

· 基础研究 ·

SDF-1/RUNX1 融合蛋白腺病毒载体的构建及滴度测定^{*}

罗红春¹, 张红宾^{2△}, 秦 波¹, 汪嘉莉³, 刘 倩⁴

(1. 重庆医科大学附属第一医院感染科 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院血液科 400016;

3. 重庆医科大学附属第一医院/重庆市传染病寄生虫病学重点实验室 400016;

4. 重庆市渝北区人民医院消化内科 401120)

摘要:目的 构建 SDF-1/RUNX1 融合蛋白腺病毒表达载体,并测定其滴度,为研究 SDF-1/RUNX1 融合蛋白介导的间充质干细胞对造血干细胞定向募集的作用打下基础。方法 全基因合成 SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 片段,并在其两端添加限制性酶切位点 XhoI 及 EcoRI,经测序验证基因序列是否正确。采用分子克隆技术构建 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体,转染入 293A 细胞中进行包装,采用免疫法测定腺病毒滴度。结果 全基因合成 SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 片段经测序验证基因序列正确,长约 3 000 bp。将其连接至目的载体 pIRES2-EGFP,构建出含有 SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 基因序列的 GFP 共表达质粒编号为 B。以 B 质粒为模板,扩增出带 attB1 和 attB2 位点的 SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-EGFP 片段,长约 4 300 bp。采用 BP 重组系统将上述目的片段重组到载体 pDONR221,构建出 BP 重组质粒 C。再采用 LR 重组系统将目的序列重组到腺病毒载体 pAD/CMV/v5-DEST 上,构建出 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体。经 293 细胞包装后,采用免疫法测定腺病毒滴度为 1.03×10^{11} ifu/mL。结论 成功构建出 SDF-1/RUNX1 融合蛋白腺病毒表达载体,且腺病毒滴度较高,有利于后续试验。

关键词: 基质细胞衍生因子-1; RUNX1 基因; 间充质干细胞; 造血干细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)12-1200-03

Construction of adenovirus vector expressing SDF-1/RUNX1 and detection of viral titre^{*}

Luo Hongchun¹, Zhang Hongbin^{2△}, Qin Bo¹, Wang Jiali³, Liu Qian⁴

(1. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016,

China; 2. Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing,

400016, China; 3. Chongqing Key Laboratory of Infectious Diseases and Parasitic Diseases, the First

Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 4. Department of

Gastroenterology, The People's Hospital of Yubei District of Chongqing City, Chongqing 401120, China)

Abstract: Objective To construct SDF1/RUNX1 fusion protein adenovirus vector, and to assay its titre, in order to lay the groundwork for researching the oriented recruitment of hematopoietic stem cells influenced by mesenchymal stem cells mediated by SDF1/RUNX1 fusion protein. **Methods** We synthesized SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 gene fragment with restriction enzyme cutting sites of XhoI and EcoRI at both ends, and sequenced the SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 gene fragment. We constructed pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP adenovirus vector by molecular cloning, transfected this adenovirus vector into 293A cell strain for packing, and assayed virus titre using immunization. **Results** We synthesized SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 gene fragment successfully, and it was about 3000bp. This right gene fragment was joined to pIRES2-EGFP vector, that composed GFP coexpression plasmid with SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 gene fragment, called plasmid B. Taking plasmid B as template, SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-EGFP fragment with attB1 and attB2 was amplified. It was about 4300bp. We used BP recombination system to recombine SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-EGFP fragment with pDONR221 vector, called plasmid C. The pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP adenovirus vector was constructed successfully using LR recombination system. Its titre was 1.03×10^{11} ifu/mL. **Conclusion** We constructed SDF1/RUNX1 fusion protein adenovirus vector successfully. And it has high virus titre. So, we had a big advantage of continuing our experiment.

