



重组表达小鼠 MIP-1 α 和 B7-1 基因的慢病毒载体的构建及鉴定

刘伟, 余英豪

(中国人民解放军南京军区福州总医院病理科, 福州 350025)

【摘要】 目的 构建重组表达小鼠 MIP-1 α 和 B7-1 基因的慢病毒载体, 为淋巴瘤基因治疗的实验研究奠定基础。方法 设计引物扩增获得目的基因小鼠 MIP-1 α 和 B7-1 基因的全长编码序列 cDNA, 将目的基因与经酶切线性化的慢病毒载体进行定向连接, 其产物转化感受态细胞, 对长出的阳性克隆进行 PCR 鉴定和直接测序序列分析。MIP-1 α 和 B7-1 目的基因质粒转染 293T 细胞, 观察绿色荧光蛋白 (GFP) 表达, 采用 Western Blot 法检测其蛋白表达, 实时荧光定量 PCR 检测慢病毒浓缩液的滴度。结果 成功构建了重组表达小鼠 MIP-1 α 和 B7-1 基因的慢病毒载体, 实时荧光定量 PCR 证实 MIP-1 α 、B7-1 基因重组慢病毒载体的滴度均达 $2.00E+8$ TU/mL。结论 本研究成功构建并包装出高滴度的小鼠 MIP-1 α 和 B7-1 基因重组慢病毒载体, 为淋巴瘤基因治疗的实验研究奠定了基础。

【关键词】 慢病毒载体; 293T 细胞; MIP-1 α 基因; B7-1 基因; 淋巴瘤

【中图分类号】 R733.1; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0054-08

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.01.013

Constructing and Identification of Lentivirus-mediated Mouse MIP-1 α and B7-1 Gene Vectors

LIU Wei, YU Ying-hao

(Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Command PLA, Fuzhou 350025, China)

【Abstract】 Objective To construct lentivirus-mediated mouse MIP-1 α and B7-1 gene vectors and lay a foundation for gene therapy with lymphoma. **Methods** Mouse MIP-1 α and B7-1 genes were synthesized and amplified by PCR. Target genes were directly connected with Lentivirus vector, the production of which were transformed into Bacterium coli DH5 α cells and the positive colonies were identified by PCR and direct sequencing analysis. Then the plasmids of MIP-1 α and B7-1 genes infected 293T cells, respectively, green fluorescence protein (GFP) in 293T cells was observed by fluorescence microscope; Western Blot was used to test protein expression of MIP-1 α and B7-1 genes and Real-time PCR was used to detect the titer of lentivirus. **Results** Lentivirus-mediated mouse MIP-1 α and B7-1 gene vectors were successfully constructed and the titer of which was $2.00E+8$ TU/ml tested by real-time PCR. **Conclusion** Lentivirus-mediated mouse MIP-1 α and B7-1 gene vectors were successfully constructed and lay a foundation for gene therapy with lymphoma in the future.

【Key words】 Lentivirus vector; 293T cells; B7-1 gene; MIP-1 α gene; Lymphoma

[基金项目] 南京军区医学科学技术研究“十一五”计划课题(07Z034); 福建省自然科学基金(2010J01221) 资助。

[作者简介] 刘伟(1985-), 男, 医师, 研究方向: 肿瘤病理及淋巴瘤的基因治疗。

[通讯作者] 余英豪(1956-), 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤病理及淋巴瘤的基因治疗。E-mail: yuyinghao0808@126.com。

人体的抗肿瘤免疫反应主要是由激活的 T 淋巴细胞介导, T 细胞激活需要双信号系统, 第一信号是由 T 细胞受体(TCR) 与抗原肽-MHC 复合物相结合所提供, 第二信号是由辅助分子或共刺激分子通过与 T 细胞上相应受体结合而传递的, 其中以 B7 分子的共刺激作用最为重要, 而肿瘤细胞表面往往缺乏或低表达 B7 分子, 是肿瘤细胞逃避宿主免疫系统监视和灭杀的重要机制之一^[1]。因此, 通过转基因使肿瘤细胞表达 B7 分子, 为 T 淋巴细胞激活提供第二信号, 从而激活 T 细胞发挥抗肿瘤效应。MIP-1 α 类属 CC 趋化因子, 与其相应受体结合后诱导趋化 T 细胞、单核细胞、树突状细胞、NK 细胞等免疫细胞, 募集到肿瘤局部, 产生抗肿瘤效应^[2,3]。

从理论上推测, 趋化因子 MIP-1 α 和共刺激分子 B7-1 基因转染淋巴瘤细胞后, 机体抗淋巴瘤免疫作用可能会明显增强。为此, 本研究拟建立重组表达小鼠 MIP-1 α 和 B7-1 基因的慢病毒载体, 为淋巴瘤基因治疗的实验研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

- 1.1.1 慢病毒载体: 慢病毒载体 pGC-FU Vector 购自上海吉凯基因化学技术有限公司。
- 1.1.2 菌株来源: 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。
- 1.1.3 细胞株: 293T 细胞, 由本实验室保存。
- 1.1.4 主要试剂: 1 kp DNA ladder Marker, 250 bp DNA ladder Marker(Fermentas 公司); AgeI (NEB 公司); In-Fusion kit (BD 公司); Taq polymerase (SinoBio 公司); Plasmid 抽提 Kit(Promega 公司); 一抗 Mouse Anti-GFP, 二抗 Goat Anti-Mouse (Santa-

