

## p62 基因过表达慢病毒载体的构建及表达

张 春<sup>1</sup>, 苏 丛<sup>2</sup>, 伍 婷<sup>3,4,5</sup>, 朱立雨<sup>1</sup>

**摘要 目的** 构建 p62 基因过表达慢病毒载体及其表达系统,并在人单核细胞白血病细胞(THP-1)中稳定表达,为在细胞水平研究 p62 基因的作用提供途径与方法。**方法** 采用聚合酶链式反应(PCR)扩增 p62 基因片段,将扩增产物连接至线性化 pcDNA3.1-Flag-PCDH10 真核表达慢病毒载体;PCR 鉴定重组质粒,将构建成功的重组质粒和包装质粒共转染至人胚胎肾细胞 293 (HEK 293T);用重组慢病毒感染人单核细胞白血病(THP-1)细胞,氨苄霉素筛选阳性细胞克隆株;Western blot 和实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测高表达 p62 基因的 THP-1 细胞株(过表达组)和转染不含 p62 基因空质粒(对照组)的 THP-1 细胞株;感染肺炎克雷伯菌(*Klebsiella Pneumoniae*, *K. p.*)后,RT-qPCR 检测 THP-1 细胞中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1 $\beta$  和趋化因子 1(Cxcl1)表达水平。**结果** 通过 PCR 成功获得 p62 基因片段并连接到 pcDNA3.1-Flag-PCDH10 病毒载体上,并且 PCR 检测显示 p62-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 重组质粒构建成功;挑选慢病毒感染 THP-1 细胞后抗氨苄青霉素细胞株,Western blot 检测结果显示药筛存活的 THP-1 细胞较对照组细胞 P62 蛋白表达增多( $P < 0.001$ ),且 RT-qPCR 检测显示 p62 mRNA 表达增高( $P < 0.001$ ),说明成功构建高表达 P62 蛋白的 THP-1 细胞株;感染 *K. p.* 后,高表达 P62 的 THP-1 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 Cxcl1 表达水平增高( $P < 0.01$ )。**结论** 经三质粒包装系统可以成功构建 p62-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 慢病毒载体及高表达 P62 蛋白 THP-1 细胞株,为后续 p62 基因的研究提供了基础。

**关键词** P62;慢病毒载体构建;三质粒包装系统;THP-1 细胞;肺炎克雷伯菌;过表达

**中图分类号** R 363

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0398-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.005

2024-02-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82100017);安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2022b076)

作者单位:<sup>1</sup> 安徽医科大学附属巢湖医院感染病科,巢湖 238000  
安徽医科大学第一附属医院<sup>2</sup> 感染管理科、<sup>3</sup> 感染病科,合肥 230022

<sup>4</sup> 安徽省细菌耐药性监控中心,合肥 230022

<sup>5</sup> 安徽医科大学细菌耐药研究所,合肥 230022

作者简介:张 春,男,副主任医师;

朱立雨,男,副主任医师,责任作者,E-mail:2414159316@qq.com

P62/SQSTM1 (sequestosome-1, SQSTM1) 蛋白是一种重要的自噬衔接蛋白,是最早发现的哺乳动物泛素化底物的自噬受体之一。P62 蛋白含有多个功能性结构域,包括泛素相关结构域(ubiquitin-associated domain, UBA)、微管相关蛋白 1 轻链 3 作用域(LC3 interacting region, LIR)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白受体(Kelch-like epichlorohydrin-associated protein receptor, KIR)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)结合结构域、ZZ 型锌指区和 Phox-Bem1p(PB1)结构域等 6 个功能区域<sup>[1-3]</sup>。其中 PB1、LIR 和 UBA 结构域在选择性自噬降解过程中发挥重要作用。P62 蛋白异常表达与多种疾病如神经退行性病变、肿瘤、遗传性疾病及感染性疾病的发生发展密切相关<sup>[4-7]</sup>。因此,该研究旨在通过构建 p62 基因过表达慢病毒,筛选出 P62 高表达的人单核细胞白血病细胞(human myeloid leukemia mononuclear cells, THP-1)细胞株,为进一步在体外深入探索 p62 基因的功能奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要材料** 人胚肾细胞 293T (human embryonic kidney 293T, HEK 293T) (目录编号:GNHu44)及人单核细胞白血病细胞(THP-1) (目录编号:SCSP-567)均购自中科院上海细胞所。包装质粒 pcDNA3.1-Flag-PCDH10 (货号:VT8014)及辅助包装质粒 pSPAX2 (货号:VT1444)和 pMD2G (货号:VT1443)购自湖南优宝生物;EcoR I (货号:ER0271)和 BamH I (货号:ER0051)、限制性内切酶、转染试剂 Lipofectamine 2000 (货号:11668500)、T4 连接酶 (货号:15224041)、DMSO (货号:D12345)、质粒提取与纯化试剂盒 (货号:K0502)、DNA Polymerase (货号:EP0702)、DNA ladder (货号:SM1553)、TRIzol RNA 提取试剂 (货号:15596026)等均购自美国赛默飞世尔科技公司;Taq 酶 (货号:R300S)、PrimeScript™ RT Master Mix (货号:RR036A)和 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (货

