

蜘蛛拖丝蛋白基因逆转录病毒载体构建与检测

安铁洙¹, 宁方勇^{1,2}, 王春生¹, 朴善花¹, 梁 洋^{1*} (1. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040;
2. 东北农业大学 动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 利用 pIRES2-EGF 和 pMX 载体以及前期获得的蜘蛛拖丝蛋白基因(2S)构建逆转录病毒载体 pMX-2S-IRES-EGFP。采用磷酸钙法将 pMX-2S-IRES-EGFP 质粒转染到 PlatE 细胞并获得重组逆转录病毒。通过小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 检测病毒侵染能力, 并采用 PCR 法检测蜘蛛拖丝蛋白基因在 NIH-3T3 细胞的整合状况。结果显示, 成功构建了逆转录病毒载体 pMX-2S-IRES-EGFP; 通过感染 NIH-3T3 细胞测定重组逆转录病毒滴度约为 2×10^5 cfu/mL; PCR 鉴定结果显示, 目的基因 2S-IRES-EGFP 已整合入 NIH-3T3 细胞基因组中。

关键词: 蜘蛛拖丝蛋白基因; 逆转录病毒载体; 重组逆转录病毒

中图分类号: Q78; S852.2

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2013)01-0064-05

Construction and detection of spider dragline silk protein gene retroviral vector

AN Tie-zhu¹, NING Fang-yong^{1,2}, WANG Chun-sheng¹, PIAO Shan-hua¹, LIANG Yang¹ (1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to establish a method of obtaining spider dragline silk protein by animal hair, pMX-2S-IRES-EGFP retroviral vector was constructed with pIRES2-EGFP vectors, pMX retroviral vector and spider dragline silk protein gene which was obtained previously. Recombinant retroviral particles were generated in platE cell by calcium phosphate transfection method. The infection ability of recombinant retroviral particles was detected by infecting into mouse fibroblasts NIH3T3, and spider dragline silk protein gene insertion into the genome could be detected by PCR in NIH-3T3 cells. The result indicated that pMX-2S-IRES-EGFP retroviral vector was constructed successfully and the viral titers were about 2×10^5 cfu/mL through infecting into mouse fibroblasts NIH3T3. Moreover, 2S-IRES-EGFP had inserted into the genome of NIH-3T3 cell. The research could be used in the study of producing transgenic spider dragline silk protein gene animals by retroviral transgenic method.

Key words: spider dragline silk protein gene; retroviral vector; recombinant retroviral particles

* Corresponding author

蜘蛛拖丝具有独特的力学特性^[1]。由于蜘蛛属肉食性动物, 因此难以通过密集饲养获取大量蜘蛛丝蛋白。随着对蜘蛛丝的化学组成和分子结构的不断了解, 特别是自 Xu 等^[2]克隆获得蜘蛛拖丝蛋白基因核心序列 spidroin1 以来, 有关人工获得蜘蛛拖丝蛋白的相关研究备受关注。迄今为止, 尚未见到

有关利用逆转录病毒转基因法通过动物组织获取蜘蛛拖丝蛋白的研究报道。本试验利用前期工作^[3]中人工合成的蜘蛛拖丝蛋白基因 2S, 通过 IRES 和报告基因 GFP 相连后插入到逆转录病毒载体 pMX 中, 构建 pMX-2S-IRES-GFP 逆转录病毒载体, 通过包装细胞获得整合有蜘蛛拖丝蛋白基因, 并能有效感染其他体细胞的重组逆转录病毒, 为开展通过转基因动物获得类蜘蛛丝蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、载体和细胞 BglII, SalI, NotI,

收稿日期: 2011-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30771538, 31000990, 30771538)

作者简介: 安铁洙(1958-), 男, 教授, 博士。

* 通讯作者

BamH I 和 Hind III (Promega); 磷酸钙转染试剂盒 (碧云天生物公司); polybrene (Sigma); pIRES2-EGFP 载体 (吉林大学欧阳红生教授惠赠); pMX 载体 (实验室自存); PlatE 细胞和小鼠成纤维细胞 NIH-3T3 (研究室自存)。

1.2 蜘蛛拖丝蛋白基因逆转录病毒载体的构建 利用前期工作^[3]中获得的拟蛛蛛丝蛋白基因及其二聚体, 即在设计 378 bp 的拖丝蛋白基因单体的基础上, 根据 Bgl II 和 BamH I 具有相同黏性末端 (3'-CATG-5') 的特点, 在基因单体 5' 端引入 Bgl II 位点的同时, 于 3' 端引入 BamH I 和 Nco I 位点, 然后将其连接到 PUC57 载体上, 命名为 PUC57-S。将 PUC57-S 分别用 Bgl II、Nco I 和 BamH I、Nco I 酶切, 分别回收约 360 bp 和 3 300 bp 的片段, 将其连接得到二聚体 (2S)。

