DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.02.007

人凝血因子Ⅸ基因(pKG_5-Ⅸ)直接注入小鼠骨骼肌中瞬间表达的研究*

谭 骏 王 燕 纪贤文 刘 昕 朱锡华 (第三军医大学基础部分子遗传学教研室) 630038
薛京伦 邱信芳 (复旦大学遗传学研究所) 200433

提 要 我们将带凝血Ⅸ因子基因cDNA的pKG_5-Ⅸ裸DNA直接注入小鼠骨骼肌内,注射后第14天取小鼠血分离血清进行研究。结果显示:十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析中能清晰地看到一与凝血因子Ⅸ cDNA表达相关的特定蛋白带,进一步的实验Western Blot、ELISA及一期法有力地证实了SDS-PAGE结果,人FⅨ基因转移小鼠出现55 kD特异带与人FⅨ相符,即证明它确系人FⅨ。

关键词 因子Ⅸ;基因表达;Western Blot;SDS-PAGE*
中图法分类号 Q343.1;R973.1

血友病B是由于凝血因子Ⅸ缺乏所致的一种严重出血性疾病。年发病率大约30万分之一。血友病B临床治疗主要靠输血或补充人Ⅸ因子浓缩剂。但经常输血不仅费用昂贵,而且使患者面临着艾滋病毒及肝炎病毒感染的威胁。自1982年人凝血因子Ⅸ cDNA被克隆以来[1],世界各国学者对血友病B的基因治疗实验研究做了大量的工作,但是多采用二步法,即将受体细胞在体外培养并导入外源基因,然后把已经遗传修饰的受体细胞作整体性外源基因表达研究。1990年,Wolff等报道将外源DNA直接注入小鼠骨骼肌中,其表达率与用成纤维细胞受体的二步法基因治疗研究处于同一数量级,表达持续时间长达2个月[2,3]。从而开辟了基因治疗实验研究的新领域。我们首次将带有凝血Ⅸ因子基因cDNA的pKG_5-Ⅸ裸DNA直接注入小鼠骨骼肌内,在小鼠血清中检测到具有凝血活性的人凝血因子Ⅸ。

1 材料与方法

1.1 材料

pKG_5-Ⅸ由英国牛津大学G·G Brownlee赠送,鼠抗人Ⅸ因子单克隆抗体3A6由日本奈良医学院Yoshioka赠送,辣根过氧化酶标记的猪抗鼠IgG抗血清由第三军医大学白云博士提供,乏Ⅸ因子基质血浆由第三军医大学西南医院提供,小鼠为本校动物所BALB/c小鼠,均为雄性,体重15~17 g。

1.2 小鼠骨骼肌注射方法

将小鼠随机分成3组,A组(5只):实验组,在每只小鼠左后肢肌注pKG_5-Ⅸ质粒30μg;B组(5只):对照组,每只小鼠左后肢肌注pKG_5质粒30μg;C组(5只):空白对照组,每只小鼠肌注TE 150μl,注射方法同前。分笼饲养于注射后第14天取小鼠血(各组)分离血清。

1.3 SDS-PAGE及Western Blot检测小鼠血清中人Ⅸ因子表达产物

SDS-PAGE:采用垂直平板电泳,按Molecular Cloning方法[1],用12%分离胶和3%浓缩胶,120V恒压电泳8 h。0.1%硝酸银染色。

Western Blot将肌注pKG_5-Ⅸ实验组4"小鼠血清和空白对照组小鼠血清以2倍稀释后做Western Blot检测,方法按Molecular Cloning[1]首先将小鼠血清做SDS-PAGE,其中分离胶为10%,浓缩胶为3%,以100 V恒压电泳8 h,电泳后胶膜剪下一条用0.1%硝酸银染色,观察电泳蛋白带的分离效果。其它的胶板夹在滤纸和电极液浸湿的硝酸纤维素膜中,以40 V恒压电泳16 h(室温)进行电转移,切下一条转移后的硝酸纤维素膜(低分子标准蛋白带)用氨基黑做蛋白染色。然后将其余的硝酸纤维素膜封于塑料袋中作免疫测定,先加入1:500稀释的3A6鼠抗人Ⅸ因子抗体,室温下作用2 h,再加入1:150稀释辣根过氧化酶标记的猪抗鼠IgG抗体室温下作用1 h,以DAB(3.3-二氨基联苯胺)作底物显色。

