

人转化生长因子 β 3、结缔组织生长因子和基质金属蛋白酶抑制剂1基因重组慢病毒多表达质粒的构建及活性检测*^{*}

江峰, 岳斌, 马学晓, 张国庆, 胡有谷, 陈伯华

Construction and detection of lentiviral plasmids containing human transforming growth factor beta 3, connective tissue growth factor and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 gene

Jiang Feng, Yue Bin, Ma Xue-xiao, Zhang Guo-qing, Hu You-gu, Chen Bo-hua

Abstract

BACKGROUND: The former tests showed that multi-gene co-expression system mediated by virus can significantly improve the transgenic curative effect of intervertebral disc degeneration.

OBJECTIVE: To construct the recombinant plasmid of lentivirus containing human transforming growth factor beta 3 (TGF β 3), connective tissue growth factor (CTGF) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1).

METHODS: 2A self-cleaving sequences were used to ligate the cDNA of TGF β 3, CTGF, TIMP1 in a single open reading frame derived from plasmid of lentivirus in order to obtain the recombinant lentiviral plasmid Lenti-TGF β 3-P2A-CTGF-T2A-TIMP1.

RT-PCR and Western-blot were used to detect mRNA and protein expressions of TGF β 3, CTGF, TIMP1 in different times after transfection.

RESULTS AND CONCLUSION: RT-PCR and Western-blot detection shows that the mRNA and protein expressions of TGF β 3, CTGF, TIMP1 were detected in transfected 293 cells, the protein expressions reached peak value at 48 hours after transfection, and the protein level of downstream gene was about 80% of upstream gene. The recombinant plasmid, Lenti-TGF β 3-P2A-CTGF-T2A-TIMP1, is constructed successfully, providing a basic model for the packaging of virus and further study on therapy of intervertebral disc degeneration.

Jiang F, Yue B, Ma XX, Zhang GQ, Hu YG, Chen BH. Construction and detection of lentiviral plasmids containing human transforming growth factor beta 3, connective tissue growth factor and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(4): 699-703. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 前期试验显示单个病毒载体介导的多基因共表达系统能够显著提高椎间盘退变转基因疗效。

目的: 构建人转化生长因子 β 3、结缔组织生长因子和基质金属蛋白酶抑制剂1基因重组慢病毒多表达质粒。

方法: 应用全基因合成技术,以“自剪切多肽2A”串联目的基因,并克隆到慢病毒表达质粒构建重组慢病毒质粒Lenti-TGF- β 3-P2A-CTGF-T2A-TIMP1。转染293细胞后,应用RT-PCR和Western-Blot技术分别检测转染后不同时间点目的基因mRNA和蛋白质表达水平。

结果与结论: RT-PCR和Western-blot技术检测结果显示重组质粒成功表达了3种目的基因,并于转染后48h左右达到峰值,“2A”结构下游基因蛋白质表达量约为上游基因的80%。说明成功构建了携带人转化生长因子 β 3、结缔组织生长因子和基质金属蛋白酶抑制剂1基因的慢病毒多表达质粒。

关键词: 转化生长因子 β 3; 结缔组织生长因子; 基质金属蛋白酶抑制剂1; 慢病毒; 293细胞; 基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.04.030

江峰, 岳斌, 马学晓, 张国庆, 胡有谷, 陈伯华. 人转化生长因子 β 3、结缔组织生长因子和基质金属蛋白酶抑制剂1基因重组慢病毒多表达质粒的构建及活性检测[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(4):699-703. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Spine Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Jiang Feng^{*}, Studying for master's degree, Department of Spine Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China iamjiangf@163.com

Correspondence to: Chen Bo-hua, Chief physician, Department of Spine Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China 266003 bhchen@hotmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81171758^{*}

Received: 2011-09-24 Accepted: 2011-10-28

0 引言

随着医疗技术和人们生活质量要求的提高,对于椎间盘退变的研究已深入基因水平,应用转基因手段从根本上延缓甚至逆转椎间盘的退变过程也成为研究的焦点^[1]。课题组近年来致力于腰椎间盘退变基因治疗的研究,对转化生长因子 β 3(transforming growth factor- β 3, TGF- β 3)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和基质金属蛋白酶抑制剂1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1,