号:RR420A)购自日本 Takara 公司;蛋白 Marker(货号:MBP0277-25  $\mu\text{l}$ )、ECL 发光液(货号:MBP0297)购自上海毕合生物化学技术有限公司;抗 GAPDH 抗体(货号:2118L)及抗 P62 多克隆抗体(货号:5114S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司,山羊抗兔二抗(货号:ab6721)购自美国 Abcam 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(货号:C503021-0500)、大肠埃希菌感受态细胞(DH5 $\alpha$ )、PCR 引物、琼脂粉(货号:A505255-0250)购于上海生工生物工程股份有限公司。氨苄霉素(货号:A8180)购自北京索莱宝科技有限公司。高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)(货号:C11995500BT)、胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)(货号:10270-106)购自美国 Invitrogen 公司。

**1.1.2 主要仪器** 冷冻超速离心机(型号:Beckman Coulter OPTIMA I-100XP,美国贝克曼库尔特有限公司)、荧光定量 PCR 仪、超微量核酸蛋白测定仪(型号:ABI 7500、Thermo Nanodrop 2000,美国赛默飞世尔科技公司)、电泳槽和转印芯及核酸蛋白电泳系统(型号:Bio-Rad,美国 Bio-Rad 公司)、凝胶成像分析系统(型号:Tanon 5200,上海天能生命科学有限公司)、电热恒温培养箱(型号:DNP-9162,常州恒隆仪器有限公司)、生物安全柜(型号:AB2-4A1,新加坡 ESCO 公司)、细胞培养箱(型号:HERA-CELL 150L,美国赛默飞世尔科技公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *p62* 基因合成及其慢病毒表达载体的构建

通过 GenBank 网站查询小鼠 *p62* 基因序列,设计基因引物:P1(5'-CGGAATTCATGGCGTCGTTACG-GTGAAGGCC-3');P2(5'-AAGGATCCCAATGGTG-GAGGGTGCTTCGAATACTGGA-3');扩增长度:1 342 bp,引物由上海生工生物科技有限公司合成。扩增反应体系:P1 和 P2 引物各 1  $\mu\text{l}$  5 $\times$  Buffer 10  $\mu\text{l}$ , dNTP Mix 4  $\mu\text{l}$ ,模板 1  $\mu\text{l}$ ,Prime STAR HS DNA polymerase 0.5  $\mu\text{l}$ ,双蒸水 32.5  $\mu\text{l}$ ,充分混匀,条件如下:98  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,98  $^{\circ}\text{C}$ 、10 s,55  $^{\circ}\text{C}$ 、10 s,72  $^{\circ}\text{C}$ 、90 s,共循环 30 次,72  $^{\circ}\text{C}$ 、8 min。退火处理后得到带黏性末端的双链片段 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,用于后续连接反应。限制性内切酶在 EcoR I 和 BamH I 位点对载体进行双酶切,反应体系及条件如下:10 $\times$  Cut Smart Buffer 5  $\mu\text{l}$ ,pcDNA3.1-Flag-PCDH10 质粒(1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 2  $\mu\text{l}$ ,EcoR I 和 BamH I (10 U/ $\mu\text{l}$ )各 1  $\mu\text{l}$ ,ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu\text{l}$ ,充分混匀,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 3 h,得到线性化的载体。凝胶电泳后切胶,用 DNA 凝胶回收试