1.4 小鼠血清中Ⅸ因子含量测定

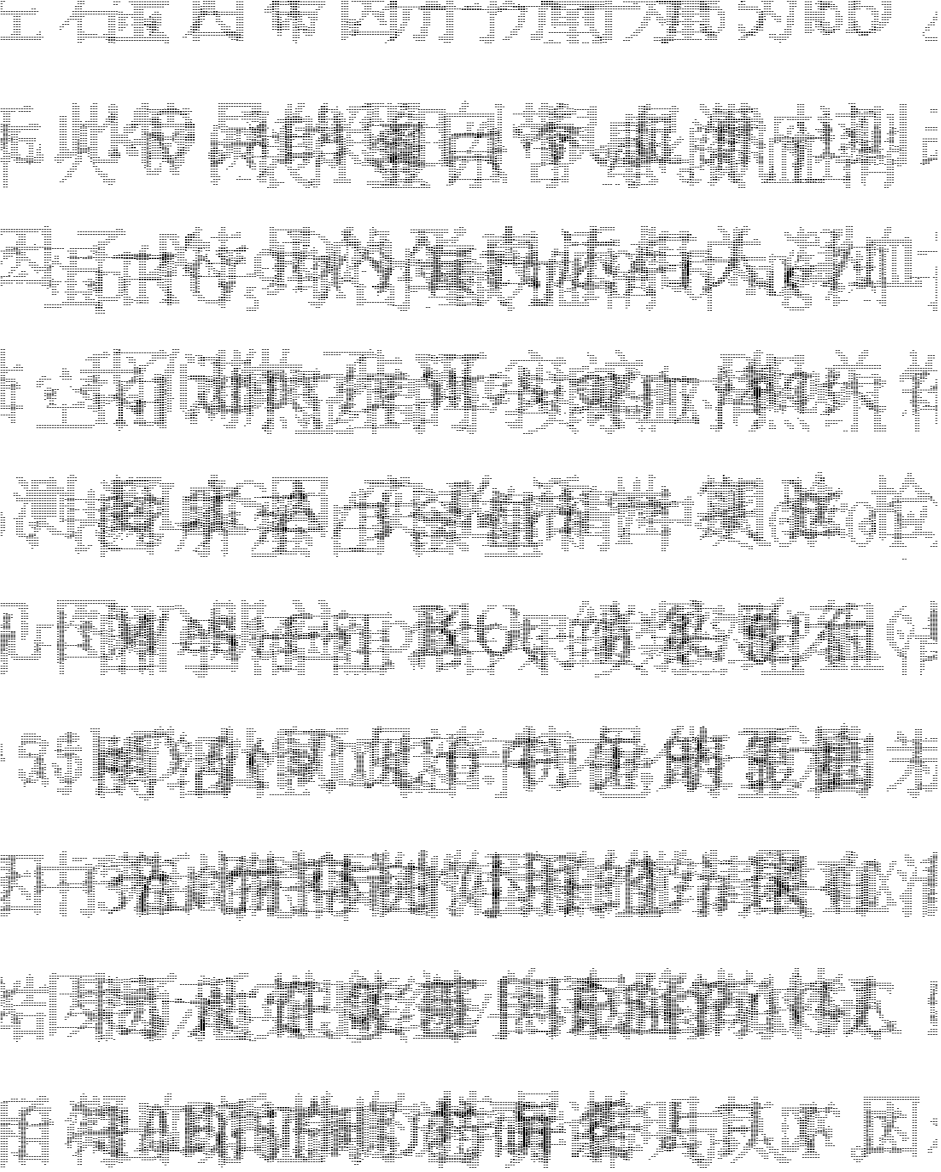
Ⅸ因子蛋白含量用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定[5]:将小鼠血清稀释1:10包被酶标板(内含NC膜),加入1:4000稀释的3A6鼠抗人Ⅸ因子抗体,再加入辣根过氧化酶标记的猪抗鼠IgG抗体,以OPD(邻苯二胺)作为底物显色,读取490 nm波长的OD值。Ⅸ因子凝血活性用一期法测定,在王鸿利报道的方法[6]上加以修改,每次ELISA或一期法测定均用一对倍稀释的混合正常人血浆制备标准曲线(1:10~1:640)。

