

一种可药物筛选及体内检测的新型慢病毒基因治疗载体的构建

许辰煜^{1,2}, 顾颖^{1,2}, 侯汪衡^{1,2}, 程通^{1,2}, 张涛^{1,2}, 阙玉琼^{1,2}, 高双全^{1,2}, 张军^{1,2}, 韩家准², 夏宁邵^{1,2}

1 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361005

2 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

摘要: 为实现基因治疗过程中的有效药物筛选及体内检测, 首次利用核糖体内部进入位点(IRES)构建了同时携带 O6-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶(MGMT)的突变型 P140K 基因和荧光素酶(Luciferase)基因的慢病毒载体 pBobi-MIL。RT-PCR、免疫荧光、药物筛选克隆形成及化学发光检测等实验结果表明感染重组慢病毒 L-MIL 的细胞能同时表达 MGMT 及 Luciferase。构建成功的新型慢病毒载体为今后的基因治疗奠定了基础, 也为慢病毒滴度的确定提供了一种新的可能。

关键词: 基因治疗, 慢病毒载体, 体内检测, MGMT, Luciferase

Construction of a Novel Gene Therapy Lentiviral Vector for Drug Resistant Selection and Detection *in vivo*

Chenyu Xu^{1,2}, Ying Gu^{1,2}, Wangheng Hou^{1,2}, Tong Cheng^{1,2}, Tao Zhang^{1,2}, Yuqiong Que^{1,2}, Shuangquan Gao^{1,2}, Jun Zhang^{1,2}, Jiahuai Han², and Ningshao Xia^{1,2}

1 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: Lentiviral vectors were powerful gene delivery tools for gene therapy. We developed a new lentiviral vector pBobi-MIL that constitutively expressed O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and Luciferase, linked by the internal ribosomal entry site (IRES), to realize drug tolerance and real time monitoring *in vivo*. All results from RT-PCR, drug treating clones forming, immunofluorometric assay and chemiluminescence detection showed that cells infected by recombinant lentivirus L-MIL simultaneously expressed these two genes. This lays the foundation for the further research in gene therapy and can also help identify lentivirus titer.

Keywords: gene therapy, lentiviral vector, monitoring *in vivo*, MGMT, luciferase

随着 RNAi 等基因水平治疗技术的日益成熟, 基因治疗手段已被越来越多地应用于对各类疾病的

Received: April 24, 2007; Accepted: July 3, 2007

Supported by: from the Key S&T Projects of Fujian Province (No. 2004YZ01); Key Knowledge Innovation Project of MOE (No. 2004YZ01).

Corresponding author: Ying Gu. Tel: +86-592-2184110; Fax: +86-592-2181258; E-mail: guying@xmu.edu.cn

福建省科技重大专项资助(No. 2004YZ01); 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目资助(No.705031)。

治疗，特别是针对诸如艾滋病与癌症等恶性疾病。慢病毒治疗载体 pBobi 上的 U6 启动子可引导各种 RNAi 相关序列，从而达到不同的基因治疗目的。为实现基因治疗过程中的有效药物筛选及体内实时检测，本实验首次利用脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES 在 pBobi 上的 mPGK 启动子后同时引入 P140K 及 Luciferase 基因，从而构建了一种新型的多表达慢病

毒载体 pBobi-MIL。

1 材料与方法

1.1 实验相关引物

通过 oligo 设计 P140K、MGMT 及 IRES 相关引物(表 1)，并根据实验需要引入相关酶切位点及保护碱基。

表 1 PCR 引物
Table 1 PCR Primers

Gene	Primer	Sequence	Restriction Site
P140K	PKf	5'-TTTTCTAGAGCCATGGACAAGGATTGTGAAATGAAAC-3'	<i>Xba</i> I
	PKr	5'-TTTCTCGAGTTAGTTTCGGCCAGCAGGCG-3'	<i>Xho</i> I
Luciferase	Lucf	5'-TTTGGATCCCCATGGAAGACGCCAAAA-3'	<i>Bam</i> H I
	Lucr	5'-TTTCTCGAGTTACACGGCGATCTTCC-3'	<i>Xho</i> I
IRES	IRf	5'-TTTAAGCTTCCAATTCCGCCCTCPCR-3'	<i>Hind</i> III
	IRr	5'-TTTGGATCCGCTTATCATCGTGTTTTCAA-3'	<i>Bam</i> H I
G3PDH	G3f	5'-CACTGCCACCCAGAAGACTG-3'	-
	G3r	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	-

