

引用格式:边 帅,赵 月,李芳宇,等. 自噬检测质粒 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 的构建和表达鉴定[J]. 科学技术与工程, 2019, 19(33): 101-104

Bian Shuai,Zhao Yue,Li Fangyu, et al. Construction and expression identification of autophagy detection plasmid pLVX-mRFP-EGFP-LC3 [J]. Science Technology and Engineering, 2019, 19(33): 101-104

生物科学

# 自噬检测质粒 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 的构建和表达鉴定

边 帅 赵 月 李芳宇 赵大庆 王佳雯\*

(长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117)

**摘 要** 细胞自噬的机体重要的一种代谢过程,为了更好地研究不同条件下细胞自噬的水平,构建自噬检测质粒 pLVX-mRFP-EGFP-LC3。使用 Trizol 法提取 Hela 细胞总 RNA,PCR 技术特异性扩增 LC3 基因,将目的片段插入 pEGFP-N3 载体中。再将 mRFP 片段插入到 EGFP-LC3 质粒中,利用 PCR 技术扩增带有不同酶切位点的 mRFP-EGFP-LC3 片段,插入到慢病毒载体 pLVX-puro 中。通过 Fugene® 6 将质粒瞬时转染到 293T 细胞中,使用荧光显微镜检测荧光蛋白的表达,使用 Western blotting 检测目的基因的表达。结果显示成功构建自噬检测质粒 pLVX-mRFP-EGFP-LC3,荧光显微镜下可见红色和绿色荧光,Western blotting 方法检测到 LC3 的表达。

**关键词** 自噬 慢病毒载体 双荧光标签 LC3

**中图分类号** Q786; **文献标志码** B

细胞自噬是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡,与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物的过程。自噬捕获并降解一些细胞内容物如蛋白和细胞器来维持自身代谢和平衡<sup>[1-3]</sup>。它参与细胞对外界刺激发生反应,参与机体发育过程,并与衰老、肿瘤发生和发展、肌肉和神经退行性疾病等病理过程有关<sup>[4-6]</sup>。LC3 是自噬的一个重要指示分子,自噬体中 LC3 的存在,及其向低迁移形式的 LC3-II 的转化被作为自噬发生的“指示器”<sup>[7]</sup>。本研究通过构建慢病毒表达质粒 pLVX-mRFP-EGFP-LC3,以期后续通过转染或感染方法检测细胞内自噬水平的变化提供有力的工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

质粒 pEGFP-C3、pmRFP-N1、pLVX-puro、*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株和 293T 细胞由本实验室保存。TRIZOL

和双抗购自 invitrogen 公司;PCR 相关试剂、反转录试剂盒、限制性内切酶、DNA 连接酶、胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒及质粒提取试剂盒等购自 TaKaRa 公司;转染试剂 Fugene® 6 购自 Promega 公司;兔抗 LC3 单克隆抗体购自 CST 公司;碱性磷酸酶标记的山羊抗兔二抗购自 Jackson 公司;DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;细胞培养板购自 Nest 公司;其他生化试剂均为国产分析纯或进口分装试剂。PCR 引物由长春华大中天生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

293T 细胞培养于 DMEM 培养基,加入 10% 血清和 1% 双抗,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。待细胞生长至汇合度 90% 时传代培养。

#### 1.2.2 Hela 细胞 cDNA 的获取

10<sup>6</sup> 个细胞中加入 1 mL TRIZOL,混匀室温静置 10 min,加入 0.2 mL 氯仿,剧烈震荡 15 s,静置 3 min。4 °C 条件下 12 000g 离心 15 min。取上层水相转移到一新的无 RNA 酶离心管中,加入等体积异丙醇混匀,室温孵育 10 min,4 °C 条件下 12 000g 离心 10 min。移去上清,加入 1 mL 75% 乙醇(DEPC 水配制),混匀后 4 °C 条件下 7 000g 离心 5 min,重

