

【研究简报】

含有人凝血因子Ⅸ自身内含子Ⅰ的反向逆转录病毒载体构建及表达

王宏伟 包云 邢永娜 杨晓青
施前 卢大儒 邱信芳 薛京伦

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433;)

关键词 hFIX cDNA intron I 反转录病毒载体 基因治疗

目前基因治疗研究遇到的普遍问题是转染效率低下及目的基因蛋白在活体表达水平较低, 其中解决目的基因表达较低的一个重要手段便是基因载体的改造. 1990年, Jallat^[1]等人在转基因小鼠研究中发现: hFIX cDNA 的表达量低, 而其余一系列带有完整内含子Ⅰ或中间缺失 4.8 kb 的内含子Ⅰ的转基因小鼠, 其表达都和完整的Ⅸ因子表达相仿. 这提示Ⅸ因子内含子Ⅰ顺序对其表达有一定的促进作用. 1995年, Kurachi 等人^[2,3]用含内含子Ⅰ片段的表达质粒转化 HepG2 细胞, 发现瞬间表达要比 cDNA 高出 7 倍, 其凝血活性和细胞内 mRNA 水平也有相应数量的提高. 本实验室也进行了 hFIX intron I 的研究工作, 构建了逆转录病毒载体 G1NaCi'IX, 但对病毒上清进行 RT-PCR 检测, 发现 intron I 常被不同程度剪切. 本文以 SN-MBAAIXm 为蓝本, 构建了反向表达载体 G1NaPai'IXBAM, 其中Ⅸ因子转录方向与 LTR 转录方向相反, 以期避免病毒包装中将 intron I 剪切掉, 使 intron I 结构能够正确引入到靶细胞中, 从而提高Ⅸ因子的表达量.

1 材料与方法

(i) 实验材料: (1) 各种限制性内切酶, T4-DNA 连接酶均为美国 New England Biolabs 公司产品; CIP 为德国 Boehringer-Mannheim 公司产品; G418, polybrene, ABTS, BSA, dNTP 均为美国 Sigma 公司产品; Taq 酶购自复旦大学遗传研究所; (2) SNMBAAIXm 质粒由美国密歇根医学中心姚寿南博士赠送; G1Na 载体由第一军医大学生化教研室彭朝晖教授赠送; pMP6 由美国 James Larrick 教授赠送; (3) 逆转录病毒包装细胞 PA317 购自美国 ATCC 公司; C2C12

- 4 王 宪, 唐跃明, 邢宇彤, 等. 内毒素引起大鼠脊髓降钙素基因相关肽(CGRP)释放. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 10: 127~130
- 5 Saria A, Bernatzky G, Humpel C, et al. Calcitonin gene-related peptide in the brain: neurochemical and behavioral investigation. Ann NY Acad Sci, 1992, 657: 164~169
- 6 Goetzl E J, Grotmol T, Vandyke R W, et al. Generation and recognition of vasoactive intestinal peptide by cells of the immune system. Ann NY Acad Sci, 1990, 594: 34~44
- 7 Schiogolev S A, Goetzl E J, Urba W J, et al. Appearance of neuropeptides in ascitic fluid after peritoneal therapy with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for intraabdominal malignancy. J Clin Immunol, 1989, 9: 169~173

(1997-04-16 收稿, 1997-07-15 收修改稿)

细胞由美国密歇根医学中心姚寿南博士赠送;(4)鼠抗人Ⅸ因子单克隆抗体 3A6 由日本奈良医学院Yoshioka 博士赠送;兔抗人Ⅸ因子抗血清和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗血清系美国 CalbioChem-Berhing 公司产品;(5)intron I-hFIX cDNA 检测引物为: 5'-GAAATTGGCTTTCAGATTAT-3' (+链,6212~6231, intron I 内), 5'-GGCCGATTCA-GAATTTTGTGTC-3'(-链,6346~6368, Exon2 内)。

(ii)方法:(1)逆转录病毒载体的构建、包括碱法提取质粒 DNA、酶切、连接、DNA 片段分离及回收、细菌转化等均按 Sambrook 等的方法进行^[4]。(2)磷酸钙介导基因转移参照 Sambrook 等介绍的改良法进行^[4]。(3)C2C12 细胞用 DMEM 加 10% 小牛血清,青链霉素(100 U/mL)培养。将生长状态良好的产病毒细胞置于 32℃ 培养 24 h 后,过滤上清用于感染 C2C12 细胞,400 μg/mL G418 选择 2 周,取混合克隆作进一步分析。(4)逆转录病毒上清 RT-PCR:病毒 RNA 提取见文献[5],PCR 按以下条件扩增:90℃ 30s, 45℃ 30s, 70℃ 2min,重复进行 30 个周期。(5)细胞培养液中人凝血因子Ⅸ抗原含量的测定采用酶联免疫吸附分析方法(ELISA)^[6]。