Cruz 公司); Lipofectamine2000(Invitrogen 公司); M-MLV 逆转录酶(PROMEGA 公司)。

1.1.5 主要仪器和器材: PCR 仪 (Applied Biosystems 公司); 稳压 DNA 电泳仪(BioRad 公司); SDS-PAGE 蛋白电泳仪, 蛋白转膜仪(上海天能公司); 5417R 台式冷冻高速离心机(Eppendorf 公司); 阳性克隆测序在上海美季生物技术公司完成。

1.2 方法

1.2.1 MIP-1 α 和 B7-1 基因重组慢病毒载体的构建:

(1) 慢病毒载体酶切 使用 AgeI 进行酶切消化 50 μ L 反应体系, 含 ddH₂O 42 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 纯化的 DNA 质粒 (1 μ g/ μ L) 2 μ L, AgeI (5 U/ μ L) 1 μ L, 将上述混合的反应物置 37 $^{\circ}$ C 2 h。

(2) 目的基因片段获取 从 GeneBank 中查寻小鼠 MIP-1 α 和 B7-1 基因序列, 设计引物, 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

①引物合成 设计 B7-1 和 MIP-1 α 基因引物 (表 1)

②PCR 扩增目的基因 分别以 Primer(+): MIP-1 α -AgeI-F, Primer (-): MIP-1 α -AgeI-R 和 Primer(+): B7-1-AgeI-F, Primer(-): B7-1-AgeI-R 为引物, 进行目的基因 MIP-1 α 和 B7-1 的 PCR 扩增。反应体系为 20 μ L, 目的基因 MIP-1 α 的 PCR 反应循环条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow (94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 30 s) 30 循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C + ∞ ; 目的基因 B7-1 的 PCR 反应循环条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow (94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min) 30 循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C + ∞ 。

(3) 重组克隆制备

①感受态制备 用氯化钙制备大肠杆菌感受态细胞, 并分装置 -70 $^{\circ}$ C 冻存。

②PCR 产物交换进入线性化慢病毒载体(表 2)。

表 1 B7-1 和 MIP-1 α 基因引物
Tab.1 The primers of B7-1 and MIP-1 gene

基因 gene	引物 primer	引物序列 gene sequence of primers
MIP-1 α	MIP-1 α -Age I-F	GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGAAGGTCTCCACCACTG
	MIP-1 - Age I-R	TCACCATGGTGGCGACCGGGCATTTCAGTTCCAGGTC
	Ubi-F	GGGTCAATATGTAATTTTCAGTG
	EGFP-N-R	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
B7-1	B7-1-Age I-F	GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGGCTTGCAATTGTTCAG
	B7-1-Age I-R	TCACCATGGTGGCGACCGGAAGGAAGACGGTCTGTTC
	Ubi-F	GGGTCAATATGTAATTTTCAGTG
	EGFP-N-R	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG

表 2 PCR 产物反应体系
Tab. 2 PCR reaction system

反应体系 Reaction system	阳性对照(μL) Positive control group(μL)	自连对照(μL) Blank control group (μL)	交换组(μL) Positive group(μL)
ddH ₂ O	13.5	15.5	13.5
10 × In-Fusion 交换酶缓冲液	2.0	2.0	2.0
线性化载体 DNA 100ng/ μL	2.0	2.0	2.0
纯化的 PCR 产物 100ng/ μL	2.0	0.0	2.0
In-Fusion 交换酶	0.5	0.5	0.5
Total	20	20	20

于 25℃ 反应 30 min, 再于 42℃ 反应 15 min, 制备克隆交换液, 准备转化。阳性对照和自连对照, 加入的载体和连接组一致, 但阳性对照加入的纯化 PCR 产物为 GAPDH 基因(同样带有交换臂)。

③转化 按说明进行转化感受态细胞并转移到 Amp 抗性(100 ug/mL) 的 LB 琼脂培养基上, 长出的克隆进行后续 PCR 鉴定。

(4) 阳性克隆的 PCR 鉴定 在长出的克隆菌表面沾一下, 溶于 10 μL LB, 混匀后取 1 μL 作为菌落 PCR 模板; 分别以 PCR 引物: Primer(+): Ubi-F; Primer(-): EGFP-N-R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μL 。目的基因 MIP-1 α 的 PCR 条件: 94℃ 2 min → 94℃ 30 s → 60℃ 30 s → 72℃ 30 s) 30 循环 → 72℃ 6 min → 4℃ + ∞。目的基因 B7-1 的 PCR 条件: 94℃ 2 min → (94℃ 30 s → 60℃ 30 s → 72℃ 1 min) 30 循环 → 72℃ 6 min → 4℃ + ∞。设阴性对照, 自连对照, 阳性对照。