2019年3月23日收到 中国博士后科学基金(2017M621181)和吉林省青年人才托举工程项目(181910)资助

第一作者简介:边 帅(1991—),女,汉族,博士研究生。研究方向:中药化学。

\*通信作者简介:王佳雯,女,助理研究员。E-mail:wangjiawen1229@163.com。

复两次。小心吸去上清,室温干燥 10 min。加入 40  $\mu$ L 无 RNA 酶的水溶解 RNA,使用逆转录酶以及 Oligo(dt) 进行逆转录 PCR 获得 cDNA。

### 1.2.3 LC3 基因的 PCR 扩增

根据 NCBI 所提供的序列设计引物,上游引物为:TAGAATTCTATGCCGTCGGAG(引入 *EcoR* I 酶切位点),下游引物为:GCGGATCCTTACACTGACAATTTC(引入 *Bam*H I 酶切位点),以 Hela 细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,扩增 30 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.2.4 mRFP 基因的 PCR 扩增

根据 mRFP 基因序列设计引物,上游引物为:TAGCTAGCCACCATGGCCTCCTCC(引入 *Nhe* I 酶切位点),下游引物为:GCACCGGTGCGCCGGTGGAGTGG(引入 *Age* I 酶切位点),以 pmRFP-N1 为模板进行 PCR 扩增。反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,扩增 30 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.2.5 mRFP-EGFP-LC3 质粒的构建和鉴定

将回收的 LC3 的 PCR 产物和 pEGFP-C3 质粒分别进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切,将目的片段和载体片段经胶回收后使用 DNA 连接酶在 16  $^{\circ}$ C 条件下连接过夜,连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$  细胞,接种卡那抗性的 LB 固体培养基,37  $^{\circ}$ C 条件下过夜培养,挑单克隆,提质粒后进行酶切鉴定,获得 GFP-LC3 表达质粒。

将回收的 mRFP 的 PCR 产物和 GFP-LC3 质粒分别进行 *Nhe* I 和 *Age* I 双酶切,将目的片段和载体片段经胶回收后使用 DNA 连接酶在 16  $^{\circ}$ C 条件下连接过夜,连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$  细胞,接种卡那抗性的 LB 固体培养基,37  $^{\circ}$ C 条件下过夜培养,挑单克隆,提质粒后进行酶切鉴定并测序,获得 mRFP-GFP-LC3 表达质粒。

### 1.2.6 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 质粒的构建和鉴定

mRFP-EGFP-LC3 表达质粒为模板,设计引物,上游引物:CGGGATCCGCCACCATGGCCTCCTCC(引入 *Bam*H I 酶切位点),下游引物:GCTCTAGATTA-CACTGACAATTTCAT(引入 *Xba* I 酶切位点)进行 PCR 扩增,反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,扩增 30 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将回收的 PCR 产物和 pLVX-puro 质粒分别进行 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切,将目的片段和载体片段经胶回收后使用 DNA 连接酶在 16  $^{\circ}$ C 条件下连接过夜,连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$  细胞,接种氨苄抗性的 LB 固体培养基,37  $^{\circ}$ C

条件下过夜培养,挑单克隆,提质粒后进行酶切鉴定,获得 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 表达质粒。

### 1.2.7 293T 转染和荧光观察

293T 细胞铺于 6 孔板中,在 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中生长至汇合度达到 70%。使用 Fugene<sup>®</sup> 6 转染试剂将重组质粒 pLVX-mRFP-GFP-LC3 转入 293T 细胞。48 h 后弃上清,加入磷酸盐缓冲溶液(PBS),在荧光显微镜下分别使用蓝色和绿色激光观察。

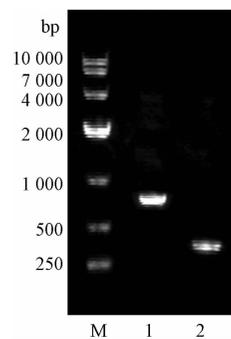
### 1.2.8 Western blot

转染 36~48 h 后收集细胞,PBS 冲洗 1 次除去残留培养基,RIPA 裂解缓冲液裂解细胞。加入上样缓冲液混合并煮沸 10 min 致蛋白变性,使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离样品。通过半干转仪将凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜在 5% 的脱脂牛奶中在室温封闭 30 min,PBST 溶液冲洗 1 次,加入含有一抗的 1% PBS 脱脂牛奶,室温摇动孵育 1~2 h 或者 4  $^{\circ}$ C 过夜,弃一抗,用 PBST 溶液漂洗 3 次,每次 5 min。再加入混有对应二抗的 1% PBS 脱脂牛奶,室温摇动孵育 45 min。再用 PBST 溶液漂洗 3 次,PBS 溶液漂洗 1 次,最后加入酶联二抗的显色底物,至特异性条带清晰可见时,终止反应。