TIMP-1)等基因延缓椎间盘退变过程进行了较为深入的研究,并取得了一定的成果,对腺病毒和腺相关病毒转基因载体也获得了较为全面的认识。2007年成功构建了腺相关病毒介导的人CTGF和TIMP-1双基因共表达质粒,并最终在动物实验中获得成功^[2]。研究显示,多个相关基因共表达干预椎间盘退变过程较单基因干预收益更多,与国内外的报道达成共识^[3]。

本实验在前期研究成果的基础上,尝试以“自剪切多肽2A”为串联工具,以慢病毒为载体构建携带人TGF- β 3、CTGF和TIMP-1基因的多顺反子,见图1,转染293细胞后检测活性和

青岛大学医学院附属医院脊柱外科, 山东省青岛市266003

江峰★, 男, 1984年生, 山东省文登市人, 汉族, 青岛大学医学院附属医院在读硕士, 主要从事脊柱外科研究。
iamjiangf@163.com

通讯作者: 陈伯华, 主任医师, 青岛大学医学院附属医院脊柱外科, 山东省青岛市266003
bhchen@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)04-00699-05

收稿日期: 2011-09-24
修回日期: 2011-10-28
(20110928016/GW-G)

探讨其作用特点, 旨在构建多基因共表达质粒模型, 为进一步的病毒转染和动物实验打基础, 推动椎间盘退变基因治疗方案的发展, 同时对慢病毒载体和“2A”结构的作用规律进行探讨。

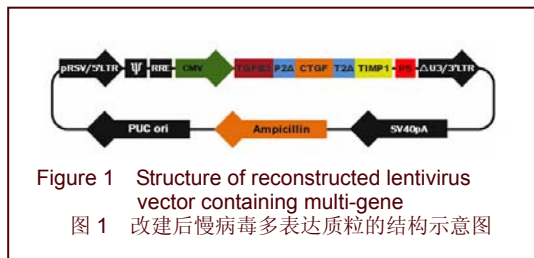


Figure 1 Structure of reconstructed lentivirus vector containing multi-gene
图1 改建后慢病毒多表达质粒的结构示意图

1 材料和方法

设计: 单一样本观察实验。

时间及地点: 于2010-10/2011-10在青岛大学医学院附属医院痛风实验室完成。

材料: 慢病毒多表达质粒由中美泰和生物技术有限公司协助构建。293细胞为本实验室冻存。

试剂: 体积分数10%胎牛血清购于HyClone公司; Lipofect转染试剂购于天根生化科技公司; RNA引物由中美泰和公司合成; 一抗、二抗购于北京博奥森公司。其余试剂及仪器由本院实验室提供。

实验方法:

慢病毒多表达质粒的构建及与鉴定: 从NCBI的基因库中搜索目的基因的cDNA序列, 根据慢病毒表达系统的要求对cDNA序列进行优化, 设计TGF-β3-P2A-CTGF-T2A-TIMP-1全序列。由中美泰和生物技术(北京)有限公司进行全基因合成并测序验证完全正确后, 将合成的目的序列克隆到慢病毒表达质粒中, 重组质粒转化至Ecoli DH5a, 涂板、挑阳性克隆后摇菌, 质粒大量提取制备超纯质粒, 准备下一步细胞转染。

293细胞的培养及转染: 将本实验室冻存的293细胞复苏, 用含体积分数10%胎牛血清和100 U/mL双抗的DMEM培养基培养293细胞, 置于二氧化碳温箱37 °C培养。细胞融合至80%时传代, 转染前至少传代两次。

采用6孔板, 把吹打均匀的细胞悬液计数后按照每孔2×10⁵密度接种, 第2天达80%融合时进行重组质粒转染。转染前2 h更换不含双抗的培养基, 每孔为500 μL。准备重组质粒、转染试剂和稀释剂并升至室温。每孔备重组质粒4 μL, 应用无蛋白培养基稀释至200 μL; Lipofect转染试剂12 μL, 应用无蛋白培养基稀

释至200 μL。边轻旋装有重组质粒溶液的试管, 边将稀释的Lipofect试剂滴加至试管中。向每个孔中加入质粒-转染试剂复合物后继续培养。相同方法转染携带绿色荧光蛋白GFP基因的空载体质粒作为对照组, 同时建立PBS对照组。