1.2.2 Western blot 检测目的基因质粒表达:

重组 MIP-1 α 和 B7-1 目的基因质粒分别转染 293T 细胞 24 h 后观察荧光表达情况, 收集转染成功的细胞, 加入细胞裂解液裂解抽提蛋白, 按照 Western blot 实验技术操作说明分别进行检测, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭, 加入一抗 Mouse Anti-GFP, 二抗 Goat Anti-Mouse, 进行杂交、洗膜等操作后, 曝光、显影定影。

1.2.3 重组慢病毒载体的包装及滴度测定:

(1) 慢病毒的包装 重组慢病毒 pGC-LV 载体, pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体组成的三质粒系统共转染 293T 细胞, 按照 Lipofectamine 2000 的说明书操作。收集转染后 48 h 的 293T 细胞上清液, 离心浓缩后分装在病毒管中, -80℃ 长期保存。取其中一支行病毒滴度测定。

(2) 实时荧光定量 PCR 法测定慢病毒滴度

①样品制备 检测前 1 天, 对 293T 细胞传代, 每个 24 孔中加 1×10^5 个细胞。次日, 准备 7 ~ 10

个无菌的 Ep 管, 在每个管中加入 90 μL 培养基 (DMEM + 10% FBS)。取待测病毒原液 10 μL 加入到第一管中, 混匀后, 取 10 μL 加入到第二管中。继续相同的操作直到最后一管。第 1 个 Ep 管中加入 10 μL 病毒原液, 记为 1E + 1 μL ; 第二个 Ep 管中进行了第 1 次 10 倍稀释, 所得病毒原液为第 1 个 Ep 中的 1/10, 记为 1E + 0 μL ; 依次类推... 第 7 个 Ep 管中进行了第 6 次 10 倍稀释, 所得病毒原液为第 6 个 Ep 中的 1/10, 记为 1E-5 μL 。

②总 RNA 抽提 根据 Invitrogen 公司的 TRIZOL 操作说明书进行, 均为 RNase-free 操作。紫外分析测定所抽提 RNA 的浓度。

③RNA 逆转录获 cDNA 目的基因 GFP: 上游引物: 5'-TGCTTCAGCCGCTACCC-3', 下游引物: 5'-AGTTCACCTTGATGCCGTTTC-3'; ACTIN 基因: 上游引物: 5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3', 下游引物: 5'-AAAGGGTGTAACGCAACTA-3'。

按 Promega 公司的 M-MLV 操作说明书进行, 均为 RNase-free 操作。RT 反应体系 11 μL , 得到的 RT 反应产物 cDNA 立即用于 PCR, 部分保存在 -80℃ 冰箱中。

④实时荧光定量 PCR 检测 Real-time PCR 在 Bio-rad 的 iQ5 上完成。总反应体系 20 μL , 设定程序为两步法 Real-Time 定量: 预变性 95℃ 15 s, 之后每一步变性 95℃ 5 s, 退火延伸 60℃ 30 s, 共 40 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。制作熔解曲线: PCR 结束后, 再 95℃ 变性 1 min, 冷却至 55℃, 使 DNA 双链充分结合。从 55℃ 开始到 95℃, 每一步增加 0.5℃, 保持 30 s, 同时读取吸光值。

2 结果

2.1 慢病毒载体 pGC-FU Vector 酶切后琼脂糖凝胶电泳图谱(图 1)。

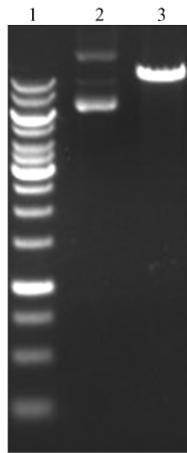


图 1 慢病毒载体 pGC-FU Vector 酶切后琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis result of Lentiviral vector pGC-FU

注: 1. Marker 条带从上到下依次为: 10 kb、8 kb、6 kb、5 kb、4 kb、3.5 kb、3 kb、2.5 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp; 2. 慢病毒载体 pGC-FU Vector; 3. 慢病毒载体 pGC-FU Vector Age I 酶切产物

Note: 1. Marker: 10 kb、8 kb、6 kb、5 kb、4 kb、3.5 kb、3 kb、2.5 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp; 2. Lentiviral vector pGC-FU; 3. The Product of Lentiviral vector pGC-FU Vector was digested by AgeI

2.2 目的基因 MIP-1 α 和 B7-1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱(图 2)。

2.3 阳性克隆的 PCR 鉴定

(1) MIP-1 α 阳性转化子得到 483 bp 的条带, 阴性转化子得到 198 bp 的条带, 初步表明 MIP-1 α 基因重组慢病毒载体构建成功(图 3)。

(2) B7-1 阳性转化子得到 1125 bp 的条带, 阴性转化子得到 198 bp 的条带, 初步表明 B7-1 基因重组慢病毒载体构建成功(图 4)。

2.4 阳性克隆测序结果及结果分析

接种阳性转化子 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 保存为甘油菌, 分别分装 200 μ L 送上海美季生物技术有限公司进行双向序列测序, 比对分析证实, MIP-1 α 和 B7-1 基因测序结果与目标序列完全一致。

