

技术与方法

表达人 PAI-1 的重组腺病毒的制备及检测

宋海云 张 菁 徐贤秀¹⁾

(南京大学生物化学系, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 人纤溶酶原激活剂抑制物 1 (PAI-1) 基因与复制缺陷型腺病毒载体 AdCMVHSgD 重组, 与 pJM17 质粒共转染 293 细胞, 采用不铺琼脂的方法产生重组病毒. PCR 证实 PAI-1 基因重组进入腺病毒. 进一步感染 B16 (F10) 细胞, 细胞表面洗提物和上清分别经纤维显示胶和反向纤维蛋白显示胶检测 PAI-1 抑制纤溶酶原激活剂 (PA) 的活性.

关键词 人纤溶酶原激活剂抑制物 1, 重组病毒, 基因表达

学科分类号 Q78

肿瘤细胞浸润和转移能力与存在其细胞表面的 uPA 活性有关^[1,2]. 纤溶酶原激活剂抑制物 1 (PAI-1) 能和 uPA 形成对 SDS 稳定的复合物, 从而抑制其活性^[3]. 由于注射外源 PAI 有导致血栓形成的可能性, 我们利用基因治疗的方法使 PAI-1 在鼠黑色素瘤细胞 B16 (F10) 中表达, 为进一步进行动物实验提供了依据.

1 材料和方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶, Klenow 酶, T4 DNA 连接酶和 Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司. 无血清培养基 DMEM 购自 GIBCO BRL.

1.2 质粒, 菌种和细胞株

腺病毒载体 AdCMVHSgD 和 pJM17 质粒由薛明博士惠赠. 克隆宿主菌 DH5 α , 人胚肾细胞 2993 细胞株和鼠黑色素瘤细胞 B16 (F10) 为本实验室保存.

1.3 重组腺病毒载体的构建

PUC18-PAI-1 经 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切, Klenow 补平后接入经 *EcoR* V 酶切的 AdCMVHSgD 载体. 转化 DH5 α , 经 Amp 筛选, 酶切检验正反, 挑出正确的重组载体 AdCMV-PAI-1.

1.4 重组病毒的产生及鉴定

10 μ g 质粒 AdCMV-PAI-1 和 4 μ g pJM17 混合后通过磷酸钙沉淀法^[4]转染 293 细胞, 培养 12 h 后, 吸去上清, 加含 5% CS 的 D-MEM 培养液培养 48 h. 吸去上清, 换含 2.5% 小牛血清 (calf

serum) 的 DMEM 培养液. 10 d 后出现完全 CPE (cytopathic effect), 收集细胞. 按 Hirt 法^[5]提取病毒 DNA, 用 PCR 检测. PAI-1 的引物为: 5'-GT-GCACCATCCCCATCCTACGTG-3' 和 5'-GGTTC-CTTCACTTGGCCCATGA-3'. PCR 反应反应条件 94 $^{\circ}$ C 60 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s. 30 个循环.

1.5 重组腺病毒表达 PAI-1 的活性检测

重组腺病毒经纯化和滴度测定后, 按 100 M.O.I 值感染 B16 (F10) 细胞, 无血清培养 24 h 后取上清和细胞表面洗提物检测 PAI 和 PA 活性^[6].

反向纤维蛋白显示胶检测 PAI 活性: 45 $^{\circ}$ C 下, 20 ml 缓冲液中含 60 mg 纤溶酶原, 60 mg 琼脂, 20 U 凝血酶, 2 U 尿激酶, 混合后立即制板, 挖样品孔. 加入 10 μ l 细胞上清, 37 $^{\circ}$ C 潮湿环境中放置 16 h.

常规纤维蛋白显示胶检测 PA 活性: 测活板成分同上 (除不含尿激酶). 挖样品孔, 加入 10 μ l 细胞表面洗提物, 37 $^{\circ}$ C 保温 16 h.

1.6 PAI-1 抑制活力的测定

纤维蛋白显示胶可以用来定量测定 PAI 活力, 将上清与 uPA 按一定比例混合, 直接把样品点在板上, 16 h 后测量溶圈的直径与标准曲线对照, 计算 PAI-1 的活力. 定义 1 个单位的 PAI-1 活力相当于一个国际单位的 uPA.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-10-19, 修回日期: 1999-01-18

2 结 果

2.1 重组质粒 AdCMV-PAF-1 的构建

正接质粒经 *Sal* I 酶切后, 产生 7.8 kb 和 450 bp 片段 (图 1).

