论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1346-04

磁共振报告基因 magA 的慢病毒载体质粒构建及体外表达

秦 勇[1,2],蔡金华[1],郑鹤琳[1],刘官信[2],王世一[2],刘 波[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:放射科[1],儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地[2])

【摘要】 **目的** 构建携带磁共振报告基因 magA 的慢病毒载体质粒,初步检测其体外转铁效应。**方法** 采用人工 DNA 合成技术合成目的基因 magA,DNA 重组技术将 magA 基因连接入慢病毒表达载体质粒 pLenti-EGFP,酶切及 DNA 测序鉴定重组质粒 pLenti-EGFP/magA 的准确性。包装、包膜及重组质粒共转染 293FT 细胞包装慢病毒,收集包被 magA 基因的慢病毒上清并感染 293T 靶细胞,细胞培养基内加入 500 μmol/L 枸橼酸铁连续 4 次传代,荧光显微镜观察并提取细胞行台盼蓝排除实验和普鲁士蓝染色,同时设立对照组行同样方法实验。**结果** 酶切和 DNA 测序分析证实 magA 基因准确克隆入慢病毒表达载体设计位点,合成目的基因序列与 GenBank 中 magA 序列完全一致。荧光显微镜下观察包装细胞 293FT 细胞质内有大量绿色荧光表达,病毒滴度达到 10^8 Tu/μl。慢病毒感染 293T 靶细胞后,细胞内稳定表达 EGFP,且效率 >80%。实验组及对照组台盼蓝拒染率分别为(92.80 ± 2.65)、(93.50 ± 1.29),2 组拒染率差异无统计学意义(P > 0.05)。普鲁士蓝染色发现实验组细胞内有大量蓝染铁颗粒形成,对照组呈阴性。**结论** 成功构建了携带磁共振报告基因 magA 的慢病毒表达载体,证实了 magA 基因在哺乳动物 293T 靶细胞内的转铁作用。

【关键词】 magA;报告基因;磁共振成像;慢病毒载体

【中图法分类号】 R394-33;R394.2 【文献标志码】 A

Construction of recombinant lentivirus expression vector carrying MagA and its *in vitro* expression

Qin Yong[1,2], Cai Jinhua[1], Zheng Helin[1], Liu Guanxin[2], Wang Shiyi[2], Liu Bo[1] ([1]Department of Radiology, [2]Key Laboratory of Child Development and Disorders Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics of Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To construct a recombinant lentivirus expression vector encoding magA, a new MRI reporter gene, and to determine the iron-transporting effect of *in vitro* expressed magA. **Methods** The gene sequence of magA was synthesized by synthetic DNA technology, and then inserted into the lentivirus expression vector pLenti-EGFP by recombinant DNA technique. The recombinant lentivirus expression vector pLenti-EGFP/magA was verified by enzyme digestion and DNA sequencing. Then the recombinant lentivirus was packaged in the 293FT cells by co-transfecting with packaging plasmid, envelope plasmid, and lentiviral vector plasmid. The 293T cells were transfected with the packaged lentivirus particles, and then cultured in the medium containing 500 μmol/L ferric citrate. Prussian blue staining was performed to detect the iron particles in the 293T cells. Viability was assessed *via* Trypan blue exclusion testing. **Results** The enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that the sequence of PCR-amplified magA was consistent with that in Genbank. The magA were cloned into pLenti-EGFP in a right direction. The three plasmids were transferred into 293T cells, which emitted green fluorescence under fluorescence microscope. The titer of resulting virus reached 10^8 TU/μl and infected 293T cells successfully with an efficiency of more than 80%. Prussian blue staining revealed numerous iron particles in the cytoplasm of 293T cells. Cell viability was >90% for all cell with no noteworthy difference between the control group and the experimental group. **Conclusion** The recombinant lentivirus expression vector of magA is successfully constructed and the iron transporting effect of magA in

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2009JJ0305)

【通信作者】 蔡金华,电话:(023)63632016,E-mail:cjh710506@tom.com

mammal 293T cells is verified, which provides a basis for further exploring MRI tracking in cells *in vivo* by using magA as a reporter gene.