2 结果

2.1 含 hFIX 自身 intron I 的反向载体 G1NaPAi'IXBAM 的构建

G1NaPAi'IXBAM 的构建过程见图 1,主要分两步进行:(a)用内切酶 Xho I 和 BamH I 对 SNMBAIXm 进行部分酶切,回收 3.2 kb 的片段;同时用上述酶酶切 G1Na 载体,将两者连接得到 G1NaPAi'IXBAM;(b)用 BamH I 和 Sal I 酶切 pM26 回收 200 bp 的 SV40poly(A),插入 G1NaPAi'IXBAM 中 hFIX 基因下游,得到带 hFIX 自身 intron I 的反向转录的逆转录病毒载体 G1NaPAi'IXBAM。

2.2 病毒颗粒及被转染的 C2C12 细胞中 hFIX 自身 intron I 的鉴定

用磷酸钙沉淀法将反向载体 G1NaPAi'IXBAM 转入 PA317 细胞,G418 选择 2 周后取混合克隆培养,上清用来感染 C2C12 细胞,同样条件选择后取混合克隆培养。为证实反向载体中 intron I 是否存在于靶细胞中,我们在 intron I 3'端及 hFIX Exon2 之间设计了一对引物(图 2 单箭头所指位置),分别对 PA317、C2C12 细胞进行 PCR 分析(图 3);对病毒颗粒进行 RT-PCR 分析(图 4),结果均为阳性,说明在病毒包装过程中反向载体携带的 intron I 结构没有被剪切掉。

2.3 正反向载体离体表达比较

正反向载体转染 PA317、C2C12 所得混合细胞克隆分别计数 10^6 , 24 h 后取上清进行 ELISA 检测,结果见表 1。

表 1 带 hFIX 自身 intron I 的正反向载体离体表达量比较^{a)}

载体	PA317	C2C12
SNMBAIXm	116	158
G1NaPAi'IXBAM	417	495

a) 单位:ng(以上数据为 10^6 细胞、24 h 表达量)

携带反向载体的细胞 hFIX 表达量均高于正向载体,这可能是由于正向载体在病毒包装过程中 intron I 常常被剪切,而反向载体中却保留了 intron I 结构,从而起到增强表达的结果。