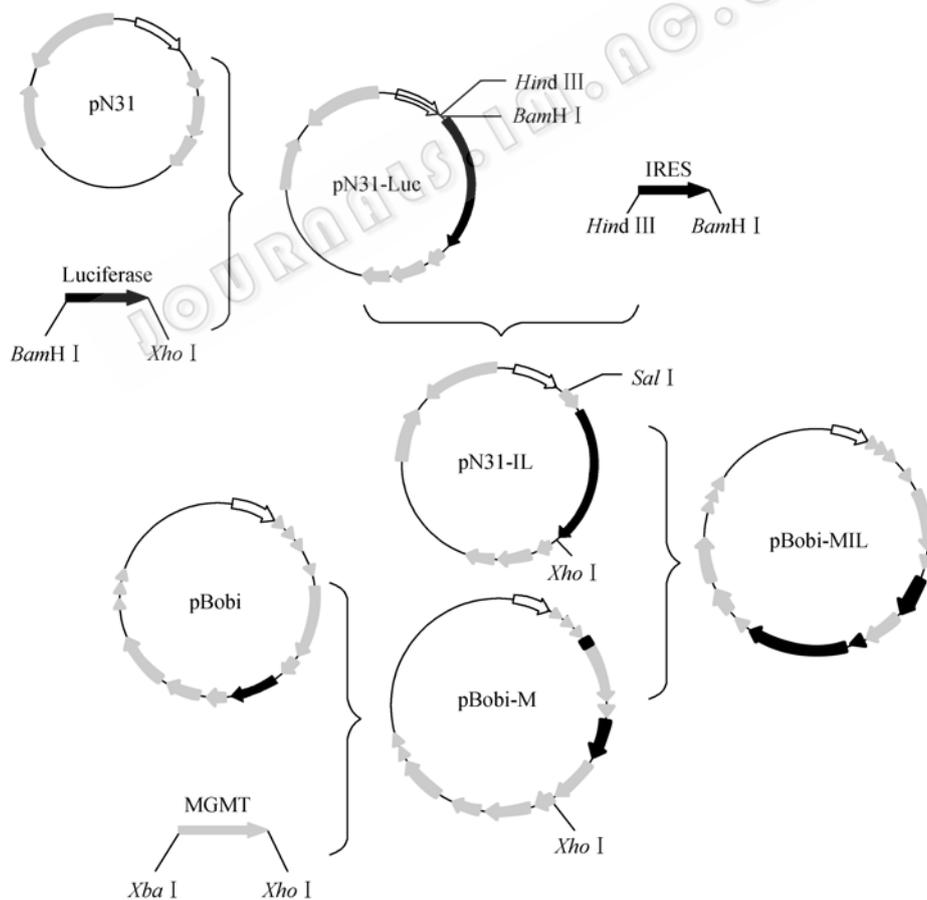


图 1 pBobi-MIL 质粒构建流程图
Fig. 1 Construction of pBobi-MIL

1.2 pBobi-MIL 载体的构建

P140K 相关 PCR 产物以 *Xba* I/*Xho* I 接入 pBobi 载体, 得到 pBobi-M; Luciferase 相关 PCR 产物以 *Bam*H I/*Xho* I 接入 pcDNA3.1+, 得到 pN31-Luc; IRES 相关 PCR 产物以 *Hind* III/*Bam*H I 接入 pN31-Luc, 得到 pN31-IL; 以 *Sal* I/*Xho* I 酶切 pN31-IL, 得到 IRES-Luc 片段, 接入 *Xho* I 单酶切的 pBobi-M, 鉴定正反插, 正插克隆即为 pBobi-MIL 载体(图 1)。