[Key words] magA; reporter gene; magnetic resonance imaging; lentivirus vector

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009JJ0305). Corresponding author: Cai Jinhua, Tel: 86-23-63632016, E-mail: cjh710506@tom.com

干细胞治疗以及以干细胞为载体的基因治疗是目前医学领域的研究热点之一[1-3]。如何对这些细胞的生物学行为进行实时、有效的活体示踪是细胞治疗应用于临床的必要前提，MRI 因其具有较高的时间和空间分辨率而成为细胞活体示踪的最佳方法。目前多数研究采用体外超顺磁性氧化铁标记的方法对移植细胞进行 MRI 示踪，但细胞内铁含量随细胞增殖逐渐减少是这一方法的主要缺陷，利用 MRI 报告基因成像有望解决这一问题。magA 基因是一种存在于趋磁菌中并能介导磁小体形成的重要基因片段[4-6]，该基因有望成为一种理想的 MR 报告基因，用于活体细胞的 MRI 示踪。本研究利用利用人工 DNA 合成技术获得 magA 基因，并以慢病毒为载体将 magA 基因转入 293T 细胞，初步观察并鉴定其转铁效应，为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 目的基因、载体及慢病毒包装系统 目的基因 magA 委托上海比昂生物技术有限公司合成，含 EGFP 报告基因的慢病毒载体质粒 pLenti-EGFP(含氨苄西林抗性基因)及慢病毒包装系统购于上海比昂生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂及细胞 DNA 连接试剂盒、DNTP、限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Sma* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、Marker 均购自 TaKaRa 公司，质粒提取试剂盒及胰蛋白酶购自 Sigma 公司，胎牛血清购自 PAA，氨苄西林及分析纯枸橼酸铁购自成都贝斯特试剂有限公司，293FT 及 293T 细胞、高糖 DMEM 培养基、青霉素-链霉素溶液、DMSO、培养板及实验其他设备等均由重庆医科大学附属儿童医院儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 magA 基因合成及引物设计 根据基因库查询数据人工合成 magA(1 311 bp)序列，并在其两端分别合成 2 条引物(上游引物 5′-TTTGCAAAAAGCTCCC-3′，下游引物 5′-TTTAA-GACCAATGAC-3′)和 2 个限制性内切酶 *Xba* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ识别位点。利用 *Xba* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点用 DNA 连接酶将合成序列连接入 pUC57(2 710 bp)载体质粒多克隆位点内，进行双酶切及 DNA 测序验证 magA 的准确性。

1.2.2 慢病毒载体 pLenti-EGFP/magA 的构建 *Kpn* Ⅰ和 *Sma* Ⅰ双酶切慢病毒表达载体 pLenti-EGFP(8.10 kb)，获得 7.11 kb 和 0.79 kb 片段，回收 7.11 kb 片段，获得连接用慢病毒载体片段。*Kpn* Ⅰ和 *Sma* Ⅰ(合成序列位于 *Kpn* Ⅰ和 *Sma* Ⅰ酶切位点之间)双酶切 pUC57/magA 质粒，获得 1.37 kb(magA + 上下游引物及在内的酶切位点)和 2.70 kb，回收 1.37 kb 含目的基因 magA 的片段。然后使用 DNA 连接试剂盒将之前回收的连接用慢病毒载体片段和含目的基因 magA 的片段连接，所得重组慢病毒质粒命名为 pLenti-EGFP/magA，酶切及 DNA 测序验证重组准确性。

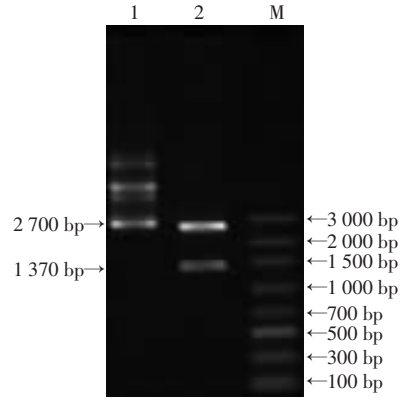
1.2.3 包被 magA 基因的慢病毒制备 慢病毒包装按公司慢病毒包装系统操作说明，在脂质体介导下将 3 种质粒(包装质粒、包膜质粒、重组载体质粒 pLenti-EGFP/magA)共转染包装细胞 293FT 细胞，48 h 和 96 h 后在荧光显微镜下观察包装细胞荧光表达情况，并收取病毒上清，低温超速(4 ℃，25 000 r/min)离心 2 h，PBS 稀释病毒，分装成 10 μl 备用，流式细胞仪检测病毒滴度。

