq (NM\_002072) 的编码序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 通过 NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) 检测序列的特异性核酸内切酶位点, 选择了 BamHI<sup>®</sup> 和 Sac-II 作为克隆酶切位点. 以 CDS 序列 5' 端的 20 个碱基设计成上游克隆引物: Gnaq-F-BamHI: 5'-CGCGGATCCACCATGAC TCTGGAGTCCATCA-T-3'; 选择 CDS 序列 3' 端的 20 个碱基的互补逆序碱基设计成下游克隆引物: Gnaq-R-SacII: 5'-TCCCCGCGGTTAGACCAGATTGTACT CCT-3'. 以肝癌细胞株 HepG2 中所获得的 cDNA 为模板, 利用 Platinum<sup>®</sup> Taq 高保真 DNA 聚合酶 (Invitrogen, USA) 通过 PCR 扩增得到带有 BamHI 和 SacII

酶切位点的 Gnaq 编码序列, 将 Gnaq 序列连接入 PLIG 的相应位点之间得到重组质粒 PLIG-Gnaq, 转染 XL1-Blue 感受态细胞, 利用含 Ampicillin 的 LB 培养基进行阳性克隆筛选并经测序 (上海捷瑞生物工程有限公司) 证实.

### 1.4 慢病毒包装

PLIG 是由 pRRL-cPPT-CMV-X-PRE-SIN 质粒改良的表达绿色荧光蛋白的自灭活慢病毒载体<sup>[5]</sup>, 利用磷酸钙沉淀法将重组质粒与包装质粒共同转染入 293T 细胞中, 48 h 后收集培养液, 过滤、高速离心得到纯化的携带目的基因或空载体的自灭活慢病毒, 溶于 0.05 M 的 Tris 缓冲液 (TBS, pH8.0) 中 -80 °C 保存备用.

### 1.5 慢病毒滴度测定

用 LaSRT 法进行病毒滴度测定<sup>[24]</sup>, 将 293T 细胞以  $5 \times 10^4$  cells/mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔加 100  $\mu$ L 含 10%FCS 培养液培养过夜. 测定时 8 孔为 1 组, 换含 2%血清培养液 90  $\mu$ L 每孔, 第 1 孔中加入待测病毒原液 10  $\mu$ L, 此后每孔依次 10:1 倍比稀释, 最后一孔做空白对照. 48 h 后以浓度自高到低的方向, 在荧光倒置显微镜下观察绿色

荧光细胞的数量，如前一孔阳性细胞较多 ( $\geq 5$  个)，而此孔及以后荧光消失；或如以后各孔荧光消失，而此孔阳性细胞较少 ( $< 5$  个)，则此孔

作为计量孔 (计为 1TU)，并计数阳性细胞数 (m)，计算病毒的滴度。

病毒滴度 =

$$\frac{m \times (1 \text{ TU} \times \text{计量孔相对于第 1 孔的稀释倍数})}{\text{第 1 孔加入的病毒体积}}$$

### 1.6 转染 SH-SY5Y 细胞获得稳定表达细胞株

将 SH-SY5Y 细胞种于 12 孔板中 ( $5 \times 10^4$  孔)，过夜后转染，转染时加入  $8 \mu\text{g/mL}$  Polybrene (Sigma, USA)，转染后 6 h 换液，24 h 后在荧光显微镜检查转染效率并继续后续实验。实验分 3 组：PLIG-Gnaq 转染组、PLIG 转染组、对照组 (Naive 组)。以转染后的细胞为第 1 代，各组细胞传代培养至第 3 代，取 1/3 细胞提取 RNA，剩余细胞  $-80^\circ\text{C}$  冻存。2 周后复苏细胞 (第 4 代)，传代培养，至第 6 代时，荧光显微镜检查 GFP 表达效率，取部分细胞提取 RNA，其余细胞冻存备用。

### 1.7 RNA 提取、cDNA 制备及 RT-PCR

Trizol 法提取细胞总 RNA，定量并确认 RNA 质量后继续实验。取  $2 \mu\text{g}$  总 RNA，使用 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, USA) 试剂盒， $25^\circ\text{C}$  5 min， $42^\circ\text{C}$  60 min， $72^\circ\text{C}$  15 min 制备 cDNA。通过免费引物设计网站 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 设计了相应的引物，利用 GoTaq® DNA 聚合酶 (Promega, USA) 在 RT-PCR 仪 (Takara, Japan) 中进行扩增，反应条件为： $95^\circ\text{C}$  2 min  $\rightarrow$  ( $95^\circ\text{C}$  30 s  $\rightarrow$   $56^\circ\text{C}$  30 s  $\rightarrow$   $72^\circ\text{C}$  30 s) 30 个循环  $\rightarrow$   $72^\circ\text{C}$  5 min。以磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参。