2.5 重组 MIP-1 α 和 B7-1 目的基因质粒转染 293T 细胞 48 h 后的荧光蛋白表达情况(彩插 4 图 5~6)。

2.6 Western Blot 检测结果

Western blot 检测结果显示 MIP-1 α 基因融合 GFP 和 B7-1 基因融合 GFP 在 293T 细胞中都获得表达(彩插 4 图 7~8)。

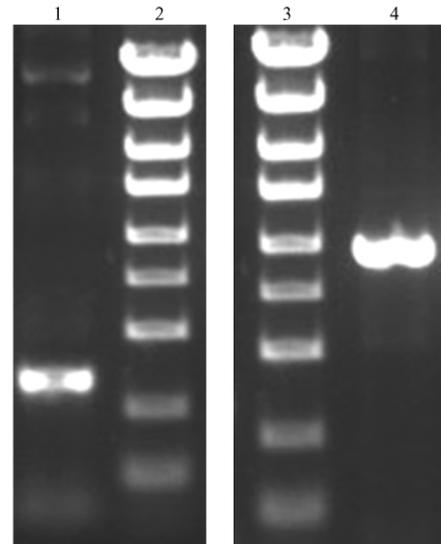


图 2 目的基因 MIP-1 α 和 B7-1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis results of target segments of MIP-1 α and B7-1 gene

注: 1. MIP-1 α PCR 产物: 322bp; 2~3. Marker 条带从上到下依次为: 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp; 4. B7-1 PCR 产物: 964 bp

Note: 1. MIP-1 α gene: 322bp; 2~3. Marker: 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp. 4. B7-1 gene: 964 bp

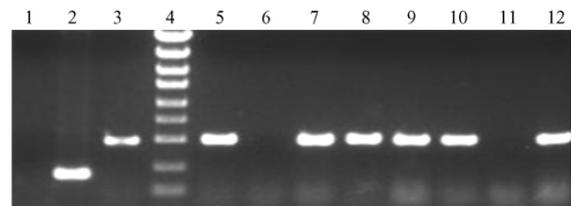


图 3 MIP-1 α 转化子的 PCR 扩增产物电泳结果图

Fig. 3 The electrophoresis results of target segment of MIP-1 α gene

注: 1. 阴性对照(ddH₂O); 2. 空载自连对照, 198 bp; 3. 阳性对照(GAPDH); 4. Marker, 从上到下依次为: 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp。5~12: MIP-1 α 转化子

Note: 1. Negative control group (ddH₂O); 2. Blank control group, 198 bp; 3. Positive group(GAPDH); 4. Marker: 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp. 5~12: MIP-1 α gene

2.7 重组 MIP-1 α 慢病毒滴度测定

(1) 实时定量 PCR 曲线图(图 9)

(2) 不同浓度病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量分析(表 3)

加入不同病毒量的细胞样品, 通过比较 control

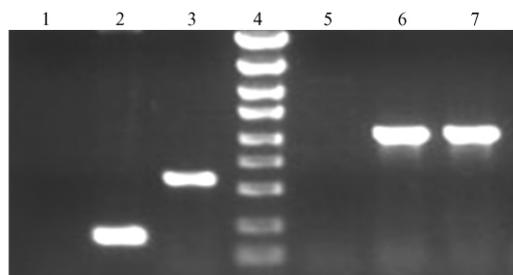


图 4 B7-1 转化子的 PCR 扩增产物电泳结果图

Fig. 4 The electrophoresis results of target segment of B7-1 gene

注: 1. 阴性对照(ddH₂O); 2. 空载自连对照, 198 bp; 3. 阳性对照(GAPDH); 4. Marker, 从上到下依次为: 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 5 ~ 7: B7-1 转化子

Note: 1. Negative control group (ddH₂O); 2. Blank control group, 198 bp; 3. Positive group (GAPDH), 483bp; 4. Marker: 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp. 5 ~ 7: B7-1 gene

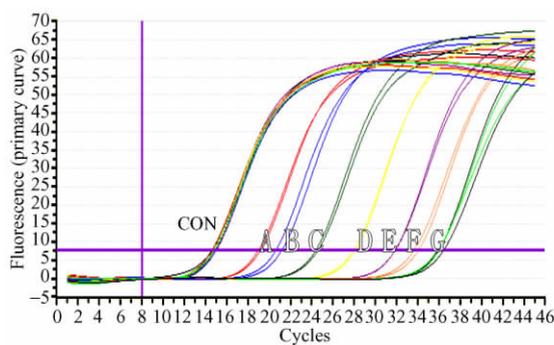


图 9 加入不同重组 MIP-1 α 慢病毒量的细胞样品随着 PCR 循环的增加, 荧光值开始上升, 经过 40 个循环后均达到峰值

Fig. 9 Fluorescence curve in different MIP-1 α gene groups gradually rose with the PCR process and reached the peak after 40 cycles