1.2.4 重组慢病毒感染靶细胞 实验分为 3 组：重组慢病毒组以包被 magA 基因的重组慢病毒上清感染 293T 细胞，5 次药物(氨苄西林 100 μg/ml)筛选后获得稳定表达 EGFP 的 293T 细胞，流式细胞仪计数分析阳性感染率；空载组用无 magA 基因包被的慢病毒感染 293T 细胞，同法筛选并分析阳性感染率；对照组细胞不加入任何病毒。3 组细胞分别经 4 次传代培养，培养基内加入初始浓度为 500 μmol/L 枸橼酸铁，每次传代前荧光显微镜观察 EGFP 表达情况，并提取细胞行普鲁士蓝染色观察细胞内有无铁颗粒形成及铁颗粒的形态、大小和分布等，同时采用台盼蓝排除实验检测细胞活性，细胞活力(台盼蓝拒染率) = 染色阴性细胞数/100 个细胞 × 100%。

2 结果

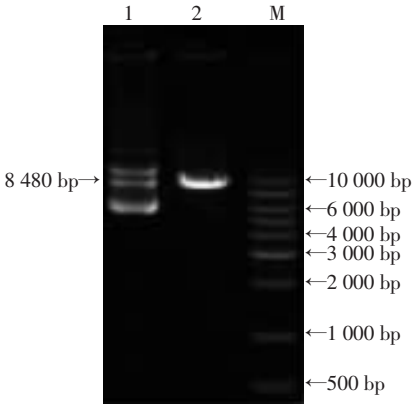
2.1 合成目的基因及重组慢病毒载体的鉴定

Xba Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 pUC57/magA，获得与目的基因 magA 理论碱基对长度(1.3 kb)一致的清晰条带(图 1)。*Kpn* Ⅰ单酶切重组慢病毒载体 pLenti-EGFP/magA，获得目的基因与慢病毒载体碱基对理论长度总和一致的清晰条带(图 2)。pUC57-magA 和 pLenti-EGFP/magA 测序结果表明：我们获得的目的基因片段与 GenBank 所公布的 magA 基因碱基对序列高度一致，无碱基对缺失或错误，magA 准确链接入慢病毒载体连接位点。



M：DL 3000 标准；1：pUC57/magA 质粒；2：*Xba* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 pUC57/magA 质粒

图 1 pUC57/magA 载体质粒的 PCR 双酶切鉴定结果



M：DL 10000 标准；1：重组慢病毒载体 pLenti-EGFP/magA 质粒；2：*Kpn* Ⅰ单酶切重组慢病毒载体 pLenti-EGFP/magA 质粒

图2 pLenti-EGFP/magA 表达载体质粒的单酶切鉴定结果

2.2 magA 基因慢病毒的包装鉴定

含目的基因重组慢病毒质粒的三质粒共转染 293T 细胞 48、96h 后，荧光显微镜下可见包装细胞内大量绿色荧光（图 3）。流式细胞仪检测病毒滴度约为 10^8 Tu/μl。重组慢病毒组（图 4）及空载组慢病毒感染 293T 细胞经 5 次筛选后细胞内荧光稳定表达，且阳性感染率 >80%，对照组细胞内无荧光表达。

