

· 论 著 ·

趋化因子融合蛋白 SDF-KDEL 慢病毒载体 pLenti6/V5-S-K 的构建和表达

孙 利, 曲晓莉, 张久聪, 张 颖, 黄长形, 连建奇, 魏 欣, 姜 泓, 张 野, 庄 严, 翟 嵩, 孙永涛, 聂青和, 白雪帆
(第四军医大学唐都医院, 陕西 西安 710038)

[摘 要] **目的** 构建含趋化因子融合蛋白 SDF-KDEL 的慢病毒载体 pLenti6/V5-S-K, 为研究 I 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)感染的基因治疗奠定基础。**方法** 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增目的基因片段 SDF-KDEL, 纯化后的 PCR 产物定向连接入 pLenti6/V5-D-TOPO®载体, 构建慢病毒载体 pLenti6/V5-S-K, 并在 293FT 细胞中建立慢病毒株, 最后转染人宫颈癌 HeLa 细胞观察 SDF-1 蛋白的表达。**结果** 成功构建了慢病毒载体 pLenti6/V5-S-K, 并证实 SDF-1 蛋白可在 HeLa 细胞系内表达。**结论** 慢病毒载体可介导 CXC-细胞内趋化因子(CXC-intrakin, SDF-K)基因高效、稳定转染 HeLa 细胞, 可用于抗 HIV-1 感染的基因治疗。

[关 键 词] 人免疫缺陷病毒, I 型; 趋化因子受体; 细胞内趋化因子; 慢病毒载体; 基因治疗; SDF-KDEL; pLenti6/V5-S-K

[中图分类号] R512.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2008)06-0367-05

Construction and expression of lentiviral vector pLenti6/V5-S-K on SDF-KDEL

SUN Li, QU Xiao-li, ZHANG Jiu-cong, ZHANG Ying, HUANG Chang-xing, LIAN Jian-qi, WEI Xin, JIANG Hong, ZHANG Ye, ZHUANG Yan, ZHAI Song, SUN Yong-tao, NIE Qing-he, BAI Xue-fan (Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xian 710038, China)

[Abstract] **Objective** To study the HIV-based lentiviral vector, pLenti6/V5-S-K, which contains the gene of interest, CXC-intrakin (SDF-KDEL), on the gene therapy of HIV-1 infection. **Methods** A pLenti-based expression vector, pLenti6/V5-D-TOPO, was used to produce the lentiviral vector, which was cotransfected with the ViraPower™ Packaging Mix (pLP1, pLP2, and pLP/VSVG) into 293FT cells to produce a replication-incompetent lentivirus stock. After lentiviral stock had been titrated the by HeLa cells, the expression of the interest gene of of SDF-1 could be assayed by indirect immunofluorescence in transduced HeLa cells. **Results** The lentiviral expression vector, pLenti6/V5-S-K, was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The lentivirus stock was constructed in 293 FT cell line. The fluorescent protein was mainly scattered in cytoplasm and perinucleus in transduced HeLa cells. **Conclusion** These findings demonstrated the ability of the lentiviral vector to transduce multiple genes into HeLa cells, and the potential therapeutic effect on the treatment of HIV-1 infection.

[Key words] human immunodeficiency virus type I (HIV-1); chemokine receptor; intrakin; lentiviral vector; gene therapy; SDF-KDEL; pLenti6/V5-S-K

[Chin Infect Control, 2008, 7(6):367-371]

I 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)入侵靶细胞是一个病毒和细胞膜融合的过程, 需要由细胞表面 gp120 糖蛋白与靶细胞表面的 CD4 受体和相应的

辅受体 CXCR4 或 CCR5 相互作用, 并导致关键性蛋白结构的构象改变, 继而发生膜融合及最终靶细胞的感染^[1-3]。

[收稿日期] 2008-07-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助(39970695)

