文章编号:1000-5404(2005)12-1197-04

论著

Delta1-IRES-EGFP双顺反子逆转录病毒表达载体的构建及鉴定

何 飞[1],谭颖徽[2],杨峥嵘[3] ([1]第四军医大学秦都口腔医院,西安 710032;[2]第三军医大学新桥医院口腔科,重庆 400037,[3]第三军医大学预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建并鉴定人Delta1和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因双顺反子逆转录病毒表达载体。**方法** 利用基因重组技术将人Delta1基因构建到含IRES-EGFP逆转录病毒载体中;电穿孔法将重组质粒pDelta1-IRES-EGFP分别转入单、双嗜性包装细胞GP+E86和PA317,嘌呤霉素(puromycin)筛选获得阳性表达克隆;"乒乓球"法提高病毒滴度;重组病毒感染NIH3T3细胞,流式细胞仪(FACS)及RT-PCR法分别检测细胞荧光和Delta1 mRNA表达变化;C2C12共培养实验检测蛋白的功能。**结果** 酶切、PCR鉴定及DNA测序证实逆转录病毒表达载体pDelta1-IRES-EGFP构建正确;经体外包装,获得最高滴度9.7×10^5 CFU/ml的重组病毒液;重组病毒液感染NIH3T3细胞,FACS检测部分细胞荧光强度显著提高;RT-PCR证实细胞内有外源基因Delta1表达;C2C12共培养实验证实外源蛋白Delta1可抑制C2C12细胞的分化。**结论** 逆转录病毒基因转移系统安全,效率较高,可获得外源基因长期、稳定的表达。

关键词: Delta;GFP;IRES;逆转录病毒;基因转移;基因表达

中图法分类号: R373; R394-33 **文献标识码:** A

Construction and identification of bicistronic retrovirus expression vector for Delta1 and EGFP gene coexpression

HE Fei[1], TAN Ying-hui[2], YANG Zheng-rong[3] ([1]Qindu Stomatology Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, [2]Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a bicistronic retrovirus expression vector to coexpress Delta1 and EGFP genes. **Methods** Delta1-IRES-EGFP bicistronic retrovirus vector was constructed by linking full-length Delta1 cDNA with IRES-EGFP retrovirus vector. Transfected with the retrovirus vector by electroporation, the ecotropic- and amphotropic-packaging cell lines GP+E86 and PA317 were selected by addition of puromycin. Positive cell clones were obtained and tested for the efficiency of the retroviral supernatants. Two positive cell clones with relatively highest titers were picked up and used for ping-pong amplification assay to improve the retroviral supernatants titer. At day 2 after transfection, GFP expression in NIH3T3 was detected by FACS, and Delta1 expression was determined by RT-PCR assay. Transfected or wild type NIH3T3 were co-cultured with myoblasts cell line C2C12 to test whether the exogenous Delta1 protein was functional or not. **Results** The bicistronic retrovirus expression vector coexpressing Delta1 and EGFP genes was successfully constructed and verified by PCR and DNA sequencing. A high-level expression of functional Delta protein was detected in transfected NIH3T3 cells. **Conclusion** Retrovirus is a safe, highly efficient gene transfer system.

Key words: Delta; GFP; IRES; retrovirus; gene transfer; gene expression

Notch信号途径是一种古老的进化保守性细胞间相互作用机制,在多细胞动物发育中起重要作用[1]。Delta蛋白是Notch的特异性配体之一,为一类膜受体结合蛋白,与相邻细胞表面Notch受体的胞外域相互作用后,可导致该受体活化,从而启动Notch信号转导[2]。研究表明,Notch-Delta信号在牙胚发育、牙髓损伤修复等过程中起重要作用,与成釉细胞、成牙本质细胞分化有关,被认为是牙胚发育细胞分化多样性的原因之一[3]。另外,目前已明确的与牙齿发育中细胞分化有关的生长因子如TGFβ、FGF、BMP等均可诱导Notch受、配体的表达[4]。

基金项目: 全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA165)
Supported by the Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (01MA165)

作者简介: 何 飞(1972-),女,黑龙江省兰西县人,博士研究生,医师,主要从事牙髓损伤修复方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65334646

