

- early chick embryos and estimation of their content. *Experientia*, 1971, **27** (7): 817~ 819
- 3 Bruce L, Emanuelsson H. Analysis of DNA isolated from intracellular yolk granules in the early chick blastoderm. *Exp Cell Res*, 1975, **92** (2): 462~ 466
- 4 李玉安, 李 莱, 潘宗耀等. 鸡胚细胞核和胚下卵黄颗粒染色质的电子显微镜观察. *中国科学 B 辑*, 1982, (11): 1007~ 1010
Li Y A, Li L, Pan Z Y, *et al.* *Science in China B*, 1982, (11): 1007~ 1010
- 5 李玉安, 李 莱, 潘宗耀等. 鸡胚细胞核和胚下卵黄颗粒 DNA 分子的电子显微镜观察. *中国科学 B 辑*, 1982, (12): 1089~ 1091
Li Y A, Li L, Pan Z Y, *et al.* *Science in China B*, 1982, (12): 1089~ 1091
- 6 Sun L J, Yu L, Chen C C. Presence, isolation and characterization of yolk DNA from chicken eggs. *Science in China (Series C)*, 1998, **41** (3): 251~ 257
- 7 Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem*, 1980, **102** (1): 344~ 352
- 8 Goda S K, Minton N P. A simple procedure for gel electrophoresis and northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (16): 3357~ 3358
- 9 Takemori H, Halder S K, Nonaka Y, *et al.* Polyadenylation-mediated translational regulation of maternal P450 (11 β) mRNA in frog oocytes. *Eur J Biochem*, 1997, **250** (1): 197~ 204
- 10 孙立军, 许怀庆, 陈楚楚. 鸡蛋胚下表层卵黄 DNA 的提取方法. *生物化学与生物物理进展*, 1997, **24** (1): 82~ 85
Sun L J, Xu H Q, Chen C C. *Prog Biochem Biophys*, 1997, **24** (1): 82~ 85

Distribution of DNA and RNA in the Yolk of Fertilized Eggs. LEI Ha-Xin, YU Lei, SUN Li-Jun, CHEN Chur-Chu (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract By the investigation on different regions of the yolk of fertilized eggs, it was discovered that DNA and RNA were widely distributed in the yolk. DNA and RNA in the yolk were quantified by the method of fluorescence spectrophotometry with the reagents Hoechst33258 and RiboGreen respectively. The results indicated that DNA was uniformly distributed in the whole yolk (about 65.7 $\mu\text{g/L}$) and it was most probably that the DNA was contained in the yolk granules; while the distribution of RNA in the yolk showed another pattern: the amount of RNA in the superficial yolk beneath blastoderm was about 0.43 mg/L, which was much less than that of lateral yolk (2.87 mg/L) and vegetative pole (3.63 mg/L). The significance of the existence of yolk DNA and the unique distribution of yolk RNA remains to be elaborated.

Key words fertilized egg, yolk, DNA distribution, RiboGreen

腺相关病毒介导基因组来源的基因转移与整合*

李 斌 刘德培¹⁾ 王 晶 董文吉 郭志晨 夏 薇 梁植权

(中国医学科学院 基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学)

摘要 构建一个带 β -珠蛋白基因组序列的腺相关病毒载体 AV53HS2 $\Delta\beta$ 2Neo. 经包装成重组腺相关病毒后, 转导红系细胞. DNA 印迹证实包含红系增强子、 β -珠蛋白基因和筛选标志基因的前病毒基因组完整整合于红系细胞基因组中. 结果说明腺相关病毒载体能介导基因组序列来源的目的基因稳定整合于受体细胞基因组中.