## 2 结果

### 2.1 LC3 和 mRFP 的 PCR 扩增结果

Hela 细胞中提取总 RNA,以 RNA 为模板使用 RT-PCR 技术获得 cDNA,设计引物,再次进行 PCR 反应。以 DNA Marker 为对照,在 250~500 bp 处可见一特异性亮带,与 LC3 大小相符。以 pmRFP-N1 为模板,根据 mRFP 序列设计引物,进行 PCR 反应。以 DNA Marker 为对照,在 500~1 000 bp 处可见一特异性亮带,与 mRFP 大小相符。如图 1 所示。



M 为 DNA 相对分子质量标准;1 为 mRFP;2 为 LC3

图 1 LC3 和 mRFP 的 PCR 扩增结果

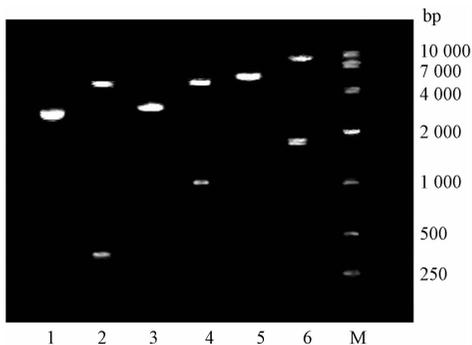
Fig. 1 PCR amplification of LC3 and mRFP

## 2.2 EGFP-LC3 质粒的鉴定

LC3 的 PCR 产物纯化后,经双酶切并胶回收,插入到 pEGFP-C3 中,并进行琼脂糖凝胶电泳分析。由图可见,质粒线性大小为 5 000 bp 左右,由于质粒具有超螺旋结构,在电泳结果中展现出 2 000 ~ 3 000 bp 大小的条带。经过双酶切鉴定,在 5 000 bp 和 250 ~ 500 bp 分别可见特异性条带,为载体和目的片段,说明 EGFP-LC3 质粒构建成功。

## 2.3 mRFP-EGFP-LC3 质粒的鉴定

mRFP 的 PCR 产物纯化后,经双酶切并胶回收,插入到 EGFP-LC3 质粒中,并进行琼脂糖凝胶电泳分析。由图 2 可见,质粒线性大小为 5.7 kb 左右,由于质粒具有超螺旋结构,在电泳结果中展现出 3 000 bp 大小的条带。经过双酶切鉴定,在 5 000 bp 和 500 ~ 1 000 bp 分别可见特异性条带,为载体和目的片段,说明 mRFP-EGFP-LC3 质粒构建成功。采用通用引物测序,结果证明插入片段 mRFP 和 LC3 均无突变,构建成功。测序结果与 NCBI 数据库中序列匹配率为 100%。



1 为 EGFP-LC3 质粒;2 为 EGFP-LC3 双酶切;3 为 mRFP-EGFP-LC3 质粒;4 为 mRFP-EGFP-LC3 双酶切;5 为 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 质粒;6 为 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 双酶切;M 为 DNA 相对分子质量标准

图 2 EGFP-LC3、mRFP-EGFP-LC3 和

pLVX-mRFP-EGFP-LC3 质粒的双酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of EGFP-LC3, mRFP-EGFP-LC3 and pLVX-mRFP-EGFP-LC3 plasmid by double enzyme digestion