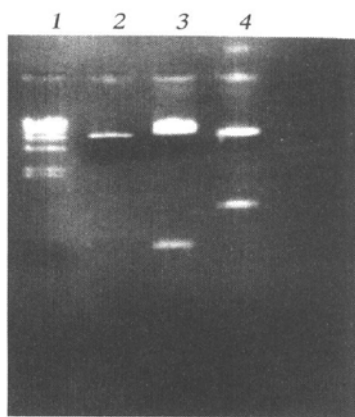


图 1 重组腺病毒载体的构建

1: 分子质量标准 (*N* *Hind* III); 2: 载体 AdCMV 经 *Sal* I 酶切; 3: 正接质粒经 *Sal* I 酶切; 4: 反接质粒经 *Sal* I 酶切.

2.2 重组腺病毒 AdCMV-PAF-1 的鉴定

提取病毒 DNA, PCR 扩增出 1.1 kb 的片段 (图 2), 与 PAF-1 基因大小相符.



图 2 PCR 检测重组病毒

1: 以质粒 pUC-18-PAF-1 为模板; 2: 以重组腺病毒 DNA 为模板; 3: 分子质量标准 (*N* *Hind* III).

2.3 PAI 和 PA 的活性检测

反向纤维蛋白显示胶中含尿激酶, 随保温时间延长, 尿激酶激活纤溶酶原生成纤溶酶水解纤维蛋白, 使显示胶呈透明状态, 但如有 PAI 活性存在, 则抑制 uPA 活性, 在样品孔处出现不透明的抑制圈 (图 3). 常规纤维蛋白显示胶中无尿激酶, 所以整个显示胶呈不透明乳白色. 当加入的样品具有 PA 活力时, 样品孔处有透明圈, 圈的面积和 uPA

浓度在双对数表上成线性关系. 当 uPA 活力被 PAF-1 完全抑制后, 透明圈不出现 (图 4).

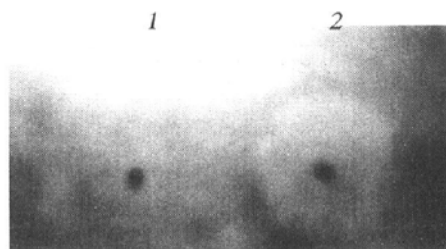


图 3 PAF-1 活性的测定

1: B16 细胞上清; 2: 感染重组腺病毒的 B16 细胞上清.

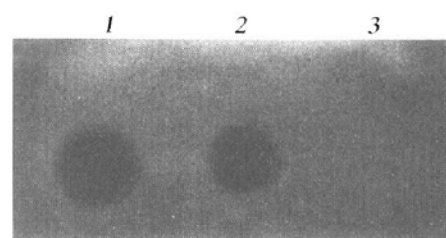


图 4 PA 活性的测定

1: uPA 样品, 阴性对照; 2: B16 细胞洗提物; 3: 感染重组腺病毒的 B16 细胞洗提物.

2.4 PAF-1 的抑制活力

根据标准曲线测定 PAF-1 比活为 1000 U / ml.

3 讨 论

人们对 uPA 在肿瘤浸润及转移过程中的作用已有较多的研究, 但是对 PAI 在限制肿瘤转移过程中扮演的角色还不很清楚. Eitzman^[6]和 Alizadeh 等^[7]分别有完全不同的报道. 我们选用 E1 区缺失的腺病毒载体, 通过同源重组, 制备了表达人 PAF-1 的重组腺病毒. 在体外实验中肯定了 PAF-1 在黑色素瘤细胞中的作用, 进一步还可以进行动物实验.

重组腺病毒的产生, 国内大多采用铺琼脂, 挑噬斑的方法. 我们根据 Falck-Pederson 的推荐采取了不铺琼脂的方法, 这种方法可以使病毒 DNA 在包装成病毒后继续感染其他细胞. 与挑斑相比, 既简捷又可减少一轮增值过程, 特别是可以避免某些噬斑病毒滴度低的问题.