[作者简介] 孙利(1971-), 女(汉族), 陕西省富平县人, 主治医师, 主要从事艾滋病趋化因子辅受体研究。

[通讯作者] 孙利 E-mail: sunli197122@sina.com

趋化因子受体 CXCR4 属于 7 次跨膜 G 蛋白耦联受体超家族(GPCRs)成员。CXCR4 是第一个被发现的辅受体,协同 CD4 分子在 T 嗜性 HIV-1 的感染中发挥重要作用。CXCR4 的配体是基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor 1 α , SDF-1 α)^[4-5],后者亦称为 CXCL12 或前 B 细胞刺激因子(PBSF),它是 CXC 趋化因子的成员,也是此辅受体的唯一配体。SDF-1 以 2 种形式存在:SDF-1 α 和 SDF-1 β ,两者区别在于 SDF-1 β 的羧基端比 SDF-1 α 多 4 个氨基酸(RFKM)的延伸。CXCR4 与 SDF-1 α 的结合,阻断了 T 嗜性 HIV-1 病毒株与 CXCR4 的结合,从而抑制了病毒的感染。研究证明^[6-8],SDF-1 α 以及从 SDF-1 α 得到的肽段和一些单克隆抗体,都可作为小分子拮抗剂,有效地竞争性阻断 T 嗜性 HIV-1 的入侵。本实验构建了包含 CXC-细胞内趋化因子(CXC-intrakine, SDF-K)的慢病毒载体 pLenti6/V5-S-K,并观测了人宫颈癌 HeLa 细胞中重组融合蛋白 SDF-1 的表达情况,以期为将来研究 HIV-1 感染的基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 pCMV-S-K(CMV/SDF-K/PolyA/Neo Cassette)质粒及 HeLa 细胞,由本实验室保存。

1.1.2 试剂 pLenti6/V5-D-TOPO® Cloning Kit、胶回收试剂盒、PureLink™ HQ Mini 质粒纯化试剂盒,由 Invitrogen 公司提供。FBS、DMEM 培养液由 GIBCO 公司提供。羊抗人 SDF 由 Sigma 公司提供。分子生物学试剂由 TakaRa 公司提供。

1.1.3 聚合酶链反应(PCR)引物 引物序列根据基因库收录的 SDF、KDEL 基因序列及 pLenti6/V5-D-TOPO® Cloning Kit 引物设计要求设计而成(由北京三博远志生物技术有限责任公司合成)。上游引物 P1:5' - CACCATGAACGCCAAGGTC - 3';下游引物 P2:5' - CAGCTCGTCCTTTACT-TGTTT - 3',扩增产物为 286 bp。CMV 正向引物:5' - CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG - 3';V5(C 末端)反向引物:5' - ACCGAGGAGAGGGT-TAGGGAT - 3'。

1.2 方法

1.2.1 PCR 反应 50 μ L 反应体系:含模板 pCMV-S-K 质粒(<1 μ g)1 μ L,10 μ mol/L P1、P2 引

物各 1 μ L,10 \times Pfu 缓冲液 5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,2.5 U/ μ L Pfu DNA 聚合酶 1 μ L,ddH₂O 37 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,随后进行 30 个循环扩增:94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,57 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,末轮循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的构建 用凝胶回收试剂盒将 PCR 产物回收,并连接入 pLenti6/V5-D-TOPO®载体:6 μ L 反应体系含 PCR 产物 4 μ L,氯化钠溶液 1 μ L,TOPO®载体 1 μ L。室温培养 5 min,转化 Stbl3TM 化学感受态 E. coli,涂布于氨苄西林 LB 平板,培养 10~14 h。

1.2.3 重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的筛选与鉴定 挑取阳性克隆,加入含氨苄西林的 LB 培养液中,剧烈振荡增菌 1 h 后,分别重悬于 50 μ L 包含 PCR 引物的 PCR SuperMix 反应体系:SuperMix 46 μ L,菌液 2 μ L,P1、V5(C 末端)反向引物或 P2、CMV 正向引物各 1 μ L,反应条件同上,琼脂糖凝胶电泳鉴定。用 PureLink™ HQ Mini 质粒纯化试剂盒纯化质粒 DNA,经 Hind III 和 cla I 双酶切及测序鉴定。

1.2.4 重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的测序 由全自动测序仪测序(北京三博远志生物技术有限责任公司)。

1.2.5 慢病毒株的建立与滴定 无血清 Opti-ME-MI 液稀释 9 μ g 慢病毒包装质粒(pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG)及 3 μ g 慢病毒表达质粒 DNA,与稀释的脂质体 2000 轻轻混匀,室温放置 20 min 后,转染 293FT 细胞,收集转染 48~72 h 后的包含病毒的上清液,分装保存。同时用 HeLa 细胞系滴定慢病毒株:准备 10 \times 连续稀释培养基,用 Blasticidin 作筛选,12 天后加龙胆紫染色液,计数蓝染克隆,测定出慢病毒株滴度。

