技术与方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.022

人细胞色素 P450 2A13 与 GFP 融合基因共表达慢病毒载体的构建与表达

范晓丽，谭 宁，孙 莉

（桂林医学院基础医学院组织学与胚胎学教研室，桂林 541004）

【摘 要】目的：构建人细胞色素 P450 2A13(CYP2A13)基因与绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein，GFP)共表达的慢病毒载体，并转染肺腺癌 A549 细胞使之持续高表达 CYP2A13 基因。方法：采用基因重组技术，将 CYP2A13 基因与 GFP 连接，构建慢病毒载体。转染 293T 细胞，包装后产生病毒液，测定其滴度。包装后的病毒感染 A549 细胞。激光共聚焦显微镜检测 GFP-CYP2A13 融合蛋白在 A549 细胞中的定位；Real-time PCR 和 Western blot 检测 A549 细胞中 CYP2A13 表达情况。结果：成功构建人细胞色素CYP2A13 基因与 GFP 共表达的慢病毒载体，转染 293T 细胞后，荧光显微镜下可见有大量的绿色荧光。激光共聚焦显微镜观察，感染后的 A549 细胞的胞核和胞浆中有绿色荧光，Real-time PCR 和 Western blot 检测到 A549 细胞中 CYP2A13 的高表达。结论：成功构建了 CYP2A13 与 GFP 基因共表达的慢病毒表达载体，为研究 CYP2A13 基因与呼吸系统肿瘤的关系，提供了稳定的感染细胞的载体。

【关键词】CYP2A13；绿色荧光蛋白；慢病毒载体；转染

【中国图书分类法分类号】Q782 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-24

Construction and expression of CYP2A13 and GFP gene co-expressing lentiviral vector

FAN Xiao-li，TAN Ning，SUN Li

（*Department of Histology and Embryology，College of Basic Medicine，Guilin Medicial University*）

【Abstract】*Objective*：To construct human cytochrome enzyme P450 2A13 (CYP2A13) and green fluorescent protein (GFP) co-expressing lentiviral vector，and transfect A549 lung cancer cells for highly expressing CYP2A13 gene continuously. *Methods*：Gene recombinant technology was employed to link CYP2A13 and GFP genes for constructing lentiviral vector.After transfecting 293T cells，virus was collected and the titer was

作者介绍：范晓丽(1985-)，女，硕士，研究方向：肿瘤相关基因。

通信作者：孙 莉，女，教授，Email：sunli2196@glmc.edu.cn。

基金项目：2003 年广西教育厅科研基金资助项目(编号：桂教科研[2003] 22 号)。

from：http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700 Epi Update 2009 en.pdf. [cited：August 6，2010].

[3] 卫生部，联合国 AIDS 规划署，WHO.2009 年中国 AIDS 疫情估计工作报告[R].北京：卫生部，2010.

[4] 石卫东，李 刚，杨 涛，等.武汉市 456 例男男性接触者高危性行为及 HIV、梅毒与丙肝调查[J].医学与社会，2009，22(10)：42-43.

[5] 张北川，李季芳，史同新，等.对中国男同/双性爱人口数量与 AIDS 病毒感染率的初步估测[J].中国性病 AIDS 防治，2002，8(4)：197-199.

[6] 胡 珍.2000 年中国大学生性 调查对比分析[J].中国性科学，2001，10(4)：28-33.

[7] 师 伟，李新旭，阮玉华，等.男男性接触者异性性行为特征的调查研究[J].中国 AIDS 性病，2007，13(1)：33-36.

[8] Choi K H，Gibson D R，Hart L，et al.High levels of unprotected sex with men and women among men who have sex with men：a potential bridge of HIV transmission in Beijing China[J].AIDS Education and Prevention，2004，16(1)：19-30.

[9] Dandona L，Dandona R，Gutierrez J P，et al.Sex behavior of men who have sex with men and risk of HIV in Andhra Pradesh，India[J].AIDS，2005，19(6)：611-619.

[10] Xia Q，Osmond D H，Tholandi M，et al.HIV prevalence and sexual risk behaviors among men who have sex with men[J].J Acquit Immune Defic Syndr，2006，41(2)：238-245.

