

大鼠 Nogo 受体基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建与鉴定

吕碧涛¹, 袁文^{1*}, 徐盛明¹, 刘百峰¹, 曹莉²

(1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 2. 第二军医大学基础部神经生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 构建大鼠 Nogo 受体(Nogo receptor, NgR)基因 RNA 干扰慢病毒表达载体, 并观察其对 293T 细胞感染效率。**方法:** 应用基因工程技术, 首先构建携带目的基因 siNgR199 的慢病毒穿梭质粒表达载体, 然后使用慢病毒包装质粒混合物和构建好的慢病毒穿梭质粒共转染 293T 细胞, 转染 48 h 后收集上清离心过滤后冰浴保存, 最后进行病毒滴度测定, 与标准病毒液分别感染 293T 细胞, 按 MOI 值分为 5 个梯度: 1、3、5、10、20, 以确定病毒滴度及适合感染的 MOI 值。其中采用 PCR 方法对重组载体进行鉴定, 利用绿色荧光蛋白作为报告基因, 对病毒滴度和感染效率进行检测。**结果:** 酶切鉴定及 PCR 结果与病毒载体的预期结果一致, 病毒滴度达 1×10^8 ifu/ml, 适合感染的 MOI 值为 3。**结论:** 应用基因工程技术, 成功构建了大鼠 siNgR199 慢病毒表达载体, 为应用于治疗脊髓损伤后轴突再生创造了条件。**[关键词]** 慢病毒; Nogo 受体; RNA 干扰**[中图分类号]** Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0040-04

Construction and identification of a recombinant lentivirus harboring RNAi targeting rat Nogo receptor gene

LÜ Bi-tao¹, YUAN Wen^{1*}, XU Sheng-ming¹, LIU Bai-feng¹, CAO Li² (1. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct a recombinant lentivirus harboring RNAi sequence targeting rat nogo receptor gene and to observe its infection efficiency of 293T cells. **Methods:** Lentivirus shuttle plasmid containing siNgR199 cDNA was constructed by gene engineering and was used to transfect 293T cells in the presence of packaging plasmids. Forty-eight hours later the supernatant was collected and the titer of virus was determined. The recombinant lentivirus and the standard lentivirus were used to transfect 293T cells at 1 MOI, 3 MOI, 5 MOI, 10 MOI and 20 MOI. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the recombinant vector; enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression was used to determine the titer and the infection rate of the recombinant lentivirus under fluorescent microscope. **Results:** Restriction endonuclease and PCR analysis confirmed that the siNgR199 cDNA was successfully inserted into the lentivirus vector. The titer of the recombinant lentivirus harboring siNgR199 was 1×10^8 ifu/ml and the best MOI was 3. **Conclusion:** The recombinant lentivirus containing siNgR199 gene has been successfully constructed, which lays a foundation for future axon regeneration in treatment of spinal cord injury.**[KEY WORDS]** lentivirus; Nogo receptor; RNA interfering

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 40-43]

髓磷脂相关轴突生长抑制因子是引起脊髓损伤后轴突再生失败的主要因素之一, 髓磷脂中三种轴突生长抑制性蛋白—Nogo-A、髓磷脂相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)和少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte myelglycoprotein, OMgp), 均通过 Nogo 受体(Nogo receptor, NgR)及与其相连的受体复合物发挥作用, 因此 NgR 可能是中枢神经系统髓磷脂中各种轴突生长抑制性蛋白发挥作用的集中点^[1]。RNA 干扰是由双链 RNA 介导的、在转录后 mRNA 水平关闭相应基因表达的过程。我们在前期实验中^[2], 成功筛选出两条抑制效率较高的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 系列, 根据靶序列起始位置命名

为 siNgR199 和 siNgR964, 并于体外培养大鼠原代皮质和海马细胞, 应用阳离子脂质体转染试剂转染针对 2 个基因片段(199 和 964 位点)的大鼠 NgR 特异性 siRNA, 证实 NgR 特异性 siRNA 能够在原代皮质和海马细胞下调靶基因 mRNA 的表达水平, 同时发现通过脂质体融合技术导入 NgR 特异性 siR-

[基金项目] 国家自然科学基金(30471757); 长江学者和创新团队发展计划; 上海市医学领军人才项目。Supported by National Natural Science Foundation of China (30471757), the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team, and the Program for Outstanding Academic Leaders in Shanghai.