关键词 腺相关病毒载体, 基因组, 目的基因, 基因转移, 整合

学科分类号 Q785

腺相关病毒 (adenovirus-associated virus, AAV) 载体是新近发展的基因转移载体, AAV 属细小 DNA 病毒, 基因组全长 4 700 bp. 构建 AAV 载体时, 以外源基因的表达序列盒代替 AAV 的编码序列 (rep/cap 基因), 只保留其基因组两端长 145 bp 负责病毒获救、复制、包装与整合的顺式元件——倒

转重复序列 (ITR). 当 AAV 载体与携带 AAV 编码序列 (rep/cap) 的辅助质粒共转染辅助病毒 (腺病毒) 感染的 293 细胞时, 即能获救、复制并

* 863 计划项目资助.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 65296415, E-mail: liudp@public.east.cn.net

收稿日期: 1999-02-05, 修回日期: 1999-08-16

包装成重组 AAV 病毒颗粒^[1]. AAV 感染谱宽且能感染并稳定整合于非分裂细胞基因组中. 某些基因治疗的目的基因在受体细胞中呈组织特异性的有效表达需要内含子及近端顺式元件的参与, 因此, 采用基因组来源的 DNA 序列作目的基因. 但在反转录病毒载体中经常发生缺失, 影响其整合稳定性和表达水平. 为了建立能介导这一类型的目的基因稳定整合于受体细胞基因组的基因转移方法, 我们以 AAV 为载体, 以 β -珠蛋白基因为靶基因, 新霉素抗性基因 (Neo) 为筛选标志, 构建了 AAV 重组体. 经病毒转导红系细胞 (MEL), 分析了它的整合状态.

1 材料与方法

1.1 主要材料

AAV 载体 (pAV53) 与辅助质粒 (pAAV/Ad) 由美国南卡大学董剑云博士赠送. 其他质粒、探针、宿主菌和细胞由本室提供. 限制性内切酶、修饰酶、T4 连接酶购自 Promega 公司, DMEM 培养基购自 GIBCO 公司, 放射性核素 (α -³²PdCTP) 购自亚辉公司.

1.2 主要方法

1.2.1 β -珠蛋白基因腺相关病毒载体构建

DNA 酶切、回收、连接、转化均按 Sambrook 等的方法进行^[2].

1.2.2 病毒重组体包装与病毒滴度测定

接种于 10 cm 培养皿的 293 细胞长至 80% 融合 (confluence) 后, 于转染前 4 h, 用感染指数为 10 的腺病毒 (Ad5) 感染 293 细胞. 取 10 μ g AAV 载体和 10 μ g pAAV/Ad 辅助质粒经磷酸钙共沉淀转染 293 细胞. 8 h 后, 换新鲜 DMEM 培养液. 培养 40 h 后, 收获细胞. 经反复 3 次冻融, 56℃ 灭活 Ad5 病毒 30 min. 离心取出上清, 分装, -20℃ 保存.

病毒原液按 1:10 稀释接种于 5×10^5 HeLa 细胞. 感染过夜后, 1:10 传细胞. 24 h 后, 加入含 500 mg/L G418 的 DMEM 培养液, 筛选 10~14 d 后, 计数抗性克隆, 按公式: 滴度/CFU \cdot ml⁻¹ = G418 抗性克隆数 \times 病毒稀释倍数 \times 细胞传代倍数, 算出重组 AAV 病毒滴度.

1.2.3 重组病毒转导 MEL 细胞

取含 1×10^4 CFU/ml 的重组病毒 500 μ l 与 2×10^5 MEL 细胞共培养 24 h, 洗涤后, 用含 1 g/L G418 的 DMEM 培养液悬浮, 按每孔 2×10^3 接种

于 24 孔或 96 孔板中, 10~14 d 后, 将抗性克隆分离后单克隆扩增, 或合并后扩增.

1.2.4 细胞基因组 DNA 提取与 DNA 印迹: 均按 Sambrook 方法进行.

