

研究报告

hEPO cDNA 重组逆转录病毒的构建*

瞿成奎 魏汉东 贺福初¹⁾ 王立生 吴祖泽

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 通过 DNA 重组技术, 将不含非编码区的 hEPO cDNA 片段重组到逆转录病毒质粒 pLXSN, pLNCX 中. 重组质粒转染 PA317 细胞后, 经 G418 筛选, 抗性克隆细胞培养上清能成功地感染 NIH3T3 细胞, 使之在筛选培养基中形成典型的 G418 抗性克隆, 该克隆细胞染色体中成功地整合了 EPO cDNA, 并且表达出有生物学活性的红细胞生成素 (EPO) 产物.

关键词 红细胞生成素, 重组逆转录病毒载体, 基因转移

逆转录病毒介导的基因转移是 80 年代才发展起来的一种高效基因转移技术^[1,2], 它是借助逆转录病毒 DNA 载体与外源基因重组后, 经包装细胞系包装, 产生缺陷性重组逆转录病毒, 该病毒可以成功地感染靶细胞, 将外源基因整合于靶细胞染色体基因组中, 并得到表达. 这种基因转移技术是进行基因治疗、细胞增殖、分化、死亡、癌变等调控研究的基础之一.

红细胞生成素 (EPO) 是造血生长因子中特异刺激红系祖细胞向功能成熟的红细胞增殖、分化的一种, 重组 EPO 应用于临床治疗慢性肾性贫血已取得确切、可喜的疗效^[3,4]. 无论是进行 EPO 基因治疗还是进行其对造血干细胞增殖、分化调控的研究, 构建重组的 EPO 逆转录病毒载体是其前提.

本文利用 DNA 重组技术, 将 hEPO cDNA 重组到逆转录病毒载体 pLXSN, pLNCX 中, 经 PA317 细胞包装后, 成功地构建了产缺陷性重组逆转录病毒的细胞株.

1 材料与方法

1.1 材料

DNA 限制性内切酶, Taq 酶, T4 连接酶

购自华美生物工程公司, DMEM 培养基, G418 购自美国 GIBCO 公司; 聚凝胺 (polybrene) 购自 Sigma 公司. pUC19-EPO 质粒 (其中含 EPO 全长 cDNA 片段), 逆转录病毒质粒 pLXSN, pLNCX, PA317 细胞均由美国加州大学 Qian-jing Hu 博士赠送; 大肠杆菌 HB101, COS7 细胞系本室保存.

1.2 hEPO cDNA 重组逆转录病毒质粒的构建

设计并人工合成一对 hEPO cDNA 特异引物 (引物 1; 引物 2), 在其 5' 端分别掺入 EcoR I、Hind III 与 BamH I、Cla I 酶切位点. 以 pUC19-EPO 质粒为模板, 进行 PCR, 扩增条件为 94℃ 变性 1 min, 65℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 2 min. 扩增产物分别用 EcoR I、BamH I 及 Hind III、Cla I 两套双酶切, 经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 650 bp DNA 片段, 二者分别与经相应双酶切、回收的 6.0 kb、6.6 kb 的 pLXSN、pLNCX 载体以 3 mol:1 mol 连接、转化感受态大肠杆菌 HB101 后, 快提转化子质粒 DNA, 根据分子量大小及相应双酶切图谱鉴定阳性重组子.

* 国家自然科学基金资助课题.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1995-03-15, 修回日期: 1995-09-22

1.3 重组质粒在 COS-7 细胞中的瞬时表达

大量提取制备重组逆转录病毒质粒, 经 CsCl 超离心纯化后, 以常规磷酸钙 DNA 共沉淀法^[5]转染 COS-7 细胞, 72 h 后, 收集细胞培养上清液, 检测 EPO 生物学活性^[6]。

1.4 重组载体包装及包装细胞克隆

按上述方法, 将重组质粒转染病毒包装细胞 PA317, 转染后 48 h, 消化, 1:100 稀释、分散, 培养 24 h 后, 以 600 mg/L G418 进行筛选。二周后, 挑取单克隆细胞, 转入 24 孔培养板培养, 经扩增后, 转入 $\Phi 6$ cm 培养皿培养。