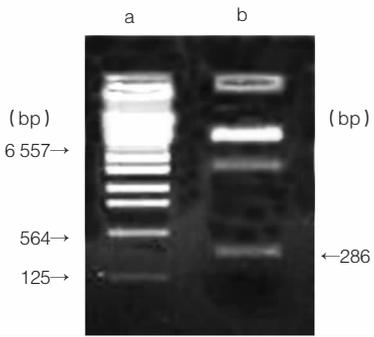
1.2.6 转染慢病毒株 融化慢病毒株并用新鲜的完全培养基稀释合适数量的病毒,加至 HeLa 细胞上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养细胞,次日移去包含病毒的培养液,换以新鲜的完全培养基,接下来一天收集细胞,瞬时表达融合蛋白。

1.2.7 免疫荧光表达重组融合蛋白 (1)移去培养液,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加 2 mL 室温 100%甲醇固定细胞,室温培养 5 min;用 2 mL PBS 洗涤细胞 5 次,每次 2 min,加 2 mL 封闭液(包含 10%FBS 的 PBS),室温培养 20 min。移去封闭液,加 1 mL 包含抗-V5-FITC 结合抗体的 PBS/10%FBS(1:500 稀释抗体),室温、黑暗培养 1 h;用 PBS 洗涤细胞 2 次,每次 5 min,以荧光显微镜观察细胞。(2)取出

玻片,用 PBS 洗 3 遍,过水,风干;4 %低温多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 遍,过水,风干;0.2 %的 Triton X-100 透化 10 min, PBS 洗 3 遍,过水,风干;5 %牛血清白蛋白(BSA)封闭 30 min, PBS 洗 3 遍,过水,风干。加一抗(羊抗人 anti-SDF),4℃ 温育,过夜,用 PBS 洗 5 遍,过水,风干;加二抗(0.01 %伊兰稀释的兔抗羊 IgG -FITC),37℃ 温育 1 h, PBS 洗 8 遍,过水,风干。封片,用荧光显微镜观察细胞。

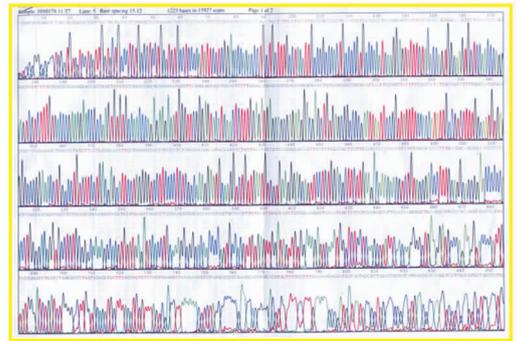
2 结果

2.1 SDF-KDEL 基因片段的扩增 用所设计的引物特异性地扩增出 SDF-KDEL 目的基因片段,PCR 产物经 1 %琼脂糖电泳显示,在 286 bp 处出现特异性扩增条带,见图 1。



a:DNA Marker λHindIII; b:用 Hind III and cla I 酶切重组质粒 pLenti6/V5-S-K

A 限制性内切酶鉴定重组质粒 pLenti6/V5-S-K



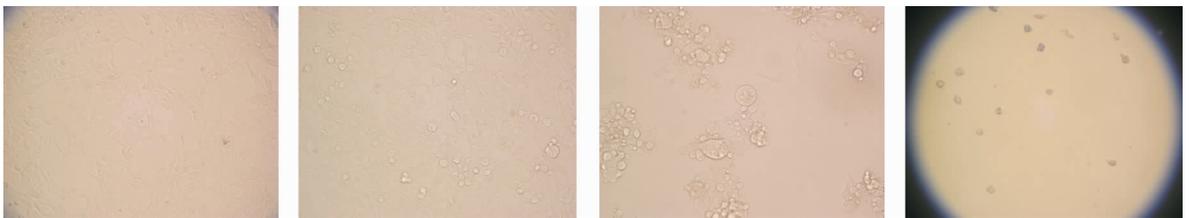
B DNA 序列分析重组质粒 pLenti6/V5-S-K

图 2 重组质粒 pLenti6/V5-S-K 酶切鉴定及基因测序图

Figure 2 Restriction enzyme digestion analysis and DNA sequencing of pLenti6/V5-S-K