用 Bgl II 和 Sal I 双酶切 pIRES2-EGFP, 回收获得 IRES-EGFP 片段; 用 Bgl II 和 Sal I 双酶切 pUC57-2S, 回收获得 2S 片段; 将 IRES-EGFP 片段和 2S 片段经连接、转化和摇菌, 并提取重组质粒; 利用 Bgl II 和 Sal I 对重组质粒进行酶切鉴定; 将酶切鉴定正确的重组质粒用 Bgl II 和 NotI I 双酶切, 回收获得 2S-IRES-EGFP 片段; 用 BamH I 和 NotI I 双酶切 pMX, 回收获得 pMX 片段; 将 2S-IRES-EGFP 片段和 pMX 片段进行连接、转化和摇菌及提取质粒, 然后分别利用双酶切体系 Bgl II 和 NotI I 以及 Bgl II 和 Hind III 进行酶切鉴定, 以此获得逆转录病毒载体, 命名为 pMX-2S-IRES-EGFP。

1.3 pMX-2S-IRES-EGFP 载体的鉴定 利用 primer5.0 在目的片段 2S-IRES-GFP 上设计并合成引物 (上海生工生物工程公司合成), 其引物序列上游 IG-1: 5'-CGTCTGTAGCGACCTTTG-3'; 引物序列下游 IG-2: 5'-CGTTGTGGCTGTTGTAGTTGT-3', 对重组质粒 pMX-2S-IRES-EGFP 进行 PCR 鉴定, 鉴定正确后送到 invitrogen 公司测序。

1.4 重装逆转录病毒的包装 将在液氮中冷冻保存的含有 PlatE 细胞的冷冻细管取出后, 直接投入 37℃ 的水浴中快速解冻, 并将管中的液体全部移入 10 mL 离心管, 添加 2 mL 合成培养液 (在高糖 DMEM 中添加 10% 血清, 1% 谷氨酰胺和 1% 青链霉素), 缓慢混合后 (1 000 r/min) 离心 5 min。离心后将上清液去除, 并用 4 mL 合成培养液重悬沉淀, 然后导入 Φ60 mm 的培养皿中并置于二氧化碳培养箱中 (37℃、5% CO₂ 饱和、95% 空气、100% 湿度) 进行培养, 当细胞达到 80% 以上汇合后进行传代培养。

采取磷酸钙转染法 (参照说明书) 将 pMX-2S-IRES-EGFP 质粒转染经传代培养达到约 60% 汇合的 PlatE 细胞。在转染并续培养第 24 h 后, 在荧光倒置显微镜下观察 PlatE 细胞的 GFP 表达状况。

1.5 重组逆转录病毒滴度的检测 采用上述的 PlatE 复苏和传代培养方法, 将冷冻保存的 NIH-3T3 细胞进行复苏和传代培养, 当传代培养后细胞达到 60%~70% 汇合时, 备用。

采用磷酸钙法将 pMX-2S-IRES-EGFP 质粒转染 PlatE 细胞。在转染并续培养后的第 48 h 收集上清液。将上清液 500 μL、合成培养液 500 μL 和 polybrene 液 (0.8 g/L) 10 μL 依次加入已去除原培养液的 NIH3T3 细胞培养孔中。在培养后的第 24 h, 将培养孔中的上述混合液去除, 然后更换新的合成培养液后进行续培养。在续培养后的第 48 h, 荧光显微镜下观察表达 GFP 阳性的细胞数, 并根据下列公式计算病毒滴度。

病毒滴度 = 阳性细胞数 × 病毒上清稀释倍数 / 病毒上清量

1.6 拖丝蛋白基因 2S 在 NIH3T3 细胞基因组中的整合 经病毒滴度检测后, 收集含有表达 GFP 阳性的 NIH-3T3 细胞, 采用常规方法提取细胞基因组 DNA。利用上述在目的片段 2S-IRES-GFP 上设计和合成的引物, 采用 PCR 方法鉴定目的基因 2S-IRES-GFP 在 NIH-3T3 细胞基因组中的整合情况。

