

技术与方法

人红细胞生成素基因在小鼠体内的转移与表达

岳军明 焦保权 贾补年 户荣良 金宁一 殷 震

(中国人民解放军农牧大学基因工程室, 长春 130062)

史 江 聂海洋 胡云龙 吴 钢 周宗安

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

摘要 将人的红细胞生成素 (EPO) 基因克隆在 CMV 启动子的下游, 构建 EPO 表达质粒, 在 BHK₂₁ 细胞中表达成功后, 将该质粒经脂质体包埋, 再导入到小鼠的骨骼肌内, 在体内亦获得了表达, 一个月时小鼠血浆中人红细胞生成素的表达量高达 1 340 ng/L, 这为贫血病人的基因治疗提供了科学依据.

关键词 人红细胞生成素, 基因转移, 表达

学科分类号 Q78

人红细胞生成素反应性贫血, 目前都是通过皮下或静脉注射纯化的重组蛋白加以治疗, 通常需要重复进行. 体内基因转移的研究给这类疾病的治疗带来了一种新的方案, 体内的基因转移有间接 (*ex vivo*) 和直接 (*in vivo*) 两种, 间接的基因转移需要将病人的原代成肌细胞在体外分离, 培养和转染, 然后在体内包埋, 有时虽有效, 但是操作麻烦, 况且价格又非常昂贵. 最近的临床试验表明, 患有杜氏肌营养障碍的病人, 其成肌细胞移植效果很差^[1]. 1990 年 Wolff 等^[2] 将外源 DNA 直接注射到小鼠的骨骼肌其表达效率与用成纤维细胞作受体的间接基因转移处于同一数量级, 表达的时间长达二个月. 所以直接的基因转移已显示出其特点: 简单而又经济. 我们将构建的人红细胞生成素表达质粒在细胞上获得表达以后, 又经脂质体处理再导入到小鼠体内比直接的质粒注射取得了更为理想的结果, 现将其报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒, 菌种和细胞: 宿主菌 HB101,

质粒 pCMV 由本室保存, 细胞购于中国兽药监察所.

1.1.2 酶及主要的生化试剂: 限制性内切酶购于华美公司, Klenow, 4 × dNTP, T4DNA 连接酶, 随机引物标记试剂盒购于 Promega 公司, DMEM, Lipofectin 为 BRL 公司产品, ELISA-EPO 试剂盒为 Borehringer Mannmheim 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 基因重组: 质粒的提取, 酶切, 回收, 连接转化参照文献 [3] 进行.

1.2.2 PCR: 反应条件为 96℃变性 8 min 后进入循环, 95℃变性 1 min, 56℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后再延伸 10 min.

1.2.3 细胞基因组 DNA 的提取: 参照文献 [3] 进行.

1.2.4 DNA 探针的标记: 用随机引物法, 见参考文献 [4].

1.2.5 RNA 的提取: 用 NP-40/ 尿素变性法, 按试剂盒使用说明进行.

收稿日期: 1996-10-30, 修回日期: 1997-02-28

1.2.6 RNA 印迹: 经甲醛变性凝胶电泳后转移到硝酸纤维素膜上, 具体见参考文献 [3].

1.2.7 重组 DNA 导入到受体细胞采用脂质体法, 将质粒 DNA 无菌处理后, 溶于 200 μ l 无血清的 DMEM 中再加入 10 μ l lipofectin (1 g/L), 室温 10 min, 将消化传代长成 75% 单层的 BHK₂₁ 细胞用无血清的 DMEM 洗两遍后, 缓慢加入 DNA-lipofectin 复合物, 同时补加 800 μ l 无血清的 DMEM, 37 $^{\circ}$ C 15 h, 然后换有血清培养基.