2.3 慢病毒株的建立与滴定 在 293FT 细胞中建立慢病毒株,并用 HeLa 细胞系滴定慢病毒株,计数

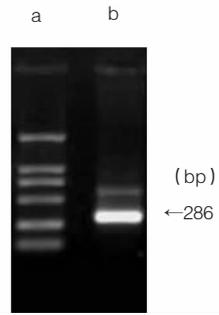
蓝染克隆后,测出慢病毒株滴度为 8.56×10^5 转导单位(TU)/mL,见图 3。



A 正常 293FT 细胞; B 在 293 FT 细胞系中制备慢病毒株 24 h; C 在 293 FT 细胞系中制备慢病毒株 48 h; D 在 HeLa 细胞系中滴定慢病毒株

图 3 包含重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的慢病毒株的制备与滴定(×40)

Figure 3 Construction lentivirus stock expressing pLenti6/V5-S-K in 293 FT cell line and titre of it in HeLa cell line(×40)



a:DNA Marker DL2000; b:SDF-KDEL 片段

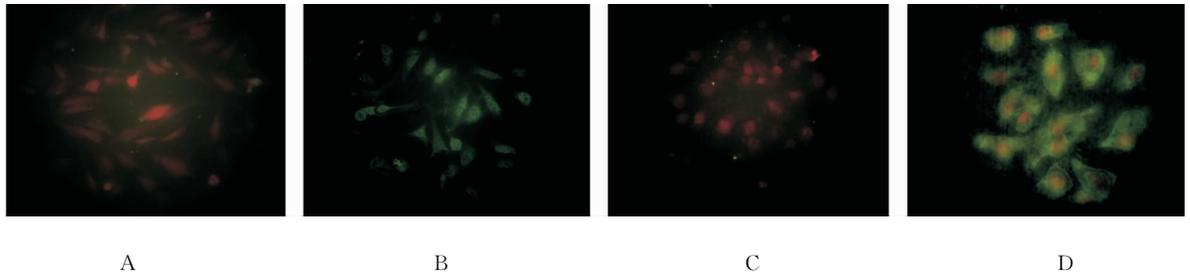
图 1 PCR 扩增目的基因片段 SDF-KDEL

Figure 1 Identification of SDF-KDEL fragment amplified by PCR

2.2 重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的鉴定 选取 E. coli 的阳性转化子,PCR 扩增出近 286 bp 的特异性条带,抽提阳性重组质粒并经 Hind III + cla I 双酶切后,可见 286 bp 和近 7 000 bp 两条带;测序结果与已知序列完全相符,见图 2。

2.4 免疫荧光表达重组融合蛋白 转染重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的 HeLa 细胞滴加抗-V5-FITC 结合抗体及羊抗人 anti-SDF-1 后,可分别表达特异性

绿色及黄绿色荧光,荧光蛋白主要分布于胞质及核周;转染空载体的细胞未见特异性荧光,见图 4。



A: 抗-V5-FITC 结合抗体观测转染空质粒的 HeLa 细胞系重组融合蛋白 SDF-1 免疫荧光表达;B: 抗-V5-FITC 结合抗体观测包含重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的慢病毒株转染 HeLa 细胞系重组融合蛋白 SDF-1 免疫荧光表达;C: 羊抗人 SDF-1 抗体联合兔抗羊 IgG-FITC 二抗观测转染空质粒的 HeLa 细胞系重组融合蛋白 SDF-1 免疫荧光表达;D: 羊抗人 SDF-1 抗体联合兔抗羊 IgG-FITC 二抗观测包含重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的慢病毒株转染 HeLa 细胞系重组融合蛋白 SDF-1 免疫荧光表达

图 4 抗-V5-FITC 结合抗体和抗 SDF-1 抗体观测包含重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的慢病毒株转染 HeLa 细胞系重组融合蛋白免疫荧光表达情况(× 40)