剂盒回收载体 pcDNA3.1-Flag-PCDH10。将目的片段与线性载体连接,于冰水浴中配制如下反应体系:线性化 pcDNA3.1-Flag-PCDH10 载体 DNA 4  $\mu\text{l}$ ,*p62* DNA 4  $\mu\text{l}$ ,T4 连接酶 1  $\mu\text{l}$ ,T4 Buffer 1  $\mu\text{l}$ ,共 10  $\mu\text{l}$ 。混匀后离心,室温过夜连接。将上述产物转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ ,经含有氨苄霉素抗性的 LB 琼脂培养基过夜筛选后,挑取单克隆细胞株送 DNA 测序鉴定,获取重组 *p62*-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 质粒,PCR 扩增后双酶切凝胶电泳验证。扩大培养阳性 DH5 $\alpha$ ,质粒提取试剂盒提取重组质粒,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.2 重组表达 *p62* 慢病毒在 HEK 293T 细胞的包装和转染** 转染前 1 d,将生长状态良好的 HEK 293T 细胞接种于 6 孔板中,待细胞汇合度达 70% 左右时,将 *p62*-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 5  $\mu\text{g}$ 、包装质粒 pSPAX2 3.75  $\mu\text{g}$  和 pMD2G 1.5  $\mu\text{g}$  加入 500  $\mu\text{l}$  Optimum,混匀配制成 DNA mixture,室温静置 5 min,同时将 500  $\mu\text{l}$  Optimum 和 20  $\mu\text{l}$  Lipofactamine2000 混匀,于室温静置 20 min,再将 DNA mixture 与之混匀,均匀滴至 HEK 293T 细胞中;将细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 环境中转染 6 h 后更换为含 10% FBS 的新鲜完全培养基,继续培养 48 h 后收集细胞上清液,使用 0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤,4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 5 min,继而获得 P62 过表达慢病毒,-80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻保存,以备后续实验使用。

### 1.2.3 慢病毒感染 THP-1 及筛选 P62 稳定表达株

将  $2 \times 10^6$  个 THP-1 细胞接种至 6 孔板,待细胞长至汇合度达 50%~60% 时,根据病毒感染复数及细胞数量加入相应体积的病毒原液;感染 24 h 后,更换无病毒的适应性培养基,细胞培养箱中继续培养 24 h,利用含氨苄霉素(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的适应性培养基继续筛选感染病毒的细胞,继续培养 3~4 d,直至剩余极少部分 THP-1 细胞存活,使含 *p62*-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 慢病毒的 THP-1 稳定传代,从而得到 *p62* 基因高表达 THP-1 细胞株,即过表达组(over expression, OE),转染不含 *p62* 基因空质粒的 THP-1 细胞株为对照(control, Con)组。

**1.2.4 RT-qPCR 检测 *p62* mRNA 相对表达量** 提取氨苄霉素筛选阳性细胞总 RNA,根据说明书对 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix 进行逆转录,逆转录体系及条件为:Dntp Mixture(10 mmol/L) 1  $\mu\text{l}$ 、Oligo Dt Primer(2.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、Total RNA 5  $\mu\text{l}$ 、无酶去离子水补足至 10  $\mu\text{l}$ ;37  $^{\circ}\text{C}$  预反应 15 min;85  $^{\circ}\text{C}$  扩增 5 s。*p62* mRNA 引物序列如下:Forward prim-

er: 5'-TTCAGCTTCTGCTTCAGCCC-3'; Reverse primer: 5'-CTCCTGAGCACATGGTGGG-3'; GAPDH mRNA 引物序列如下: Forward primer: 5'-GTCAAGGC-CGAGAATGGGAA-3'; Reverse primer: 5'-CTCGTG-GTTCACACCCATCA-3'; 进行 RT-qPCR 反应, 反应体系及条件为: 上述变性、退火后的反应液 10  $\mu$ l、5  $\times$  PrimeScript<sup>TM</sup> Buffer 4  $\mu$ l、Rnase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、PrimeScript<sup>TM</sup> Rtase (for 2 Step) 0.5  $\mu$ l、Rnase Free H<sub>2</sub>O 5  $\mu$ l, 总体积 20  $\mu$ l; 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup>法计算相对表达量。

**1.2.5 Western blot 检测 THP-1 细胞中 P62 蛋白的相对表达量** 经氨苄青霉素筛选阳性 THP-1 克隆株, 培养细胞至对数生长期, 加入适量的细胞裂解液 RAPI, 冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。20  $\mu$ g 样品中加入 4  $\times$  蛋白 Loading buffer, 煮沸, 冰上冷却, 蛋白上样、80 V 恒压电泳、转 PVDF 膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h、分别以抗 p62 (1:1 000) 和抗 GAPDH (1:5 000) 抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 1  $\times$  TBST 清洗 3 次, 每次 8 min, 再分别以山羊抗兔二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 1  $\times$  TBST 清洗 3 次, 每次 8 min, ECL 化学发光法显示蛋白条带。