1.5 3A6抗体对小鼠血清中人Ⅸ因子活性抑制作用的测试

将鼠抗人Ⅸ因子单克隆抗体3A6的腹水原液以2.5%的终浓度加入以1:10稀释的肌注pKG_5-Ⅸ质粒小鼠血清标本中,置

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1 小鼠血清中人Ⅸ因子蛋白含量

Tab 1 The amount of human factor Ⅸ in the mouse serums

Sample	Factor Ⅸ antigen (ELISA assay)	
	Account for normal plasma (%)	ng/ml
Test (pKG_5-Ⅸ)	0.99±0.198	49.5
Test control (pKG_5)	0.18±0.102	9
Blank control (TE)	0.20±0.009	10

$n=5$, $P<0.01$

表2 小鼠血清中人Ⅸ因子活性

Tab 2 The activity of human factor Ⅸ in the mouse serums

Sample	Activity factor Ⅸ (one-stage assay)	
	Account for normal plasma (%)	ng/ml
Test (pKG_5-Ⅸ)	0.75±0.164	37.5
Test control (pKG_5)	0.16±0.007	8
Blank control (TE)	0.17±0.101	8.5

$n=5$, $P<0.01$

表3 3A6抗体对小鼠血清中人Ⅸ因子活性抑制作用

Tab 3 3A6 antibody inhibition to human factor Ⅸ in the mouse serums

Sample	Clotting Time (second)
Test (pKG_5-Ⅸ)	397
Control (pKG_5)	198

$n=5$, $P<0.01$

从我们的实验结果中发现，实验组5只小鼠血清中人凝血因子Ⅸ表达产物的量有很大差异。SDS-PAGE硝酸银染色（灵敏度达0.1～1 ng/带）[4]分析，小鼠4#血清中特异蛋白带颜色最深（见图3），而小鼠1#血清中特异蛋白带颜色最浅（没有提供照片）。ELISA实验也证实了小鼠4#血清中凝血因子Ⅸ蛋白含量（150 ng/ml）是小鼠1#（15.2 ng/ml）的10倍。我们认为这与pKG_5-Ⅸ进入细胞后的存在状态有关，很值得深入研究。但是可以预料这一新策略在人类基因治疗研究领域中具有很广阔的应用前景。

参考文献

1 Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor Ⅸ. Proc Natal Acad Sci USA, 1982, 79: 6461

2 Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science, 1990, 247: 1465

3 麦 跃，谭 骏，等. 基因治疗的新策略——外源基因直接注射法. 国外医学：遗传学分册，1993, 2: 66

4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Detection and Analysis of Proteins Expressed from Cloned Genes——SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 18: 47

5 戴一凡，刘 坚，邱信芳，等. 人凝血因子Ⅸ基因在中国仓鼠卵巢细胞中的转移及表达. 科学通报，1989, 12: 932～934

6 王鸿利，李盛华，文立民，等. 凝血因子Ⅷ和Ⅸ凝血活性一期法测定及其临床意义的探讨. 中华医学检验杂志，1983, 6 (3): 156

（收稿：1993-05-31；修回：1993-09-15）

Expression of human clotting factor Ⅸ in mice after intramuscular injection of DNA constructs

Tan Jun, Wang Yan, Ji Xianwen, Liu Xin, Zhu Xihua (Department of Medical Genetics, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Xue Jinglun, Qiu Xinfang (Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai, 200433)

Abstract DNA expression vector containing the gene for human clotting factor Ⅸ (pKG_5-Ⅸ) was injected into the skeletal muscle of mice in vivo. Protein expression was detected 14 days after injection in all the mice with SDS-PAGE, Western Blot, ELISA and one-stage assay.

Key words factor Ⅸ; gene expression; blotting, western; SDS-PAGE

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net