1.5 重组逆转录病毒滴度的测定

NIH 3T3 细胞以每 6 cm 平皿接种 5×10^5 细胞, 接种后 24 h, 加入产病毒细胞培养上清及 polybrene 4 mg/L, 继续培养 24 h 后, 以 1:50 比例胰酶消化、分散, 培养 24 h, 再加入 300 mg/L G418 筛选二周后, 经甲醇固定, Giemsa 染液染色, 计抗性细胞克隆数, 并计数病毒滴度, 以克隆形成单位 (集落数) 表示 (CFU/ml)。同时消化、混合培养抗性克隆细胞, 5×10^5 细胞接种 6 cm 平皿, 培养 48 h 后, 收集培养上清, 测定 EPO 生物学活性^[7]。

1.6 工程细胞外源基因整合的鉴定

按文献 [8] 进行培养细胞染色体 DNA 的提取, 并以此 DNA 为模板, hEPO cDNA 为特异引物, 进行 PCR 扩增, 条件同前述, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.7 表达产物生物学活性检测

收集基因转移的 G418 抗性细胞培养上清, 以小鼠骨髓有核细胞体外集落培养技术 (CFU-E, BFU-E) 测定 hEPO 生物学活性^[6]。

2 结果与讨论

2.1 hEPO cDNA 重组逆转录病毒质粒的构建

以 pUC19-EPO 为模板, 所得的 hEPO cDNA 扩增产物经酶切、回收后分别与逆转录病毒载体 pLXSN, pLNCX 进行连接, 分别得阳性重组质粒 pLEPOSN10 和 pLNCEPO-11, 二组重组质粒经 EcoR I、BamH I 与 Hind III、Cla I 双酶切后, 均可切下 650 bp 特异的 EPO

cDNA 片段, 表明重组质粒构建正确 (图 1)。

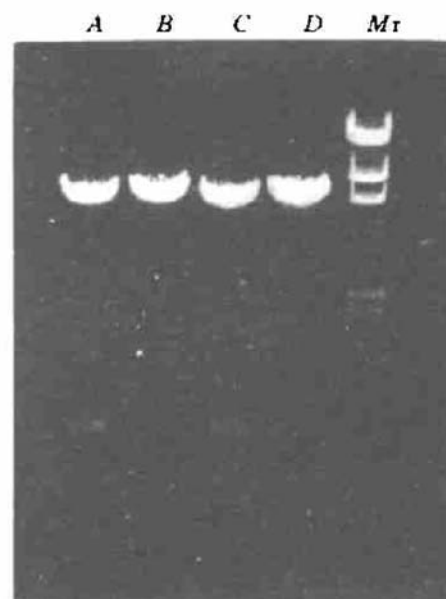


图 1 重组质粒 pLEPOSN10, pLNCEPO11 双酶切图谱

A: pLNCEPO11/Cla I、Hind III; B: pLNCX/Cla I、Hind III; C: pLEPOSN10/EcoR I、BamH I; D: pLXSN/EcoR I、BamH I; Mr: λ DNA/Hind III 分子量标准。

2.2 重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

为了进一步验证重组质粒是否能表达出有生物活性的 hEPO 和在此基础上筛选出更适合 hEPO cDNA 表达的重组质粒, 将二组重组质粒转染 COS-7 细胞, 其培养上清均可刺激小鼠骨髓细胞在体外形成爆增型红系集落 (BFU-E), 表明重组质粒构建正确, 且能表达出有生物学活性的 EPO 产物。结果还表明, 当以 pLXSN 为载体时, EPO cDNA 表达效率远较以 pLNCX 为载体时高 (表 1), 这可能与二者重组质粒中启动 EPO cDNA 表达的启动

表 1 COS-7 细胞中不同重组质粒的 EPO 表达效率

质粒组	BFU-E 数/皿
COS-7	2.5 $\pm$ 1.9
COS-7/pLXSN	7.8 $\pm$ 2.9
COS-7/pLEPOSN10	24.0 $\pm$ 4.2
COS-7/pLNCX	6.2 $\pm$ 2.4
COS-7/pLNCEPO11	10.5 $\pm$ 3.5

子效率不同有关,前者启动子为 LTR 启动子,后者为 CMV 启动子. 随后的研究我们将以此重组质粒为主进行产病毒细胞的构建.