Figure 4 Expression of SDF-1 in HeLa cells transfected with lentivirus expressing pLenti6/V5-S-K by anti-V5-FITC antibody and by goat-anti-human SDF-1 antibody with rabbit-anti-goat IgG-FITC second antibody(× 40)

3 讨论

CXCR4 是第一个被发现的具有 HIV-1 辅受体 (coreceptor)作用的趋化因子受体,其他 CXC 类趋化因子受体还有 CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR5,但除了 CXCR4 与 HIV-1 病毒糖蛋白可发生融合外,其余受体均不发生融合^[9-10]。功能性研究表明^[11-12],CXCR4 广泛存在于人体各组织中,在大多数 T 细胞、所有单核细胞和几乎所有 B 细胞、人外周淋巴细胞中都有高表达,但在 NK 细胞上仅有微量表达,中性粒细胞上则不表达;能与多种其他受体共表达,CXCR4 是 T 嗜性 HIV-1 进入 CD4+ 细胞内的一个必需受体。CXCR4 的配体 SDF-1 与辅受体 CXCR4 有高度亲和性,并与 CXCR4 相结合,从而阻断 T 嗜向性 HIV 病毒株与 CXCR4 的结合而强烈抑制其 T 嗜向性感染。因此,目前关于趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 的研究已成为抗 HIV-1 感染的研究热点之一。

近年来,慢病毒载体已作为一个有效而多用途的基因转移工具得以运用^[13-14]。多种细胞类型都被携带多种基因的慢病毒载体成功转导,并将有治疗作用的基因设计进慢病毒载体进行表达,特异靶向性针对病毒复制的不同阶段^[15-18]。为此,我们构建了含 CXC-intrakine (SDF-K)的慢病毒载体

pLenti6/V5-S-K。本实验中所用的 ViraPower™慢病毒表达系统允许在分裂或非分裂哺乳动物细胞中让失去复制能力的以 HIV-1 为基础的慢病毒来传递和表达目的片段。ViraPower™慢病毒表达系统是第 3 代系统,其生物安全性高,并与野生型一人 HIV-1 病毒关系最小。

质粒构建中,首先以 pCMV-S-K 质粒为模板,合成了目的基因片段 SDF-KDEL。在 SDF-1 基因片段后面加上一个 KDEL 序列,目的是使 pLenti6/V5-S-K 转导入 HIV-1 易感细胞后,SDF-1 能滞留于内质网,在内质网结合、“扣押”新合成的 CXCR4,阻止其向细胞表面转运和表达,以阻断和抑制 T 嗜性 HIV-1 与靶细胞的附着和融合。引物 P1、P2 是根据 pLenti6/V5-D-TOPO®克隆体系的引物设计要求设计而成。在此体系中,PCR 产物可通过上游引物中所加的 4 个碱基(CACC)而被定向克隆。克隆载体的突出部分(GTGG)侵入 PCR 产物的 5'末端,所加碱基复性后,正确取向并稳定表达 PCR 产物,插入片段可被正确、定向、高效克隆(≥90%)。经 Hind III + cla I 双酶切重组慢病毒载体 pLenti6/V5-S-K 及全自动测序仪测序重组质粒,并与已知序列相比对后证实:重组慢病毒载体 pLenti6/V5-S-K 的构建是成功的。

制备慢病毒株需要将重组质粒 pLenti6/V5-S-K 和包装质粒混合物(pLP1、pLP2 和 pLP/VS-

VG)共转染 293FT 细胞。尽管 3 个包装质粒允许在 293FT 细胞系中反向表达生产病毒后代所必需的蛋白(gal、pol、rev、env),但是它们不包含 LTRs 或 ψ 包装序列,这保证了在此系统中生产的慢病毒颗粒无复制能力,仅携带目的基因片段,不会有新的有活力的病毒产生。实验中的慢病毒株滴度由 HeLa 细胞系滴定测出,此慢病毒株的滴度为 8.56×10^5 TU/mL(如用 HT1080 细胞滴定,滴度将提高 10 个数量级),此病毒滴度范围可用于后续研究。间接免疫荧光法观测了重组融合蛋白 SDF-1 在 HeLa 细胞系中瞬时表达的情况,检测发现包含重组质粒 pLenti6/V5-S-K 的慢病毒株转染 HeLa 细胞后,可在细胞的胞质和核周观察到特异性绿色及黄绿色荧光,而转染空载体的细胞未见特异性荧光,再次证明我们的构建是成功的。同时发现 SDF-KDEL 蛋白主要存在于细胞裂解产物中,培养上清中没有发现,这表明 SDF-KDEL 蛋白很少有分泌性表达。