表 3 病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量

Tab. 3 The Ct values of different groups infected with virus

样品组 samples	Ct _{Actin}	Ct _{Target gene}	Ct _{Target gene} 均值	$\Delta Ct = Ct_{Target gene} 均值 - Ct_{Actin}$	$\Delta Ct_{Con} - \Delta Ct_{样品组}$
CON	14.66	36.39 36.1	36.245	21.585	0
1E + 1 μ l (A)	14.76	18.81 19.1	18.955	4.195	17.39
1E + 0 μ l (B)	14.67	21.19 20.5	20.845	6.175	15.41
1E-1 μ l (C)	14.56	24.64 24.44	24.54	9.98	11.605
1E-2 μ l (D)	14.44	28.04 28.22	28.13	13.69	7.895
1E-3 μ l (E)	14.38	31.96 32.01	31.985	17.605	3.98
1E-4 μ l (F)	14.25	33.74 34.18	33.96	19.51	2.075
1E-5 μ l (G)	14.55	35.61 36.07	35.84	21.29	0.295

组和试验组的 Ct 值差异判断滴度值。判断标准为 Ct 值差异 > 2 即存在显著差异。反转录反应所获得的 20 μ L cDNA 中只取了 1 μ L 用于实时定量检测, 该结果仅表示 1/20 样品的情况, 所以在滴度计算时应该乘以系数 20。

在本次滴度检测中, 1E-4 μ L 组样品和 control 组样品的差值, 即 $\Delta Ct_{Con} - \Delta Ct_{样品组} = 2.075 > 2$, 说明 1E-4 μ L 组与 control 组样品的 Ct 值存在显著差

异, 证实 1E-4 μ L 组样品中存在病毒颗粒。假定该组样品含有至少 1 个病毒颗粒, 则病毒的滴度为: $1 / (1E-4) * 20 = 2.00E + 5 TU / \mu L = 2.00E + 8 TU / mL$ 。

(3) 目的基因及 Actin 基因的熔解曲线(图 10)。

2.8 重组 B7-1 慢病毒滴度测定

(1) 实时定量 PCR 曲线图(图 11)。

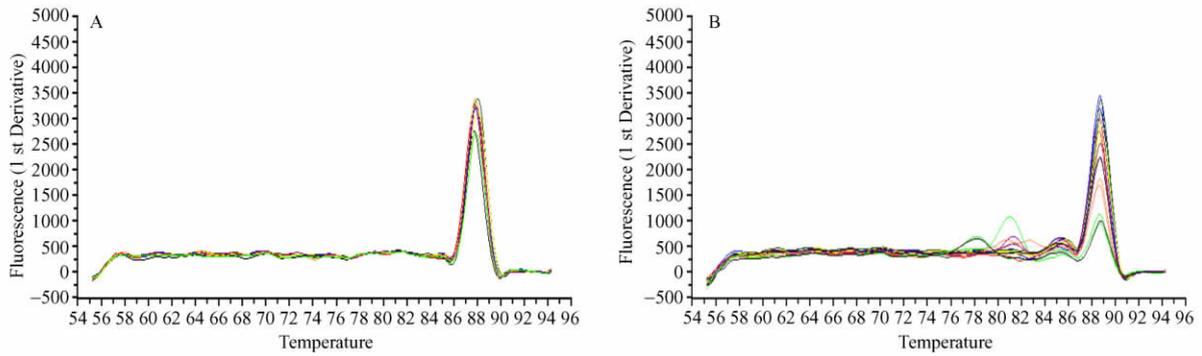


图 10 Actin 基因和目的基因的熔解曲线

Fig. 10 The melting curve of actin gene and target gene

注: A. Actin 基因的熔解曲线; B. 目的基因的熔解曲线。Actin 基因和目的基因的熔解曲线中没有出现杂峰,也未出现主峰的异常增宽,表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增

Note: A. The melting curve of actin gene; B. The melting curve of target gene. There were no complex peak and broadening of the peak in the melting curve of actin gene and target gene, which indicated that there were no contamination, primer dimers and nonspecific amplification in the experiments

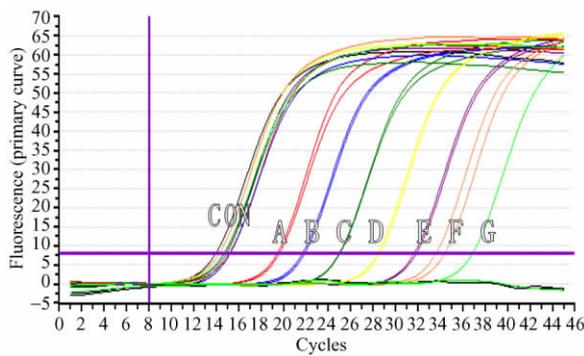


图 11 加入不同重组 B7-1 慢病毒量的细胞样品随着 PCR 循环的增加,荧光值开始上升,经过 40 个循环后均达到峰值

Fig. 11 Fluorescence curve in different B7-1 gene groups gradually rose with the PCR process and reached the peak after 40 cycles

(2) 不同浓度病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量分析(表 4)