RT-PCR检测目的基因的mRNA水平: 应用RT-PCR技术分别检测转染后12, 24, 36, 48, 72, 96 h各组样品(每组/时间点检测6份样品)目的基因的mRNA的表达水平, 同时检测β-Actin基因的mRNA水平以校正误差。操作流程: ①应用DNAMAN软件设计并由中美泰和公司合成引物, 合成各引物序列见表1。②采用TIANGEN产RNA提取试剂盒离心柱型提取各样本总RNA。③按以下方案配置反转录反应液: 5×RT Buffer 2 μL, dNTP Mixture 1 μL, Random 6 mers 1 μL, RNase Inhibitor 0.5 μL, PrimerScript™ RTase 0.5 μL, Template RNA 1 μL, 加RNase Free DH₂O稀释至10 μL。在PCR仪上进行反转录反应, 反应条件: 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 95 °C 5 min。获得模板CDNA。按以下方案配制PCR反应液: 10×PCR Buffer II 5 μL, dNTP Mixture 2 μL, Primer-F 0.5 μL, Primer-R 0.5 μL, TaKaRaExTaq™ HS 0.5 μL, Template CDNA 2.5 μL, 加RNase Free dH₂O稀释至50 μL。PCR反应条件: 94 °C 2 min, 一个循环; 94 °C 40 s, 50~65 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 10 min, 一个循环。④PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 成像并保存结果。

表1 PCR引物序列
Table 1 PCR primer sequence

mRNA	Primer sequences (5'-3')	Size (bp)
Transforming growth factor beta 3	S-TAC TAT GCC AAC	522
	TTC TGC TC	
	AS-AAC TTA CCA TCC CTT TCC TC	
Connective tissue growth factor	S-GGC AAA AAG TGC	436
	ATC CGT ACT C	
	AS-ATC GGC CGT CGG TAC ATA CTC	
Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	S-GCT TCT GGC ATC	349
	CTG TTG TTG	
	AS-CTT CTG GTG TCC CCA CGA ACT	
β-Actin	S-TGGA GAA GAT TTG	198
	GCA CC	
	AS-TAC GAC CAG AGG CAT ACA	

Western-Blot检测目的基因蛋白质表达水平: 于转染后48 h对各组样品(每组检测6份样品)中目的基因的蛋白表达水平进行Western-Blot检测。

操作流程如下: 每份样品取10⁷细胞, PBS

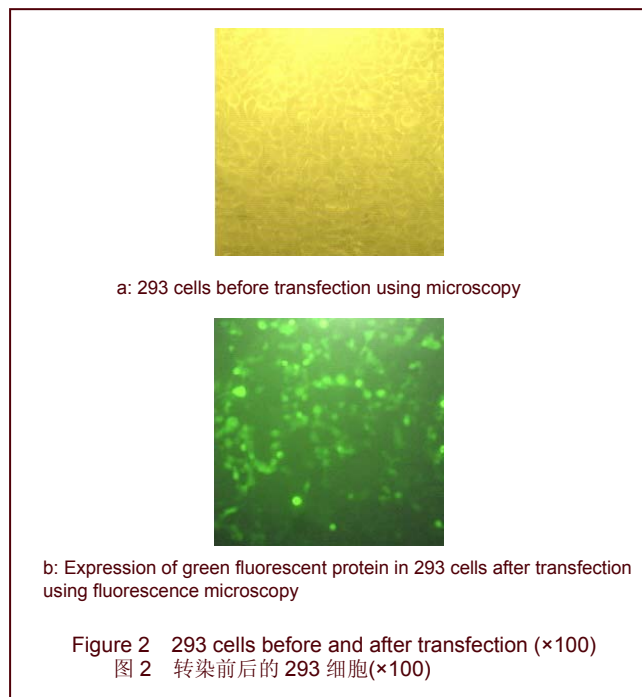
清洗, 去PBS后加入1 mL TIANGEN产含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂抽提总蛋白。按照蛋白质定量试剂盒操作说明操作, 测定样品浓度。应用SDS-PAGE, 将准备好的样品液和预染蛋白marker分别上样, 加进相应孔中, 电泳分离蛋白。将蛋白质转移到PVDF膜, 按蛋白转移装置说明组装滤纸凝胶纤维素夹层, 30 mA恒流条件下, 4 °C转移过夜。膜在5%脱脂奶粉溶液中室温孵育1 h以封闭膜上的非特异结合。封闭过的膜加入一抗室温孵育1.5 h, 完成抗原抗体结合。加入HRP标记的二抗以结合一抗, 同时加入HRP标记的β-Actin抗体同时检测β-Actin含量, 室温孵育膜1 h。膜与化学发光底物孵育后显影照相。