与一些真核表达体系相比, 本实验中重组腺病毒表达的 PAF-1 活力不高, 但是已足以抑制细胞表面的 uPA 活力. 而且, 由于腺病毒具有安全性好, 感染效率高, 可以直接注射到肿瘤附近的优点, 使它在肿瘤免疫中具有良好的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Dano K, Andreasen P A, Grondah-Hansen J, *et al.* Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res*, 1985, **44**: 139~ 266
- 2 Vassalli I D, Sappin A P, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*, 1991, **88** (4): 1067~ 1072
- 3 Cajot J F, Bamat J, G E Bergaonzelli, *et al.* Plasminogen activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (18): 6939~ 6943
- 4 Miller A D, Rosman G J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*, 1989, **7** (9): 980~ 988
- 5 Laug W E, Cao X R, Yu Y B, *et al.* Inhibition of invasion of HT1080 sarcoma cells expressing recombinant plasminogen activator inhibitor 2. *Cancer Res*, 1993, **53** (24): 6051~ 6057
- 6 Eitzman D T, Krauss J C, Shen T, *et al.* Lack of plasminogen activator inhibitor 1 effect in a transgenic mouse model of metastatic melanoma. *Blood*, 1996, **87** (11): 4718~ 4722
- 7 Alizadeh H, Ma D, Berman M, *et al.* Tissue-type plasminogen activator induced invasion and metastasis of murine melanomas. *Curr Eye Res*, 1995, **14** (6): 449~ 458

Construction and Identification of Recombinant Adenovirus for Expressing Human Plasminogen

Activator Inhibitor 1. SONG Hai-Yun, ZHANG Jing, XU Xian-Xiu (*Department of Biochemistry, Nanjing University, National Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing 210093, China*).

Abstract Human plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene was recombined into a replication-defective adenovirus vector AdCMVHSgD, co-transfected with plasmid pJM17 into human embryo kidney cell line 293 cells. Recombinant virus was produced without use of agarose overlay, identified by PCR analysis and used to infect B16 (F10) cells. The inhibition of plasminogen activator (PA) activity of PAI-1 was revealed in the elute and supernatant of infected B16 cells by regular and reverse agarose-fibrin autography.

Key words human plasminogen activator inhibitor 1, recombinant virus, gene expression

蛋白质氯胺-T 双相碘标法的建立及其应用*

从玉文 陈家佩 邵 源

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 常规的蛋白质碘标方法易引起被标细胞因子的失活, 是受体配基竞争结合实验失败的原因之一。试用氯胺-T 双相碘标法标记 rhG-CSF 和 rhEPO, 并应用受体配基竞争结合分析法测定 NFS-60 细胞 G-CSF 受体及 BET-2 细胞 EPO 受体的特性。结果显示所获¹²⁵I-EPO 和¹²⁵I-G-CSF 放射比活度均较高; 发现 BET-2 细胞有高、低两种亲和力的 EPO 受体, NFS-60 细胞只有一种高亲和力的 G-CSF 受体, 所获结果与文献资料相一致。说明氯胺-T 双相碘标法是细胞因子同位素碘标记的理想方法之一。

关键词 细胞因子, 同位素碘标记, 受体特性

学科分类号 Q5-3

放射配基结合分析法是研究受体特性的经典方法, 获得高放射比活度的标记蛋白质是实验成功的关键。常规的同位素标记法如氯胺-T 法及 Iodogen 法, 因氧化剂和被标记物在同一个反应体系中, 反应较剧烈, 条件不易控制, 很容易引起标记多肽的失活。为解决这一难题, Butt^[1]于 1972 年提出氯胺-T 双相碘标法的设想并进行了生长激素标记实验, 随后, Tejedor 等^[2]于 1982 年优化了该方法实验过程。因当时对蛋白质标记后活性变化的要求不高, 且实验中需制备一些实验器材, 因此, 在一段

时间内并未引起人们的普遍重视。最近国外少数实验室为解决小分子活性多肽标记后失活问题, 尝试应用氯胺-T 双相碘标法标记生物活性多肽, 获得了较满意的效果。目前国内还没见到该方法的应用报道。为在国内推广该方法的应用及积累细胞因子标记经验, 本文应用双相法成功地标记了 rhEPO 及 rhG-CSF, 并观察了造血细胞 EPO 及 G-CSF 的受体特性。

* 国家自然科学基金资助项目 (39800032)。

收稿日期: 1998-10-23, 修回日期: 1999-01-21