1.3 慢病毒的制备与浓缩

将慢病毒载体系统的 4 质粒(pBobi-MIL、pMDL、pRev、pVSVG)用磷酸钙沉淀的方法共转染 293FT 细胞。对照组以不含目的基因的载体 pBobi 替换 pBobi-MIL, 其余皆同。12 h 后换液, 换液后 48 h 收集培养上清, 用 0.22 μ m 滤膜过滤后, 4 $^{\circ}$ C 25 000 rpm 离心 90 min, 弃上清。用 1/50 体积的无血清 DMEM 4 $^{\circ}$ C 溶解过夜后分装后于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 所得浓缩病毒分别命名为重组慢病毒 L-MIL 及对照慢病毒 L-Mock。

1.4 慢病毒的感染

以 20 μ L/孔将浓缩病毒加入 24 孔板中的 293FT 细胞, 同时加入终浓度为 10 μ g/mL 的 polybrene, 600 \times g 离心感染 60 min, 培养 12 h 后换成正常培养基培养。

1.5 慢病毒自我感染能力的检测

收集病毒感染后 1 d 到 14 d 的细胞培养上清, 用 HIV p24 ELISA 检测试剂盒检测其 p24 水平, 以检验慢病毒的自我复制能力。

1.6 RT-PCR 检测

分别收集 L-MIL 及 L-Mock 感染后的 293FT 细胞, 用 Trizol 法提取总 RNA, 加入无 RNase 的 DNase I 消化质粒残余。将前述 P140K 及 Luciferase 引物和内参 G3PDH 引物(表 1)按一定比例混合成反转录和检测引物。用获得的 RNA 进行反转录, 取 2 μ L cDNA 产物为模板, 以检测引物进行 PCR 扩增。扩增后产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.7 MGMT 表达相关的免疫荧光检测

细胞感染病毒后 48 h, 经 4% 多聚甲醛固定, 0.3% Triton X-100 的 PBS 通透及大鼠血清封闭后, 加入 1: 100 稀释的 Mouse anti-human MGMT(BD biosciences), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤后加入 1: 100 稀释的 FITC Rat anti-mouse IgG1(Sigma), 4 $^{\circ}$ C 孵育 1

h, 取 DAPI(Sigma)染核 10 min, 制片于正置荧光显微镜下观察。

1.8 MGMT 相关的抗药性克隆形成能力检测

细胞感染病毒后 16 ~ 24 h, 换用无血清 DMEM, 并加入终浓度 100 μ mol/L 的 O⁶-苯甲基鸟嘌呤(BG); 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后, 再加入终浓度为 80 μ mol/L 的 1,3-二(2-氯乙烷)-1-亚硝基脲(BCNU); 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 换用含 10 μ mol/L BG 的无血清 DMEM 培养。37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后, 经上述药物处理的细胞以 100 个细胞/孔或 50 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板, 在含 10 μ mol/L BG 的完全培养基中培养 7 d 后用结晶紫的方法计算形成的细胞克隆数。

1.9 荧光素酶表达的检测

培养于 24 孔板的细胞感染病毒后 48 h, 用 Luciferase Activity 检测试剂盒(Promega)进行样本处理后, 放入 Orion II Microplate Lumiometer(Berthold)检测荧光素酶活性。

1.10 不同剂量病毒感染与荧光素酶表达的对应关系

将同一批次的浓缩病毒 L-MIL(对照组使用 L-Mock)以 2 倍浓度逐级稀释(最高浓度 400 μ L/孔), 另一孔不加病毒, 共 10 个梯度。以此分别感染 24 孔板中的 293FT 细胞, 3 d 后进行荧光素酶表达检测。

2 结果

2.1 pBobi-MIL 质粒的构建

在 pBobi-MIL 上, mPGK 及 U6 启动子及其引导的序列皆位于慢病毒基因整合信号内。其中 P140K 基因及 Luciferase 基因通过 IRES 前后相连, 共同由 mPGK 启动子引导表达; 下游 U6 启动子则可引导接入 MCS 的各种治疗性 RNAi 序列(图 2)。