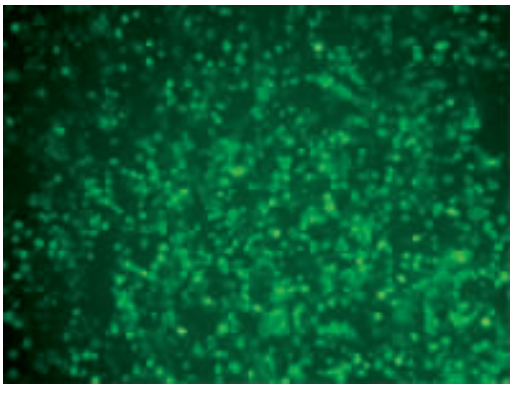


图3 重组质粒、包装质粒及包膜质粒共转染 293T 细胞后第 3 天荧光显微镜观察 （×200）

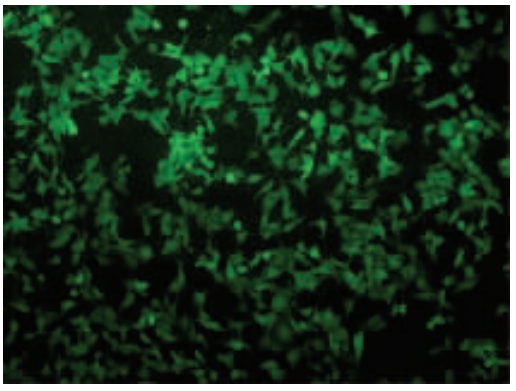
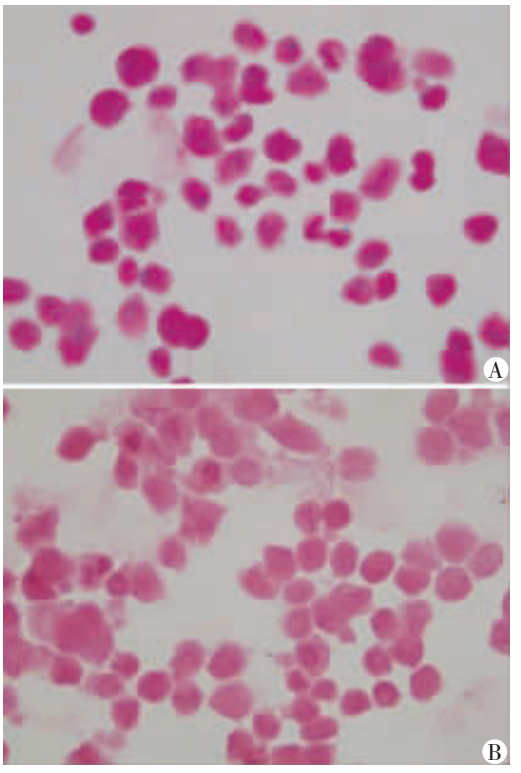


图4 包被 magA 目的基因的重组慢病毒感染 293T 细胞荧光显微镜观察 （×200）

2.3 magA 基因表达鉴定

荧光显微镜结果：重组慢病毒组及空载组细胞经 4 次传代 EGFP 稳定持续表达，且阳性表达率均维持 >80%（图 4）。普鲁士蓝染色结果：重组慢病毒组发现靶细胞内有大量蓝染的铁颗粒（图 5A），铁颗粒位于细胞质内，呈散在分布，大小及浓度较均匀，各代细胞内铁颗粒含量基本一致；空载组及无病毒组细胞内没有明显的蓝染铁颗粒发现（图 5B）。实验组及对照组台盼蓝拒染率分别为（92.80 ± 2.65）、（93.50 ± 1.29），2 组拒染率差异无统计学意义（P >0.05）。



A：重组慢病毒组；B：空载组

图5 magA 基因转铁效应鉴定 （普鲁士蓝 ×1 000）

3 讨论

近年来 MRI 分子影像学的迅速发展为细胞的活体示踪提供了可能。MRI 对细胞的显示依赖于超顺磁性物质的介导，目前国内外多数研究采用体外超顺磁性氧化铁（superparamagnetic iron oxide，SPIO）标记的方法使细胞获得超顺磁性[7-9]，这种方法虽然具有方便、快捷、标记效率高等优点，但也存在其固有缺陷，即随着细胞的分裂增殖，细胞内铁含量呈指数递减直至消失，MRI 示踪的时间仅能持续 2～4 周[9]。因此，采用体外 SPIO 标记的方法不能对标记细胞进行长期示踪。克服上述问题的有效策略是采用 MRI 报告基因显像系统，借助报告基因在细胞内的稳定表达有可能实现对移植细胞的长期示踪。目前 MRI 报告基因主要有酪氨酸酶、转铁蛋白受体基因、铁蛋白基因等[10-11]，此类报告基因的主要缺点在于基因表达所产生的铁含量较少，相应的 MRI 信号放大作用非常微弱，常需采用高场强实验专用 MR 成像系统来显示，这

在一定程度上制约了MRI报告基因成像技术的应用[10]。

magA基因存在于趋磁菌中,后者是一类能够沿地球磁力线作定向运动的革兰阴性菌[4-6],趋磁菌之所以具有趋磁性运动的特性,是因为其体内含有丰富的磁小体,这些磁小体大小均匀、排列整齐,具有超顺磁性。目前,趋磁菌内磁小体形成的具体机制尚不完全清楚,较为公认的假说是:在某些基因调控下,细菌包膜内侧形成脂质双分子层囊泡,并在囊泡内外产生一定的电位差,细菌外铁离子在电位差作用下进入囊泡,经过一系列包装、排列及维护等过程,最后形成磁小体。对趋磁菌基因及基因组的研究发现,在磁小体形成的过程中,magA基因可能起到了关键作用。基于以上理论,本研究利用人工DNA合成的方法获得magA基因,并利用慢病毒表达载体将magA基因转入了人293T细胞,结果表明,magA基因不仅能够将细胞外铁成功转入细胞内,而且转铁效率较高,此外magA基因转染对293T细胞活力无显著影响,完全有希望成为一种新型的MRI报告基因。