[11] Wade A S，Kane C T，Diallo P A，et al.HIV infection and sexually transmitted infection among men who have sex with men in Senegal[J].AIDS，2005，19(18)：2133-2140.

[12] 高 省，王丽艳，丁正伟，等.中国部分城市男男性行为人群性行为特征及 HIV 感染状况的研究[J].中国 AIDS 性病，2008，14(6)：548-551.

[13] 曹 淦，管文辉，吴小刚，等.某同性恋浴室男男性接触者 HIV/梅毒感染状况的研究[J].南京医科大学学报，2007，27(6)：637-640.

（责任编辑：张学颖）

measured. The packed lentiviral vector was used to infect A549 cells.Then laser scanning confocal microscope(LSCM) were applied to detect the location of fusion protein GFP-CYP2A13,while real-time PCR and Western blot were applied to deteat and the expression of CYP2A13 in the infected A549 cells respectively. *Results*:A recombinant lentiviral vector co-expressing CYP2A13 and GFP gene was constructed successfully. After transfection,a large number of 293T cells with green fluorescence were observed under fluorescent microscope,and green fluorescence was seen in the nucleus and cytoplasm of A549 cells under LSCM.Real-time PCR and Western blot showed that CYP2A13 gene was highly expressed. *Conclusion*:Successful construction of human CYP2A13 and GFP co-expressing lentiviral vector provides a stable vector for further investigation of the relationship between CYP2A13 gene and respiratory tumors.

【Key words】cytochrome P450 2A13;green fluorescent protein;lentivirus vector;transfection

细胞色素 P450 2A13(Cytochrome P450 2A13,CYP2A13)是 1 种具有高效代谢活化功能的 CYP450 酶,主要在呼吸系统中表达[1]。可代谢活化多种致癌物质,如烟草中重要前致癌物 4-甲基亚硝胺-1-3-吡啶基-1-丁酮[2][4-(Methylnitrosamino)-1-(3- pyridyl)-1-butanone,NNK],AFB1[3],萘[4]以及 4-氨基联苯[5]等,因此被认为与肺癌等呼吸系统肿瘤的发生有关[6]。本实验构建了CYP2A13与绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)共表达的慢病毒载体,将其感染肺腺癌 A549 细胞,并在其中稳定表达,为研究 CYP2A13 基因与呼吸系统肿瘤的关系,提供稳定的感染细胞载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 质粒 pWPXL 由瑞士日内瓦大学 T. Didier 博士馈赠;肺癌细胞株 A549、人胚肾细胞系(293T)细胞系购自中科院生化细胞所。

1.1.2 主要酶和试剂 限制性内切酶 *Mlu* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、*BamH* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ(Fermentas);50 bp Lad der(康为世纪);T4 DNA ligase(NEB);SYBR Primscrip™ RT-PCR kit、Taq polymerase、Trizol(Takara);dNTP(Promega);Lipofectamine 2000(Invitrogen);胎牛血清、胰酶(GIBCO);胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司,BCA 蛋白浓度定量检测试剂盒、Beta-actin 一抗、羊抗鼠辣根过氧化物酶二抗(碧云天);CYP2A13 一抗、羊抗兔辣根过氧化物酶二抗(bio-world)。

1.2 方法

1.2.1 携带人 CYP2A13 基因慢病毒载体 pWPXL 的构建

1.2.1.1 引物的设计与合成 针对人 CYP2A13 的 mRNA 序列(NCBI GenBank,基因号:NM_000766),设计引物,并分别在每条引物上加入相应的酶切位点,提交序列由上海生工生物技术公司合成,引物序列如表 1。