主要观察指标: 转染后48 h 293细胞TGF-β3、CTGF和TIMP-1基因蛋白质的表达情况。

数据整理和统计学分析: 应用凝胶定量软件Quantity One4.6.2测量各特异性条带的灰度值, 除以内参β-Actin的灰度值以校正误差, 所得结果代表该mRNA或蛋白质的相对表达量。并应用SPSS 13.0统计软件对各组数据进行统计学分析。组间比较采用t 检验, P < 0.05为差异有显著性意义。

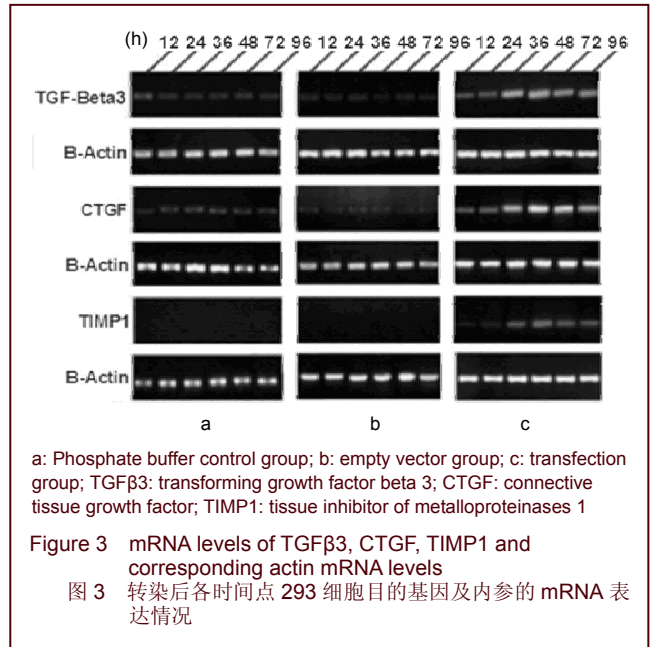
2 结果

2.1 质粒转染 质粒转染前对293细胞进行明视野显微镜观察, 见图2a, 显示细胞长势良好, 融合率约为80%, 符合转染条件。转染后48 h在荧光显微镜下观察到空质粒对照组细胞有大量绿色荧光蛋白表达, 见图2b, 说明质粒转染成功。

