

## SCN3A 基因突变型表达载体的构建及在 HEK 293 细胞中的表达

陈勇军<sup>1</sup>, 邱国真<sup>2</sup>, 汤斌<sup>3</sup>, 刘稀金<sup>1</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 何妍妍<sup>1</sup>

(1. 南华大学附属南华医院神经内科, 湖南衡阳 421002; 2. 深圳市罗湖区人民医院神经内科; 3. 广州医科大学神经病学研究所)

**摘要:** **目的** 体外构建含有 SCN3A 基因 mRNA 片段的质粒 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A 的突变体 N302S (c.905A>G), 为进一步的功能研究奠定实验基础。 **方法** 设计带突变位点的引物, 以野生型质粒为模板进行定点诱变, 构建突变质粒。质粒经扩增纯化后瞬时转染到 HEK293 细胞中, 24 h 后用 RT-PCR 方法验证目的基因的表达。 **结果** 重组质粒经酶切鉴定及测序证实突变成功。突变质粒转入 HEK293 细胞系 24 h 后, RT-PCR 可以检测到目的基因的表达。 **结论** 本实验成功地构建了 SCN3A 基因突变型真核表达载体 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A-N302S, 并在基因水平上验证了能在 HEK293 细胞中表达。

**关键词:** SCN3A; 质粒; 表达; RT-PCR

中图分类号: R349 文献标识码: A

## Construction of SCN3A gene mutant expression vector and its expression in HEK 293 cells

CHEN Yongjun, QIU Guozhen, TANG Bin, et al

(Department of Neurology, Nanhua Hospital Affiliated to University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

**Abstract:** **Objective** To construct the mutant N302S (c.905A>G) of plasmid pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A containing the SCN3A gene mRNA fragment in vitro, and provide experimental basis for further functional studies. **Methods** The primers with mutation sites were designed and the mutant plasmids were constructed by site-directed mutagenesis using wild-type plasmids as templates. The recombinant plasmid was transiently transfected into HEK293 cells, and the expression of the target gene was verified by RT-PCR after 24 hours. **Results** Recombinant plasmid digestion and sequencing confirmed that the mutation was successful. The expression of the target gene was detected by RT-PCR after transfection of recombinant SCN3A eukaryotic expression plasmid into HEK293 cell line. **Conclusion** The SCN3A gene mutant eukaryotic expression vector pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A-N302S was successfully constructed and expressed in HEK293 cells at the gene level.

**Key words:** SCN3A; plasmid; expression; RT-PCR

癫痫是以脑部神经元异常高度放电所致的突发和短暂的中枢神经系统功能失常为特征的综合征, 电压依赖性钠离子通道作为神经系统兴奋活动的基础<sup>[1]</sup>, 与癫痫的发生密切相关。在哺乳动物中, 已经证实有功能表达的钠通道亚型有 9 型<sup>[2-3]</sup>, 亚型

SCN1A 早已明确为热性惊厥相关性癫痫的主要致病基因<sup>[4-5]</sup>, 而 SCN3A 与癫痫的相关性在近年才逐渐引起人们的关注<sup>[6-8]</sup>。本文作者对热性惊厥相关性癫痫的病人进行 SCN3A 基因筛查时发现一例新发突变 c.905A>G/p.N302S, 该突变位于钠离子通道的孔区, 而正常人对照中没有发现相应的突变, 与人和哺乳动物各型钠离子通道进行同源比对后发现高度保留, 提示可能为致病性突变。为了进一步阐述基因突变后对蛋白功能的影响, 如对钠离子通道电