1.2.1.2 携带人 CYP2A13 基因慢病毒载体 pWPXL 的构建 取 100 mg 的人鼻黏膜组织,按照 Trizol 说明书抽提总 RNA。利用引物 1(CYP-F1、CYP-F1)建立 PCR 反应体系。用于 CYP2A13 的开放阅读框架的扩增得到 CDS 区,用 PCR 产物纯化试剂盒回收 PCR 产物,得到目的基因 1;利用引物 2(CYP-F2、CYP-F2)建立 PCR 反应体系进行扩增,回收 PCR 产物将其插入 pEGFP-N1 载体,构建 CYP-GFP 融合质粒,然后利用 CYP-F1 及 RFP-R 扩增,将 CYP-GFP 融合蛋白 DNA 序列插入病毒载体,得到目的基因 2。将得到的目的基因经 *BamH* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切,通过 T4 DNA 连接酶连接到慢病毒载体 pWPXL 上。因此,我们可以得到 4 组慢病毒载体,分别为空载体 pWPXL-Control、携带 CYP2A13 基因的慢病毒载体 pWPXL-CYP2A13、携带 GFP 的慢病毒载体 pWPXL-GFP 以及携带CYP2A13基因及GFP的慢病毒载体pWPXL-CYP2A13-GFP(引物序列如表 1)。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列	酶切位点
CYP-F1	GCG*ACGCGT*ATGCTGGCCTCAGGGCTG	*Mlu* Ⅰ
CYP-R1	CCG*GAATTC*TCAGCGGGGCAGGAAGCTCA	*EcoR* Ⅰ
CYP-F2	CCG*GAATTC*ATGCTGGCCTCAGGGCTG	*EcoR* Ⅰ
CYP-R2	GG*GGTACC*GCGCGGGGCAGGAAGCTCAT	*Kpn* Ⅰ
RFP-R	CCG*GAATTC*GATCTAGAGTCGCGGCCG	*EcoR* Ⅰ

1.2.2 慢病毒载体的包装

1.2.2.1 3 质粒共转染 293 T 细胞 取对数生长期的 293 T 细胞于转染前 1 d 接种于培养板,培养 24 h 使其细胞密度达到 70%~80%。次日,取 1 管向其中加入所制备的各种 DNA 溶液[Transfer vector(pWPXL),Packaging plasmid (pA2),Envelope plasmid(pMDG2)],加适量 DMEM 混匀;将 Lipofectamine2000 加入另一管中,加适量 DMEM;静置 5 min,将 2 管混合,室温放置 20~25 min。将质粒及 Lipofectamine2000 混合液滴入培养 293 T 细胞的培养基中。48 h 后,用荧光显微镜观察 GFP 的表达情况并收集转染后的培养基,室温下,3 000 r/min 离心 5 min,用 0.45 μm 的过滤器过滤收获病毒液,病毒液可直接用于感染或-80℃保存。

1.2.2.2 病毒滴度测定 第 1 天,将 293 T 细胞接种到 6 孔板内。次日,消化 1 孔细胞计算细胞数目,其余孔加入聚凝胺(Polybrene),30 min 后,加入病毒(病毒量按梯度加入,10、50、

100、200 μl）。24 h 后，加入新鲜培养基，次日，收获细胞，用流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞数。GFP 阳性率=GFP 阳性细胞数/通过检测的总细胞数。根据公式计算病毒滴度：滴度(U/ml)=[GFP 阳性率]×[第 2 天细胞数(cells/ml)]/病毒液体积(ml)。

1.2.3 慢病毒载体感染 A549 细胞及激光共聚焦显微镜观察

1.2.3.1 慢病毒载体感染 A549 细胞 将 A549 细胞接种在 6 孔板内，次日，换液，加入完全培养基培养，30 min 后，加入病毒液，继续培养 24 h 后，更换新鲜培养基。次日于荧光显微镜下观察 GFP-CYP2A13 表达情况。

1.2.3.2 激光共聚焦显微镜观察 为了检测 GFP-CYP2A13 融合蛋白在 A549 细胞中的定位，将感染后的细胞接种在 2 个共聚焦培养皿上，第 1 组 24 h 后用 PBS 洗去培养基，用激光共聚焦显微镜观察，并拍照记录 GFP-CYP2A13 融合蛋白在细胞中的定位。第 2 组，转染病毒 96 h 后，吸去培养基后用含 4%甲醛和 10%蔗糖的 PBS 液固定 15 min，PBS 洗 5 min×2 次，加入 DAPI 染核 2 min，PBS 洗 5 min×2 次，H_2O洗 1 次，用激光共聚焦显微镜观察核的染色。