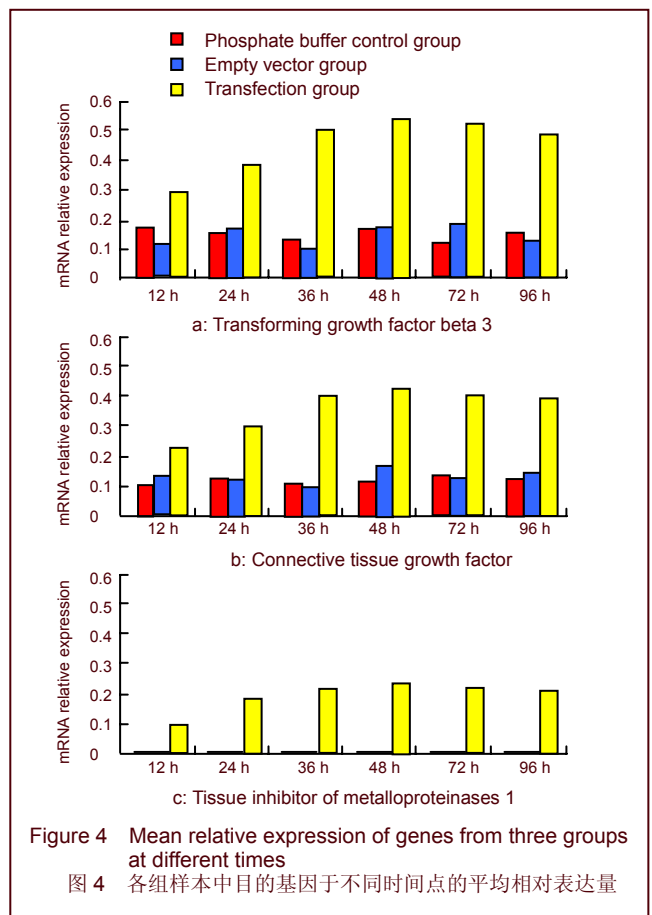


2.2 RT-PCR检测结果 PBS对照组、空载体对照组和

实验组于转染后各时间点均检测到TGF-β3和CTGF基因mRNA的表达。实验组于转染后各时间点均检测到TIMP-1基因mRNA的表达, 而PBS对照组和空载体对照组未检出, 见图3。说明重组慢病毒质粒成功地表达了携带的TIMP-1基因。



以各样本目的基因特异性条带灰度值比较相应β-Actin灰度值得到其相对表达量, 见图4。



统计学分析显示, PBS对照组总样本的TGF-β3和CTGF基因mRNA表达量与空载体对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 而实验组的表达量高于前两组($P < 0.05$)。说明重组慢病毒质粒能够表达携带的TGF-β3和CTGF基因。