Key words: SDF-1; RUNX1 gene; mesenchymal stem cell; hematopoietic stem cell

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是构成造血微环境的重要成分,对造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)保持干细胞特性和归巢具有重要的支持和趋化作用^[1-5]。MSCs 与 HSCs 联合移植可促进 HSCs 的植活率,缩短无髓期,减少病死率^[6-7]。如何合理利用二者关系增强移植细

胞在骨髓的分布并促进骨髓重建,是目前研究的热点和难点。研究发现 SDF-1/CXCR4 生物轴对 HSCs 的归巢起到了重要的调节的作用^[8]。另外,Runx1 基因作为一种造血细胞分化早期的关键调控因子,编码一类具有 runt 结构域核蛋白,是一种特异性的转录因子,对于调节 HSCs 自我更新与分化间的平衡

起着重要作用^[9-10]。因此,作者设想将 SDF-1 基因和 Runx1 基因构建融合分子,两个片段间加入不影响各自蛋白表达空间构象的(GlyGlyGlyGlySer)₃ 柔性肽,采用分子克隆技术成功构建 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体。该重组腺病毒经 293 细胞包装后,采用免疫法测定腺病毒滴度。该腺病毒载体的顺利构建,将有利于本课题组后续进行的 SDF-1/RUNX1 融合蛋白介导的间充质干细胞对造血干细胞定向募集的作用研究。

1 材料与方法

1.1 材料 platinum Pfx Polymerase 高保真扩增酶,platinum HIFI Taq Polymerase 高保真扩增酶,pMD-18T 载体,DH5 α 感受态细胞,氨苄抗生素溶液及平板,卡那抗生素溶液及平板,XhoI,EcoRI 限制性内切酶,Ligase,pIRES2-EGFP 载体,pDONR221 载体,pAD/CMV/V5-DEST 载体,BP clonase II enzyme mix,LR clonase II enzyme mix,293A 细胞,DMEM+10% FBS,Lipofectamine 2000,Opti-MEM 培养液,0.05% Trypsin,Pac I(NEB)。

1.2 方法

1.2.1 全基因合成 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1 序列 对所需合成的 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1 全序列进行分析,根据基因序列分析的结果,分别进行单链 oligo 的设计及合成,并在序列的两端分别添加限制性酶切位点 XhoI 及 EcoRI。将全长序列装入 pMD-18T 载体并转化至感受态细胞 DH5 α 测序验证重组克隆中基因序列是否与要求相符,含有正确 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1 序列的质粒编号为 A。

1.2.2 构建含有正确 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1 基因序列的 GFP 共表达质粒 将质粒 A 用 XhoI 和 EcoRI 酶切下约 3 000 bp 片段后连接至目的载体 pIRES2-EGFP,并转化到感受态细胞 DH5 α 中。酶切体系 1:质粒 A(200 ng/ μ L)5 μ L;XhoI 1 μ L;EcoRI 1 μ L;Buffer tango 10 μ L;ddH₂O 33 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h 后凝胶电泳回收。酶切体系 2:pIRES2-EGFP(500 ng/ μ L)2 μ L;XhoI 1 μ L;EcoRI 1 μ L;Buffer tango 10 μ L;ddH₂O 36 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h 后凝胶电泳回收。连接体系:A 质粒酶切片(XhoI/EcoRI)5 μ L;pIRES2-EGFP(XhoI/EcoRI)3 μ L;10 $\times$ Ligase Buffer 1 μ L;Ligase 0.5 μ L;ddH₂O 0.5 μ L。16 $^{\circ}$ C 连接 1 h 后转化到感受态细胞 DH5 α 测序验证重组克隆中插入片段的序列信息,含有正确 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1 基因序列的 GFP 共表达质粒编号为 B。

1.2.3 构建 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体 以 B 质粒为模板,扩增带 attB1 和 attB2 位点的 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-EGFP 片段,引物信息如下 F:5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAC CAT GAA CGC CAA GGT CGT GGT-3'。R:5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GA-3'。扩增体系:10 $\times$ Buffer 5 μ L;MgSO₄(50 mmol/L)1 μ L;dNTP(10 mmol/L)1 μ L;引物 F/R(10 μ mol/L)各 1 μ L;B 质粒 0.5 μ L;Platinum PFX polymerase 0.5 μ L;ddH₂O 40 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 4 min;28 个循环(95 $^{\circ}$ C 40 s,60 $^{\circ}$ C 40 s,68 $^{\circ}$ C 2 min);68 $^{\circ}$ C 5 min。回收凝胶电泳片段。使用 Invitrogen 公司的 BP 重组系统将上述目的片段重组到载体 pDONR221 上。筛选阳性克隆并测序验证,