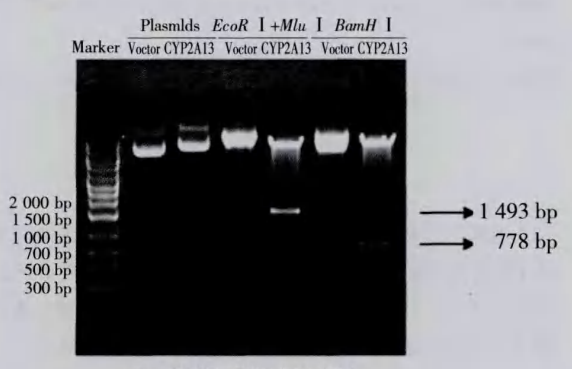
1.2.4 实时定量 PCR 检测感染后 A549 细胞中 CYP2A13 基因的表达 取慢病毒感染效率在 80%以上的目的细胞，提取总 RNA，然后逆转录为 cDNA，采用实时定量 PCR 法检测 CYP2A13 基因的表达情况，判断干扰效果。按照 Takara SYBR Primscrip™ RT-PCR kit 说明书进行，检测 CYP2A13 在各组的表达情况。β-actin 做为内参：引物的序列如下：CYP2A13-F.5'-AGG GCA CTG AAG TGT TCC CTA TGC TG-3'；CYP2A13-R.5'-ACG TCG ATA TCC TTA GGC GAC TGA GG-3'；扩增产物长度 259 bp；β-actin-F.5'-AGT GTG ACG TGG ACA TCC GCA AAG-3'；β-actin-R.5'-ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG GAC-3'，扩增产物长度 220 bp。扩增条件为：94℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，60℃退火 30 s 35 个循环，72℃延伸 45 s，产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 Western blot 检测感染后 A549 细胞中 CYP2A13 基因的表达 取慢病毒感染效率在 80%以上的目的细胞，提取蛋白，用 BCA 蛋白定量测定法测定蛋白浓度，行 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转移至 NC 膜，用 TBST(TBS+0.05% Tween20)加 5%脱脂奶粉封闭 1 h，抗人 CYP2A13 抗体孵育(1:1 000 稀释)，4℃过夜，次日，TBST 洗膜 3 次(5 min/次)，加辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 稀释)，在恒温摇床上 30℃孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次(5 min/次)，暗室显影，检测蛋白的表达。

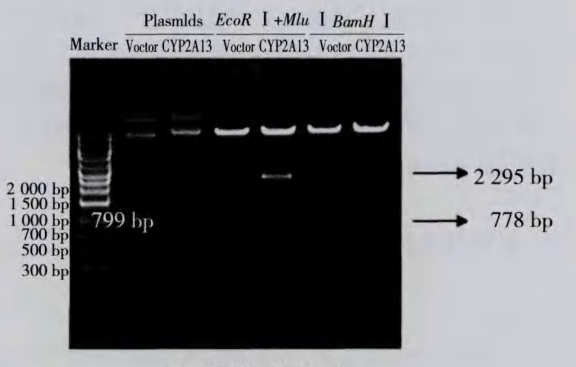
2 结 果

2.1 重组慢病毒载体的酶切鉴定

对重组的慢病毒载体进行酶切鉴定，反应体系为：酶 1 μl(5 U/μl)，10×Buffer 2.5 μl，质粒 5 μl，蒸馏水 16.5 μl。37℃过夜。pWPXL-CYP2A13-GFP 经 *EcoR* Ⅰ/*Mlu* Ⅰ双酶切，载体(含 GFP)切出片段长为 799 bp，CYP2A13-GFP 切出片段长为 2 295 bp；经 *BamH* Ⅰ酶切，载体与 CYP2A13 上均有，片段长为 778 bp(见图 1A)。pWPXL-CYP2A13 经 *EcoR* Ⅰ/*Mlu* Ⅰ双酶切，CYP2A13 切出片段长为 1 493 bp；经 *BamH* Ⅰ酶切，载体与 CYP2A13 上均有，CYP2A13 切出片段长为 778 bp(见图 1B)。