收稿日期: 2016-10-11; 修回日期: 2016-12-30

基金项目: 湖南省教育厅立项课题资助 (15C1206) 及衡阳市科技局课题资助 (2015KJ59)。

生理功能的影响,以探讨基因突变的致病机制,本实验旨在构建 SCN3A 基因的突变表达载体,并在 HEK293 细胞上验证表达,为深入的功能研究提供实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 质粒、菌株、细胞和主要试剂** 含有正常人 SCN3A 基因 mRNA 全长片段的真核细胞表达质粒 (pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A) 由北京敖锐东源生物科技有限公司 (OriGene Technologies, Inc) 合成。电转化感受态大肠杆菌菌株 (STBL<sub>2</sub>) 购自于 Invitrogen 公司。HEK293 细胞购自中科院上海细胞库。定点诱变试剂盒 (Stratagene 公司), EcoR I 和 Xho I 内切酶、DNA marker、胶回收试剂盒 (大连宝生物工程有限公司), 质粒提取试剂盒、转染试剂 (德国 QIAGEN 公司), DMEM、优等胎牛血清 (赛默飞世尔化学制品有限公司), PCR 扩增试剂盒 (广州东盛生物制品有限公司), RNA 提取试剂、逆转录试剂 (Fermentas 公司), 引物合成 (上海生工生物工程有限公司)、millipore 透析膜 (美国密理博公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A 野生质粒鉴定** 将 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A 全长序列输入软件 Primer Genesis 中 (方法: 进入 <http://primergenesis.com>, 点击 DNA Tools, 输入碱基序列, 点 Restriction Map 显示出所有酶切位点, 选择合适内切酶, 能将该序列切为长短不同的两个以上的便于辨认的片段), 选择 EcoR I, Xho I 酶切位点, 其中 EcoR I 有两个酶切位点, 能将该质粒切为长短不同的三个片段, 依次为: 2 514 bp、3 637 bp、7 526 bp。配置双酶切体系: 取质粒约 150 ng, EcoRI 0.5 μL, XhoI 0.5 μL, 10×buffer 1 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 到 10 μL。37 °C 孵育 45 min, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳。选取酶切正确的质粒纯化后送华大基因公司测序, 参照文献 [9] 所列引物测通 SCN3A 基因编码区全长序列, 无碱基改变的质粒作为定点诱导突变的模板。

**1.2.2 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A-N302S 突变质粒构建** 采用 Quick change XL site-directed mutagenesis kit 定点诱变试剂盒, 按说明书要求设计引物及进行扩增, 正反向引物为反向互补, 所用引物如下。

SCN3A-N302S-F: 5'-GGCACAATGGATTCAAGTGGGACATTTGTTAATG -3', SCN3A-N302S-R: 5'-CAT-

TAACAAATGTCCCACTTGAATCCATTGTGCC -3'。

(1) 突变质粒的 PCR 扩增: 反应体系为 50 μL, 按次序加入 ddH<sub>2</sub>O 37 μL, 10× Reaction buffer 5 μL, dNTP mix (10 mM) 1 μL, 正、反向引物 (125 ng/μL) 各 1 μL, PfuTurbo DNAPolymerase (2.5 U/μL) 1 μL, pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A 质粒 (约 20 ng) 1 μL, Quik Solution 3 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 1 min, 然后 95 °C 变性 50 s, 60 °C 退火 50 s, 68 °C 延伸 14 min, 18 个循环, 最后 68 °C 保温 40 min。(2) 模板质粒的去除: 在上述 PCR 产物中加入 1 μL Dpn I 于 37 °C 水浴中处理 1 h, 以除掉母质粒。该步骤的原理是: Dpn I 内切酶作用于来自大肠杆菌的甲基化的质粒 DNA, 而 PCR 扩增的新质粒 DNA 没有甲基化, 不会被 Dpn I 内切酶所消化。(3) 突变质粒 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A-N302S 的克隆: 将上述酶切处理的 PCR 产物透析后, 再电击转化 STBL<sub>2</sub> 感受态细胞, 涂布于 LB 平板上 (含 100 μg/mL 氨苄青霉素), 30 °C 条件下培养 48~72 h, 挑取单克隆入 LB 液体培养基 (含 100 μg/mL 氨苄青霉素) 中, 于 30 °C 条件下振荡培养 36~48 h 至液体混浊, 提取质粒。

透析过程: 取预冷的 20% PEG8000 透析液 2 mL 加入小培养皿内, 培养皿平放冰上, 夹取 millipore 透析膜一张平放浮于透析液面上, 光面朝上, PCR 产物小心滴在膜上, 透析 1 h。

电转化过程: 吸取透析剩余液体约 5 μL, 加入 40 μL 大肠杆菌 STBL<sub>2</sub> 电击感受态细胞中混匀, 冰浴 3 min。混合液吸入 0.1 cm 电击杯中, 注意避免产生气泡, Eco I 模式按压 pulse 键一次, 电击参数为 1.75 kV、5.00 ms。电击杯内快速加入 500 μL SOC 混匀吸出, 加入 1.5 mL EP 管内, 然后经 37 °C 200 rpm 振摇 1 h 复苏后涂板。

(4) pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A-N302S 质粒的鉴定和扩增: 按 QIAGEN 质粒提取试剂盒抽提质粒, EcoI 和 XhoI 双酶切初步鉴定, 电泳条带符合预期的质粒送华大基因公司测序。测序符合 c.905A>G 而其它位点碱基无变化的质粒为突变成功, 留取菌液 150 μL 加入 150 mL LB 液体培养基中扩大摇, 30 °C 条件下持续振荡培养 24 h, 提取质粒, 经酶切正确者测浓度后放入 -20 °C 保存, 供后续实验使用。

### 1.2.3 质粒异源表达的鉴定

(1) 细胞培养及转染: 以含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基培养 HEK293 细胞, 6 孔板内接种, 待细胞融合近 80% 时, 按照每孔 2.0 μg pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A

