

网络出版时间:2016/1/28 14:23:11 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160128.1423.068.html

◇技术与方法◇

HLA-G 慢病毒表达载体的构建及病毒颗粒的包装

廖贵益, 钟金彪, 赵 飞, 朱道方

摘要 设计合成全长人类白细胞抗原 G(HLA-G) 基因系列, 在克隆质粒 pLV-EF1a-EGFP-N 的基础上构建 HLA-G 基因慢病毒表达载体, 测序鉴定 pLV-EF1a-EGFP-N-HLA-G 构建成功。与包装质粒(pGag/Pol, pRev, pVSV-G) 转染 293T 包装细胞, 包装出高效感染率的慢病毒颗粒, 测定病毒滴度为 1×10^9 TU/ml。HLA-G 慢病毒表达载体的构建及病毒颗粒的包装为转染 HLA-G 诱导移植肾免疫耐受的研究奠定了基础。

关键词 HLA-G; 慢病毒; 基因工程; 免疫耐受

中图分类号 R 392.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0457-04

人类白细胞抗原 G(human leucocyte antigen-G, HLA-G) 是一种非经典的 HLA-I 类分子, 其编码基因与分子结构与经典 HLA-I 类分子相似。HLA-G 的特点是分子胞内段仅 6 个氨基酸残基且缺乏经典 HLA-I 类分子保守的丝氨酸残基, 是其高效稳定表达在细胞膜表面的结构基础。1987 年 Geraghty 首次克隆 HLA-G 基因, 其位于 6 号染色体短臂, 编码 4 种膜结合型 HLA-G 和 2 种可溶性 HLA-G。各型 HLA-G 通过不同的机制对细胞免疫反应和体液免疫反应产生全面持久的抑制作用, 在胎儿、眼球等免疫赦免区的免疫耐受及肿瘤的免疫逃逸中起着重要作用。利用转基因技术使移植肾表达 HLA-G 可望建立移植肾的免疫耐受。该实验即构建携带 HLA-G 基因的慢病毒载体, 包装慢病毒颗粒, 用于后续转染 HLA-G 基因诱导移植肾免疫耐受的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细菌和细胞 携带绿色荧光蛋白基因的慢病毒表达载体 pLV-EF1a-EGFP-N 及包装质粒(pGag/Pol, pRev, pVSV-G) 购自上海吉玛制药技术

有限公司; DH5a 感受态细菌购自上海 TIANGEN 公司; 293T 细胞购自中国科学院上海细胞所。

1.1.2 主要试剂 EcoR I、BamH I、T4 连接酶和 DNA marker 购自加拿大 MBI Fermentas 公司; PCR 引物由生工生物工程(上海)公司合成; 质粒抽提试剂盒购自上海 QIAGEN 公司; PCR 检测试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 凝胶回收试剂盒购自北京英茂盛业生物科技有限公司; RNAi-Mate 购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HLA-G 基因的合成 参照 GenBank, 提交北京英茂盛业生物科技有限公司设计合成全长 HLA-G 基因片段, 上游引入 EcoR I 切点和增强基因表达的 Kozak 序列(GCCACC), 下游引入 BamH I 切点。

1.2.2 克隆载体与 HLA-G 基因片段的双酶切 用 EcoR I、BamH I 分别双酶切携带绿色荧光蛋白基因的慢病毒表达载体 pLV-EF1a-EGFP-N (图 1) 和 HLA-G 基因片段。HLA-G 酶切反应体系: HLA-G 20 μ l, EcoR I 1.5 μ l, BamH I 3 μ l, 10 $\times$ buffer 20 μ l 加 ddH₂O 至 100 μ l。pLV-EF1a-EGFP-N 酶切反应体系: pLV-EF1a-EGFP-N 10 μ l, EcoR I 1.5 μ l, BamH I 3 μ l, 10 $\times$ buffer 20 μ l 加 ddH₂O 至 100 μ l。37 $^{\circ}$ C 水浴保温 4~6 h。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并凝胶回收目的条带。

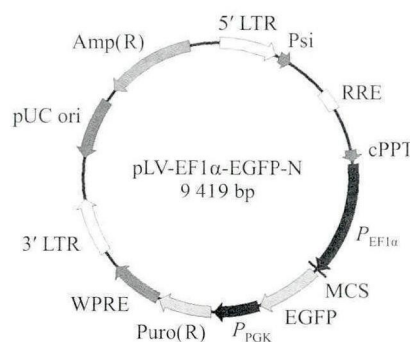


图 1 携带绿色荧光蛋白基因的慢病毒表达质粒 pLV-EF1a-EGFP-N

1.2.3 HLA-G 慢病毒载体构建 将酶切好的 HLA-G 连接到 pLV-EF1a-EGFP-N 载体上。连接反应体系: HLA-G 1.5 μ l, pLV-EF1a-EGFP-N 1 μ l, 10

2015-12-08 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2014A123)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科, 合肥 230022