**1.2.6 RT-qPCR 检测炎症因子 mRNA 的表达量** 肺炎克雷伯 (*Klebsiella Pneumoniae*, *K. p.*) 标准菌株 (ATCC 43816) 感染两组 THP-1 细胞 (细菌: 细胞 = 10:1), 刺激 6 h 后收集细胞, 采用 RT-qPCR 方法检测两组细胞分泌的肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$  和 Cxcl1 的 mRNA 相对表达量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PCR 扩增 p62 基因片段及含目的基因重组质粒 p62-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 的鉴定** 目的基因 p62 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后显示, 在 1 342 bp 处显示有一明亮特异性扩增条带, 片段大小与目的条带一致, 表明目的基因扩增成功。将扩增成功的 p62 目的基因与线性化载体连接, 重组质粒图谱如图 1 所示, 后转染 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆株, 提取质粒, 将重组质粒 p62-pcDNA3.1-Flag-PC-

DH10 进行扩增后再双酶切进行 PCR 鉴定, 可见被切开如图 2 所示两条条带, 同时经基因测序验证, 表明 p62 目的基因成功插入慢病毒质粒中。

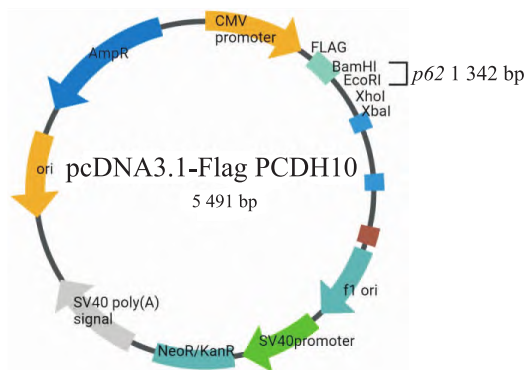


图 1 重组质粒图谱

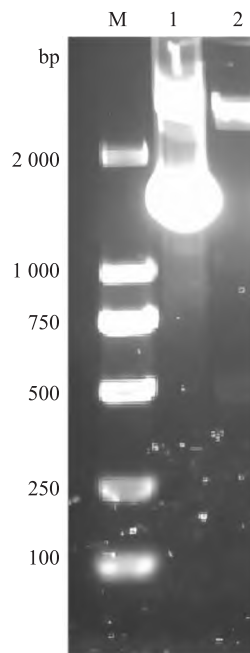


图 2 EcoR I 和 BamH I 双酶切重组质粒琼脂糖凝胶电泳鉴定图  
M: Marker; 1: 构建成功的重组质粒; 2: 对照质粒

## 2.2 稳转 THP-1 细胞株 p62 mRNA 的相对表达量

RT-qPCR 检测结果显示, 与 Con 组相比, OE 组 p62 相对表达量升高 ( $t = 8.639$ ,  $P < 0.001$ )。见图 3。

## 2.3 稳转 THP-1 细胞株 P62 蛋白的相对表达量

Western blot 检测结果如图 4 所示, OE 组 P62 蛋白表达高于 Con 组, 表明 P62 稳转 THP-1 细胞株构建成功。

## 2.4 K. p. 感染 THP-1 细胞炎症因子的 mRNA 表

达量 实验组细胞内的炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 Cxcl1 的相对表达量均高于对照组 ( $t = 8.620$ 、4.278、7.551, 均  $P < 0.01$ )。见图 5。

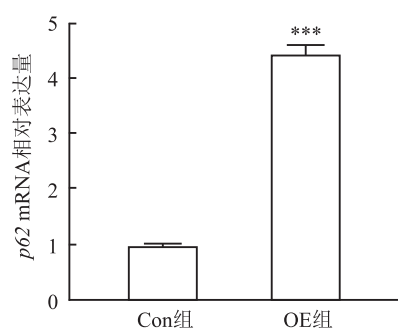


图3 两组细胞 p62 mRNA 相对表达量的比较  
与 Con 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