[作者简介] 吕碧涛, 博士, 主治医师。E-mail: lvbitao@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: spine@citiz.net

NA,转染效率低且作用时间短暂。为适合脊髓损伤治疗的长期性需要,本次实验中我们选择能持续有效地表达 siRNA 且能将该效应传给子代的慢病毒作为导入 siNgR199 的载体,以期获得长期 NgR 沉默效应。

1 材料和方法

1.1 质粒和细胞 慢病毒质粒 pRNAT-U6.2/Lenti(SD1259)购自 GenScript 公司,包装试剂盒 pPACKH1 Lentivector Packaging Kit(LV500A-1)购自 SBI 公司;293T 细胞由康成公司提供。

1.2 酶类及主要生化试剂 限制酶 *Bam*H I D1010A、*Xho* I D1094A,连接酶 *T₄* D2011A,DL2000 D501A,*Taq* DDR001A 均为 TaKaRa 公司产品;感受态 Top10(上海康成);TRIzol(Invitrogen),Trypsin 0.25% (Gibco);实验用血清:Fetal Bovine Serum (Gibco);实验所用培养基:NEURO-BASAL DMEM (Gibco);转染用试剂:Opti-MEM (Gibco),Lipofectmaine™ 2000 (Invitrogen);Polybrene® (Sigma);质粒抽提试剂盒及 PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 携带 siNgR199 的慢病毒穿梭质粒表达载体的构建与鉴定

1.3.1 实验设计原理 根据前期实验中筛选的 siNgR199 序列,设计合成两对单链寡核苷酸。每一正向单链内,19 nt 的寡核苷酸以正反向组合,中间添加 loop 结构,使寡核苷酸可以形成发夹结构,每对寡核苷酸两端分别带有酶切位点。siNgR199 序列:CCG AAT CTC TTA CGT GCC A。正义链:5'-GAT CCC GCC GAA TCT CTT ACG TGC CAT TGA TAT CCG TGG CAC GTA AGA GAT TCG GTT TTT TCC AAC-3';反义链:5'-TCG AGT TGG AAA AAA CCG AAT CTC TTA CGT GCC ACG GAT ATC AAT GGC ACG TAA GAG ATT CGG CGG-3'。因为 siNgR199 序列是以 C 开始的,因此我们在序列前添加一个碱基“G”,实验中的作用是 RNA 聚合酶 III 的识别位点,即质粒转染到细胞后,转录起始位点为添加的“G”,转录从“G”开始,到“TTTTTT”终止。

1.3.2 siNgR199 的慢病毒穿梭质粒表达载体的构建 按照设计好的双链 DNA 进行合成、退火,DNA 稀释到 1 μ g/ μ l,退火反应体系如下:DNA 模板单链 1 1 μ l, DNA 模板单链 2 1 μ l, 20 \times SSC 1 μ l,dH₂O 17 μ l 混匀,95 $^{\circ}$ C 加热 10 min;取出,室温放置 1 h;稀释至终浓度 10 ng/ μ l。将退火产物与线性化处理的载体片段连接,连接体系如下:线性化载体(0.1 μ g/

μ l) 1 μ l, siRNA 插入片段 1 μ l, 10 \times buffer 2 μ l, *T₄* 连接酶 0.5 μ l,dH₂O 5.5 μ l,反应条件为:22 $^{\circ}$ C 连接 2 h。最后将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞,涂布平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