图 2 慢病毒载体 pBobi-MIL 表达框示意图

Fig. 2 Schematic diagram of pBobi-MIL's expression cassettes

2.2 慢病毒安全性验证

慢病毒在感染细胞后, 细胞上清的 p24 水平迅速下降, 8 d 以后就降到本底水平, 被感染细胞无明显的 p24 表达(图 3)。

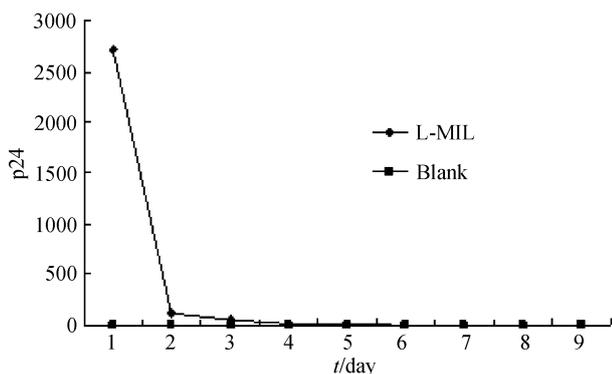


图3 慢病毒感染后细胞培养上清 p24 变化

Fig. 3 p24 levels in post-infected culture supernatant

2.3 RT-PCR 检测结果

PCR 扩增产物包含 3 种条带, 大小依次为 435 bp、641 bp 及 1660 bp, 分别对应 G3PDH、P140K 和 Luciferase; L-Mock 感染的细胞 PCR 扩增产物只有 G3PDH, L-MIL 感染的细胞则三者皆有, 后者存在对 P140K 及 Luciferase 的特异性转录(图 4)。

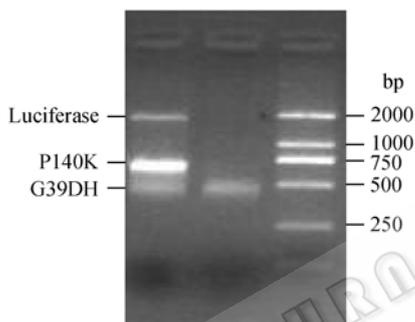


图4 RT-PCR 检测 MGMT 及 Luciferase 在感染病毒细胞中的转录

Fig. 4 Detection of MGMT and Luciferase transcription in infected cells by RT-PCR

1: L-MIL; 2: L-Mock; M: marker(DL2000)

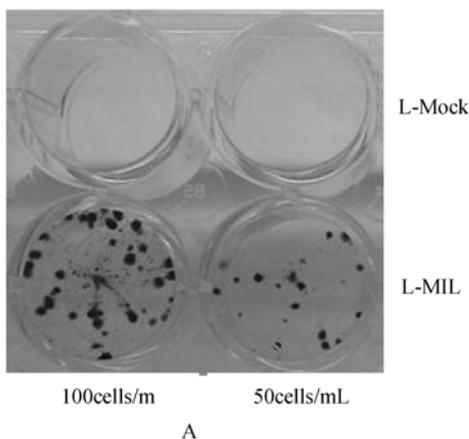


图6 BG/BCNU 作用后的细胞克隆形成比较

Fig. 6 Comparison of clones forming after BG/BCNU treatment

A. results of crystal violet staining; B: comparison of clone numbers

2.4 病毒感染后细胞 MGMT 相关的免疫荧光

通过荧光染料 DEPI 定位细胞核, 与对照组相比, L-MIL 感染后的细胞其核具有明显的特异性 FITC 荧光。MGMT 在细胞中特异性表达, 并由于其核酸修复酶特性集中于细胞核内(图 5)。