A. pWPXL-CYP2A13-GFP



B. pWPXL-CYP2A13

图 1 重组慢病毒载体酶切鉴定

2.2 Real-time PCR 检测

Real-time PCR 的方法检测肺癌 A549 细胞中 CYP2A13 基因的表达，结果如下(图 2，其中 β-actin 作为内参)。从图中可以看出，与空载体株比较无论是否携带 GFP，CYP2A13 的表达量都明显升高。产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳检测，在导入慢病毒载体的 A549 细胞中可看到在 259 bp 处有一明显的条带，而空载体株没有，说明人 CYP2A13 慢病毒载体成功的导入受体细胞并稳定的表达(图 3，β-actin 作为内参，220 bp)。

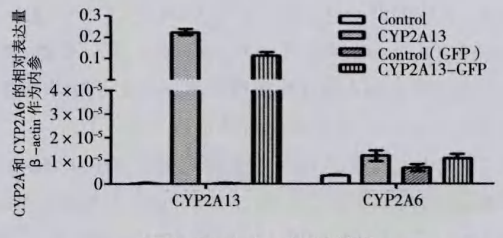


图 2 Real-time PCR 结果

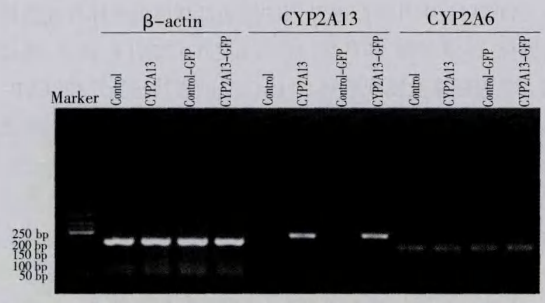


图 3　琼脂糖凝胶电泳 CYP2A13（259 bp）；β-actin（220 bp）

2.3　Western blot 鉴定

Western blot 检测 CYP2A13 的表达，可见 CYP2A13-GFP 共转染的细胞 CYP2A13 高表达，GFP 及 CYP2A13 空载体株 CYP2A13 高表达无表达，携带 CYP2A13 株表达较CYP2A13-GFP 株低，结果见图 4。

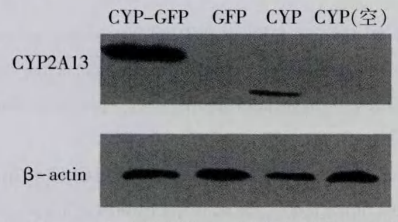
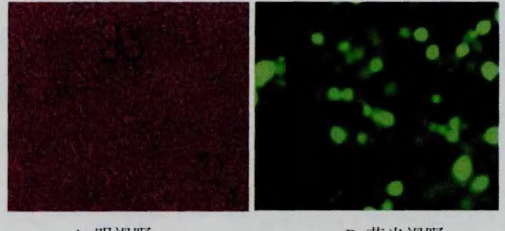


图 4　Western blot 检测 A549 细胞中 CYP2A13 蛋白的表达

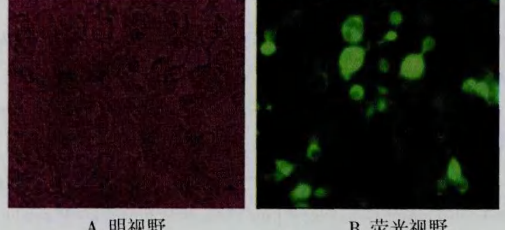
2.4　慢病毒载体的包装及鉴定

将慢病毒载体在 293 T 细胞中进行包装，于 48 h 后在荧光显微镜下观察见大量绿色荧光，表明病毒包装成功（见图 5、6）；同时收集细胞上清液，进行病毒滴度测定。



A. 明视野　　B. 荧光视野

图5　转染293 T细胞48 h后，观察pWPXL-GFP细胞（×200）

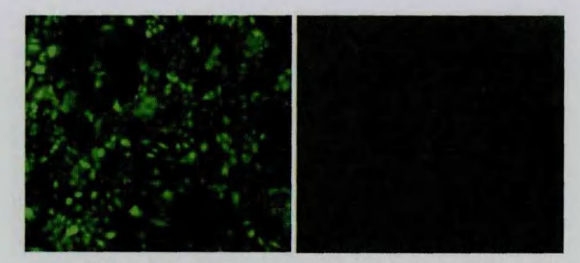


A. 明视野　　B. 荧光视野

图6　转染293 T细胞48 h后，观察pWPXL-CYP-GFP细胞（×200）

2.5　慢病毒感染 A549 细胞

包装好的慢病毒感染 A549 细胞后，荧光显微镜下，观察慢病毒的感染效率，与对照细胞（A、pWPXL-GFP）相比可看到绿色荧光，均匀分布于 A549 细胞中（图 7）。