## 2.4 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 质粒的鉴定

以 mRFP-EGFP-LC3 质粒为模板,通过 PCR 方法获得两端带有不同酶切位点的 mRFP-EGFP-LC3 片段,经琼脂糖凝胶电泳,在 2 000 bp 左右可见一特异性条带,与预期大小相符。PCR 产物纯化后,双酶切并胶回收,插入到 pLVX-puro 质粒中,并进行琼脂糖凝胶电泳分析。由图 2 可见,质粒线性大小为 10 kb 左右,由于质粒具有超螺旋结构,在电泳结果中展现出 5 000 bp 大小的条带。经过双酶切鉴定,在 8 000 bp 和 1 000 ~ 2 000 bp 处分别可见特异性条带,为载体和目的片段,再次测序,结果显示插入片

段无突变,说明 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 质粒质粒构建成功。

## 2.5 荧光显微镜观察结果

通过荧光显微镜观察可见,转染 mRFP-EGFP-LC3 和 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 重组质粒的细胞可见明显的绿色及红色荧光,说明插入片段得到了表达。转染 EGFP-LC3 质粒的细胞可见明显绿色荧光而无红色荧光。如图 3 所示。

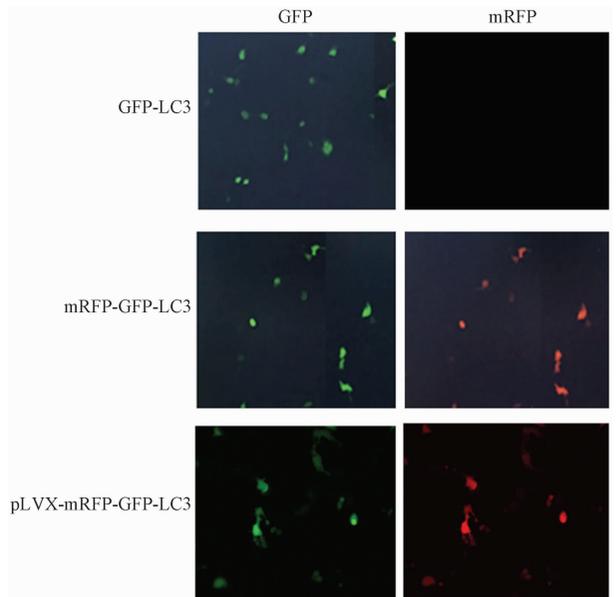
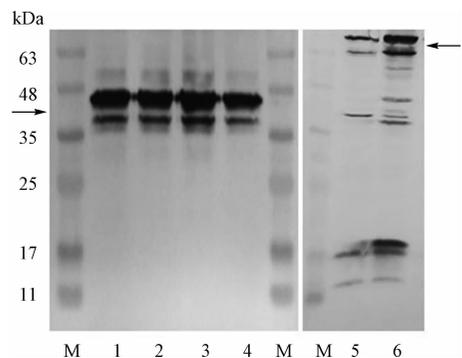


图 3 荧光蛋白表达的检测结果

Fig. 3 Detection results of fluorescence protein expression

## 2.6 Western blot 分析结果

三种质粒转染 293T 细胞,48 h 后收取细胞使用 LC3 抗体进行 Western blotting 分析,结果表明,转染 EGFP-LC3 质粒的样品在 35 ~ 48 kDa 处可见特异性条带(图 4,第 1 ~ 4 道),转染 mRFP-EGFP-LC3 和 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 的样品在 63 ~ 75 kDa 可



M 为蛋白质分子量标准;1 ~ 4 为转染 EGFP-LC3 质粒的样品;5 为转染 mRFP-EGFP-LC3 质粒的样品;6 为转染 pLVX-mRFP-EGFP-LC3 质粒的样品