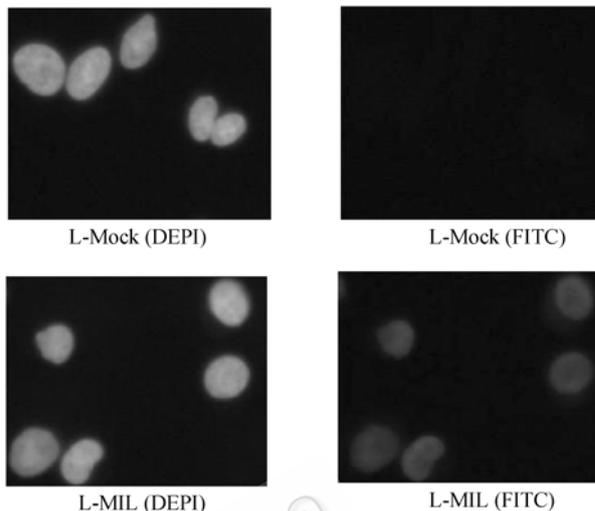


图5 细胞感染病毒后免疫荧光检测

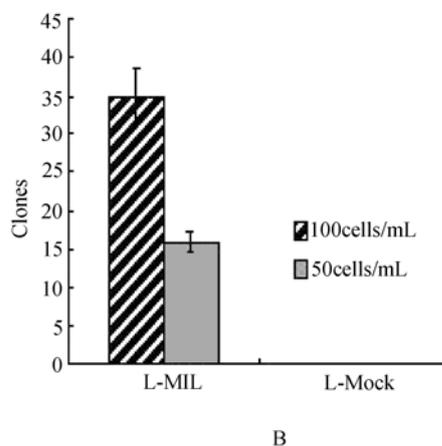
Fig. 5 Immunofluorometric assay of infected cell

2.5 病毒感染后抗药克隆形成

BG/BCNU 联用药物筛选后, 感染 L-MIL 的细胞能有效表达具抗药性的 P140K, 形成抗药性细胞克隆, 而感对照组则无一细胞克隆形成(图 6)。

2.6 病毒感染后细胞荧光素酶的活力检测

随着病毒量的增加, L-MIL 感染的细胞 Luciferase 活力也相应地增加。只有当病毒量过高, 细胞状态受到影响, Luciferase 活力才开始下滑; 对照组在各个感染梯度均无明显的 Luciferase 表达。



取梯度 1 至梯度 7 共 7 个滴度梯度, 对 L-MIL 病毒感染量与荧光素检测读值做线性回归分析, 线性关系良好($R^2=0.9957$)(图 7)。

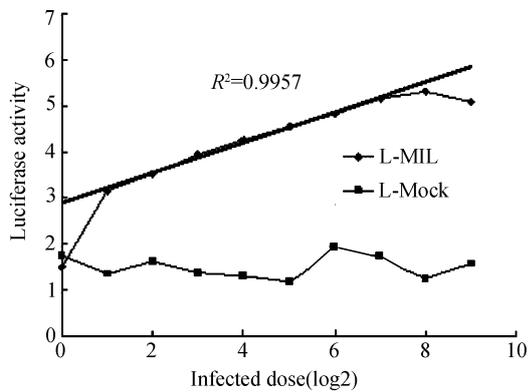


图 7 梯度稀释病毒感染后细胞 Luciferase 表达情况
Fig. 7 Luciferase activity assay of cells infected by a series diluted lentiviral stocks

3 讨论

人获得性免疫缺陷病毒(HIV)来源的慢病毒载体与其他病毒载体相比, 其优势主要在于: 一、能很好地感染干细胞等非分裂期细胞; 二、感染细胞后其整合信号内的目的基因序列将稳定地整合于宿主的基因组上, 从而实现目的基因在宿主及其子代细胞中的持续性表达。加上其能容纳大片断基因的特点, 慢病毒已成为目前基因治疗载体的一个非常重要的选择^[1-4]。出于基因治疗的安全性考虑, 本实验采用复制缺陷性慢病毒系统。p24 检测结果表明, 包装细胞生产的慢病毒感染细胞后, 宿主细胞不表达病毒组装所必须的 p24 蛋白, 无新病毒产生。

在基因静默治疗中, 大量不含治疗性目的基因的靶细胞将会严重影响最终的治疗效果, 甚至使治疗失败。而缺乏有效的检测手段将无法对治疗效果尤其是早期治疗效果做出正确的判断, 从而无法及时做出相应的治疗方案调整, 极大地影响了治疗的实际效果。本实验尝试改造慢病毒载体 pBobi, 希望能通过引入合适的抗药物筛选基因及报告基因以解决上述问题。

核酸修复酶 MGMT 的突变型 P140K 具有超过天然型 MGMT500 倍的抗 BG 抑制能力, 能有效地耐受 BG/BCNU 联用^[5]。由于其药物筛选较为温和, 体内筛选效果优于多药耐药基因、二氢叶酸还原酶等