测序验证正确的 BP 重组质粒,编号为 C。使用 Invitrogen 公司的 LR 重组系统将质粒 C 中的目的序列重组到腺病毒载体 pAD/CMV/v5-DEST 上。筛选阳性克隆并测序验证,测序验证正确的为 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体。

1.2.4 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体的包装 转染前 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体需 Pac I 单酶切,37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h,酶切体系为:10 $\times$ Buffer 20 μ L;Plasmid 10 μ g;BSA 2 μ L;Pac I(1 U/ μ L)8 μ L;ddH₂O 加至 200 μ L。采用经典酚氯仿抽提法对单酶切质粒进行纯化,用紫外分光光度计测定纯化质粒浓度。将其转染入 293 细胞,-80 $^{\circ}$ C 保存。用反复冻融法使病毒从细胞中释放出来,离心收集初级病毒液,扩增后分装小管,放置于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒滴度测定 采用免疫法检测腺病毒滴度。首先制备感染细胞:(1)准备 5 $\times$ 10⁵ 细胞/mL 的 293A 细胞。(2)用无血清培养液将待测病毒样品做 10 倍系列稀释,从 10⁻³ 到 10⁻⁷。(3)摇匀上述准备好的细胞,接种 24 孔板,每孔 0.5 mL。在接种细胞未完全贴壁情况下,每孔滴加 50 μ L 待测病毒样品。在 37 $^{\circ}$ C,5%的 CO₂ 的培养箱培养 48 h。(4)吸去培养液,室温下干燥 5 min(吸尽孔内液体,勿碰触细胞)。然后,甲醇固定细胞,加入抗体,显色和计数。

2 结果

2.1 成功构建 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体 将质粒 A 用 XhoI 和 EcoRI 酶切下 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1 片段,凝胶电泳回收约 3 000 bp 片段。同时,质粒 pIRES2-EGFP 亦被 XhoI 和 EcoRI 酶切,凝胶电泳回收约 5 300 bp 片段。将以上两片段连接后,转化到感受态细胞 DH5 α 构建出含有正确 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1 基因序列的 GFP 共表达质粒 B。以 B 质粒为模板,扩增带 attB1 和 attB2 位点的 SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-EGFP 片段,其长约 4 300 bp。BP 重组系统将上述 4 300 bp 目的片段重组到载体 pDONR221 上,构建出质粒 C。LR 重组系统将目的序列重组到腺病毒载体 pAD/CMV/v5-DEST 上,构建出测序正确的 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体。

2.2 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体的包装和滴度测定结果 pAD-SDF-1-(GlySer)₃-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体需 Pac I 单酶切后,转染入 293A 细胞。当感染 13 d 后,出现 80% CPE,如封 2 图 1 所示。采用免疫法检测腺病毒滴度,待测病毒样品做 10 倍系列稀释,从 10⁻³ 到 10⁻⁷。将其感染 293A 细胞。通过抗腺病毒的多抗与感染了腺病毒供试样品的细胞结合,再用辣根过氧化物酶标记的二抗与一抗结合,经显色液显色,被感染的细胞显示出明显的棕色,如插 I 图 2 所示。通过计算,该重组腺病毒的滴度为 1.03 $\times$ 10¹¹ ifu/mL。

3 讨论

骨髓移植是治疗血液病、实体瘤、免疫系统疾病、急性放射病等疾病的有效方法之一。骨髓移植后的造血重建过程是一个多阶段、多因素的过程,其中骨髓造血微环境(Niche)的修复,影响着归巢 HSCs 的自我更新、增殖和分化,对于机体重建

造血功能具有重要意义^[11-14]。但造血微环境重建及移植后 HSCs 归巢率问题一直是治疗的难点。

Niche 是容纳 HSCs, 调控其行为的细胞微环境, 称为“干细胞龕(stem cell Niche)”。MSCs 是构成造血微环境的重要成分, 造血 Niche 的支持细胞成分主要由 MSCs 分化产生其对维持造血微环境的结构和功能完整性, 对 HSCs 保持干细胞特性和 HSCs 归巢具有重要的支持和趋化作用。有报道 MSCs 与 HSCs 联合移植可促进 HSCs 的植活率, 缩短无髓期, 减少死亡率^[6-7]。因此, 如何合理利用二者之间的关系, 是需要考虑的问题。