通讯作者: 谭颖徽,电话:(023)68755632

收稿日期: 2004-04-15;**修回日期:** 2004-12-05

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一类存在于水母、水螅等腔肠动物体内的生物发光蛋白,当受到紫外或蓝光激发时,能发射绿色荧光。它是目前惟一能在异源细胞内表达后自发产生荧光的蛋白,近年来已成为生物化学和细胞生物学领域中最为广泛应用的标记性蛋白之一[5]。

为获得人 Delta1 和 EGFP 基因的共表达,本研究将人 Delta1 cDNA 序列与含 IRES-EGFP 序列的逆转录病毒载体相连,构建了双顺反子逆转录病毒表达载体 pDelta1-IRES-EGFP,进行体外包装,获得较高滴度的病毒液,从而为进一步的 Delta1 基因作用研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

逆转录病毒质粒载体 pBMN-IRES-EGFP 由葡萄牙 Leonor Parreira 和 Helia Neves 教授惠赠;含人全长 Delta1 cDNA 片段的 pCDNA3 质粒载体由美国 Spyros Artavanis-Tsakonas 教授惠赠;大肠杆菌 DH5α、PA317 细胞株、NIH3T3 细胞株由第三军医大学全军复合伤研究所保存;GP+E86 细胞株由第三军医大学分子遗传学教研室章波博士惠赠;肌母细胞株 C2C12 购于复旦大学遗传研究所。

1.2 Delta1-IRES-EGFP 逆转录病毒载体的构建和鉴定

逆转录病毒质粒载体 pBMN-IRES-EGFP 和含全长人 Delta1 cDNA 片段的 pCDNA3 质粒载体分别经限制性内切酶 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ消化,1%琼脂糖凝胶电泳后,PCR 片段回收试剂盒回收 Delta1 cDNA 片段与线性化的逆转录病毒载体片段,以 T4 DNA 连接酶 14 ℃连接过夜,取 5~10 μl 连接产物转化大肠杆菌 DH5α,挑选阳性转化菌落,扩增,提取重组质粒。限制性内切酶 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ双酶切,PCR、DNA 测序等方法鉴定重组子。

1.3 重组病毒生产细胞的制备

用电穿孔法分别将重组子转染单、双嗜包装细胞 GP+E86 和 PA317;4 μg/ml puromycin 筛选,获得阳性细胞克隆;选取荧光表达较强的病毒生产细胞 PA317 和 GP+E86 各 1 株,以 1∶1 的比例种植于培养瓶中,"乒乓球"法提高逆转录病毒的滴度,共培养 2 周,收集病毒上清,0.45 μm 微孔滤膜过滤,-70 ℃保存或用于病毒滴度测定。

1.4 病毒滴度的测定

将对数生长期 NIH3T3 细胞接种于 6 孔板中(1×10^5/孔),每孔加不同浓度的病毒上清及终浓度为 8 μg/ml 聚凝胺(polybrene)培养 12 h,按 1∶10 传代培养 48 h,筛选 2 周,克隆形成后甲醇固定,Giemsa 染色,计数克隆,按下列公式计算病毒滴度:CFU/ml = 克隆数/病毒体积(ml)×复制因子×接种率。

1.5 辅助病毒的检测

以重组病毒感染的 NIH3T3 细胞 DNA 为模板,扩增 PA317 包装蛋白(env)基因,上游引物:5′-ACCTGGAGAGTCACCAACC-3′;下游引物:5′-TACTTTGGAGAGGTCGTA-3′;产物电泳后以紫外透射仪观察,出现 411 bp 条带者为阳性。

1.6 FACS、RT-PCR 法检测 NIH3T3 细胞中绿色荧光及 Delta1mRNA 的表达

重组病毒感染、经药物初步筛选的 NIH3T3 及正常 NIH3T3 细胞分别以流式细胞仪检测绿色荧光表达情况,激发波长 475 nm,发射波长 490 nm。

提取重组病毒感染 NIH3T3 及正常 NIH3T3 细胞总 RNA,以此为模板,RT-PCR 法检测细胞中 Delta1 mRNA 的表达。上游引物:5′-ACCATGGCAGTCGGTGCGCGCT-3′;下游引物:5′-TTACAC-CTCAGTTGCTAGACGCA-3′。