方法, 已被普遍应用于基因治疗^[6,7]。本实验希望通过引入 P140K 基因来解决基因治疗中的筛选问题。

现有检测 MGMT 的手段操作复杂、灵敏度低, 不适于准确的定量及体内检测。为此, 已有研究构建了 P140K 与绿色荧光蛋白(EGFP)联合表达的病毒载体, 通过检测 EGFP 来实现对 MGMT 的间接检测。但研究表明 EGFP 在动物实验中经常会表现出不同程度的毒性^[8,9]。且 EGFP 所发出的荧光容易受到各种组织遮挡, 在活体检测的情况下灵敏度很低, 实用性不高。近几年, 由于检测灵敏度高并可定量, 荧光素酶作为报告基因已得到了越来越广泛的应用^[10,11]。其与相应的荧光素作用所发出的荧光主要部分大于 600 nm, 能很好透过组织块及生物体被 IVIS(Xenogen)等特定的体内成像系统所捕获。由于是自发光, 不存在由激发光产生的非特异背景荧光, 适于体内的示踪检测^[12,13]。本实验希望通过引入 Luciferase 基因来解决基因治疗中的检测问题。

目前, 采用 IRES 串联基因是实现一个启动子同时引导两个目的基因最常用的有效手段^[14,15]。本研究利用此法改造得到了慢病毒载体 pBobi-MIL, 其中 P140K 与 Luciferase 基因通过 IRES 前后连接, 由 mPGK 启动子同时引导表达。实验结果证实, P140K 及 Luciferase 基因在感染 L-MIL 的细胞内都能被转录并表达。其中, 病毒感染细胞表达的 P140K 主要集中于细胞核, 能有效起到 BG 耐受的核酸修复作用, 使细胞获得对 BG/BCNU 联用的耐受能力。而特异表达的 Luciferase 活性明显, 与相应的荧光素作用后所产生的荧光与对照组有显著差异。

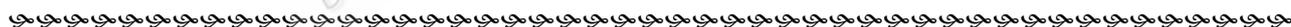
综上所述, 我们成功地构建了多价慢病毒载体 pBobi-MIL, 其 mPGK 启动子能有效地同时引导 P140K 及 Luciferase 基因的表达, 其 U6 启动子则可根据不同的基因治疗需要接入相应的 RNAi 相关序列。当其应用于特定的基因静默治疗时, 就能用 BG/BCNU 联合给药进行体内药物筛选以富集含目的基因的细胞, 并能通过对 Luciferase 的检测有效地实现对治疗全过程的体内外监控。

另外, 由于慢病毒感染细胞后并不形成空斑, 所以其滴度较难准确测定。梯度感染实验表明, 在一定的滴度范围内, L-MIL 的感染量与细胞感染后的 Luciferase 表达强度有正相关线性关系, 提示我们在将来可以利用对 Luciferase 活力的检测来建立