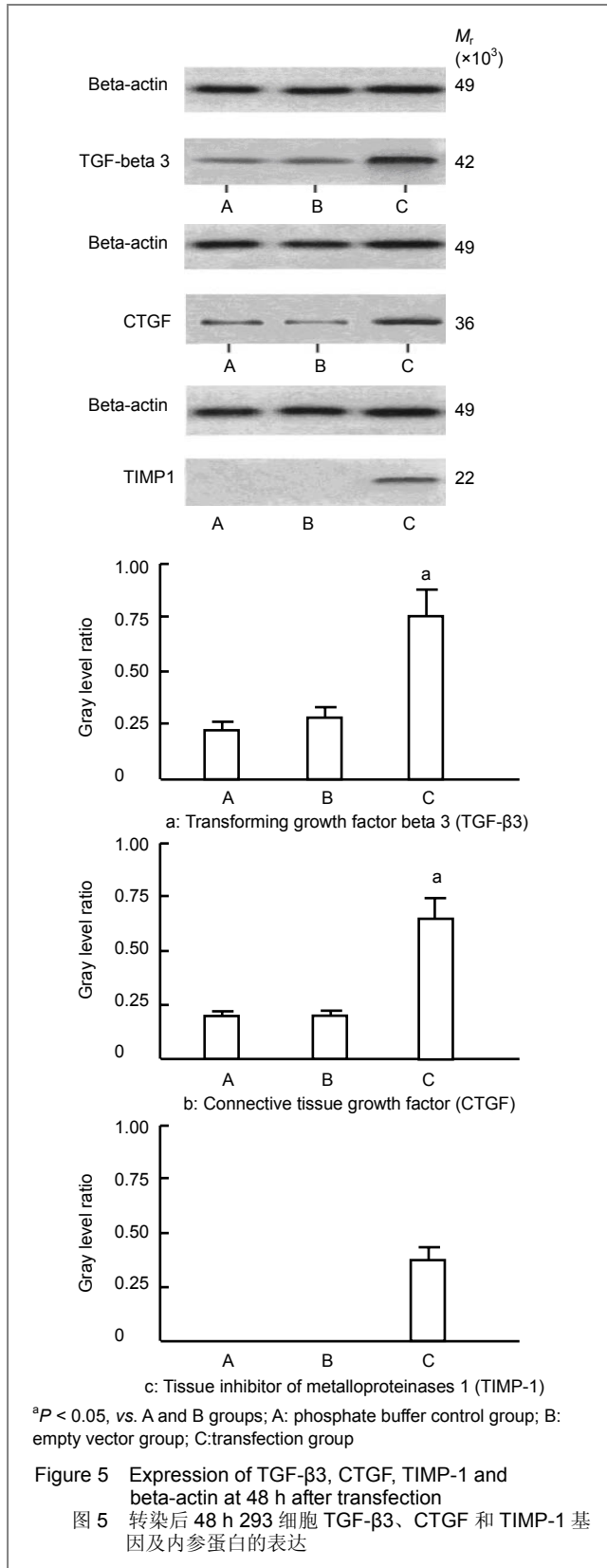
2.3 Western-Blot检测结果 见图5。

各组样本于转染后48 h均检测到TGF-β3和CTGF基因蛋白质的表达。实验组于转染后48 h检测到TIMP-1基因蛋白质表达, 而PBS对照组和空载体对照组未检出, 见图5上。说明实验组成功地翻译了重组慢病毒质粒携带的TIMP-1基因。以各样目的基因特异性条带灰度值比较相应β-Actin灰度值得到其相对表达量。统计学分析显示, 见图5理, PBS对照组总样本的TGF-β3和CTGF基因蛋白质表达量与空载体对照组比较无差别($P > 0.05$), 而实验组的表达量高于前两组($P < 0.05$)。说明实验组能够翻译重组质粒携带的TGF-β3和CTGF基因。

3 讨论

前期实验和国内外研究表明, 单个病毒载体介导的多基因共表达系统能够显著提高转基因疗效。而慢病毒系统由于其自身优点, 逐渐成为构建多顺反子的常用载体之一。例如, 近年来较为关注的诱导多能干细胞(iPS)技术在慢病毒载体的协助下得到快速发展^[4], 学者们应用慢病毒载体携带4种转化因子基因(总计约5 kb), 成功诱导了多种分化型鼠和人体细胞向多能性发生转化。Fang等^[5]在慢病毒载体上同时表达了单克隆抗体DC101的重链和轻链, 实现了全长抗体在体内持续高效的合成, 取得了显著的抗肿瘤效果。基因治疗研究的发展提高了对慢病毒载量的要求。由于HIV1可有效包装约9.7 kb的基因组(野生型HIV1基因组为9.7 kb), 可以通过减少或转移慢病毒载体功能序列的长度来增加其有效载量。1999年Cui等^[6]通过去除SD, RRE等调节基因和gag的大部分序列, 构建了长度小于550 bp的空病毒载体, 并成功表达了约9 kb的外源基因, 但是这一优化方案却需要以牺牲病毒滴度为代价(约为野生型的一半)。而Kumar等^[7]设计了1.6~2.2 kb的空载体, 表达了约11.3 kb的外源基因并获得了较高的病毒滴度。因此, 在重建高载量慢病毒结构时, 应最大限度地去除非必需序列, 同时加入能有效提高病毒滴度或表达量的调节基因。

在构建慢病毒多表达载体时, 还必须根据实验要求选择有效的启动子和串联工具, 以确保各外源基因准确和高效地表达。为使单载体表达多种不同蛋白质, 以往通常采用多启动子或内部核糖体进入位点(IRES)串联目的基因。但这两种方法存在以下缺陷^[8-10]: ①病毒载体上多个启动子同时存在可引起基因组产生易变性。②启动子之间存在干扰作用。③IRES序列相对较长(585 bp), 增加了包装病毒颗粒的难度。④IRES上、下游基因表达量不平衡(下游基因表达量通常仅为上游基因的20%~50%)。相比之下, 近几年应用较多的“自剪切多肽2A”具有剪切效率高(85%~100%)^[11]、结构短小(18~22aa)、下游基因表达量高及多个2A结构间不存在干扰作用等特点^[12], 是在同一载体上构建多顺反子的理



想工具。Zoll等^[13]的研究显示,发生于2A结构区的“核糖体跳跃”机制,能够保证一次翻译事件中准确高效地产生多段独立的蛋白质结构。目前,2A多顺反子系统已被应用于各种病毒载体的构建。Szymczak等^[14]以反转录病毒为载体,利用3段2A结构实现了T细胞受体CD3蛋白复合体4个亚基的共表达,并检测到了CD3的生物学功能。Carey等^[15]应用3种2A结构串联4段外源基因,以慢病毒为载体成功诱导了体细胞向多能性发生转变。