1.2.8 重组 DNA 在小鼠体内的基因转移: a. 脂质体介导的表达质粒在体内的转移将 20 μ g 的表达质粒溶于 100 μ l 的生理盐水中, 加入 10 μ l 的脂质体, 在室温作用 30 min, 使之形成 DNA 和脂质体复合物, 再注射到小鼠的左后骨骼肌内. b. 直接质粒注射在体内的转移将 100 μ g 的表达质粒溶于 100 μ l 的生理盐水中直接注射到小鼠的左后骨骼肌, 对照小鼠直接注射生理盐水.

1.2.9 表达产物的测定: 应用 Boehringer Mannheim 的 EPO-ELISA 试剂盒, 含量以标准品作对照, 建立回归方程后求出. 具体见试剂盒说明.

1.3 表达产物的活性测定

表达产物的活性测定参考文献 [5].

2 结 果

2.1 表达质粒的构建及在 BHK₂₁ 细胞的表达

2.1.1 人红细胞生成素表达质粒的构建: 将人的红细胞生成素基因 EPO 从质粒 pUC18 中用 EcoR I 酶切后 Klenow 补平, 再用 Hind III 酶切回收 2.5 kb 的片段, 克隆在 pCMV-neo 的 Hind III 和 Sma I 位点, 构建成了人红细胞生成素的表达质粒 pCMV-EPO. 该质粒的特点是: 人巨细胞病毒 CMV 启动子控制其 EPO 基因的转录, 牛生长激素的 PolyA 为聚腺苷酸化加工信号, 多克隆位点与 CMV 的启动子之间没有 “ATG” 三联体存在, 插入到多克隆位点的 EPO 基因以其第一个 ATG 作为翻译起始密码子 (图 1).

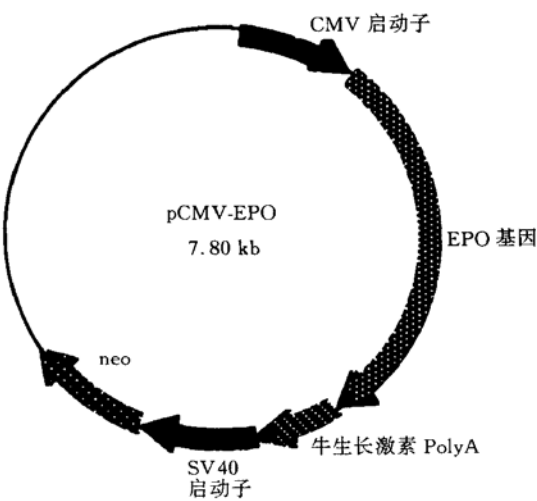


图 1 人红细胞生成素表达质粒的构建图

2.1.2 人红细胞生成素基因在 BHK₂₁ 细胞上整合水平的检测: 根据文献 [7] 发表 EPO 的序列, 合成了两条引物. 上游为 TGGGGT-GCACGAATGTCCTGCCT, 下游为 TCATCT-GTCCCCTGTCCTGCAGGC 从提取的细胞基因组 DNA 中, 按方法中的条件进行 PCR, 结果从用表达质粒转染的细胞中扩增出约 1.5 kb 的片段, 而仅用对照质粒转染的细胞中未扩增出相应的带 (图 2). 这表明 EPO 基因已整合于细胞的染色体中.

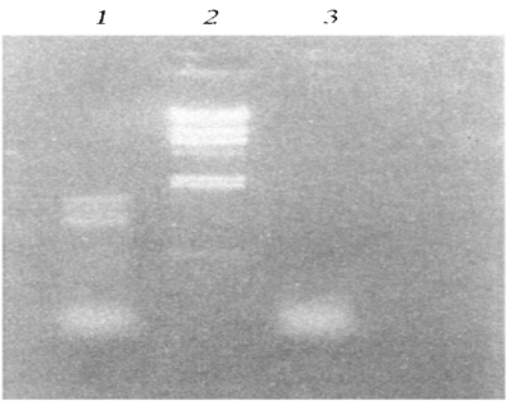


图 2 人红细胞生成素基因在 DNA 水平的检测

1: 1 kb Hind III 分子质量标准; 2: 转染细胞扩增产物; 3: 阴性对照.