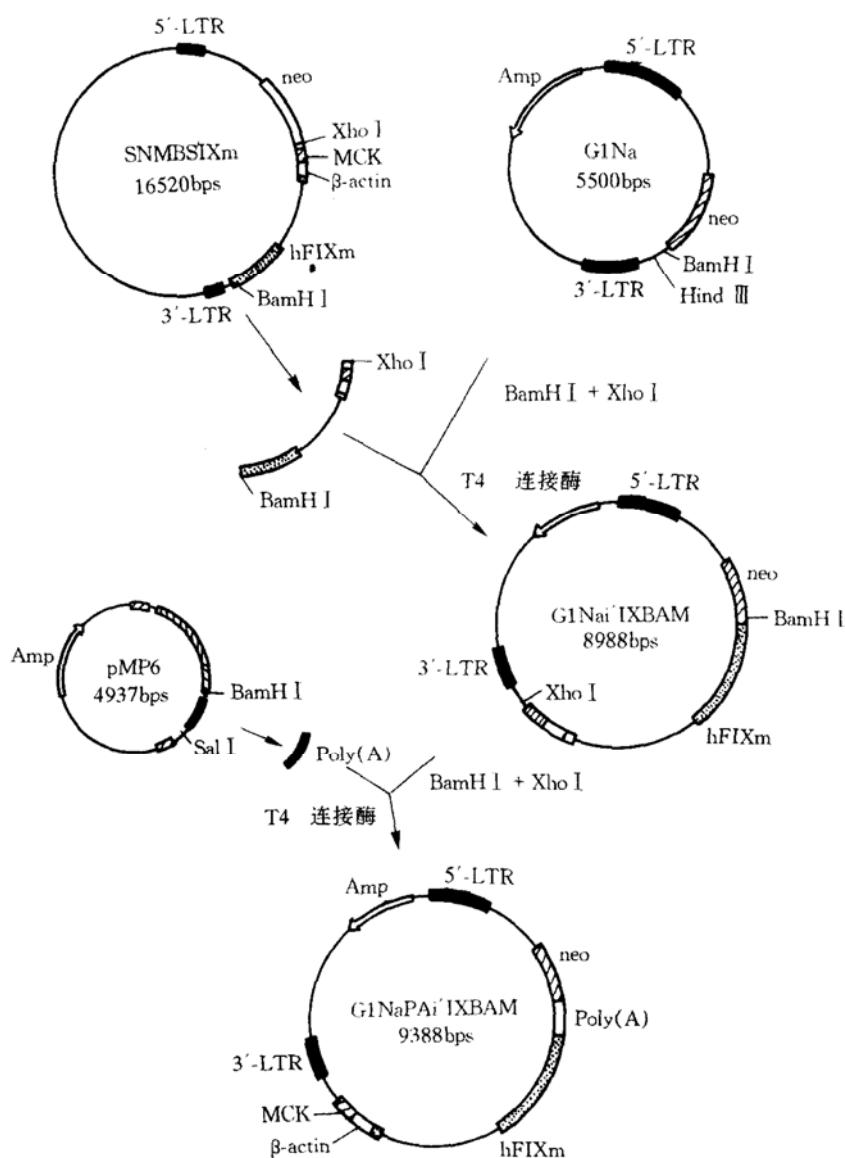


图1 G1NaPAi'IXBAM 构建示意图

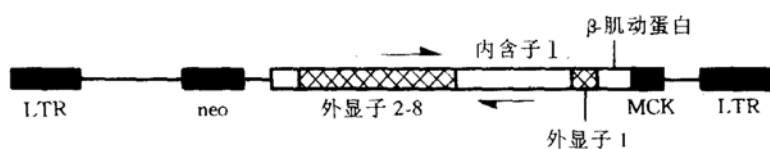


图2 G1NaPAi'IXBAM 结构及 PCR 引物位置

3 讨论

近年来,人们对内含子的功能提出了许多新的见解,内含子在染色体的特定结构和基因功能之间的相互关系中起着重要作用. 目前在许多基因的内含子特别是内含子 I 中都发现了转

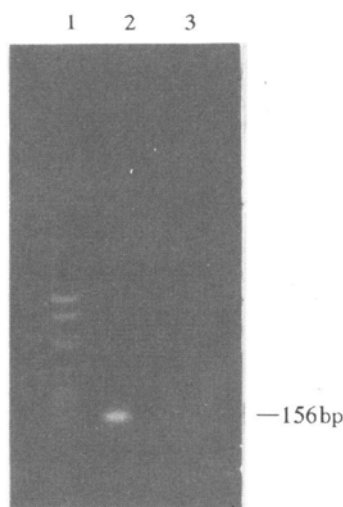


图 3 细胞中 hFIX intron I 的 PCR 检测

1——pBR322/Msp I Marker, 2——C2C12/G1NaPAi' IXBAM, 3——PA317/G1NaPAi' IXBAM, 4——C2C12 (阴性对照)

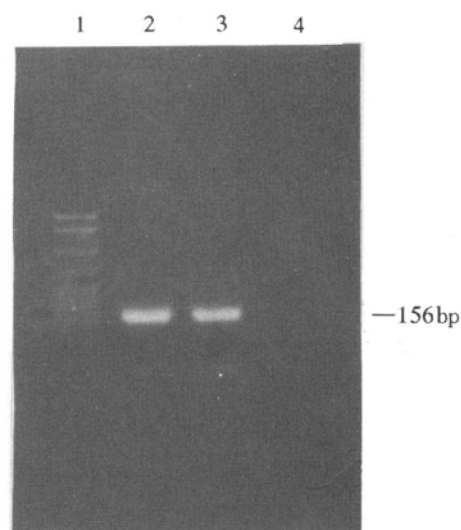


图 4 G1NaPAi' IXBAM 病毒颗粒中 intron I 的 RT-PCR 检测

1——PBR322/Msp I Marker, 2——PA317/G1NaPAi' IXBAM 上清病毒颗粒, 3——PA317 上清(阴性对照)

录调控元件,主要是增强子,也有弱化子和静息子,这些顺序大多是 DNase I 的超敏位点,故而体现出基因表达的组织特异性. 内含子在转录后的调控作用目前则主要认为与内含子 I 的剪切有关,内含子在剪切过程中不但能参与 5'端加帽和 3'端 polyA 的形成从而提高 mRNA 的稳定性,而且前体 RNA 与剪切体形成的复合物还能保护新生 RNA 不受核 RNA 酶降解,并通过核内的微梁骨架系统促进 mRNA 向胞质运输^[7].