2 结果

2.1 β -珠蛋白基因腺相关病毒载体构建与包装

为适应 AAV 载体容量, 先删除了对表达没有影响的 β -珠蛋白基因部分第二内含子部分序列及 3' 增强子序列, 获得 2.0 kb β -珠蛋白基因 $\Delta\beta 2$. $\Delta\beta 2$ 基因 5' 端与 341 bp 红系增强子片段 HS2 相连, 3' 端与新霉素抗性基因 (Neo) 相连, 插入 AAV 载体 pAV53 得到重组体 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo. 红系增强子 HS2 片段使 β -珠蛋白基因呈红系组织特异性表达, 载体中 ITR 保证 AAV 载体获救、复制、包装成重组 AAV 病毒 (图 1 和图 2). 瞬时包装得到重组病毒滴度为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml.

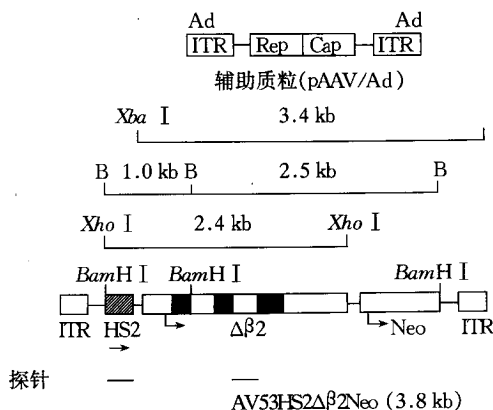


图 1 腺相关病毒重组体 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 与辅助载体 pAAV/Ad 示意图

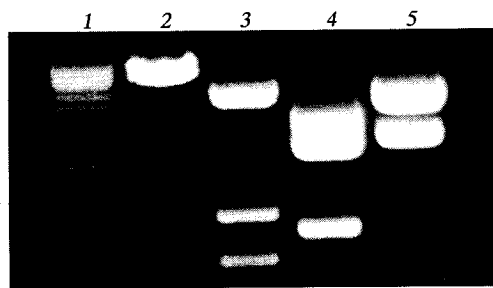


图 2 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 重组体的酶切图谱

1: 分子质量标记 λ /BstE II; 2: Xba I 酶切; 3: EcoR I 酶切; 4: BamH I 酶切; 5: Xho I 酶切.

2.2 β -珠蛋白基因病毒重组体在 MEL 细胞中整合用 DNA 印迹检测 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 的整合状态. 首先, 用 Xho I 酶切病毒转导细胞基因组

DNA, 以 $\Delta\beta 2$ 基因的第二内含子作探针进行杂交. 检测到 2.4 kb 长与相同酶切的质粒对照一致的杂交带, 说明 HS2 和 $\Delta\beta 2$ 片段已完整整合于 MEL 细胞. 用 *Bam*H I 酶切, 以 HS2 和 $\Delta\beta 2$ 的第二内含子序列作探针进行杂交, 结果显示: 转导细胞出现两条长分别为 2.5 kb 和 1.0 kb 的杂交带, 与质粒对照一致. 进一步证实经 AAV 病毒转导, 包含红系增强子、 β -珠蛋白基因及筛选标志基因已经稳定转移至 MEL 细胞 (图 1, 图 3 和图 4). 为确定重组病毒已整合于 MEL 细胞的基因组中, 用重组病毒基因组中存在单个酶切位点的内切酶 *Xba*I 酶切不同的病毒转导细胞克隆的基因组 DNA, 以 $\Delta\beta 2$ 的第二内含子序列作探针, 进行 DNA 印迹实验. 理论上, 被检测的 *Xba*I 单酶切的重组病毒 DNA 片段若完整整合于细胞基因组的不同位点上时, DNA 杂交带长度不应小于 3.4 kb (图 1). 我们的结果发现四个病毒转导细胞克隆出现长度不同但均大于 3.4 kb 的杂交带, 证实 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 病毒重组体经病毒转导已稳定整合于靶细胞中 (图 1 和图 5).