## 2 结果

### 2.1 PLIG-Gnaq、PLIG 在 SH-SY5Y 细胞中

转染后 24 h，通过荧光显微镜检测 PLIG 载体中的绿色荧光蛋白证实，PLIG-Gnaq、PLIG 在 SH-SY5Y 细胞中的转染效率接近 100%，95%CI 为 93.94% ~ 98.80%；经冻存、复苏并传代培养后，所检测到的荧光强度有所减弱，但绿色荧光蛋白的表达率仍接近 100%，95%CI 为 88.89 ~ 95.72，见图 1。

### 2.2 转染细胞中 Gnaq 转录水平

将转染 PLIG-Gnaq 的 SH-SY5Y 细胞传代培养，第 3 代时作 RT-PCR 检测，显示 Gnaq 转录水平明显升高；经冻存、复苏并继续传代培养，第 5 代时再作 RT-PCR 检测，显示转染 PLIG-Gnaq 的 SH-SY5Y 细胞中的 Gnaq 仍呈明显的高转录水平，见图 2。

## 3 讨论

基因过表达技术是通过不同途径将外源基因导入靶细胞，使其表达相应蛋白质，从而实现对基因 (或蛋白质) 功能的研究或进行基因治疗的一种技术<sup>[6]</sup>。基因导入的基本方法可分为 3 类：化学法、

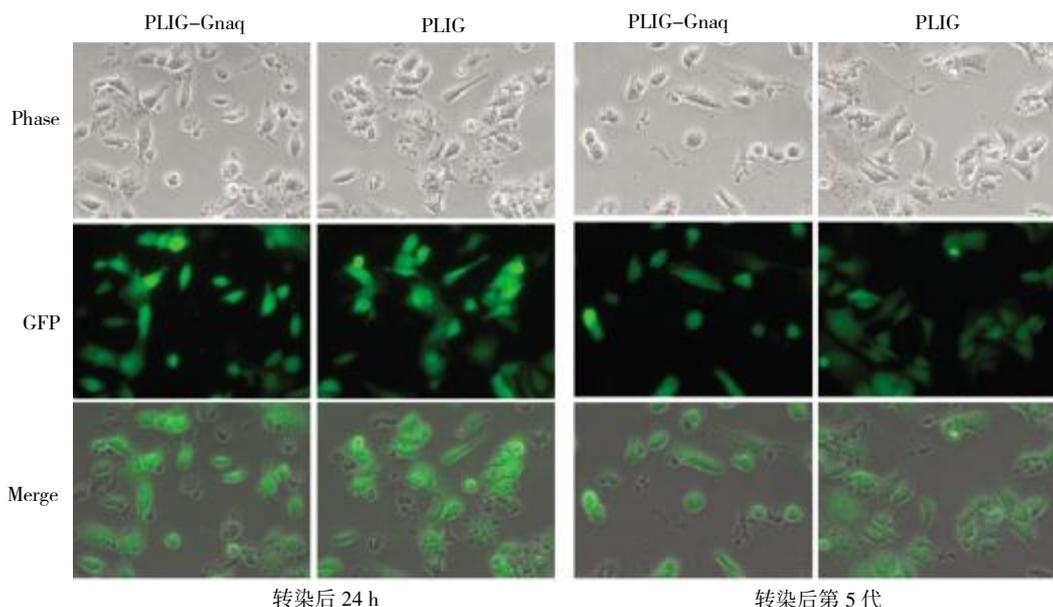


图 1 PLIG-Gnaq、PLIG 在 SH-SY5Y 细胞中实现的转染效率 ( $\times 400$ )

Fig. 1 Transfection efficiency of PLIG-Gnaq or PLIG into SH-SY5Y cell line ( $\times 400$ )

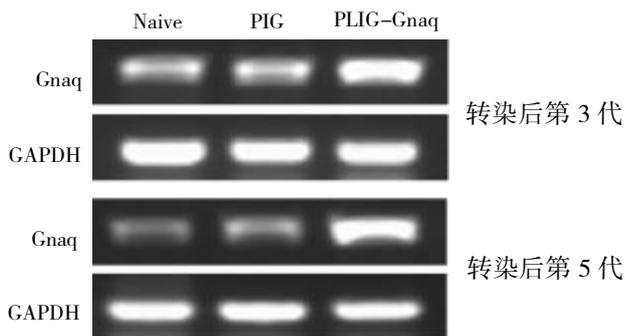


图2 Gnaq 在未处理、转染空载体及转染 PLIG-Gnaq 的 SH-SY5Y 细胞中的转录水平 (n=3)

Fig. 2 Transcription level of Gnaq in Naive, PLIG, PLIG-Gnaq transfected SH-SY5Y cell line (n=3)