1.3.3 PCR 鉴定 挑取 8 个单菌落,使用载体多克隆位点两端的引物进行 PCR 扩增,其中 Forward Sequencing Primer:5'-TAC GAT ACA AGG CTG TTA GAG AG -3';Reverse Sequencing Primer:5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'。(1)PCR 体系如下:LA Buffer(MgCl₂+) 2.5 μ l, *Taq*(2.5 U/ μ l) 0.25 μ l, DNTP(25 mmol/L) 4 μ l, F Primer (10 μ mol/L) 0.25 μ l, R Primer(10 μ mol/L) 0.25 μ l,dH₂O 17.75 μ l。(2)PCR 反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 10 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s(33 个循环), 55 $^{\circ}$ C 30 s(33 个循环), 72 $^{\circ}$ C 30 s(33 个循环), 4 $^{\circ}$ C 延伸。PCR 反应结束后,使用 PCR 产物 5 μ l 上样,进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3.4 DNA 测序鉴定 挑选 1 号克隆,接菌,过夜培养后,使用质粒抽提试剂盒提取质粒;抽提好的质粒使用载体上的引物送测序。对于测序结果正确的克隆,进行不含内毒素质粒的提取;提取完成之后,进行 0.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 携带 siNgR199 的慢病毒重组体的包装、生产和鉴定 胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞,细胞密度为 0.5 \times 10⁹/L 时,重新接种于 10 ml 的细胞培养皿中,37 $^{\circ}$ C、50 ml/L CO₂ 培养箱内培养,细胞密度达 70% 左右时进行转染。使用慢病毒包装质粒混合物和构建好的慢病毒穿梭质粒共转染 293T 细胞;转染后 24 h 使用含 1% FBS 的 DMEM 对细胞进行换液处理;转染后 48 h,收集细胞上清,5 000 r/min($r=10$ cm)离心 5 min,然后使用 0.45 μ m 的 PVDF 膜过滤上清液,冰浴保存;按相同浓度接种生长状态良好的 293 细胞到 96 孔板,分为 2 组,每组 5 个孔,使用病毒感染细胞,实验组使用生产的待测定病毒液,对照组使用标准病毒液(1 \times 10⁸ ifu/ml),两组样品按 MOI 值分为 5 个梯度:1、3、5、10 和 20,37 $^{\circ}$ C 温箱培育 8 h 后,更换 1%FBS 的培养液继续培养,感染 24 h 之后,细胞荧光趋于稳定后,通过荧光显微镜观察荧光强度和数量,和标准病毒液相比较以确定病毒滴度和最适感染的 MOI 值。

2 结果

2.1 携带目的基因慢病毒穿梭质粒的鉴定

2.1.1 PCR 结果 PCR 反应结束后,取产物 5 μ l 上样 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1。

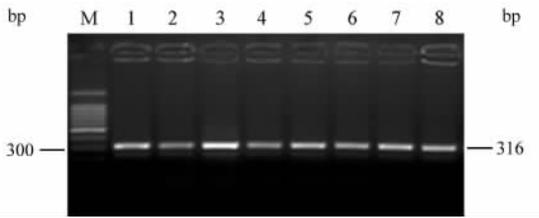


图1 慢病毒穿梭质粒 PCR 产物电泳图
Fig 1 Electropherogram of PCR product of lentivirus shuttle plasmid

M:100 bp DNA ladder;1-8:Lentivaris-NgR plasmid DNA(316 bp)

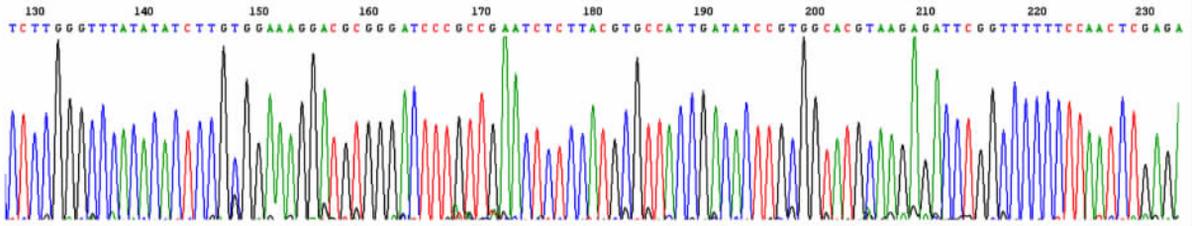


图2 慢病毒穿梭质粒 DNA 测序结果
Fig 2 DNA sequencing of lentivirus shuttle plasmid

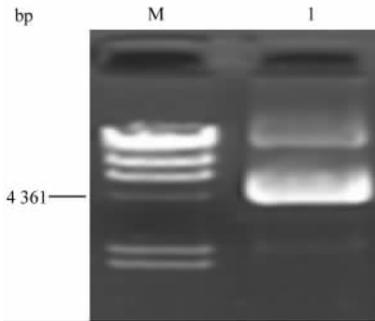


图3 不含内毒素质粒凝胶电泳图
Fig 3 Gel electropherogram of plasmid without endotoxin
M: λ HindIII DNA marker;1:Lentivector-NgR plasmid DNA