一种新的慢病毒滴度的测定方法。

REFERENCES

- [1] Boztug K, Dewey RA, Klein C. Development of hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Mol Ther*, 2006, **8** (5): 390-395.
- [2] van Griensven J, De Clercq E, Debyser Z. Hematopoietic stem cell-based gene therapy against HIV infection: promises and caveats. *AIDS Rev*, 2005, **7** (1): 44-55.
- [3] Lois C, Hong EJ, Pease S, *et al.* Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 2002, **295** (5556): 868-872.
- [4] Huang DY, Zhang ZJ, Chen BL, *et al.* Construction of Rat Bdnf gene lentiviral vector and its expression in mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(2): 235-240.
黄东煜, 张志坚, 陈柏龄, 等. 大鼠 Bdnf 基因慢病毒载体的构建及其在骨髓间质干细胞中的表达. *生物工程学报*, 2007, **23**(2): 235-240.
- [5] Ragg S, Xu-Welliver M, Bailey J, *et al.* Direct reversal of DNA damage by mutant methyltransferase protein protects mice against dose-intensified chemotherapy and leads to in vivo selection of hematopoietic stem cells. *Cancer Res*, 2000, **60**(18): 5187-5195.
- [6] Bowman JE, Reese JS, Lingas KT, *et al.* Myeloablation is not required to select and maintain expression of the drug-resistance gene, mutant MGMT, in primary and secondary recipients. *Mol Ther*, 2003, **8** (1): 42-50.
- [7] Cai S, Hartwell JR, Cooper RJ, *et al.* In vivo effects of myeloablative alkylator therapy on survival and differentiation of MGMP140K-transduced human G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Mol Ther*, 2006, **13** (5): 1016-1026.
- [8] Liu HS, Jan MS, Chou CK, *et al.* Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **260** (3): 712-717.
- [9] Detrait ER, Bowers WJ, Halterman MW, *et al.* Reporter gene transfer induces apoptosis in primary cortical neurons. *Mol Ther*, 2002, **5**(6): 723-730.
- [10] Lutz A, Dyal J, Olivo PD, *et al.* Virus-inducible reporter genes as a tool for detecting and quantifying influenza A virus replication. *J Virol Methods*, 2005, **126** (1-2): 13-20.
- [11] Li CJ, Zhang XL, Yang Y, *et al.* Expression patterns of PPARgamma2 in differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells into adipocytes. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(2): 187-191.
李成健, 张晓兰, 杨扬, 等. 小鼠胚胎干细胞向脂肪细胞分化过程中 PPAR γ 2 基因的表达模式. *生物工程学报*, 2005, **21**(2): 187-191.
- [12] Bhaumik S, Gambhir SS. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(1): 377-382.
- [13] Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, *et al.* Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(3): 313-320.
- [14] Martinez-Salas E, López de Quinto S, Ramos R, *et al.* IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie*, 2002, **84**(8): 755-763.
- [15] Yan F, Zhao XY, Deng HX, *et al.* Construction and expression of a novel bisbicistronic expression vector: pCMV-Myc-IRES-EGFP. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(3): 423-428.
严飞, 赵新宇, 邓洪新, 等. 一种新的双元表达质粒 pCMV-Myc-IRES-EGFP 的构建及其表达. *生物工程学报*, 2007, **23**(3): 423-428.



盐湖生物资源的研发

在我国大约有 1000 多个盐湖, 面积约 4.1 万平方公里, 主要分布在我国西部和东北部。其中蕴藏着巨大的生物资源如盐湖中的蓝藻、螺旋藻及其他微生物等, 从中可索取人类所必需的蛋白质、食用色素、维生素和多种生物精细材料如紫膜等。盐藻中的杜氏藻(*Dunaliella* sp.) 是一类嗜盐或耐盐性真核藻类, 体内含胡萝卜素达 8%~10%(干重), 36%左右的甘油和 36%~40%蛋白质及脂肪酸、叶绿素和四烯酸等。到目前为止, 它是唯一高耐盐的真核微生物, 引起微生物科学工作者的重视。耐高盐生物资源的微生物中主要有嗜盐菌、耐盐菌、嗜碱菌或嗜盐嗜碱菌等不同类型, 它们之中的一些特别引起了关注: (1) 它们为什么在高盐环境中能生存繁衍, 并进行其生命活动, 其进化和适应机制(分子机制)待研究! (2) 那些含有紫膜的嗜盐菌如盐生嗜盐杆菌等有其特殊功能和经济价值, 紫膜所含的视觉物质如视紫红质(rhodopsin)有其特殊功能和实用价值; 再者, 嗜盐菌尽管不含叶绿素, 但有无叶绿素“光合细菌”之称; 紫膜及视紫红质的实用性和经济价值有待进一步研发。(3) 已发现淡水中的一些主要藻类在盐湖中均能找到它们。最重要的是在耐盐绿藻中的杜氏藻和蓝藻中的螺旋藻, 尽管它们是生活在淡水中的成员, 但在盐湖中亦能找到它们的存在, 有一定的抗盐性和耐盐性, 它们又是如何适应这种盐生环境以生存和繁衍呢? 有待做进一步探究。

总之, 盐湖中的生物多样性蕴藏着重要经济效益和巨大而特殊的基因资源, 这正是我们探究的对象; 盐湖中新物种客观存在, 有待去发现; 开展盐湖生物基因工程研究是现代生物技术的关注点; 探索盐湖微生物(含微藻)资源特别是盐生嗜盐杆菌的视觉物质及其它等方面效能及应用价值很有潜力, 并展现其开发前景。

(柯为)