2 结果

2.1 蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 与 pIRES-EGFP 载体的连接 用 Bgl II 和 Sal I 双酶切 pIRES2-EGFP 质粒后, 回收约为 5 300 bp 片段 (图 1), 将其与用 Bgl II 和 Sal I 双酶切 pUC57-2S 质粒后获得约 700 bp 的片段 (图 2) 相连获得重组质粒。将获得重组质粒通过 Bgl II 和 Sal I 双酶切进行鉴定, 其结果与蜘蛛托丝蛋白基因 2S 的理论序列 (约 750 bp) 一致, 显示蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 与 IRES-EGFP 片段正确连接 (图 3)。

2.2 蜘蛛拖丝蛋白基因逆转录病毒载体的构建 用 BamH I 和 Not I 双酶切 pMX 质粒, 回收大小约为 4 500 bp 片段 (图 4); 用 Bgl II 和 Not I 双酶切上述连有蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 的 pIRES2-EGFP 重组质粒, 回收约为 2 100 bp 的 2S-IRES-EGFP 片段 (图 5); 连接后获得的重组质粒分别利用 Hind III 和 Bgl II、Bgl II 和 NotI 进行双酶切, 获得 2 组条带 (约 1 350 bp 和 5 200 bp, 约 2 400 bp 和 4 200 bp), 其大小与理论序列一致 (图 6); 此外, 经 PCR 扩增

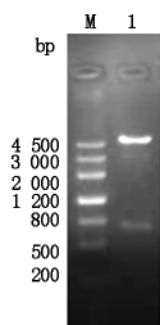


图 1 pIRES2-EGF 质粒的双酶切 M. Marker III;
1. pIRES2-EGF 酶切产物

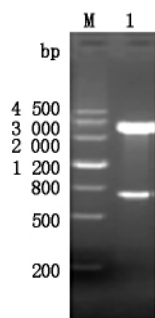


图 2 pUC57-2S 质粒的双酶切 M. Marker III; 1. pUC57-2S
质粒酶切产物

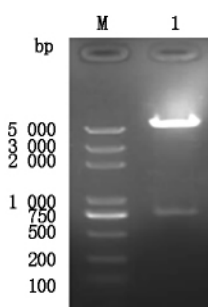


图 3 重组质粒的酶切鉴定 M. DL2000 + Marker; 1. 重组
质粒酶切产物

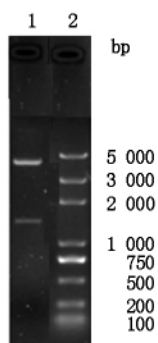


图 4 pMX 质粒酶切 1. PMX 酶切产物; 2. DL2000 +
Marker

后, 获得与理论序列一致的约 750 bp 大小的目的条带(图 7)。将该重组质粒命名为 pMX-2S-IRES-GFP, 送生物公司测序, 其结果与理论序列一致。

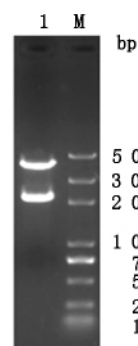


图 5 连有 2S 的 IRES-EGFP 重组质粒的酶切 1. 重组质
粒酶切产物; M. DL2000 + Marker

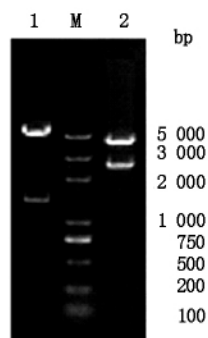


图 6 pMX-2S-IRES-EGFP 酶切鉴定 1. Hind III 和 Bgl II 酶
切产物; M. DL2000 + Marker; 2. Bgl II 和 NotI 酶切产
物

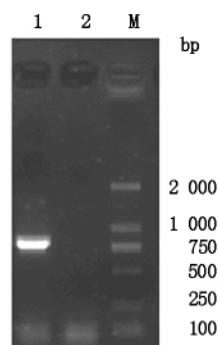


图 7 pMX-2S-IRES-EGFP 的 PCR 鉴定 1. 质粒 PCR 产
物; 2. 阴性对照; M. DL2000 DNA Marker

2.3 pMX-2S-IRES-GFP 逆转录病毒载体的包装

当将 pMX-2S-IRES-GFP 质粒转染 platE 细胞并续培养后, 在第 24 h, 高达 90% 以上的细胞表达 GFP, 表明已经成功转染 platE 细胞(图 8)。