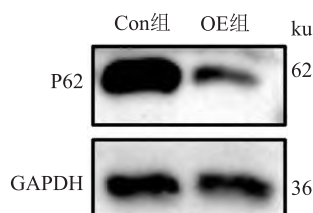


图4 THP-1 细胞株 P62 蛋白表达图

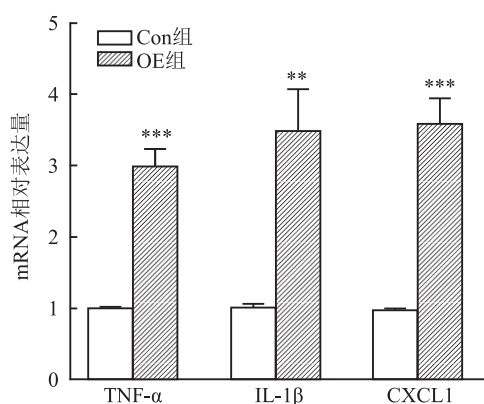


图5 两组炎症因子 mRNA 表达水平的比较  
与 Con 组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

### 3 讨论

随着分子生物学技术的快速发展,慢病毒载体作为工具广泛运用于基因编辑,人为将目的基因插入慢病毒载体,能高效地将目的基因导入真核生物细胞中,并随着细胞的不断分裂,可稳定并持久地表达目的基因<sup>[8-9]</sup>。

P62 是最早发现的哺乳动物自噬相关受体之一。P62 的 Phox、PB1、LIR 和 UBA 结构域在自噬降解病原微生物中发挥重要作用。当细菌入侵细胞时,P62 在细菌感染细胞早期发挥重要作用。E3 连接酶 TRIM50、TRAF6、MURF2 泛素化胞内细菌,然后被自噬适配器 P62 和 NBR1 识别,适配器将细菌定位到自噬小体上,并靶向胞内细菌进行自噬降

解<sup>[10]</sup>。研究<sup>[10-11]</sup>显示福氏链球菌和结核分枝杆菌以 P62 依赖的方式被选择性靶向招募并传递到新生的 LC3 阳性自噬小体中进行降解。在巨噬细胞体外感染实验中,P62 与结核分枝杆菌共同定位并控制其生存和复制,而抑制巨噬细胞中的 P62 可以增加结核分枝杆菌的存活率<sup>[12]</sup>。本研究构建 P62 高表达 THP-1 细胞株,旨在为进一步探究 P62 在感染性疾病中的作用提供方法。

P62 介导的异种吞噬的其他机制也被报道<sup>[13]</sup>,在斑马鱼感染模型中,溶酶体蛋白 DRAM-1 通过招募 P62 限制海洋分枝杆菌感染。同时,P62 可直接参与炎症的调节<sup>[14]</sup>。如 P62 同源和异源性的 PB1 结构域与丝裂原激活蛋白激酶激活蛋白激酶 3 相互作用时发生二聚化,进一步共同作用于肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6,形成 P62 复合物,该复合物磷酸化和泛素化 kappa B 抑制因子激酶复合物,进一步抑制 NF-κB 信号转导。本研究成功构建高表达 P62 的 THP-1 细胞系后,进一步探究在感染模型中 P62 对炎症因子的影响,发现高表达 P62 蛋白后促炎因子 TNF-α、IL-1β 和 CXcl1 的相对表达量均明显增高,这可能与 *K. p.* 菌株感染剂量和时间有关。此外,P62 在氧化应激调节方面也发挥重要作用,研究<sup>[15]</sup>显示 P62 磷酸化后与 keap-1 相互作用,导致抗氧化基因 *Nrf2* 的表达增加。因此,本研究中促炎因子表达增高可能与激活氧化应激通路有关,相关机制有待进一步研究。

本实验经三质粒包装系统成功构建 p62-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 慢病毒载体及高表达 P62 蛋白 THP-1 细胞株,为后续研究 p62 基因在感染性疾病中的作用提供了基础。

### 参考文献

- [1] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. Essays Biochem,2017,61(6):609-24.
- [2] Reina-Campos M, Shelton P M, Diaz-Meco M T, et al. Metabolic reprogramming of the tumor microenvironment by p62 and its partners[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer,2018,1870(1):88-95.
- [3] Zhang Z, Costa M. p62 functions as a signal hub in metal carcinogenesis[J]. Semin Cancer Biol, 2021,76:267-78.
- [4] Miyakawa K, Nishi M, Ogawa M, et al. Galectin-9 restricts hepatitis B virus replication via p62/SQSTM1-mediated selective autophagy of viral core proteins[J]. Nat Commun,2022,13(1):531.
- [5] Profumo E, Maggi E, Arese M, et al. Neuropeptide Y promotes human M2 macrophage polarization and enhances p62/SQSTM1-dependent autophagy and NRF2 activation[J]. Int J Mol Sci,