2.1.3 转染的 BHK₂₁ 细胞特异性 mRNA 的检测: 为了弄清转染细胞在转录水平上的表达, 我们用 NP-40/ 尿素变性法提取了细胞的总 RNA, 经甲醛变性的凝胶电泳后转移在硝酸纤维素膜上, 用随机引物法标记的 EPO 探针杂交, 放射自显影后有非常强的杂交信号, 表明在转录水平上得到了很好表达 (图 3).

1 2 3

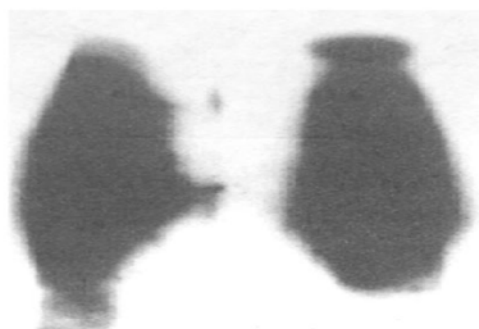


图 3 细胞水平上 RNA 印迹的结果
1, 3: 转染后的样品; 2: 阴性对照.

2.1.4 转染细胞在蛋白水平表达的检测: 脂质体转染的细胞 72 h 后收集上清, 用 Boehringer Mannheim 公司的 ELISA-EPO 试剂盒检测表达量为 30 U/ml.

2.1.5 表达产物的活性测定: 将表达的上清注射不同日龄的小白鼠, 采血涂片, 经煌焦油蓝染色后计数网织红细胞计数, 明显发现用药组比对照组高, 而且日龄较大的小鼠反应比小的明显. 表明表达产物具有体内活性.

2.2 人 EPO 基因在小鼠体内的转移与表达

2.2.1 脂质体介导的 EPO 基因在小鼠体内的转移与表达: 将人红细胞生成素表达质粒 20 μ g 按前述方法经脂质体处理后注射到小鼠的左后骨骼肌, 二周和一月时采血加肝素抗凝分离血浆, 同时取注射部位肌肉加入 1 ml 的生理盐水, 研磨、离心取上清检测, 结果均检测到表达, 在一个月时肌肉中的表达量可达 300 ng/L, 而在血浆中高达 1 340 ng/L.

2.2.2 直接质粒注射在体内的转移: 将 100 μ g 的质粒溶于 100 μ l 的生理盐水后直接注

射小鼠的左后骨骼肌, 同样在二周和一月时检测, 虽然均有表达, 但量相对较低, 一月时肌肉中的表达量为 200 ng/L, 血浆中为 340 ng/L. 对照中均未检出.

3 讨 论

我们在细胞水平上成功表达了人的红细胞生成素基因之后, 将此表达质粒经脂质体处理后, 导入到小鼠体内, 在体内也获得了表达, 这为一些贫血病人的基因治疗提供了实验证据. 目前基因治疗的途径主要有以病毒为载体和质粒为载体两类^[6]. 病毒载体有逆转录病毒、人的腺病毒、腺联相关病毒和疱疹病毒, 但由于其潜在的致病性而限制其应用. 这种质粒载体不含病毒的编码序列, 因此比较安全. 直接的质粒注射通常转染效率较低, 而将质粒经脂质体处理, 不仅质粒的用量小而且转染效率高, 我们的实验结果证明了这一点. 这种体内直接转移的方法操作简单, 相对也较经济, 不需要细胞或组织移植, 因此比间接的体内基因转移更有优势.

