

## 专题介绍

## ShRNA 慢病毒表达载体的构建和病毒颗粒包装

华敏敏 刘默芳\*

(中科院上海生命科学研究院生化细胞所 RNA 研究技术平台)

慢病毒载体主要用于感染对常规方法转染效率较低的细胞,如原代细胞等。慢病毒颗粒可同时感染增殖和非增殖的细胞,且感染比较稳定、持久。运用慢病毒载体,可实现特定基因的高表达,也可以表达 ShRNA 以 RNAi 方式下调某基因的表达。本文主要介绍 ShRNA 慢病毒表达载体的构建和病毒颗粒包装。实验步骤如下:

## 一、ShRNA 慢病毒表达载体的构建

### 1 根据实验目的选择合适的载体。

目前已有多种比较成熟的商业化 ShRNA 表达载体,可根据载体抗性,启动子的类型,是否可用于稳转株筛选、可融合表达荧光蛋白等选择合适的载体。

### 2 对目的基因设计构建 ShRNA 载体。

可利用一些公司(如 Dharmacon, Sigma 等)网站的 siRNA 设计软件,设计 3~5 个 siRNA 序列构建到 ShRNA 载体,经测序鉴定正确的克隆,用于下一步 RNAi 效率分析。

### 3 选择高效的慢病毒载体。

对 293T 细胞或是指定细胞系进行转染。可利用 qRT-PCR 方法分析目的 mRNA 的表达水平,并通过 Western blot 分析鉴定蛋白水平的变化。一般应选择 RNAi 沉默效率达到 70% 以上的 ShRNA 质粒进行后续的基因功能研究实验。

## 二、慢病毒颗粒包装

1. 选择细胞状态佳的 293T 细胞作为慢病毒包装用的细胞系。

2. 铺细胞: 在转染前 24 h, 铺 293T 细胞, 转染时细胞密度控制在 80% 左右。注意: 铺细胞时可左右轻轻摇晃培养皿, 以使细胞均匀分布在培养皿内。

3. 转染: 取大抽制备的高质量质粒(包括慢病毒包装质粒和慢病毒载体)进行转染。转染完毕后放入培

养箱, 培养条件和普通培养箱一样(从生物安全的角度考虑, 应将慢病毒包装用的培养箱和普通细胞培养箱分开)。

注意事项:

●病毒包装时各质粒的转染比例需按照生产商的说明进行。

●常用转染方法有磷酸钙转染法, 脂质体转染法, 转染效率决定病毒颗粒的产率。

●从此步骤开始, 由于细胞已开始包装病毒颗粒, 之后的所有操作必需在生物安全柜内小心完成!

4. 换液: 转染后 6~12h(根据转染方法的不同), 将培养皿中的培养基移弃, 加入新鲜的培养基(根据培养皿的大小决定培养基的用量)。

5. 收集慢病毒颗粒上清: 根据需要, 可收集 48 h, 72h (按转染时为 0 h 计)的慢病毒颗粒上清。

6. 浓缩: 若需要进一步提高慢病毒的滴度, 可将收集好的慢病毒颗粒上清进行超速离心: 50 000g×2 h, 4℃。离心结束后, 小心移去上清, 用少量 PBS 或是培养基溶解慢病毒颗粒(2 h 以上), 4℃。注意: 超速离心前可先低速离心(3 000 rpm×5min), 以除去细胞碎片。

7. 保存: 若直接保存慢病毒颗粒上清, 则将上清离心(3 000 rpm×5min)后保存; 若保存浓缩后的慢病毒颗粒, 直接保存即可。短时间内(一周左右)保存, 可将慢病毒颗粒置于 4℃; 长时间保存, 则应置于 -80℃ 冰箱。反复冻融会影响慢病毒颗粒的感染效率, 需长期保存的慢病毒颗粒可进行适当的分装。

## 三、慢病毒颗粒滴度的测定

为了保证包装的慢病毒颗粒有效, 同是也为了确

\* 通讯作者。Tel: 021-54921146, Fax: 021-54921011, E-mail: mfliu@sibs.ac.cn

定用于感染目的细胞(如原代细胞)所需要的慢病毒颗粒量,需要对得到的慢病毒颗粒(上清或浓缩后的悬液均可)进行滴度的测定。步骤如下:

1. 种细胞: 在 24 孔板中铺 293T 细胞,  $1 \times 10^5$  细胞/孔。
2. 换液: 24 h 后, 将孔板中的培养液换成 500  $\mu$ l 新鲜的培养基, 并加入 2~10  $\mu$ g/ml Polybrene (一种多聚阳离子, 可以中和电荷间的相互作用, 从而增加假病毒衣壳和细胞膜间的结合能力)。若培养时间超过 12 h, polybrene 会对某些细胞有毒性。
3. 感染: 一个滴度的测定需要用 3 个孔, 在第一个孔中加入 1 $\mu$ l~50 $\mu$ l 慢病毒颗粒, 即将慢病毒稀释 500~10 倍, 在第二个孔中加入 10 倍量的慢病毒颗粒。另一孔作为对照, 也加入等浓度的 Polybrene。
4. 换液: 在 12 h 内换不含 Polybrene 的新鲜培养液 1 ml, 继续培养 24~36 h。必要时可分到稍大的培养皿内培养。
5. FACS: 将慢病毒颗粒感染过的细胞消化后以 PBS 重悬, 利用载体共表达的 GFP 荧光在流式细胞仪上进行分析, 计算表达荧光细胞的比例。
6. 计算滴度: 细胞数(以铺时计,  $1 \times 10^5$ ) $\times$  荧光表达比例  $\times 10^3$  / 慢病毒体积( $\mu$ l)=TU/ml

## 四、其他注意事项

### 1. 实验中的关键点:

- 构建有效的 ShRNA 慢病毒载体。
- 慢病毒表达载体的质量: 转染效率很大程度上依赖于质粒 DNA 的质量。
- 状态良好的 293T 细胞系: 细胞状态影响转染效率, 而转染效率的高低直接决定了慢病毒颗粒的产率。

### 2 生物废弃物的处理:

- 虽然用于慢病毒包装的质粒均已经过改造, 使其尽可能具有最大的生物安全性。但由于其可以和内源性的病毒重组, 形成一个可以自我复制的病毒, 故仍然具有潜在生物公害危险性。因此, 慢病毒包装实验处于 NIH 生物安全级别 2 级。
- 在实验过程中, 要小心操作, 穿戴手套以及实验服, 并且凡是涉及到慢病毒颗粒包装的步骤, 均要在在安全 2 级层流通风橱下进行, 并且在操作过程中要尽量降低气溶胶的产生, 一旦有含病毒颗粒的液体溅出, 一定要及时清理台面。
- 所有相关的培养基及废弃物在弃置前需要高压灭菌方法灭活。在带离实验区前, 需要在有标记的(生物公害, 有传染性垃圾)容器内密封后方可带出。