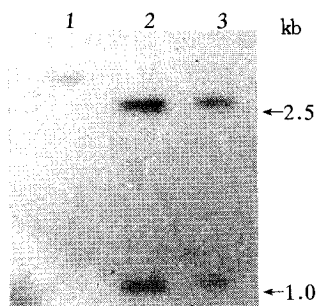


图 3 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 重组体整合的 DNA 印迹分析

1: *Bam*H I / *Xba*I 酶切的人基因组 DNA; 2: *Bam*H I 酶切的 AV 5 3 HS 2 $\Delta\beta 2$ Neo 质粒; 3: *Bam*H I 酶切的 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 整合的细胞基因组 DNA.

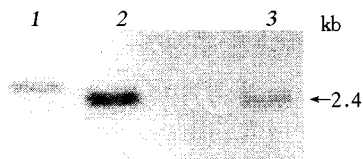


图 4 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 重组体整合的 DNA 印迹分析

1: *Bam*H I / *Xba*I 酶切的人基因组 DNA; 2: *Xho*I 酶切的 AV 5 3 HS 2 $\Delta\beta 2$ Neo 质粒; 3: *Xho*I 酶切的 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 整合的细胞基因组 DNA.

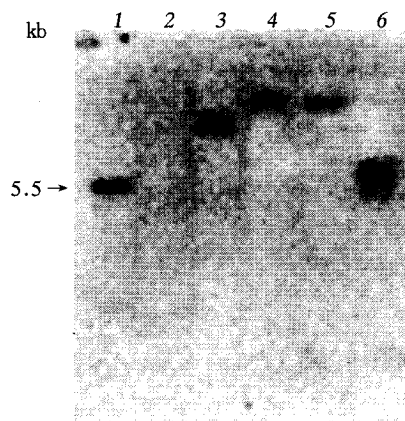


图 5 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 重组体整合的 DNA 印迹分析

1: *Eco*R I 酶切的人基因组 DNA; 2: *Xba*I 酶切的 MEL 细胞基因组 DNA; 3~6: *Xba*I 酶切的 AV53HS2 $\Delta\beta 2$ Neo 整合的 1#~4# MEL 细胞克隆的基因组 DNA.

3 讨 论

一些基因治疗的靶基因呈组织特异性的高水平表达需要内含子及近端序列的参与, 如 β -珠蛋白基因等. β -珠蛋白基因序列带有隐含的拼接信号和转录中止信号, 插入反转录病毒载体后, 严重干扰 RV 生命周期, 导致重组 RV 病毒产生缺失、重排^[3]. 而 AAV 载体由于其生命周期在 DNA 水平上完成, β -珠蛋白基因插入, 不会出现现象在 RV 载体上那样由于病毒 RNA 错误拼接、转录中止而产生的缺失、重排. 我们的结果证实了经 AAV 病毒转导后, β -珠蛋白基因能稳定整合于红系细胞中并表达出一定水平 β -珠蛋白 mRNA. 同时, 构建的反转录病毒载体却在部分转导细胞中发生了缺失重排, 整合完整率仅为 66.7% (数据未显示). 因此, 对于易在 RV 载体中缺失的基因组来源的目的基因, AAV 载体为其稳定转移提供了一个较好的基因转移系统. 已有实验结果证实 AAV 载体介导多种目的基因在体内多种组织中长期稳定表达达到治疗水平的基因产物, 展示了良好的应用前景^[4].

参 考 文 献

- 1 Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, **158** (1): 97~129
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474~489
- 3 Leboulch P, Huang G M, Humphries R K, *et al.* Mutagenesis of retroviral vectors transducing human β -globin gene and β -globin

locus control region derivatives results in stable transmission of an active transcriptional structure. EMBO J, 1994, 13 (13): 3065 ~ 3076

- 4 Nakai H, Herzog R W, Hagstrom J N, *et al.* Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. Blood, 1998, 91 (12): 4600~ 4607

Stable Integration of Genomic Gene of Interest in Mammalian Cells Following Adeno-associated Virus Vector Mediated Gene Transfer. LI Bin, LIU De-Pei, WANG Jing, DONG Wen-Ji, GUO Zhi-Chen, XIA Wei, LIANG Chieh-Chuan (*National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of*

Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China).