2.3 重组病毒分泌细胞株的构建及滴度测定

上述两种重组逆转录病毒质粒及其对应阴性对照质粒转染病毒包装细胞 PA317 后, 出现大量 G418 抗性细胞克隆, 单个克隆经扩增培养, 收集培养上清, 以 NIH3T3 细胞为靶细胞进行模拟感染试验, 各组均出现 G418 抗性的阳性克隆, 各产病毒细胞克隆的产病毒滴度不同, pLEPOSN10 组滴度最高为 1.3×10^4 CFU/ml, pLXSN 组滴度最高为 1.14×10^4 CFU/ml. 此结果表明重组质粒转染 PA317 细胞后, 该细胞内产生的外壳蛋白、核心蛋白与逆转录酶的组装, 能产生具有感染靶细胞能力并能介导 EPO 基因转移的重组逆转录病毒.

3T3 细胞经逆转录病毒感染后产生的 G418 抗性克隆扩增培养后, 按相同的方法收集其培养上清再进行 3T3 细胞的感染, 未能形成任何 G418 抗性克隆, 表明其辅助病毒的产生为阴性.

2.4 包装细胞及靶细胞 hEPO 基因整合表达

为进一步鉴定 hEPO cDNA 是否在感染后的靶细胞染色体基因组中有整合, 通过提取各组细胞染色体 DNA, 进行 hEPO cDNA 的特异 PCR, 结果表明 PA317/pLEPOSN10, PA317/pLNCEPO11, 3T3/pLEPOSN10 组均能扩增出特异的 hEPO cDNA 片段 (图 2), 表明 hEPO cDNA 已成功地整合到感染后的靶细胞及产病毒细胞的基因组中.

随后对感染后靶细胞的表达产物进行了生物学活性鉴定. 结果表明, 培养上清中具有明显的 EPO 生物学活性, 提示 hEPO 已成功地感染后的靶细胞中获得表达.

目前该重组逆转录病毒对原代培养的大鼠皮肤成纤维细胞、肌肉母细胞、骨髓成纤维细胞的感染均获成功, 且介导了 EPO cDNA 的转移与表达 (另文发表).

综上所述, 我们成功地构建了产 hEPO cDNA 重组逆转录病毒的细胞株, 该重组逆转

录病毒成功地感染了靶细胞, 并介导了 hEPO cDNA 的转移与表达. 此研究为后续 hEPO 基因治疗实验研究及相关的理论研究奠定了基础.

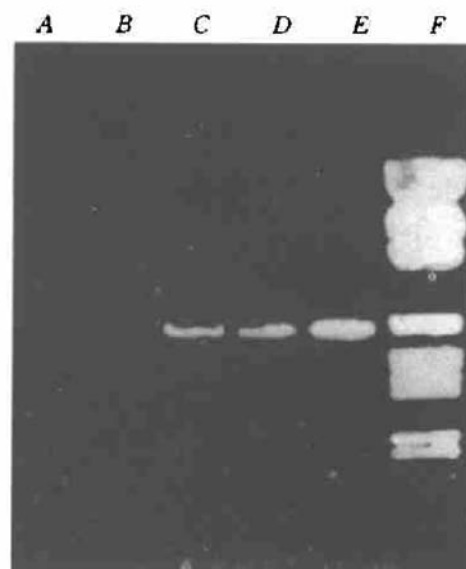


图 2 产病毒细胞与感染后靶细胞染色体中 EPO cDNA 整合鉴定

A: PA317/PLXSN; B: 3T3 细胞;
C: PA317/pLEPOSN10; D: PA317/pLNCEPO11; E: 3T3/pLEPOSN10;
F: DNA 分子量标准.