本实验选择慢病毒载体构建多基因共表达质粒,采用单个高效启动子CMV,以自剪切多肽P2A和T2A串联目的基因。总长度约9 kb,小于野生型9.7 kb的长度,不影响病毒的包装和收获滴度,其中外源基因:TGF-β3-P2A-CTGF-T2A-TIMP-1长度约3 kb。为控制总长度,重组质粒中未加入绿色荧光蛋白基因GFP,其转染情况可通过空载体转染组间接反映。实验结果显示:重组质粒转染293细胞后,能够有效表达目的基因,并合成相应蛋白。从图4可以看出,实验组3种基因的mRNA表达水平自转染后开始上升,于转染后48 h左右达到峰值,达峰后维持较高表达水平,但有逐渐下降的趋势,其原因可能为部分外源DNA未能插入核内基因组而在细胞有丝分裂过程中稀释或降解。进一步加入氨苄西林(Ampicillin)筛选可获得稳定表达目的基因的细胞株。由图5可以看出,排除293细胞基础表达的影响,重组质粒“2A”结构下游基因蛋白质表达量约为上游基因表达量的80%,明显优于内部核糖体进入位点(IRES)下游基因的表达效率。

本实验成功构建了携带人TGF-β3、CTGF和TIMP1基因的慢病毒多表达质粒,并对其活性特点做了部分研究,为进一步的病毒包装并转染椎间盘髓核细胞和动物实验打下基础。

致谢:感谢青岛大学医学院附属医院痛风实验室及中心实验室的老师在实验期间给予指导,感谢研究生同学无私的帮助。

4 参考文献

[1] Hu YG. Beijing: Renmin Weisheng Chubanshe.2004.
胡有谷.腰椎间盘突出症[M].3版.北京:人民卫生出版社,2004.

- [2] Kong J, Hu Yg, Liu Y, et al. Zhonghua Guke Zazhi. 2010;20(3): 287-292.
孔杰,胡有谷,刘勇,等. rAAV2-CTGF和TIMP1双基因联合转染恒河猴退变腰椎间盘的生物学效应[J].中华骨科杂志,2010,30(3): 287-292.
- [3] Maherali N,Ahfeldt T,Rigamonti A,et al.A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells.Cell Stem Cell.2008;3: 340-345.
- [4] Bryce W. Carey, Styliani Markoulakia, Jacob Hannaa,et al.Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. PNAS. 2009, 106, 1, 157-162.
- [5] Fang J, Qian JJ, Yi S, et al.Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide.Nat Biotechnol.2005;10: 1038-1087.
- [6] Cui Y,Iwakuma T,Chang LJ.Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function.J Virol.1969; 73: 6171-6176.
- [7] Kumar M,Keller B,Makalou N,et al.Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors.Hum Gene Ther.2001;12: 1893-1905.
- [8] Mizuguchi H,Xu Z,Ishii Watabe A,et al.IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.Mol Ther.2000;1:376-382.
- [9] Henneche M,Kwissa M, Metzger K,et al. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs.Nucleic Acids Res.2001;29:3327-3334.
- [10] de Felipe P.Polycistronic viral vectors. Curr Gene Ther.2002;2: 355-378.
- [11] de Felipe P,Martin V,Cortes ML,et al.Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy.Gene Therapy.1999;6: 198-208.
- [12] de Felipe P, Luke GA, Hughes LE,et al. E unum pluribus: multiple proteins from a selfprocessing polyprotein. Trends Biotechnol. 2006;24(2):68-75.
- [13] Zoll J, van Kuppeveld FJ, Galama JM, et al. Genetic analysis of mengovirus protein 2A: its function in polyprotein processing and virus reproduction. J Gen Virol. 1998;79(Pt1):17-25.
- [14] Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y,et al.Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. Nat Biotechnol. 2004;22(5): 589-594.
- [15] Carey BW, Markoulakia S,Hannaa J,et al.Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector.Proc Natl Acad Sci U S A.2009;106(1):157-162.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金项目(81171758)。

作者贡献: 通讯作者进行实验设计,实验实施为第一作者,实验评估为第五作者,资料收集为第三作者,第二作者成文,第四作者审校,通讯作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文创新性: 在前期研究成果的基础上,尝试以“自剪切多肽 2A”为串联工具,以慢病毒为载体构建携带人 TGF-β3、CTGF 和 TIMP-1 基因的多顺反子,转染 293 细胞后检测活性和探讨其作用特点。