Abstract An adeno-associated viral vector containing erythroid enhancer (HS2), genomic β -globin gene and neomycin resistance gene was constructed, then packaged into recombinant AAV virions. Southern analyses showed that recombinant provirus genome steadily integrated into erythroid cells via virus transduction. It was suggested that an adeno-associated virus could mediate stable integration of genomic gene of interest in mammalian cells.

Key words adeno-associated virus vector, genome, gene of interest, gene transfer, integration

细菌 3-脱氧葡萄糖醛酮代谢酶的纯化及性质研究*

梁智群 粟桂娇 李湘萍 莫柏立 梁静娟

(广西大学工业测试实验中心, 南宁 530004)

摘要 细菌 *Bacillus* sp. 2 粗酶液通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离、Q Sepharose FF、Sephadex G-100(I)、Hydroxyapatite 和 Sephadex G-100(II) 柱层析分离, 纯化了一种以 NADPH 为辅酶的 3-脱氧葡萄糖醛酮 (3-DG) 代谢酶, 定性为 2-羰基醛还原酶。纯化酶的比活力为 63.75 U/mg, 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上显示一条蛋白质带。该酶分子质量约为 32 ku, 酶反应最适 pH 约为 6.2, 在 pH 5~8, 温度 25~30℃ 之间酶保持稳定; 该酶对 3-DG 的 K_m 为 2.3 mmol/L。添加适量的 EDTA、巯基乙醇或二硫苏糖醇能明显提高酶的活性; 而碘乙酸、N-乙基顺丁烯二酰亚胺抑制酶的活性。

关键词 美拉德反应, 3-脱氧葡萄糖醛酮, 细菌, 还原酶, 纯化, 性质

学科分类号 Q554.2

3-脱氧葡萄糖醛酮 (简称 3-DG) 是美拉德反应的主要中间产物之一, 其代谢酶中的 2-羰基醛还原酶已被证实能在体外抑制美拉德反应的高级阶段^[1]。国外已有报道, 动植物体内存在抑制美拉德反应的代谢酶, Kato 等^[1~3] 在猪肝、鸡肝和欧芹中找到了对 3-DG 具有还原作用的酶, 但在微生物方面, 国内外均未见报道。我们已从细菌中筛选到对 3-DG 有强还原活性的菌株 *Bacillus* sp. 2^[4], 现进一步把其中主要的 3-DG 代谢酶分离纯化出来, 鉴定其生化特性。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 *Bacillus* sp. 2 由本课题组筛选而得。3-DG 按日本 Kato 等的方法制备。NADPH 为 Sigma 公司产品, Q Sepharose FF 为 Pharmacia 原装柱, Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品, Hydroxyapatite 为 BIO-RAD 产品, TEMED 为 SERVA 产

品, 考马斯亮蓝 R-250 为 Fluka 进口分装产品, Arc、Bis、SDS、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ 为华美公司进口分装产品, 低分子量标准蛋白为上海丽珠东风生物技术有限公司产品, 牛血清白蛋白 (电泳单点纯) 为上海长阳生化制药厂产品。其余均为国产分析纯试剂。LC-10AT 液相层析系统为岛津公司产品。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定: 酶活力测定参考文献 [3]。1 活力单位 (U) 定义为此测定条件下每分钟减少 1 μmol NADPH 所需的酶量。

1.2.2 蛋白质测定: 用 280 nm 下的吸光值跟踪柱层析流出的蛋白质峰。蛋白质的浓度参考 Lowry 法^[5]测定, 以牛血清白蛋白为标准制作标准曲线。

1.2.3 分子质量的测定: 采用电泳法和分子筛两种方法进行测定。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参考

* 国家自然科学基金 (29466012) 和广西科学基金资助项目。

Tel: (0771) 3233258, E-mail: xiangp@gxu.edu.cn

收稿日期: 1999-02-05, 修回日期: 1999-08-16