以上结果证实慢病毒载体可介导 SDF-KDEL 基因高效、稳定转染 HeLa 细胞,重组慢病毒表达质粒 pLenti6/V5-S-K 可以用于下一步的病毒感染实验。相信通过趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 相关研究的不断深入和扩展^[19-20],以及对 HIV 感染机制的进一步揭示,有可能设计出有效的 HIV-1 抑制剂或疫苗,为获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的防治带来新的希望。

[参考文献]

- [1] Hung S C, Pochampally R R, Hsu S C, *et al.* Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo [J]. PLoS ONE, 2007, 2(5): e416.
- [2] Wang F Y, Zhang T Y, Luo J X, *et al.* Selection of CC chemokine receptor 5-binding peptide from a phage display peptide library [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(9): 2035-2041.
- [3] Balabanian K, Lagane B, Pablos J L, *et al.* WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12 [J]. Blood, 2005, 105: 2449-2457.
- [4] Zhu W, Boachie-Adjei O, Rawlins B A, *et al.* A novel regulatory role for SDF-1 signaling in BMP2-osteogenic differentiation of mesenchymal C2C12 cells [J]. J Biol Chem, 2007, 282(26): 18676-18685.
- [5] Pritchett J, Wright C, Zeef L, *et al.* Stromal derived factor-1 exerts differential regulation on distinct cortical cell populations in vitro [J]. BMC Dev Biol, 2007, 7: 31.
- [6] Brumme Z L, Goodrich J, Mayer H B, *et al.* Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals [J]. J Infect Dis, 2005, 192(3): 466-474.
- [7] Melby T, Despirito M, Demasi R, *et al.* HIV-1 coreceptor use in triple-class treatment-experienced patients: baseline prevalence, correlates, and relationship to enfuvirtide response [J]. J Infect Dis, 2006, 194(2): 238-246.
- [8] Moyle G J, Wildfire A, Mandalia S, *et al.* Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection [J]. J Infect Dis, 2005, 191(6): 866-872.
- [9] Sierra S, Kaiser R, Thielen A, *et al.* Genotypic coreceptor analysis [J]. Eur J Med Res, 2007, 12(9): 453-462.
- [10] Stumm R, Höllt V. CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system; implications for neuronal regeneration in the adult brain [J]. J Mol Endocrinol, 2007, 38(3): 377-382.
- [11] Deshane J, Chen S, Caballero S, *et al.* Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism [J]. J Exp Med, 2007, 204(3): 605-618.
- [12] Guyon A, Nahon J L. Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha on neuronal activity [J]. J Mol Endocrinol, 2007, 38(3): 365-376.
- [13] Westerman K A, Ao Z, Cohen E A, *et al.* Design of a trans protease lentiviral packaging system that produces high titer virus [J]. Retrovirology, 2007, 4: 96.
- [14] Engelman A, Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication [J]. PLoS Pathog, 2008, 4(3): e1000046.
- [15] Swainson L, Mongellaz C, Adjali O, *et al.* Lentiviral transduction of immune cells [J]. Methods Mol Biol, 2008, 415: 301-320.
- [16] Ye Z, Yu X, Cheng L. Lentiviral gene transduction of mouse and human stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2008, 430: 243-253.
- [17] Harper S Q, Gonzalez-Alegre P. Lentivirus-mediated RNA interference in Mammalian neurons [J]. Methods Mol Biol, 2008, 442: 95-112.
- [18] Welm B E, Dijkgraaf G J, Bledau A S, *et al.* Lentiviral transduction of mammary stem cells for analysis of gene function during development and cancer [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(1): 90-102.
- [19] Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, *et al.* SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction [J]. FASEB J, 2007, 21(12): 3197-3207.
- [20] Chong S W, Nguyet L M, Jiang Y J. The chemokine Sdf-1 and its receptor Cxcr4 are required for formation of muscle in zebrafish [J]. BMC Dev Biol, 2007, 7: 54.