1.7 Delta1 功能检测[6]

病毒感染及正常 NIH3T3 细胞分别以 1×10^5/孔的密度接种 6 孔板,细胞生长接近融合时,分别以 ^{60}Co 照射,抑制其增殖活性,继续培养 24 h;肌母细胞 C2C12 以 DAPI 标记后以 2×10^4/孔的密度种植于上述照射细胞上,IMDM+10% FBS 培养 24 h;更换为分化诱导培养基(IMDM+2% FBS+5% HS),诱导 2~3 d;倒置荧光显微镜下观察 C2C12 细胞形态有无变化,结束培养,免疫组化法检测 C2C12 细胞肌钙蛋白 T-Tropnion 的表达。(以单纯空载体感染 NIH3T3 细胞共培养实验及单纯正常 C2C12 细胞分化诱导实验为对照)。

2 结果

2.1 重组逆转录病毒表达载体 pDelta1-IRES-EGFP 的构建结果

重组载体 pDelta1-IRES-EGFP 经 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切,1%凝胶电泳,紫外透射仪上观察可见一条 2.17 kb 目的片段和约 12 kb 的载体片段,见图 1,与预期的结果相符,表明 Delta1 已被成功地插入到载体中;以 PCR 法检测到转化菌中有强 Delta1 的表达,初步证明获得构建正确重组质粒。进一步的序列测定表明,重组子中目的片段序列与报道的基因序列一致。

2.2 重组病毒生产细胞的筛选和病毒滴度的测定

重组逆转录病毒载体经电穿孔法转染入单、双嗜性包装细胞 GP+E86 和 PA317 后 24~48 h,即可在荧光显微镜下观察到绿色荧光表达,荧光强度不一(图 1)。

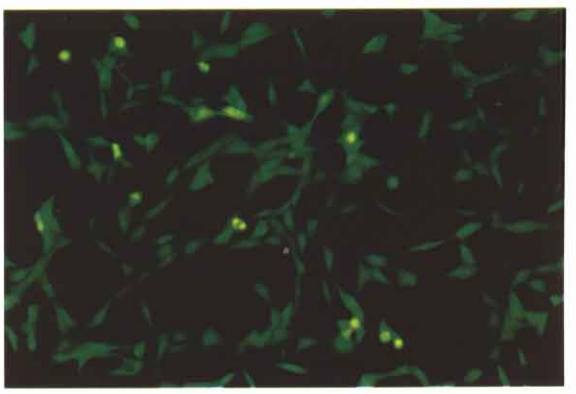


图 1 PA317 包装细胞基因转染后的绿色荧光表达
(倒置荧光显微镜×100)

Fig 1 EGFP expression in transfected PA317 packaging cells
(Fluorescence invert microscope×100)

重组子和空载体转染的 PA317 和 GP + E86 细胞抗性克隆形成，分别选择 5 个荧光表达较强的克隆进行扩增培养，收获病毒上清感染 NTH3T3 细胞，测定病毒滴度结果在 $(2 \sim 6) \times 10^4$ CFU/ml；各选择病毒滴度相对较高者进行联合培养，以“乒乓球”法提高病毒滴度后再次感染 NIH3T3 细胞，测定病毒滴度提高至 9.7×10^5/ml。

2.3　辅助病毒的检测

RT-PCR 方法鉴定重组病毒感染的 NIH3T3 中是否有 PA317 包装蛋白基因的存在，所得产物电泳未见 411 bp 的条带出现，提示未发生野生型病毒 env 基因的整合，证实得到的重组逆转录病毒上清中不含有复制能力的逆转录病毒(RCR)。

2.4　Delta1 表达检测

重组病毒感染后 48 h，倒置荧光显微镜下即可观察到 NIH3T3 细胞绿色荧光表达；经流式细胞仪检测，部分细胞荧光强度显著提高(图 2)。病毒感染 NIH3T3 细胞经 RT-PCR 扩增，可获得与设计一致的片段，说明重组病毒感染后外源基因已成功地整合进入宿主细胞中。

2.5　Delta1 功能检测

基因转导及正常 NIH3T3 分别与 C2C12 细胞共培养，诱导 2 ~ 3 d，倒置荧光显微镜下可见 C2C12 细胞形态发生明显差别：和单纯 C2C12 分化诱导后形态变化一致，与正常 NIH3T3 共培养的多数 C2C12 成行排列，部分细胞发生融合，有明显的多核肌管细胞形成(图 3A)，免疫组化法检测 C2C12 细胞 T-Tropnion 表达阳性；大多数与转导细胞共培养的 C2C12 细胞未发生融合(图 3B)，细胞 T-Tropnion 表达阴性。提示细胞表达的外源 Delta1 蛋白可抑制肌母细胞的分化，具有生物学活性。