参 考 文 献

- 1 Tripathy K. Stable delivery of physiologic levels of recombinant erythropoietin to the systemic circulation by intramuscular injection of replication defective adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 11557~ 11561
- 2 Wolff J. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, **247**: 1465~ 1468
- 3 Sambrook J. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 16 ~ 56
- 4 David T. Random primer labeling of DNA. *Promega Protocols and Applications Guide*. 2nd. Madison: Promega Corporation, 1991. 141~ 142
- 5 贾 林, 曹之放, 姜 蓉. 常规饲养小鼠用于促红细胞生成集体内活性测定的研究. 全军第四届基因工程学术讨论会论文摘要. 上海: 上海第二军医大学出版社, 1994. 86
- 6 Morsy M. Progress toward human gene therapy. *JAMA*, 1993, **270**: 2338~ 2345.
- 7 Lin F. Cloning and expression of human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 7580~ 7584

Gene Transfer and Expression of Human Erythropoietin in Mice *in vivo*. YUE Jun-ming,

JIAO Bao-quan, JIA Bu-nian, HU Rong-liang, JIN Ning-yi, YIN Zhen (*Changchun University of Agriculture and Animal Sciences, Changchun 130062, China*); SHI Jiang, NIE Hai-yang, HU Yur-long, WU Gang, ZHOU Zong-an (*Military Medical Institute of Nan Jing Army, Nanjing 210002, China*).

Abstract The expression vector was successfully constructed with the cloning of ery-

thropoietin genomic DNA into the downstream of CMV promoter, and expressed in transfected transiently BHK21 cells. Then it was introduced into the skeletal muscle of mice by the mediation of lipofectin. As a result, the EPO expressed in serum of mice reached highly to 1 340 ng/L in one month.

Key words erythropoietin, gene transfer, expression

酶放大镧系元素发光法测定碱性磷酸酶*

赵启仁 李美佳 刘 洁 宋娜玲 庄湘莲 陈 艾 林 汉

(中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192)
(中国协和医科大学)

摘要 报告了应用酶放大镧系元素发光法测定碱性磷酸酶的方法. 应用 5-氟水杨酸磷酸酯作为酶底物, 并对方法学中的多种因素进行了最佳比. 用甲基硅油 (I) 改进了信/噪比的稳定性. 方法的灵敏度为 4 U/L. 精密度为 10%. 精密度为 10% 的浓度范围是 2.00~ 3.00 × 10² U/L. 测量值的相对误差 < 10%. 测定了血清中的碱性磷酸酶浓度, 回收率为 93% ~ 95%.

关键词 酶放大镧系元素发光分析法, 酶放大时间分辨荧光分析法, 碱性磷酸酶

学科分类号 Q55, O657

酶放大镧系元素发光分析法 (EALL), 也称酶放大时间分辨荧光分析法 (EATRFA), 是把酶放大与时间分辨荧光分析技术相结合的一种超灵敏生物分析技术. 它是由 Diamandis 等在 Bobrow 等的工作基础上提出的^[1~3]. EALL 法集中酶放大作用、镧系元素螯合物以及时间分辨和波长分辨荧光测量技术等优点, 成为一种灵敏、精密的非同位素分析方法. 已应用于时间分辨荧光免疫分析等许多领域.

用 EALL 法测定了碱性磷酸酶 (AP). 基本原理如下. AP 作用于底物 5-氟水杨酸磷酸酯 (5-FSAP), 水解生成 5-FSA. 它与铽-乙二胺四乙酸 (Tb-EDTA) 螯合物作用时, 生成荧光寿命长、产额高的 Tb-EDTA: 5-FSA 三元复合物. 用时间分辨荧光仪测量荧光强度而确定 AP 的量.

1 材料和方法

1.1 材料

5-FSAP: 本所研制^[4]. Tb₄O₇: 上海跃龙有色金属公司. AP: Sigma 公司产品. 12 孔微滴定板条: 芬兰 Labsystem 公司产品.

1.2 仪器

LKB-Wallac Arcus-1230 时间分辨荧光仪. LKB-Wallac 1296-001 板式振荡器. ADIL 公司自动微滴定板洗涤器.

1.3 实验方法

1.3.1 溶液制备: AP 稀释缓冲液: 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), 每升含 6 g BSA 和 0.5 g NaN₃. AP 标准溶液: 用 AP 稀释缓

* 国家自然科学基金资助课题 (39370223).

收稿日期: 1996-10-30, 修回日期: 1997-06-17