参 考 文 献

- 1 Mann R, Mulligan R C, Baltimore D. Cell, 1983; 33: 153
- 2 Miller A D, Buttimore C. Mol Cell Biol, 1986; 6: 2895
- 3 Urabe A. Int J Cell Clon, 1988; 6: 179
- 4 Mohini R. Semin Nephrol, 1989; 9 (suppl 1): 16
- 5 Luthman H, Magnusson G. Nucleic Acids Res, 1983; 11: 1295
- 6 吴祖泽. 造血干细胞移植基础, 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1988; 86
- 7 Miller A D, Rosman G J. Biotechniques, 1989; 7: 980
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 9: 16

Construction of hEPO cDNA Recombinant Retrovirus. Qu Chengkui, Wei Handong, He Fuchu, Wang Lisheng, Wu Zuze (Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China).

Abstract hEPO cDNA without non-coding region was recombined with retrovirus vector pLXSN, pLNCX through DNA recombinant

techniques. After these two recombinant plasmids were transfected the retrovirus packaging cell line PA317, G418 resistant clones could produce defective EPO cDNA recombinant retrovirus successfully which could infect NIH 3T3 target cells and make them form typical resistant

clones in G418 selective medium. Moreover, in the genome of these infected target cells, hEPO cDNA was successfully integrated and expressed.

Key words hEPO, recombinant retrovirus, gene transfer

热休克对家蚕幼虫抗氧化酶活性的影响*

杨唐斌¹⁾ 梅尚筠²⁾

(华中师范大学生物系, 武汉 430070)

摘要 热休克诱导各龄蚕组织中的 SOD、CAT 活性显著升高, 如 40℃ 诱导活性最高, CuZn-SOD 和 MnSOD 活性也都增加. 40℃ 诱导 GSH-Px 活性显著升高, 而 36℃ 热休克诱导 GSH-Px 活性降低. 幼蚕各部位的抗氧化酶活性存在很大的差异, 以胸腹部最高, 头部次之, 后丝腺最低. 热休克对抗氧化酶活性的影响, 与幼蚕的生理状态相适应. 通过 SOD、CAT、GSH-Px 协同作用, 有助于维持机体正常生理机能.

关键词 抗氧化酶, 热休克应答, 家蚕

热休克应答 (heat shock response) 是有机体所具有的许多内源保护体系的一种, 能保护体内自身的平衡, 保护细胞免受应激环境变化造成的损伤. 热休克诱导 SOD 活性增加, 可能是受细胞中自由基水平升高的影响^[1]. 抗氧化酶包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px), 它们在体内共同发挥作用能有效地消除超氧自由基 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2) 和脂质过氧化物. 我们曾观察到热休克诱导小白鼠各组织中抗氧化酶活性增加, 其特点是协同调节^[2], 家蚕也呈现明显的热休克应答^[3]. 本实验进一步研究了热休克对不同龄期家蚕幼虫抗氧化酶的影响.

1 材料和方法

1.1 实验动物

杂交种家蚕 (朝霞蚕 × 黄鹤蚕) 第一龄、第二龄、第三龄、第四龄和第五龄幼虫 (湖北省农业科学院蚕种场提供).

1.2 家蚕幼虫的热休克

将蜕皮后 3 d 的不同龄蚕在不同温度下进行热休克, 36℃、40℃ 处理 1 h 作为实验组, 对照组保持温度 25℃.

1.3 组织酶液的提取

除去幼蚕的消化道, 用 4℃ 预冷的生理盐水 (含 1 mmol/L 葡萄糖) 清洗, 滤纸吸干水分, 称量, 于 10 倍体积制样液 (pH 6.5, 0.05 mol/L 磷酸钾缓冲液含 10 mol/L EDTA 和 0.04% 苯基硫脲) 匀浆, 4℃ 14 000 g 离心 45 min, 取上清液作酶活性分析.

1.4 酶活性测定

用 NBT 光化学还原法测定总 SOD 活性^[4]; 50 μ mol/L、2 mmol/L KCN 能部分或完全抑制 CuZn-SOD 的活性, 而对 MnSOD 活性无影响, 按 Geller 等^[5]的方法测 CuZn-SOD 和 MnSOD 的活性, 直接光谱法测 GSH-Px

* 国家自然科学基金资助项目.

¹⁾ 北京航天医学工程研究所.

²⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1995-04-07, 修回日期: 1995-09-04