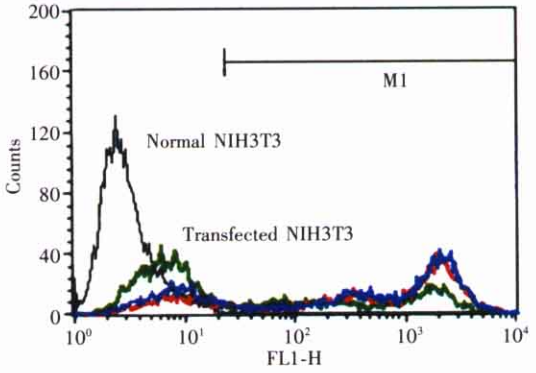
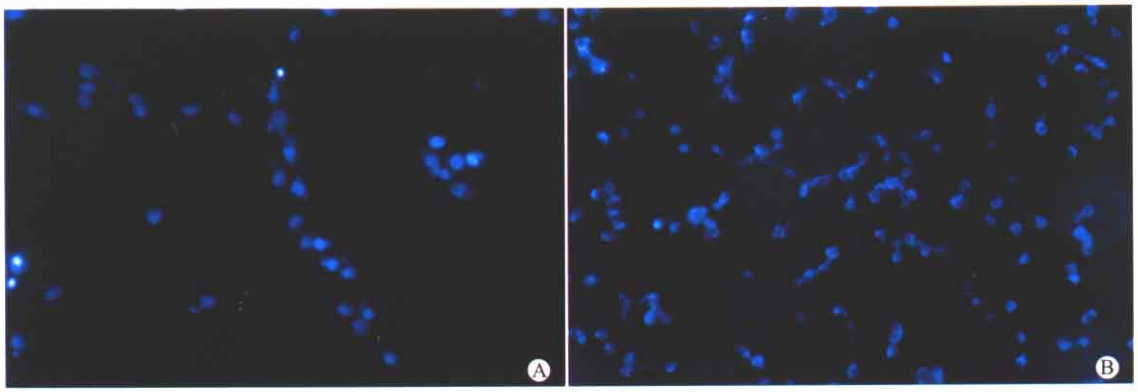


图 2　病毒感染 NIH3T3 细胞 GFP-FACs 分析

Fig 2　FACs analysis of Delta1-IRES-EGFP retrovirus transfected NIH3T3 cells



A: C2C12 cells cocultured with normal NIH3T3 cells differentiated into myotube cells; B: C2C12 cells cocultured with transfected NIH3T3 cells showed morphology similar to the undifferentiated myoblasts

图 3　C2C12 细胞共培养实验结果　(倒置荧光显微镜 × 100)

Fig 3　C2C12 cells cocultured with NIH3T3 cells　(Fluorescence invert microscope × 100)

3　讨论

Notch-Delta 信号是一种细胞间相互机制，可以通过侧向分化和信号诱导实现对相邻细胞命运的控制，参与细胞的分化、增殖和凋亡。如前所述，Notch-Delta 信号对于研究牙胚发育、牙髓损伤修复等有着十分重要的意义。为深入研究 Notch-Delta 信号与牙髓细胞增殖、分化的关系，本实验构建了 Delta1-EGFP 双顺反子逆转录病毒载体。

选择逆转录病毒载体的原因，在于其构建简单，宿主范围广，可整合入宿主基因组中获得稳定表达等优点。含内在核糖体进入位点(internal ribosome entry site，IRES)的双顺反子策略[7]，是近些年发展起来的双基因共表达方法。IRES 指微小 RNA 病毒家族中的 EMCV 的 5′端非翻译区包含的顺式作用元件，这些顺式作用元件本身无启动子活性，但其却能引导 mANA 直接进入核糖体开始不依赖帽的翻译。IRES 双顺反子逆转录病毒载体，以 LTR 单启动子驱动上下游两个基因转录并获得相同水平的双蛋白表达，避免了双启动子自相抑制作用，对病毒滴度无影响。因而，尽管含 IRES 的双顺反子载体不能提高逆转录病毒的基因转导率，但对提高目的基因的表达水平具有重要意义。