2.4 重组逆转录病毒滴度测定 采用磷酸钙法转染 platE 细胞后, 收集含有重组病毒的上清液并感染 NIH-3T3 细胞。感染后的 24 h 进行换液续培

养。续培养后第 48 h, 约有 50% 以上的 NIH-3T3 细胞表达 GFP(图 9)。经计算其假病毒滴度约为 2.0×10^5 cfu/mL。

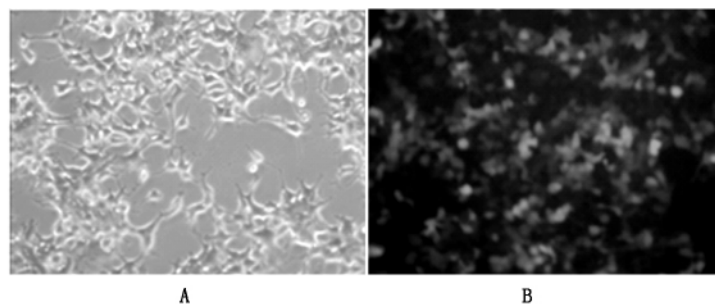


图 8 转染 pMX-2S-IRES-GFP 质粒的 plateE 细胞(100×) A. 转染前的 plateE 细胞; B. 转染后表达 GFP 的 plateE 细胞

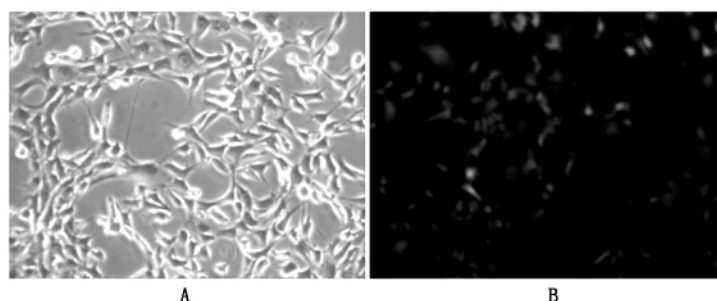


图 9 重组逆转录病毒侵染的 NIH-3T3 细胞 GFP 的表达(100×) A. 亮视野; B. 暗视野

2.5 2S-IRES-EGFP 在 NIH-3T3 细胞中的整合

用重组逆转录病毒侵染 NIH-3T3 细胞后的第 48 h, 收集全部 NIH-3T3 细胞并提取基因组 DNA, 经 PCR 法检测蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 在 NIH-3T3 细胞基因组的整合情况。结果显示, 以细胞基因组为模板扩增出了约为 750 bp 条带, 其与阳性对照条带相一致, 显示目的基因 2S-IRES-EGFP 已整合到 NIH-3T3 阳性细胞的基因组中(图 10)。

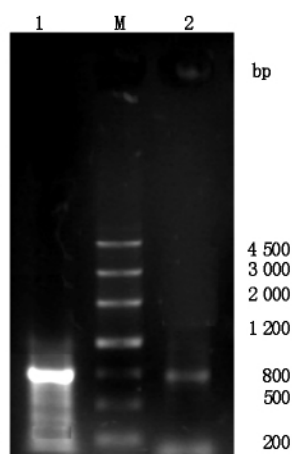


图 10 重组逆转录病毒侵染的 NIH-3T3 细胞 PCR 鉴定
1. 阳性对照; M. Marker III; 2. 基因组 PCR 产物

3 讨论

由于蜘蛛拖丝蛋白基因具有较高的 GC 含量而难以克隆其全序列, 目前仅克隆到编码蜘蛛拖丝蛋白的核心序列^[2,4]。为了建立获取大量蜘蛛丝蛋白的方法, 诸多学者采用基因工程等技术, 探讨了通过大肠杆菌^[5]、烟草或马铃薯^[6-7]及家蚕^[8]等获取蜘蛛丝蛋白的方法。但是, 这些方法仍存在表达系统不稳定、效率低下、所表达的丝蛋白缺乏分子取向和无法模拟蜘蛛丝的纤维化过程等缺陷。如果采用转基因的方法, 就有可能通过哺乳动物器官组织, 特别是通过被毛获得蜘蛛丝蛋白。

自采用逆转录病毒法建立了第 1 个转基因小鼠品系以来, 已先后采用该方法获得了转基因牛^[9]、转基因恒河猴^[10]和转基因猪^[11]等。现已证实, 逆转录病毒作为载体来传递基因具有操作简便、转基因效率高且稳定、宿主细胞广泛的特点^[12], 目前已成为生产转基因动物的一种手段。迄今为止, 尚未见到利用逆转录病毒生产转基因动物方法获得蜘蛛丝蛋白的研究报道。

研究证实, 利用内部核糖体进入位点 (Internal ribozyme entry site, IRES) 连接选择标记和报告基因双顺反子 mRNA, 在哺乳动物细胞中能有效表达