为此,在基因治疗研究中人们希望把内含子结构引入逆转录病毒载体结构中,然而常规构建的正向载体在病毒包装过程中常常将内含子剪切掉,从而无法将内含子结构带入到靶细胞中. 本文构建的反向表达载体 G1NaPAi' IXBAM,其 IX 因子转录方向与 LTR 转录方向相反,这样可避免病毒包装过程中将内含子剪切掉. 实验结果证明病毒颗粒中确实存在着内含子,并在靶细胞中取得比正向载体约高 3 倍的表达量,这说明反向载体的高表达极有可能是内含子的作用. 当然本文正反向载体不是同一框架:正向载体来自 LNL6 框架^[8],反向载体来自 G1Na 框架^[9],但两者极为相似,GaNa 为 LNL6 的衍生物,仅在 neo 基因下游缺失掉约数百碱基的非编码顺序,旨在进一步提高其安全性,对目的基因的表达无任何影响. 况且正反载体表达相差 3 倍之多,这是 LNL6 与 G1Na 的差异所无法达到的. 因此我们作出上述推测.

有报道^[10]称反向构建的逆转录报道载体会影响病毒滴度,因为反向基因的转录与 LTR 启动的病毒转录有可能相互干扰,影响病毒 RNA 的产量,从而降低滴度,但我们构建的反向载体病毒滴度并没受到影响,从离体感染 C2C12 细胞的克隆形成率来看与正向载体无明显差异. 另外此病毒悬液进行奶羊乳腺活体直接注射,也取得了很好的表达效果(另文发表),说明病毒滴度并未受到影响.

致谢 本工作为国家“八六三”高技术重大项目[批准号:863-102-17-(2)]和上海市科技发展基金(批准号:95JC14009)资助项目.

【研究简报】

玻璃掺杂固溶半导体($\text{Zn}_x\text{Cd}_{1-x}\text{S}$)纳米微晶
的溶胶-凝胶制备及光学性质研究

师文生 张良莹 姚 熹

(西安交通大学电子材料与器件研究所, 西安 710049)

关键词 溶胶-凝胶(Sol-Gel) 固溶半导体($\text{Zn}_x\text{Cd}_{1-x}\text{S}$) 纳米微晶 吸收边

玻璃掺杂半导体量子点材料表现出明显的量子限域作用和三阶非线性光学效应^[1],它在制造全光学集成元件的应用前景越来越受到人们的重视. 在这类材料的研究中一个很重要的问题就是:材料在具有大的非线性效应的同时还应具有合适的线性和非线性吸收. 因为材料的非线性值不但与非线性系数($\chi^{(3)}$ 或 n_2)成正比,而且与吸收系数成反比. 但目前非线性系数比较大的一类直接能隙半导体具有确定的吸收边,例如 CdS 和 ZnS 的吸收边分别为 2.42 和 3.8 eV,这就决定了它们的吸收特性的可调性很小. 尽管可以通过量子尺寸效应改变其吸收边,但这种改变也是很有限的. 从应用的角度来看,希望材料的吸收边能够根据需要而调整.

参 考 文 献

- 1 Jallat S, Perraud F, Dalemans W, et al. Characterization of recombinant human factor IX expressed in transgenic mice and derived trans-immortalized hepatic cell lines. *EMBO J*, 1990, 9: 3 295~3 301
- 2 Kurachi S, Hitomi Y, Furukawa M, et al. Role of intron 1 in expression of the human factor IX gene. *J Biol Chem*, 1995, 270(10): 5 276~5 281
- 3 Wang J M, Zheng H, Sugahara Y, et al. Construction of human factor IX expression vectors in retroviral vector frames optimized for muscle cells. *Human Gene Therapy*, 1996, 7: 1 743~1 756
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 5 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156~159
- 6 Wang H W, Zheng B, Xue J L, et al. Expression of human clotting factor IX with EBV shuttle vector. *Chinese Science Bulletin*, 1995, 40(21): 1 829~1 833
- 7 邱晓云, 卢大儒, 邱信芳. 内含子在基因表达调控中的作用. *国外医学遗传学分册*, 1996, 19(1): 44~48
- 8 Yao S N, Wilson J M, Nabel E G, et al. Expression of human factor IX in rat capillary endothelial cells: toward somatic gene therapy for hemophilia B. *PNAS*, 1991, 88(18): 8 101~8 105
- 9 Miller A R, Skotzko M J, Rhoades K, et al. Simultaneous use of two retroviral vectors in human gene marking trials: feasibility and potential applications. *Human Gene Therapy*, 1992, 3(6): 619~624
- 10 Jonsson J J, Habel D E, McIvor R S. Retrovirus-mediated transduction of an engineered intron-containing purine nucleoside phosphorylase gene. *Human Gene Therapy*, 1995, 6(5): 611~623

(1997-02-20 收稿, 1997-07-30 收修改稿)