野生型或突变型质粒及 15  $\mu\text{L}$  PolyFect Transfection Reagent 的比例进行转染。步骤为:按上述比例混合的质粒加入不含抗生素和血清的 DMEM 100  $\mu\text{L}$  中,再加入转染试剂 15  $\mu\text{L}$  轻轻混匀,室温静置 8 min;吸走培养板内旧液,更换新的含血清和抗生素的培养液,轻轻吸取转染复合物从各个方向均匀滴入板内,小心放入培养箱内继续培养。转染 24 h 后进行 RNA 提取。(2) 基因水平的表达:参照 Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit 说明书步骤提取

RNA,测浓度后取 2  $\mu\text{L}$  电泳观察 RNA 条带,条带清楚者进行逆转录反应,逆转录参照 RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行,反应产物放置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。以上述步骤得到的 cDNA 产物为模板,设计目的基因片段和内参基因片段引物(表 1),扩增相应的片段(目的基因和内参基因片段采用独立的 PCR 体系扩增,但加入 cDNA 量相同),PCR 产物各取 4  $\mu\text{L}$  用 2% 凝胶电泳,条带符合预期大小的送华大基因进一步测序验证序列是否正确。

表 1 目的基因和内参基因片段引物

引物	SCN3A 基因	内参 GAPDH 基因
正向	5'CGGAAGTCAGAAAGAGAAGG3'	5'CTGGTAAAGTGGATATTCTGTG3'
反向	5'CAAATAGTGATGGCAAGATC3'	5'GAAATCCCATCACCATCTTC3'

## 2 结 果

### 2.1 突变质粒的成功构建

2.1.1 原始质粒与突变质粒的酶切鉴定 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A 质粒大小为 13.7 kb(图 1A)。EcoR I 和

Xho I 双酶将质粒切为三个片段:2.6 kb、3.6 kb 和 7.5 kb(图 1B)。突变质粒 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A-N302S 大小不变,上述双酶切位点没有破坏,仍能

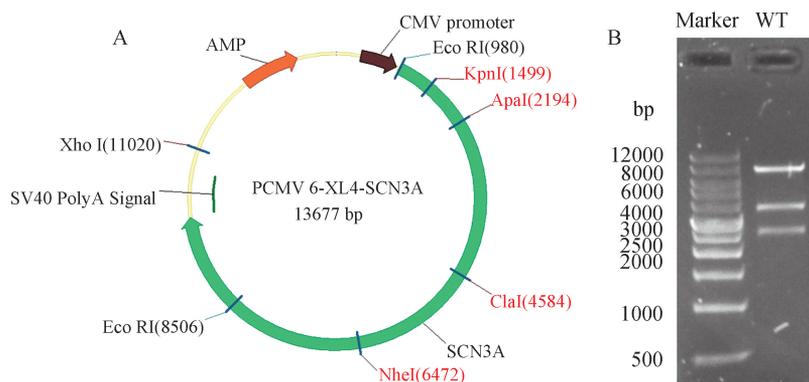


图 1 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A 质粒模式图 A: 及酶切图; B: Marker(DL 500~12000)

2.1.2 原始质粒与突变质粒的测序图 原始质粒编码区全长测序证实未出现突变。突变质粒目标位点(c.905A>G)突变成功,其它编码区全长证实未出现意外突变。质粒突变前后测序峰图对照如下(图 2)。

2.2 基因表达水平的鉴定 提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳显示完整的三条 RNA 电泳带(5S、18S、28S)。紫外分光光度计测定 RNA 的 260 nm/280 nm 吸光度值比为 1.8~2.0,浓度为 1~2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。经逆转录获得 cDNA 产物。以野生型和突变型质粒的 cDNA 为模板扩增目的片段,电泳图谱均在约 270 bp 处出

现条带,与预期 271 bp 大小相符,提示质粒在基因水平上成功表达,片段送测序证实为目的片段序列。各条带右侧为约 160 bp 的条带,是内参 GAPDH 片段,与预期 158 bp 大小相符(图 3)。由此表明野生型和突变型质粒在基因水平上都得到了表达。