A. 转染 GFP 的细胞　　B. CYP 和 GFP 共转染的细胞

图7　慢病毒感染A549细胞，荧光显微镜下观察感染效率（×100）

2.6　激光共聚焦显微镜观察 pWPXL-CYP-GFP 在 A549 中的表达及定位

激光共聚焦显微镜观察：进行 DAPI 染色后的细胞，可看到细胞核呈蓝色，轮廓清晰（图 8）。感染 pWPXL-GFP 的细胞中，绿色荧光弥散分布于细胞核周围（图 9A），而感染 pWPXL-CYP-GFP 的细胞中，绿色荧光广泛分布于胞浆及胞核，并且在核中富集，说明 pWPXL-CYP-GFP 在胞核和胞浆中都表达（图 9B）。结合（图 9、10、11）可看到 A549 细胞形态没有明显改变。



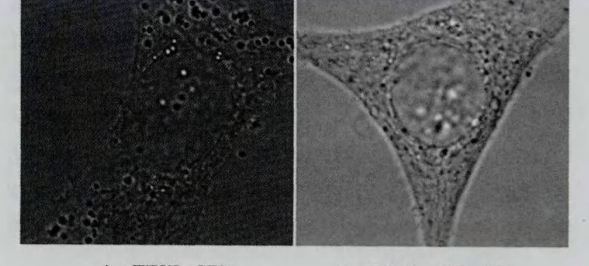
A. pWPXL-GFP　　B. pWPXL-CYP-GFP

图 8　DAPI 染色后，激光共聚焦显微镜观察 A549 细胞



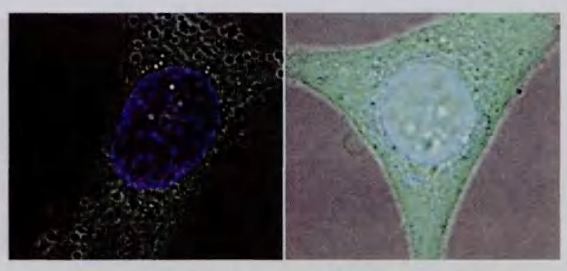
A. pWPXL-GFP　　B. pWPXL-CYP-GFP

图 9　激光共聚焦显微镜荧光视野下观察 A549 细



A. pWPXL-GFP　　B. pWPXL-CYP-GFP

图 10　激光共聚焦显微镜白光视野下观察 A549 细胞



A. pWPXL-GFP　　B. pWPXL-CYP-GFP

图 11　激光共聚焦显微镜下，光线叠加观察 A549 细胞

3　讨　论

现在，肺癌成为世界上死亡率最高的癌症之一，全球每年有超过 100 万人确诊。流行病学调查表明，肺癌与吸烟的关系十分密切，主要是因为烟草中含有多环芳烃（Polycyclic aromatic hydrocarbon，PAH）以及烟草特有亚硝胺 4-（甲基亚硝氨基）-3-吡啶-1-丁酮[4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone，NNK]等多种致癌物质。CYP2A13 对多种药物和毒物有代谢活化作用，其中以对烟草特有亚硝胺类化合物 NNK的代谢活化作用最为显著。CYP2A13 可通过对 NNK 的 α-羟化作用使其转化为致癌作用更强的 DNA 加合物，促进肿瘤的发生发展。CYP2A13 在 NNK 的代谢活化过程中起着重要的作用，一些学者认为 CYP2A13 是目前发现的代谢 NNK 最强的 CYP 酶[7]，而且，CYP2A13 在呼吸系统表达最多，因此，该酶可能在呼吸系统肿瘤的发生及发展中有重要的作用，它在吸烟引起肺癌发生的环节中所起的作用正逐渐成为研究的热点。