物理法和生物法<sup>[7]</sup>。化学法和物理法或因转染效率低,或因对细胞有明显毒性或创伤,并且不能使目的基因长期稳定表达,使其应用受到了很大限制。生物法是指利用病毒载体介导目的基因进入靶细胞。理想的病毒载体要能同时提供高效的基因转移、长期稳定的基因表达及可靠的生物安全性。近来,研究者把目光投向了以 I 型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)为代表的慢病毒。研究表明<sup>[4,8]</sup>,以 HIV-1 为基础构建的慢病毒载体具有“可感染非分裂期细胞”、“可将目的基因整合至靶细胞基因组而长期表达”、“免疫反应小”等优点,适于各种基因功能研究及体内基因治疗,因此有望成为理想的基因转染载体。

Gnaq 在人和小鼠体内均能介导神经递质受体与效应器之间的相互作用,同时其也是突触功能活动中所必需的重要组件<sup>[9]</sup>,并且可通过调节 PKC 通路而影响神经递质释放及突触的可塑性,而突触功能的衰退是脑衰老过程中的一个重要特征<sup>[10]</sup>。这些研究表明 Gnaq、氧化应激、PKC 通路、学习认知能力之间存在复杂的内在联系,脑内 Gnaq 的低表达很可能从多个方面影响了神经的功能,促进了脑衰老的过程。但迄今对“Gnaq 是否通过增强神经细胞抗氧化损伤能力而发挥抗神经退行性变作用”、“Gnaq 通过哪些信号转导通路而发挥抗氧化损伤作用”、“这些通路之间有怎样的内在交联关系”等问题知之甚少。因此,对 Gnaq 在神经细胞抗氧化应激损伤中的作用及其影响中枢神经退行性疾病的分子机制亟待进一步研究。

为了进一步研究 Gnaq 影响脑衰老及相关疾病的分子机制,笔者拟利用人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 作为模型细胞并首先实现 Gnaq 基因在其内的持续稳定高表达。本研究结果表明,通过对目的基因 CDS 序列及载体 PLIG 酶切位点的对比检

索、设计扩增引物、以已知高表达 Gnaq 的 HepG2 细胞的 cDNA 为模板、扩增目的基因片段、将目的基因与慢病毒载体 PLIG 连接、转染感受态细胞、筛选阳性克隆、测序鉴定、包装病毒并测定滴度、转染靶细胞 SH-SY5Y 等步骤,荧光检测显示转染效率接近 100%, RT-PCR 检测显示转染 PLIG-Gnaq 的 SH-SY5Y 细胞中 Gnaq 明显高表达;并且经冻存、传代培养后,荧光蛋白及 Gnaq 仍呈稳定的高表达。由此可见,利用慢病毒转染技术实现 Gnaq 基因在人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 内长期稳定高表达是切实可行的,该研究为在模型细胞中进一步探索 Gnaq 的抗氧化损伤作用及相关分子机制奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] FOSTER T C. Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2005, 26(2): 51-64.
- [2] CHEN S C, LU G, CHAN C Y, et al. Microarray profile of brain aging-related genes in the frontal cortex of SAMP8 [J]. *J Mol Neurosci*, 2010, 41(1): 12-16.
- [3] 冯波,王蓉,盛树力. 神经退行性疾病研究中拟神经细胞模型: 人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 的来源特性及应用[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(6): 121-123.
- [4] NALDINI L, BLOMER U, GALLAY P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [J]. *Science*, 1996, 272 (5 259): 263-267.
- [5] CHEN Y, LIN M C, YAO H, et al. Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin [J]. *Hepatology*, 2007, 46 (1): 200-208.
- [6] ZHANG Y, WANG Y, WANG C. Gene overexpression and gene silencing in Birch using an agrobacterium-mediated transient expression system [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39 (5): 5 537-5 541.
- [7] WU C L, KANDARIAN S. Protein overexpression in skeletal muscle using plasmid-based gene transfer to elucidate mechanisms controlling fiber size [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 798: 231-243.
- [8] ZUFFEREY R, NAGY D, MANDEL R J, et al. Mutiply attenuated lentiviral vector achieved efficient gene delivery in vivo [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(9): 871-875.
- [9] SCHEIDERER C L, SMITH C C, MCCUTCHEN E, et al. Coactivation of M(1) muscarinic and alpha1 adrenergic receptors stimulates extracellular signal-regulated protein kinase and induces long-term depression at CA3-CA1 synapses in rat hippocampus [J]. *J Neurosci*, 2008, 28 (20): 5 350-5 358.
- [10] TERRY R D. Alzheimer's disease and the aging brain [J]. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2006, 19(3): 125-128.

(2013-02-11 收稿)