- 2022,23(21):13009.
- [6] Kumar A V, Mills J, Lapierre L R. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging[J]. *Front Cell Dev Biol*,2022,10:793328.
- [7] Tan C T, Soh N J H, Chang H C, et al. p62/SQSTM1 in liver diseases; the usual suspect with multifarious identities[J]. *FEBS J*,2023,290(4):892–912.
- [8] 苏 丛, 伍 婷, 徐方明, 等. 巨噬细胞 Lamtor2 基因敲除小鼠对肺炎克雷伯菌易感性的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021,56(4):505–9.
- [9] 苏 丛, 徐方明, 伍 婷, 等. 基于 CRISPR-Cas9 技术构建 *gpr41* 基因敲除的 RAW264.7 细胞系[J]. *安徽医科大学学报*, 2020,55(5):800–3.
- [10] Zheng Y T, Shahnazari S, Brech A, et al. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway [J]. *J Immunol*,2009,183(9):5909–16.
- [11] Franco L H, Nair V R, Scharn C R, et al. The ubiquitin ligase Smurf1 functions in selective autophagy of mycobacterium tuberculosis and anti-tuberculous host defense [J]. *Cell Host Microbe*, 2017,21(1):59–72.
- [12] Sakowski E T, Koster S, Portal Celhay C, et al. Ubiquitin 1 promotes IFN-gamma-induced xenophagy of mycobacterium tuberculosis [J]. *PLoS Pathog*,2015,11(7):e1005076.
- [13] Meijer A H, van der Vaart M. DRAM1 promotes the targeting of mycobacteria to selective autophagy [J]. *Autophagy*, 2014, 10(12):2389–91.
- [14] Nakamura K, Kimple A J, Siderovski D P, et al. PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEK3 regulates NF-kappaB activation [J]. *J Biol Chem*,2010,285(3):2077–89.
- [15] Hashimoto K, Simmons A N, Kajino-Sakamoto R, et al. TAK1 regulates the Nrf2 antioxidant system through modulating p62/SQSTM1 [J]. *Antioxid Redox Signal*,2016,25(17):953–64.

## Construction and expression of lentiviral vector of *p62* gene over-expression

Zhang Chun<sup>1</sup>, Su Cong<sup>2</sup>, Wu Ting<sup>3,4,5</sup>, Zhu Liyu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Infectious Diseases, The Chaohu Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Chaohu 238000;

<sup>2</sup>Dept of Infection Management, <sup>3</sup>Dept of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>4</sup>Anhui Center for Surveillance of Bacterial Resistance, Hefei 230022;

<sup>5</sup>Institute of Bacterial Resistance, Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To construct lentiviral vector of *p62* gene over-expression, and stably express *p62* gene in human monocytic leukemia cells 1 (THP-1), and to provide a way to study the role of *p62* gene at the cellular level. **Methods** The *p62* gene fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the amplified product was ligated to the linearized pcDNA3.1-Flag-PCDH10 lentiviral vector. After identifying with PCR, the PCR product was cotransfected with the packaging plasmid into human embryonic kidney cells 293 (HEK 293T). THP-1 cells were infected with recombinant lentivirus. Positive cell clones were screened by ampicillin. Western blot and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were used to detect THP-1 cell lines with high *p62* expression (overexpression group) and THP-1 cell lines transfected with empty plasmid without *p62* gene (control group). The expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and Cxcl1 after *K. p.* infection were detected by RT-qPCR. **Results** The *p62* gene fragment was successfully obtained by PCR and ligated to pcDNA3.1-Flag-PCDH10 vector. PCR confirmed that *p62*-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 recombinant plasmid was constructed successfully. Ampicillin-resistant cell lines were selected after lentiviral infection of THP-1 cells. The results of Western blot analysis showed that the THP-1 cells with drug sieve survival increased the expression of P62 protein compared with the control cells ( $P < 0.001$ ), and RT-qPCR analysis showed that the relative mRNA expression of *p62* increased ( $P < 0.001$ ). THP-1 cells with high expression of P62 were successfully constructed. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and Cxcl1 from THP-1 cells with high expression of P62 significantly increased after infection with *K. p.* ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *p62*-pcDNA3.1-Flag-PCDH10 vector and THP-1 cells with high expression of *p62* can be successfully constructed by three-plasmid packaging system, which provides a basis for the study of *p62*.

**Key words** P62; lentiviral vector construction; three-plasmid packaging system; THP-1 cells; *Klebsiella pneumoniae*; over-expression