在本次滴度检测中,1E-4 μL 组样品和 1E-5 μL 组样品的 Ct 值,即 $\Delta Ct_{1E-4 \mu L 组} - \Delta Ct_{1E-5 \mu L 组} = 22.27 - 19.695 = 2.575 > 2$,说明 1E-04 μL 组与 1E-5 μL 组样品的 Ct 值存在显著差异,病毒滴度为: $1 / (1E-4) * 20 = 2.00E + 5 TU / \mu L = 2.00E + 8 TU / mL$ 。

(3) 目的基因及 Actin 基因的熔解曲线

① Actin 基因的熔解曲线(图 12)。

表 4 病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量

Tab. 4 The Ct values of different groups infected with virus

样品组 samples	Ct Actin	Ct Target gene	Ct Target gene 均值	$\Delta Ct = Ct_{Target gene} - Ct_{Actin}$ 均值
CON	13.98	—	—	—
1E + 1 μl (A)	15.22	19.49 19.48	19.485	4.265
1E + 0 μl (B)	15.00	21.72 21.62	21.67	6.67
1E - 1 μl (C)	14.67	24.9 24.89	24.895	10.225
1E - 2 μl (D)	14.34	28.33 28.58	28.455	14.115
1E - 3 μl (E)	14.78	31.67 31.84	31.755	16.975
1E - 4 μl (F)	14.38	34.46 33.69	34.075	19.695
1E - 5 μl (G)	14.68	36.95 36.95	36.95	22.27

3 讨论

肿瘤基因治疗的关键是载体的选择,用于基因治疗的载体系统可分为病毒性载体和非病毒性载体两类。目前常用的病毒载体包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、疱疹病毒载体、痘苗病毒载体等,但是这些载体均存在不足之处,严重影响了基因治疗的有效性及安全性。慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载

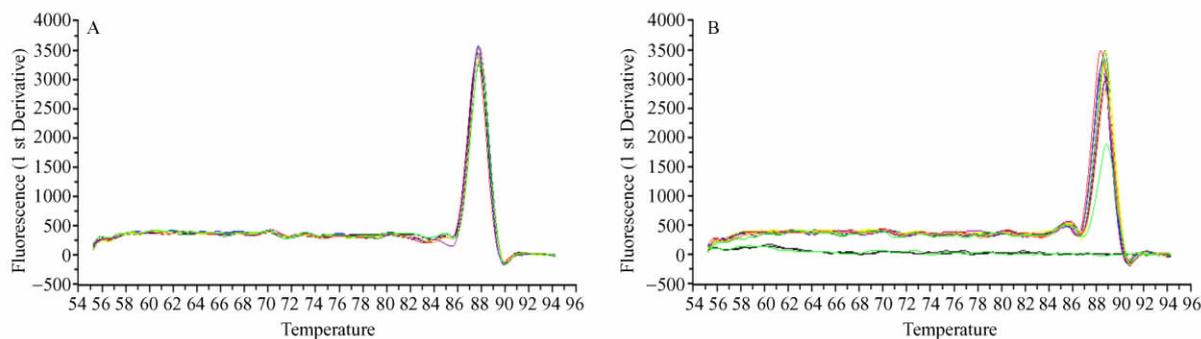


图 12 Actin 基因和目的基因的熔解曲线

Fig. 12 The melting curve of actin gene and target gene

注: A. Actin 基因的熔解曲线; B. 目的基因的熔解曲线。Actin 基因和目的基因的熔解曲线中没有出现杂峰,也未出现主峰的异常增宽,表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增

Note: A. The melting curve of actin gene; B. The melting curve of target gene. There were no complex peak and broadening of the peak in the melting curve of actin gene and target gene, which indicated that there were no contamination, primer dimers and nonspecific amplification in the experiments

体,它对分裂期细胞和非分裂期细胞均具有感染能力,能够整合到宿主细胞的基因组中,可以在体内长期稳定表达,还具有容纳外源性目的基因片段大、免疫反应小等优点^[4]。本研究所用的 Lentivirus 为“自杀”性病毒,即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。慢病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代,属于假型病毒,但该病毒仍然具有潜在的生物学危险^[5-6]。目前,慢病毒载体已被应用于帕金森氏病、镰状细胞贫血、血友病、肝癌及结直肠癌等疾病的研究^[7-11]。

本研究中,我们自行设计引物合成和 PCR 扩增目的基因后,将目的基因与酶切线性化的慢病毒载体进行定向连接,其产物转化细菌感受态细胞,对长出的阳性克隆进行 PCR 鉴定及直接测序比对分析,证实测序结果与目标基因序列完全一致,表明 B7-1 和 MIP-1 α 基因重组慢病毒载体构建成功。B7-1 目的基因质粒转染 293T 细胞 48 h 后,在荧光显微镜下能够观察到 >90% 的 293T 细胞中有强荧光表达;然而为何 MIP-1 α 目的基因质粒转染 293T 细胞后,只观察到部分细胞中有荧光表达呢?这是因为小鼠 MIP-1 α 蛋白是分泌蛋白^[12],表达后分泌到胞外,在细胞内不能逐渐蓄积所含 MIP-1 α 蛋白量较少,故仅观察到部分细胞有荧光蛋白表达。Western Blot 检测到目的基因 B7-1 和 MIP-1 α 融合 GFP 的表达,进一步证实了目的基因重组载体在 293T 细胞中的表达。