研究发现趋化因子及其受体对 HSCs 的归巢和植入起到了重要的调节的作用。内皮细胞、成骨细胞和其他基质细胞均表达 SDF-1, 而 HSCs 表达 CXCR4。因此, SDF-1/CXCR4 生物轴就是其中最重要的一对调节分子^[12]。本试验前期发现, 体内刺激因子较多, 可导致 HSCs 过度分化, 使 HSCs 自我更新能力下降。所以, 应更多地关注如何增强干细胞自我更新的能力。Runx1 基因作为一种造血细胞分化早期的关键调控因子, 即为一个较佳的选择。Runx1 基因编码一类具有 runt 结构域核蛋白, 是一种特异性的转录因子, 对于调节 HSCs 自我更新与分化间的平衡起着重要作用^[9-10]。由于 SDF-1/CXCR4 生物轴及 Runx1 基因对 HSCs 归巢和分化起重要作用。因此我们设想构建 SDF1/RUNX1 融合蛋白腺病毒表达载体, 转染入 MSCs, 增强 MSCs 诱导 HSCs 归巢和保持干细胞特性的能力, 同时调节 HSCs 分化。

作者采用全基因合成 SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 片段, 并在其两端添加限制性酶切位点 XhoI 及 EcoRI, 构建出含正确 SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 序列的质粒 A。将质粒 A 用 XhoI 和 EcoRI 酶切下约 3 000 bp 片段, 连接至目的载体 pIRES2-EGFP, 构建出含有正确 SDF-1-(GlySer)3-RUNX1 基因序列的 GFP 共表达质粒 B。以 B 质粒为模板, 扩增带 attB1 和 attB2 位点的 SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-EGFP 片段, 先后重组到载体 pDONR221 和载体 pAD/CMV/v5-DEST 上, 成功构建出 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体。该重组腺病毒经 293 细胞包装后, 采用免疫法测定腺病毒滴度为 1.03×10^{11} ifu/mL。重组腺病毒的滴度较高, 从而保证了转染入 MSCs 的效率, 使有足够的 SDF-1/Runx1 融合蛋白分子在 MSCs 中表达, 有利于本课题组后续进行的, 检测转染重组腺病毒的 MSCs 对 HSCs 的扩增, 趋化及干性保持作用。

参考文献:

- [1] Bell E. Transplantation: making space for HSCs[J]. Nat Biotechnol, 2008, 8(5): 4-5.
- [2] Adams GB, Chabner KT, Alley IR, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor[J]. Nature, 2006, 439 (7076): 599-603.
- [3] Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in

the bone marrow niche[J]. Cell, 2004, 118(2): 149-161.

- [4] Goncalves R, Lobato DA, Silva C, et al. A Stro-1(+) human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system[J]. Exp Hematol, 2006, 34 (10): 1353-1359.
- [5] Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, et al. Expansion of LTC-1cs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer[J]. Stem Cells, 2002, 20(6): 573-582.
- [6] Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells[J]. Leukemia, 2007, 21 (8): 1733-1738.
- [7] Poloni A, Leoni P, Buscemi L, et al. Engraftment capacity of mesenchymal cells following hematopoietic stem cell transplantation in patients receiving reduced-intensity conditioning regimen[J]. Leukemia, 2006, 20 (2): 329-335.
- [8] Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1106: 1-19.
- [9] Burns CE, Traver D, Mayhall E, et al. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway[J]. Genes Dev, 2005, 19(19): 2331-2342.
- [10] Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter[J]. Nature, 2009, 457(7231): 887-891.
- [11] Flidner TM, Poesle R, Sirohi B, et al. Radiologic and nuclear events: the METREPOL severity of effect grading system[J]. Blood, 2008, 111(12): 5757-5758.
- [12] Weisdorf D, Apperley J, Courmelon P, et al. Radiation emergencies: evaluation, management, and transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13 (2): 103-106.
- [13] Weisdorf D, Chao N, Waselenko J, et al. Acute radiation injury: contingency planning for triage, supportive care, and transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(6): 672-682.
- [14] Borhane G, Mickie B. Transplantation of human hematopoietic repopulating cells: mechanisms of regeneration and differentiation using human-mouse xenografts[J]. Current Opinion in Organ Transplantation, 2008, 13(1): 44-52.

(收稿日期: 2011-12-06 修回日期: 2012-01-05)