2.1.2 DNA 测序鉴定 DNA 测序的结果与实验要求的 DNA 序列完全一致(图 2)。对于测序结果正确的克隆,进行不含内毒素质粒的提取:提取完成之后,进行 0.5%琼脂糖凝胶电泳,1 μ l 上样。从电泳图(图 3)上看,超螺旋结构的质粒占了大多数,而且没有 RNA 核蛋白污染,状况较好。使用蛋白核酸测定仪(Eppendorf, PS232C)测量 Lentivector-NgR plasmid DNA D_{260}/D_{280} 值为 1.79,表明我们获得了纯度和完整性均较高的质粒 DNA。

2.2 携带目的基因慢病毒重组体的包装及鉴定 使用慢病毒包装质粒混合物和构建好的慢病毒穿梭质粒共转染 293T 细胞转染后 24 h,荧光显微镜下观察荧光强度强烈,细胞生长良好,表明病毒包装成功(图 4A,4B);转染后 48 h 收集合成的慢病毒液,再分别与标准病毒液感染 293T 细胞,感染后 24 h 在荧光显微下进行两组间对照比较,通过比较荧光强度和数量,发现两组间荧光强度和数量一致,当 MOI 值为 3 时,荧光强度最为强烈,从而确定生产的病毒液滴度为 1.0×10^8 ifu/ml,并确定适合高效感染的 MOI 值为 3(图 4C,4D)。

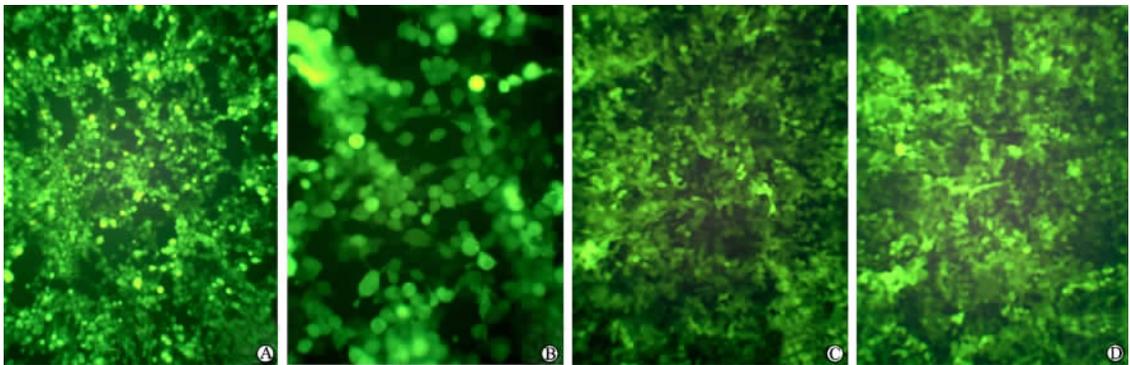


图4 慢病毒重组体的包装及鉴定

Fig 4 Package and identification of lentivirus recombinant

A: 24 h after transfection, $\times 40$; B: 24 h after transfection, $\times 100$; C: 24 h after infecting 293T with standard lentivirus, MOT=3, $\times 40$; D: 24 h after infecting 293T with target lentivirus, MOT=3, $\times 40$

3 讨论

脊髓损伤的基因治疗目前认为是最有前途的治疗方法之一,也是当前治疗脊髓损伤研究的热点。近来,关于 NogoA、MAG 和 OMgp 等髓磷脂相关抑制因子的研究倍受学者们重视。研究证明^[1],应用 Nogo-A 抗体 IN-1 中和髓磷脂中轴突生长抑制物,其结果虽然在一定程度上促进了神经元轴突再生和损伤大鼠功能恢复,但其结果仍然不尽人意,这可能由于 IN-1 不能同时对抗 MAG 和 OMgp 的轴突再生抑制作用。因此,3 种髓磷脂相关抑制物 Nogo-66、MAG 和 OMgp 的共同受体 NgR 逐渐成为另一个引入瞩目的靶点。NgR 在中枢神经系统的多个不同类型的神经元中表达,其作为配基和信号传递与调节的功能域已经明确。由于 NgR 具有高亲和性、高效性(同时与 3 个抑制蛋白结合)以及神经特异性,NgR 已经成为中枢神经系统损伤后促进轴突再生的诱人目标。