目前常用的测定慢病毒滴度的方法有孔稀释

法和实时荧光定量 PCR,孔稀释法是根据目的基因质粒转染 293T 细胞后的荧光表达情况计算病毒的滴度,由于荧光蛋白的表达程度易受到插入的目的基因片段的影响,从而导致该方法不能准确反映病毒的滴度,从而其应用受到限制。另外,如果目的基因表达的蛋白为分泌蛋白,因转录翻译生成的蛋白不能在细胞的胞浆或包膜中蓄积,导致观察不到或仅观察到较弱的荧光表达,应用孔稀释法就难以准确测定病毒滴度。实时荧光定量 PCR 法检测病毒基因组 RNA 的拷贝数,不受目的基因转录翻译生成的蛋白类型和蛋白表达量的影响,既能检测蛋白表达定位于胞浆及胞膜的目的基因,也能检测到表达分泌蛋白的目的基因,此方法简便易行、灵敏度高、特异性好;本研究采用实时荧光定量 PCR 法检测到 B7-1 和 MIP-1 α 基因重组慢病毒载体的滴度均达到 $2.00E+8$ TU/mL;虽然其能够比较准确的反映慢病毒载体的整合情况,但不能准确反应目的蛋白的实际表达情况^[13,14],其原因可能是由于病毒载体整合入靶细胞异染色质中,使目的蛋白表达受到影响。

在应用实时荧光定量 PCR 检测重组慢病毒载体滴度的过程中,由熔解曲线来分析产物的均一性有助于更准确地分析实时荧光定量 PCR 定量结果。由于 SYBR Green I 与所有的双链 DNA 相结合,因此由引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性。通过测量升高温度后荧光的变化可以帮助降低非特异产物的影响。荧光强度变化的拐点(熔点, T_m)为熔解峰

值。本研究的熔解曲线图中没有出现杂峰,也未出现主峰的异常增宽,表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增,B7-1 和 MIP-1 α 基因重组慢病毒载体的滴度均达 $2.00E+8$ TU/mL。

B7-1 和 MIP-1 α 基因重组慢病毒载体的成功构建,为后续淋巴瘤基因治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity [J]. *Immunity*, 2003, 18: 849 - 861.
- [2] Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, et al. CXC chemokines in angiogenesis of cancer [J]. *Semin Cancer Biol* 2004, 14: 195 - 200.
- [3] Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy [J]. *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25: 357 - 371.
- [4] Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors [J]. *Nat Protoc* 2006, 1: 241 - 245.
- [5] Sena-Esteves M, Tebbets JC, Steffens S, et al. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes [J]. *J Virol Methods* 2004, 122: 131 - 139.
- [6] Reiser J. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors [J]. *Gene Ther* 2000, 7: 910 - 913.
- [7] Poeschla E, Corbeau P, Wongst F. Development of HIV vectors for Anti-HIV gene therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,

93: 11395 - 11399.

- [8] Naldini L, Blomer U, Gage F H, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 92: 11382 - 11388.
- [9] Yamada K, Olsen JC, Patel M, et al. Functional correction of fanconi anemia group haematopoietic cells by the use of novel lentiviral vector [J]. *Mol Ther* 2001, 3: 485 - 490.
- [10] 李国平,潘润阳,张志波,等. 人 caveolin21 基因慢病毒过表达载体构建及其对 SMMC7721 细胞凋亡的影响[J]. *福建医科大学学报* 2009, 43: 297 - 300.
- [11] 于莉娜,张庆玲,丁彦青,等. Tiam1 基因慢病毒表达载体构建及其 HT29 细胞中的表达[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26: 2895 - 2898.
- [12] Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD, et al. Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties [J]. *J Exp Med*, 1988, 167: 1939 - 1944.
- [13] Butler SL, Hansen MS, Buslunan FD. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo [J]. *Nat Med* 2001, 7: 631 - 634.
- [14] Charrier S, Stockholm D, Seye K, et al. A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome Protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knock-out mice [J]. *Gene Ther* 2005, 12: 597 - 606.

(修回日期)2011-09-10

(上接第 53 页)

- [5] Rutgers SR, Poster DS, Hachen NH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke [J]. *Thorax*, 2000, 55 (1): 12 - 18.
- [6] Yao H, Edirisinghe I, Rajendrasozhan S, et al. Cigarettesmoke-mediated inflammatory and oxidative responses are strain-dependent in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(6): L1174 - 1186.
- [7] Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, et al. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(1): 24 - 31.
- [8] Noguera A, Batle S, Miralles C, et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Thorax*,

2001, 56(6): 432 - 437.

- [9] Amrani Y, Lazaar AL, Panettieri RA Jr. Up-regulation of ICAM-1 by cytokines in human tracheal smooth muscle cells involves an NF- κ B-dependent signaling pathway that is only partially sensitive to dexamethasone [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (4): 2128 - 2134.
- [10] Nishikawa M. Cigarette smoke-induced acute airway impairment [J]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 2000, 38(5): 347 - 353.
- [11] Erjefält JS, Uller L, Malm-Erjefält M, et al. Rapid and efficient clearance of airway tissue granulocytes through transepithelial migration [J]. *Thorax*, 2004; 59(2): 136 - 143.