自从 1990 年世界上第 1 例针对重症联合免疫缺陷综合征（Severe combined immunodeficiency disease，SCID）的人体基因治疗获得成功以后，基因治疗的研究进展十分迅速。由于近年来肿瘤的发病率不断上升，而且缺乏有效地治疗手段，预后差，所以肿瘤的基因治疗是目前的研究热点。目前基因转染的方法很多，病毒转染是最近的研究热点。病毒载体包括腺病毒、单纯疱疹病毒和慢病毒等。与其他相比，慢病毒载体具有转染效率高、安全性好、免疫原性小的优点[8-10]，近年来被广泛的应用在基因治疗领域。

本研究构建了稳定表达人 CYP2A13 基因的慢病毒载体，将 CYP2A13 基因（目的基因）连接到慢病毒载体上。载体质粒共转染 293 T 细胞 24 h 后通过荧光显微镜观察到绿色荧光，说明病毒包装成功，同时进行病毒滴度检测，pWPXL-CYP-GFP 的滴度为 6×10^5 U/ml。为了验证所构建载体的活性与安全性，将包装后的慢病毒载体转染体外培养 A549 细胞，通过荧光显微镜观察和 Real-time PCR 的方法证实，携带人 CYP2A13 基因和 GFP 基因的慢病毒载体可在体外成功转染肺癌 A549 细胞，传代后可持续表达 CYP2A13。而且，通过激光共聚焦显微镜观察对 CYP-GFP 的表达进行定位，CYP-GFP 均匀的在胞浆中表达。近年来，虽然已经有不少利用慢病毒构建基因转染载体的研究，但是还没有同时进行 CYP2A13 和 GFP 基因转染的研究。本实验在 CYP2A13 基因转染的同时加入了报告基因 GFP，这将更加有利于转染后对标记的蛋白质进行细胞内的活体观察。

综上，本实验成功构建了 CYP2A13 和 GFP 基因共表达的慢病毒载体，具有良好的转染活性，转染 A549 后并未对细胞的生物活性产生影响，为 A549 细胞的基因转染提供了较为安全的载体工具。

参　考　文　献

[1] Zhang X，D'Agostino J，Wu H.CYP2A13：variable expression and role in human lung microsomal metabolic activation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone [J].J Pharmacol Exp Ther，2007，323(2)：570-578.

[2] Su T，Bao Z，Zhang Q Y.Human cytochrome P450 CYP2A13：predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen，4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone[J].Cancer Res，2000，60(18)：5074-5079.

[3] He X Y，Tang L，Wang S L，et al.Efficient activation of aflatoxin B1 by cytochrome P450 2A13，an enzyme predominantly expressed in human respiratory tract[J].Int J Cancer，2006，118(11)：2665-2671.

[4] Fukami T，Katoh M，Yamazaki H.Human cytochrome P450 2A13 efficiently metabolizes chemicals in air pollutants：naphthalene，styrene，and toluene[J].Chem Res Toxicol，2008，21(3)：720-725.

[5] Nakajima M，Itoh M，Sakai H.CYP2A13 expressed in human bladder metabolically activates 4-aminobiphenyl[J].Int J Cancer，2006，119(11)：2520-2526.

[6] He X Y，Shen J，Ding X，et al.Identification of critical amino acid residues of human CYP2A13 for the metabolic activation of 4-(methylnitrosamino)-1-3-pyridyl)-1-butanone，a tobacco-specific carci- nogen[J].Drug Metab Dispos，2004，32(12)：1516-1521.

[7] Nakajima M.Smoking behavior and related cancers：the role of CYP2A6 polymorphis[J].Curr Opin Mol Ther，2007，9(6)：538-544.

[8] Lundstrom K.Latest development in viral vectors for gene therapy [J].Trends Bioteehnol，2003，21(3)：117-122.

[9] Mandel R J，Burger C，Snyder R O.Viral vectors for in vivo gene transfer in Parkinson's disease：properties and clinical grade production [J].Exp Neurol，2008，209(1)：58-71.

[10] Wizerowicz M，Trono D.Harnessing HIV for therapy，basic research and bio-technology[J].Trends Biotechnol，2005，23(1)：42-47.

（责任编辑：张学颖）