本研究用此策略获得了目的蛋白 Delta1 与 EGFP 的共表达，荧光显微镜下可以观察到明亮的绿色荧光，RT-PCR 显示 NIH3T3 细胞 Delta1 表达阳性。

逆转录病毒载体也存在一些缺陷，其中最常见的是病毒滴度低，这也是本实验遇到的最大难题。病毒滴度决定了病毒的临床应用价值，目前一般较好的逆转录病毒滴度在 10^6 CFU/ml，通过超滤能提高 10 倍左右，进一步浓缩则效果不明显。

影响逆转录病毒滴度的主要因素有温度、pH 值、血清浓度等[8,9]。据此，曾对实验操作进行了如下改进：①在收获病毒前 24～48 h，将包装细胞移入 32 ℃孵箱培养；②尽量保持包装细胞培养基的 pH 值稳定于 7.2；③血清浓度降低至 5%；④PA317 和 GP+E86 混合培养，进行“乒乓球”法相互感染，同时在培养基中加入较高浓度的 polybrene(15 μg/ml)。通过改进，病毒滴度提高 10 倍以上。经反复比较，认为“乒乓球”法[10]对提高病毒滴度最有效，其它方面也有一定的效果。

选择 EGFP 作为转染细胞标记，借助荧光显微镜或流式细胞仪，可以快速、方便地辨别转染与非转染细胞。根据包装细胞绿色荧光的表达强度，可以大致比较各克隆外源基因的表达情况，推测病毒滴度。通过具备细胞分选功能的流式细胞仪，可根据 GFP 表达情况，直接进行转染细胞的快速分离，筛选出目的基因高表达的细胞，而无需进行传统的药物方法筛选，从而大大提高工作效率，节约时间和经费。同时，作为 Delta1 表达的报告分子，EGFP 也将在后续研究中发挥作用。

总之，本研究利用双顺反子逆转录病毒载体，获得了功能性目的蛋白 Delta1 与 EGFP 的共表达，证实为一种有效的基因转导方式，为进一步研究 Notch-Delta 信号打下良好基础；同时 EGFP 作为目的蛋白表达的报告分子，为逆转录病毒体外包装、病毒转导细胞的生物学特性检测过程提供一种方便、快捷的监测手段。

参考文献：

[1] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415): 770-776.

[2] Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini M E. Notch signaling[J]. Science, 1995, 268(5208): 225-232.

[3] Mitsiadis T A, Hirsinger E, Lendahl U, *et al*. Delta-notch signaling in odontogenesis: correlation with cytodifferentiation and evidence for feedback regulation[J]. Dev Biol, 1998, 204(2): 420-431.

[4] Mitsiadis T A, Henrique D, Thesleff I, *et al*. Mouse Serrate-1 (Jagged-1): expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and fibroblast growth factor-4[J]. Development, 1997, 124(8): 1473-1483.

[5] Imreh G, Beckman M, Iverfeldt K, *et al*. Noninvasive monitoring of apoptosis versus necrosis in a neuroblastoma cell line expressing a nuclear pore protein tagged with the green fluorescent protein[J]. Exp Cell Res, 1998, 238(2): 371-376.

[6] Jaleco A C, Neves H, Hooijberg E, *et al*. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation[J]. J Exp Med, 2001, 194(7): 991-1002.

[7] Wang X, Wan H, Korzh V, *et al*. Use of an IRES bicistronic construct to trace expression of exogenously intorduced mRNA in zebrafish embryos[J]. Biotechniques, 2000, 29(4): 814-816,818,820.

[8] McTaggart S, Al Rubeai M. Effects of culture parameters on the production of retroviral vectors by a human packaging cell line[J]. Biotechnol Prog, 2000, 16(S): 859-865.

[9] McTaggart S, Al Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery[J]. Biotechnol Adv, 2002, 20(1): 1-31.

[10] Kozak S L, Kabat D. Ping-Pong amplification of a retroviral vector achieves high-level gene expression: human growth hormone production[J]. J Virol, 1990, 64(7): 3500-3508.

（编辑 王 红）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部