2 种蛋白^[13-14]。如果利用 IRES 元件相连目的基因和报告基因 EGFP, 则可在一个启动子作用下独立翻译表达目的基因, 又能在几乎相同的表达水平上观察和评价 EGFP 的表达。为了构建蜘蛛拖丝蛋白基因逆转录病毒载体, 本试验利用前期工作中获得蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 与 pIRES-EGFP 载体相连接, 构建了重组质粒。在此基础上, 利用对 MMLV (Moloney murine leukemia virus) 改造的 pMX 逆转录病毒载体构建 pMX-2S-IRES-EGFP。由于该逆转录病毒载体可同时表达蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 和 EGFP, 因此可通过 EGFP 表达即可间接检测蜘蛛拖丝蛋白基因 2S 表达状况。

逆转录病毒载体 pMX 属于复制缺陷型载体, 提供病毒包装信号、转录调控元件和多克隆位点, 但缺失编码壳蛋白的基因。目前, 常用 Plat-E 细胞辅助完成逆转录病毒的包装^[15], 并通过感染 NIH-3T3 细胞检测逆转录病毒的滴度及其在体细胞基因组中的整合状况。本试验中, 当将 pMX-2S-IRES-EGFP 质粒转染 Plat-E 细胞后, 约有 90% 以上的 Plat-E 细胞表达 GFP; 利用转染 Plat-E 细胞获得的重组逆转录病毒上清感染 NIH-3T3 细胞时, 约有 50% 的 NIH-3T3 细胞表达 GFP, 经计算回收的重组逆转录病毒滴度达到 2×10^5 CFU/mL; 此外, 经 PCR 检测, 重组逆转录病毒感染的 NIH-3T3 细胞基因组中整合有目的基因 2S-IRES-EGFP。上述结果表明, 所构建的 pMX-2S-IRES-EGFP 逆转录病毒载体及其包装体系, 能够获得具有侵染能力并能整合目的基因到宿主细胞基因组中的重组逆转录病毒, 该方法为进一步获得被毛中表达蜘蛛丝蛋白基因的转基因动物奠定基础。

参考文献:

- [1] 王晓玉, 柳增善, 任洪林. “生物刚性及弹性蛋白”蜘蛛丝研究进展[J]. 第四军医大学学报, 2004, 23(增刊): 31-34.
- [2] Xu Ming, Lewis R V. Structure of protein superfiber: spider dragline silk[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 7120-7124.
- [3] 王春生, 刘欣, 安铁洙, 等. 转 pK2.10-拟蜘蛛丝蛋白基因绵羊成纤维细胞株的筛选[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(8): 1262-1265.
- [4] Hinman M B, Lewis R V. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. Nephila clavipes dragline silk is a two-protein fiber[J]. J Biol Chem, 1992, 267: 19320-19324.
- [5] Arcidiacoco S, Mello C, Kaplan D L, et al. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49(1): 31-38.
- [6] Scheller J, Guhrs K H, Grosse F, et al. Production of spider silk proteins in tobacco and potato[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(6): 573-577.
- [7] Piruzina E S, Bogush V G, Sidoruk K V, et al. Construction of the synthetic genes for protein analogs of spider silk carcass spidroin 1 and their expression in tobacco plants[J]. Mol Biol(Mosk), 2003, 37(4): 654-662.
- [8] Miao Y G, Zhao A C, Zhang Y S, et al. Silk worm, *Bombyx mori* larvae expressed the spider silk protein through a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus [J]. J Appl Entomol, 2006, 130: 297-301.
- [9] Chan A W, Homan E J, Ballou L U, et al. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(24): 14028-14033.
- [10] Chan A W, Chong K Y, Martinovich C, et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes[J]. Science, 2001, 291(5502): 309-312.
- [11] Matsunara H, Onodera M, Tada N, et al. Transgenic-cloned pigs systemically expressing red fluorescent protein, kusabira-orange [J]. Cloning Stem Cells, 2008, 10(3): 313-323.
- [12] Ponder B A. Cancer genetics[J]. Nature, 2001, 411(6835): 336-341.
- [13] Pfutzner W. Retroviral bicistronic vectors[J]. Drug News Perspect, 2008, 21(9): 473-480.
- [14] Royer Y, Menu C, Liu X. High-throughput gateway bicistronic retroviral vectors for stable expression in mammalian cells; exploring the biologic effects of STAT5 overexpression[J]. DNA Cell Biol, 2004, 23(6): 355-365.
- [15] Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses[J]. Gene Therapy, 2000, 7(12): 1063-1066.