体外合成 siRNA 的应用是 RNA 干扰技术的最新发展,尤其是在哺乳动物细胞可特异性抑制、降解同源的 RNA 序列,有效阻止相应蛋白质的表达,又可避免长链 dsRNA 引起的非特异性基因降解和细胞死亡。siRNA 的导入方式包括直接导入法和间接导入法:(1)直接导入法:传统体外合成 siRNA 的方法是分别转录出正义和反义 RNA,再将两者退火,形成双链 RNA。Myers 等^[3]用活化重组 Dicer 在体外成功地将 dsRNA 切割成具有基因沉默活性的 siRNA,从而使体外合成步骤大大简化。合成的 siRNA 可利用脂质体融合技术转入细胞中,但有些细胞脂质体转移效果差,且作用短暂。(2)载体导入法:与直接导入相比,载体导入法的优势在于 siRNA 能持续表达,且生物载体的转化效率较高,转化的细胞更接近自然状态。常用的载体包括质粒和病毒。质粒作为稳定载体在体外能成功转化 siRNA 并持续表达,但是却不能在哺乳动物体内发挥作用。如今人们已将注意力集中到病毒特别是慢病毒载体来构建 siRNA 表达系统。慢病毒载体不仅能持续有效地表达 siRNA,而且还能将该效应传给子代。正是在此背景下,本实验中我们选择慢病毒作为传导 siNgR199 的载体。

慢病毒属逆转录病毒家族,为非致癌性病毒,能感染多种脏器,其感染特点为潜伏期长、持续时间长的慢性感染。慢病毒独特之处在于其在逆转录酶基因和包膜基因之间以及 3'端包膜蛋白基因区含有开放性读码框,最常用的慢病毒是基于人类免疫缺陷 I 型病毒演变而来。慢病毒载体以删除 vpr、vpu、

nef、vif 基因的质粒进行包装,以增加其安全性^[6]。构建慢病毒载体时,5'长末端重复系列的 U3 区以细胞巨化病毒(CMV)启动子取代,而在 3'长末端重复系列的 U3 区,通过删除 133 bp 碱基以达到病毒载体的自身灭活。同 AAV 比较,以 G 型水泡性口炎病毒包装的假型化慢病毒载体在感染非分裂性的神经元细胞时特别适合,同时对干细胞和其他体外培养的细胞具有高度亲嗜性,这种特性在其他的病毒载体中并不存在。慢病毒具有携带 9 kb 基因信物的容量,对神经元具有高度亲嗜性,不具有逆向转运的能力,对干细胞也具亲嗜性,在中枢系统中作为介导 RNA 干扰的载体非常理想。目前尚没有一种病毒载体可以作为所有疾病类型基因研究的通用工具,虽然慢病毒载体较之 AAV 具有更强的嗜神经性,但由于其是基于人类免疫缺陷 I 型病毒演变而来,存在一定的风险性,临床试验中只应用于 HIV 阳性的患者,从而使其应用大大受到限制。科学家们正致力于研究新型的慢病毒载体^[5-6],以提高其生物安全性并保留其长期表达及强嗜神经性,在其应用于临床时尚需得到长期严格检验和观察。在未来几年中,慢病毒载体可能是中枢神经系统功能障碍基因治疗特别是介导 RNA 干扰的基因治疗的最常用的载体。

本次实验中作者构建了大鼠 NgR 基因 RNA 干扰慢病毒表达载体,并经酶切鉴定及 PCR 鉴定,结果证实病毒载体构建成功,并具有较高滴度,为进一步应用 NgR 基因 RNA 干扰慢病毒载体治疗脊髓损伤的治疗研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Woolf C J, Bloechlinger S. It takes more than two to Nogo[J]. *Science*, 2002, 297: 1132-1134.
- [2] 张涛,袁文,刘百峰,等. siRNA 干扰大鼠神经元 Nogo 受体 mRNA 表达的时程研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2005, 15: 588-590.
- [3] Myers J W, Jones J T, Meyer T, et al. Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 324-328.
- [4] Karolewski B A, Watson D J, Parente M K, et al. Comparison of transfection conditions for a lentivirus vector produced in large volumes[J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14: 1287-1296.
- [5] Sinn P L, Sauter S L, McCray P B Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors—design, biosafety, and production[J]. *Gene Ther*, 2005, 12: 1089-1098.
- [6] Romano G. Current development of lentiviral-mediated gene transfer[J]. *Drug News Perspect*, 2005, 18: 128-134.

[收稿日期] 2006-11-23

[修回日期] 2007-01-09

[本文编辑] 邓晓群