图 4 目的蛋白 LC3 表达的 western blot 检测结果

Fig. 4 Western blot analysis of LC3 expression of target protein

见特异性条带(图4,第5、6道),说明LC3基因在293T细胞中得到了表达。

### 3 结论

EGFP,即增强绿色荧光蛋白,由GFP改造而来,在488 nm波长激发下会发出明亮的绿色荧光,荧光强度比GFP大6倍以上。mRFP是红色荧光蛋白,在561 nm波长激发下会发出红色荧光。这两种荧光蛋白被广泛应用于蛋白示踪中<sup>[8-10]</sup>。LC3是一个自噬标记分子,当自噬启动,自噬体出现时,mRFP和EGFP均可观察到点状分布,两色荧光重合后出现黄色斑点;当自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体后,红色斑点指示自噬溶酶体,而绿色荧光蛋白由于对酸性敏感,在融合后发生猝灭<sup>[11,12]</sup>。研究共构建成功了三种质粒,分别为EGFP-LC3、mRFP-EGFP-LC3两种表达质粒以及pLVX-mRFP-EGFP-LC3慢病毒表达质粒。其中表达质粒可以直接转染细胞,观察不同条件下细胞自噬的情况,慢病毒表达质粒可以与包装质粒共转染293T细胞,完成病毒包装后感染其他待测细胞,通过观察红色荧光与绿色荧光的比例来量化自噬的水平,或通过嘌呤霉素筛选稳定表达mRFP-GFP-LC3蛋白的细胞系,为后续研究细胞自噬调节提供了基础<sup>[13]</sup>。

#### 参 考 文 献

- Klionsky D J, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12: 1-222
- Klionsky D J, Abdalla F C, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8: 445-544
- Klionsky D J, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. *Autophagy*, 2008(4): 151-175
- White E, Mehnert J M, Chan C S. Autophagy, metabolism, and cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21: 5037-5046
- White E. The role for autophagy in cancer [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125: 42-46
- Metaxakis A, Ploumi C, Tavernarakis N. Autophagy in age-associated neurodegeneration [J]. *Cells*, 2018(7): 5-37
- Schaaf M B, Keulers T G, Vooijs M A, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un) related functions [J]. *Faseb Journal*, 2016, 30: 3961-3978
- Chen X, Zaro J L, Shen W C. Fusion protein linkers: property, design and functionality [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65: 1357-1369
- Ford K L, Baumgartner K, Henricot B, et al. A native promoter and inclusion of an intron is necessary for efficient expression of GFP or mRFP in *Armillaria mellea* [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 29226
- Mishin A S, Belousov V V, Solntsev K M, et al. Novel uses of fluorescent proteins [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 27: 1-9
- Kim D G, Jung K H, Lee D G, et al. 20(S)-Ginsenoside Rg3 is a novel inhibitor of autophagy and sensitizes hepatocellular carcinoma to doxorubicin [J]. *Oncotarget*, 2014(5): 4438-4451
- Girault V, Gilard V, Marguet F, et al. Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels [J]. *Cell Death & Disease*, 2017(8): e2610
- 边 帅, 赵 月, 白雪媛, 等. 梅花鹿 BST-2 真核表达质粒的构建和表达 [J]. *中国兽医杂志*, 2018, 54(9): 43-47, 125
- Bian Shuai, Zhao Yue, Bai Xueyuan, et al. Construction and expression of recombinant eukaryotic plasmid of sika deer BST-2 [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2018, 54(9): 43-47, 125

## Construction and Expression Identification of Autophagy Detection Plasmid pLVX-mRFP-EGFP-LC3

BIAN Shuai, ZHAO Yue, LI Fang-yu, ZHAO Da-qing, WANG Jia-wen\*

(Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] The autophagy is an important metabolic process. In order to better study autophagy under different conditions, an autophagy detection plasmid pLVX-MRFP-EGFP-LC3 was constructed. The total RNA of Hela cells was extracted by Trizol. LC3 fragment was specifically amplified by PCR technique, and then inserted into the plasmid pEGFP-N3 vector. The mRFP fragment was inserted into the EGFP-LC3 plasmid, and the mRFP-EGFP-LC3 fragment with different restriction sites was amplified by PCR and inserted into the lentiviral vector pLVX-puro. The plasmid was transiently transfected into 293T cells with Fugene® 6. The expression of the fluorescent protein was detected by fluorescence microscope. The expression of the target gene was detected by western blotting. The results showed that the autophagy detection plasmid pLVX-mRFP-EGFP-LC3 was successfully constructed. Red and green fluorescence were observed under fluorescence microscope. The expression of LC3 was detected by western blotting.

[Key words] autophagy    lentiviral vector    double fluorescent label    LC3