本研究结果显示,在magA基因的作用下,细胞内形成的铁颗粒其形态虽然类似于趋磁菌内的磁小体,但分布较为均匀、散在,这与趋磁菌内磁小体呈链状分布的特性不符,提示磁小体的形成可能是一个复杂的过程,除了magA基因的转铁作用,可能还存在其它基因参与转铁后的包装、排列以及修饰等一系列程序。尽管没有其他基因的协同作用,magA本身所具有的高转铁效率以及铁颗粒均匀分布等特点已经足以使其成为一种理想的MRI报告基因。

慢病毒载体是以HIV-1(人类免疫缺陷Ⅰ型病毒)为基础发展起来的基因载体,它通过包装质粒、包膜质粒及重组质粒共转染293FT细胞,并在293FT细胞内分别表达出病毒组装所需的各种原件,然后组装出含有目的基因的慢病毒颗粒,该病毒颗粒具有可感染非分裂细胞、目的基因整合至靶细胞基因组长期表达、免疫反应小等优点,目前已广泛应用于体内外转基因实验研究中[11-13],本实验将新型MR报告基因magA克隆入慢病毒表达载体pLenti-EGFP,成功构建了重组慢病毒载体质粒pLenti-EGFP/magA,包装出含有magA的重组慢病毒并高效感染293T细胞,经过多次传代后,细胞内EGFP荧光稳定表达,而且普鲁士蓝染色显示细胞内铁颗粒含量不随传代而减少,这说明目的基因已经成功整合到靶细胞基因组,实现了目的基因在细胞内的稳定恒久表达。

总之,本实验将magA基因成功转入了293T细胞,并初步证实了magA基因的转铁作用,为进一步利用magA作为MRI报告基因在体内进行基因转铁研究并最终实现活体细胞的MRI示踪奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] De-Paula S, Greggio S, DaCosta J C. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside[J]. J Pediatr (Rio J), 2010, 86(6): 451-464.

[2] Marquass B, Somerson J S, Hepp P, *et al*. A novel MSC-seeded triphasic construct for the repair of osteochondral defects[J]. J Orthop Res, 2010, 28(12): 1586-1599.

[3] Ng S Y, Wong C K, Tsang S Y. Differential gene expressions in atrial and ventricular myocytes: insights into the road of applying embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for future therapies[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 299(6): C1234-C1249.

[4] Schuler D. Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2008, 32(4): 654-672.

[5] Arakaki A, Nakazawa H, Nemoto M, *et al*. Formation of magnetite by bacteria and its application [J]. J R Soc Interface, 2008, 5(26): 977-999.

[6] Wang X, Liang L. Effects of static magnetic field on magnetosome formation and expression of mamA, mms13, mms6 and magA in Magnetospirillum magneticum AMB-1 [J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(4): 313-321.

[7] Ju S, Teng G J, Lu H, *et al*. In vivo MR tracking of mesenchymal stem cells in rat liver after intrasplenic transplantation[J]. Radiology, 2007, 245(1): 206-215.

[8] Focke A, Schwarz S, Foerschler A, *et al*. Labeling of human neural precursor cells using ferromagnetic nanoparticles [J]. Magn Reson Med, 2008, 60(6): 1321-1328.

[9] Cai J, Zhang X, Wang X, *et al*. In vivo MR imaging of magnetically labeled mesenchymal stem cells transplanted into rat liver through hepatic arterial injection[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2008, 3(2): 61-66.

[10] Gilad A A, Winnard P T Jr, van-Zijl P C, *et al*. Developing MR reporter genes: promises and pitfalls [J]. NMR Biomed, 2007, 20(3): 275-290.

[11] 张立群, 段文元, 许雪青, 等. B7-H1慢病毒的制备及其在B16F10细胞中的表达鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 24-27.

[12] Cohen B, Ziv K, Plaks V, *et al*. MRI detection of transcriptional regulation of gene expression in transgenic mice[J]. Nat Med, 2007, 13(4): 498-503.

[13] 褚波, 黄雪峰, 唐云明. 慢病毒载体及其应用进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2008, 25(1): 224-226.

[14] Schambach A, Baum C. Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice[J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(6): 474-482.

(收稿:2010-11-26 修回:2010-12-14)

(编辑 张 维)