## 3 讨 论

SCN3A 基因与癫痫相关的报道至今仍然较少,而其致癫痫的机制仍然是探索性的<sup>[10]</sup>,但是目前报

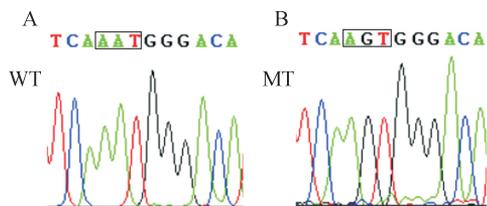


图 2 测序峰图对照 A: 野生型; B: 突变型 c.905A>G

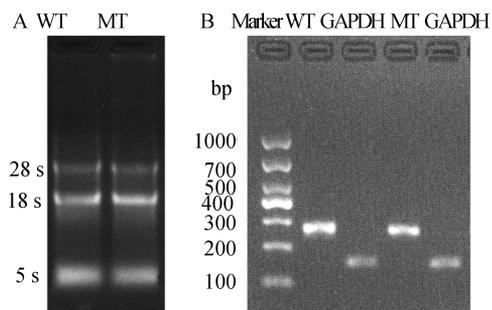


图 3 HEK293 细胞 SCN3AmRNA 条带及基因表达 A: RNA 电泳条带; B: 野生型和突变型基因目的片段及各自对应的内参片段

道与癫痫相关的 5 例 SCN3A 基因突变都进行了电生理功能研究<sup>[6-7]</sup>。本文作者在 1 例癫痫病人中新发现了 SCN3A-N302S 突变,采用定点诱导突变的方法成功构建了含有突变点的质粒 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A-N302S,随后将野生型及突变型质粒转染到 HEK293 细胞中进行异源表达,在基因水平上得到了验证,提示了 SCN3A 基因体外表达的细胞模型成功构建。质粒定点诱变的基础为 PCR 技术,为了保证外源性 DNA 能够扩增、繁殖,形成大量拷贝,必须与载体连接进入受体细胞后形成一个复制子,即形成能够在细胞内进行自我复制的遗传因子。载体是基因克隆中的一个重要组成部分,缺乏载体的帮助,外源 DNA 很难进入到受体细胞内,即使能够进入往往也不能复制和表达,因为这些外源性 DNA 一般不带有复制控制系统。本文用到的质粒载体,全长 4 707 bp,带有巨细胞病毒 (CMV) 启动子、SV40 启动子等。其中 SV40 启动子可以使基因在多种哺乳细胞中表达,使外源基因稳定表达成为可能,并且对外源基因的插入片段的长度没有太多限制。pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub> 载体内插入了长度为 8 994 bp 的 SCN3AmRNA 全长,获得的质粒大小在 10 Kb 以上,扩增的难度加大、碱基错配率提高、成功率下降,Stratagene 试剂盒使用了高保真酶进行扩增,高度保证了扩增的忠实性,使得一步法构建质粒操作过程变为可能。为了减少碱基的错配率,反应的循环

次数和常规相比明显减少,但是延伸的时间明显延长 (延伸 14 min, 18 个循环)。电转化是利用高压电击细胞,使细胞壁和细胞膜瞬间被击穿,形成能通过外源物质的跨膜通道,外源 DNA 分子通过该通道进入细胞内<sup>[11]</sup>。对于大分子质粒,PCR 产物经透析后进行电转化极大地提高了转化效率,为基因成功克隆提供了保障。

综上所述,应用基因定点诱变技术,成功的将含有野生型的 SCN3A 基因的质粒 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A 诱变为突变型的 pCMV<sub>6</sub>-XL<sub>4</sub>-SCN3A-N302S,为进一步的基因突变功能研究,如膜片钳电生理功能研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels [J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 13-25.
- [2] Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels [J]. *Neuron*, 2000, 28(2): 365-368.
- [3] Goldin AL. Resurgence of sodium channel research [J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 871-894.
- [4] Nakayama J, Arinami T. Molecular genetics of febrile seizures [J]. *Epilepsy research*, 2006, 70 Suppl 1: S190-198.
- [5] Nakayama J. Progress in searching for the febrile seizure susceptibility genes [J]. *Brain & Development*, 2009, 31(5): 359-365.
- [6] Holland KD, Kearney JA, Glauser TA, et al. Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy [J]. *Neuroscience Letters*, 2008, 433(1): 65-70.
- [7] Vanoye CG, Gurnett CA, Holland KD, et al. Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 62: 313-322.
- [8] Hessel EV, van Lith HA, Wolterink-Donselaar IG, et al. Mapping of a FEB3 homologous febrile seizure locus on mouse chromosome 2 containing candidate genes SCN1A and SCN3A [J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 44(11): 2950-2957.
- [9] Weiss LA, Escayg A, Kearney JA, et al. Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism [J]. *Molecular Psychiatry*, 2003, 8(2): 186-194.
- [10] Tan NN, Tang HL, Lin GW, et al. Epigenetic downregulation of SCN3A expression by valproate: a possible role in its anticonvulsant activity [J]. *Mol Neurobiol*, 2016 Mar 25. [Epub ahead of print]
- [11] 荀安营, 李娜, 邹兵, 等. 双歧杆菌感受态细胞的制备和电转化条件的研究 [J]. *中国微生物学杂志*, 2013, 25(10): 1128-1130.

(本文编辑: 蒋湘莲)