(修回日期)2011-10-27

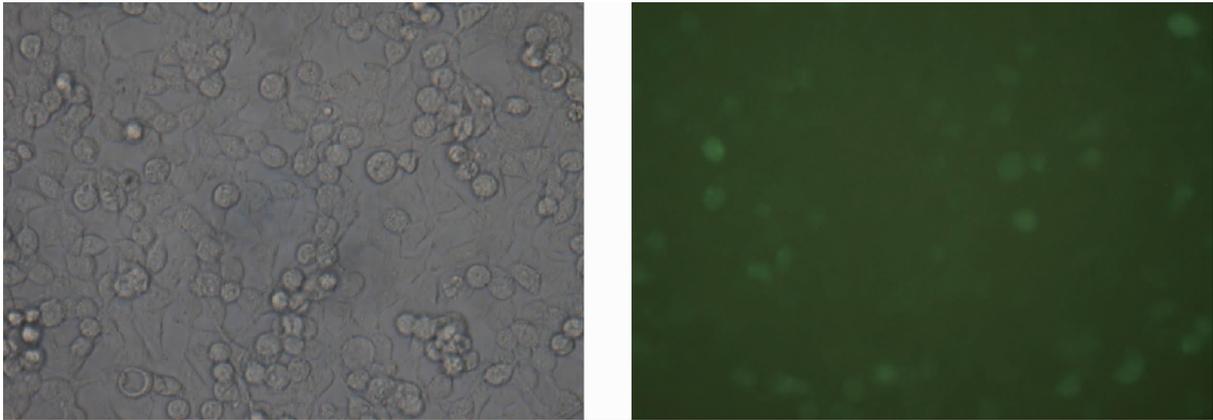


图 5 重组 MIP-1 α 目的基因质粒转染 293T 细胞后部分细胞内见荧光蛋白表达(MIP-1 α 蛋白为分泌蛋白)

Fig. 5 A part of 293T cells transfected with MIP-1 α gene recombinant plasmid showed the expression of fluorescent protein (MIP-1 α protein is secreted)

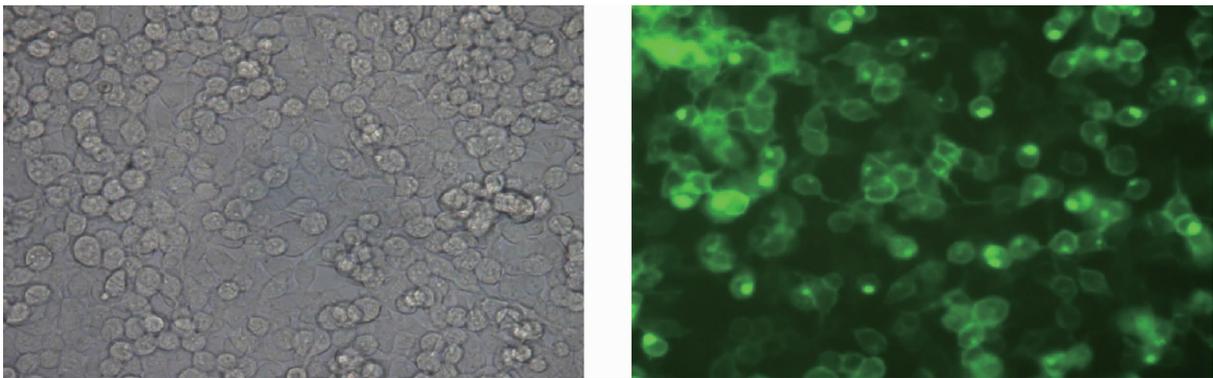


图 6 重组 B7-1 目的质粒转染 293T 细胞后 48 h, >90%细胞中可见荧光蛋白表达

Fig. 6 >90% 293T cells transfected with B7-1 gene recombinant plasmid showed the expression of fluorescent protein

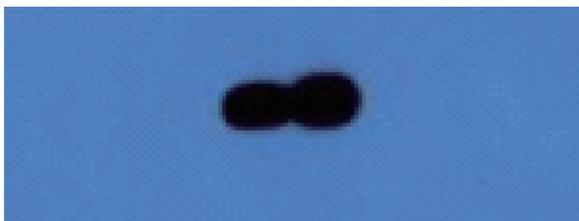


图 7 MIP-1 α 基因融合 GFP 表达

Fig. 7 The fusion expression of MIP-1 α and GFP gene

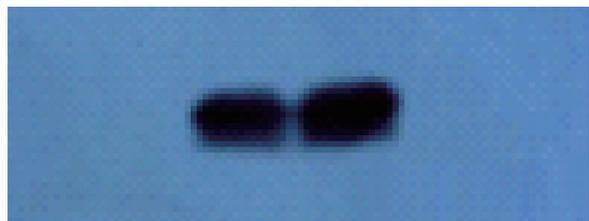


图 8 B7-1 基因融合 GFP 表达

Fig. 8 The fusion expression of B7-1 and GFP gene