作者简介: 廖贵益, 男, 副教授, 副主任医师, 责任作者, E-mail: liaogu-
iyi2@sina.com

× T4 连接 buffer 0.5 μl, T4 连接酶 0.5 μl, PEG4000 0.5 μl 加 ddH₂O 至 5 μl。将连接反应液 22 ℃ 孵育 30 min 转化至 DH5a 感受态, 涂于带有 Amp 抗性的 LB 培养皿中 37 ℃ 过夜培养。挑选 6 个克隆进行 PCR 阳性筛选, 上游引物 EF-F: ATTCTCCTTG-GAATTTGCCCT; 下游引物 pEGFP-N-3': CGTCGC-CGTCCAGCTCGACCAG。将阳性克隆送到擎科新业公司测序备用。

1.2.4 慢病毒颗粒包装 293T 细胞悬液接种培养皿, 10% FBS DMEM, 37 ℃、5% CO₂ 培养过夜。按比例将 pLV-EF1a-EGFP-HLA-G 和包装质粒 (pGag/Pol, pRev, pVSV-G) 加入无血清 DMEM 离心管。将 300 μl RNAi-Mate 加入另一无血清 DMEM 离心管。室温放置 5 min 后两管混合, 混合物室温再放置 20 ~ 25 min。除去 293T 细胞培养皿中的培养液, 加入无血清 DMEM 培养液, 再加入混合物, 混匀, 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中温育 4 ~ 6 h。吸弃培养液, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 37 ℃ 5% CO₂ 继续培养 72 h。将培养皿中上清液吸到离心管中, 4 ℃, 4 000 r/min 离心 4 min。将离心管上清液倒入注射器内, 用 0.45 μm 过滤器过滤。滤液在离心机中超速离心, 4 ℃, 20 000 r/min, 2 h。将浓缩的病毒液收集分装, -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.5 慢病毒滴度测定 293T 细胞培养至 90% 融合时, 倾去培养液, 用 3 ml D-Hank 液洗涤两次。加 1 ml Trypsin-EDTA 液, 混匀, 小心吸去胰酶溶液, 37 ℃ 放置 3 ~ 5 min。再加入 2 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 吹打使形成单细胞悬液。按 3 × 10 细胞/孔的浓度接种 96 孔板, 混匀后于 37 ℃ 5% CO₂ 培养 24 h。将慢病毒原液 10 μl, 用 10% FBS 的 DMEM 培养液十倍稀释 3 个 ~ 5 个梯度。吸去 96 孔板中的培养液, 每孔加入 100 μl 稀释的病毒液, 同时设立空白对照组, 于 37 ℃ 5% CO₂ 培养 24 h。吸弃 96 孔板中的稀释病毒液, 每孔加入 100 μl 10% FBS 的 DMEM 培养液于 37 ℃ 5% CO₂ 继续培养 72 h。通过 FACS 计数荧光细胞, 结合稀释倍数计算病毒滴度。

2 结果

2.1 HLA-G 基因的合成 参照 GenBank 提交的系列, 北京英茂盛业生物科技有限公司成功合成全长 HLA-G 基因片段, 并在上游引入 EcoR I 切点 (CAATTC)、增强基因表达的 Kozak 序列 (GCC ACC), 在下游引入 BamH I 切点 (GGATCC)。基因

系列如下: GAATTC GCCACC ATGGTGGTCATG
GCGCCCCGAACCCCTCTTCCTGCTGCTCTCGGGGGCC
CTGACCCTGACCGAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCC
ATGAGGTATTTACGCGCCCGCTGTCCCGGGCCCGGC
CGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTG
GACCACACGCAGTTCGTGCGGTTCGACAGCGACTCG
GCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGT
GGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGA
CACGGAACACCAAGCCCCACGCACAGACTGACAGA
ATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAG
AGCGAGGCCAGTTCTCACACCCCTCCAGTGGATGATT
GGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGC
GGGTATGAACAGTATGCCTACGATGGCAAGGATTAC
CTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCA
GCGGACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGT
GAGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTA
CCTGGAGGGCACGTGCGTGGACTGGCTCCACAGAT
ACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGCGCGCG
GACCCCCCAAGACACACGTGACCCACCACCCTGT
CTTTGACTATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCT
GGGCTTCTACCCTGCGGAGATCATACTGACCTGGCA
GCGGGATGGGAGGACACAGACCCAGGACGTGGAGC
TCGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGATGGAACCTTCC
AGAAGTGGGCAGCTGTGCTGGTGCCTTCTGGAGAGG
AGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGC
TGCCGGAGCCCCCTCATGCTGAGATGGAAGCAGTCTT
CCCTGCCCACCATCCCCATCATGGGTATCGTTGCTGG
CCTGGTTGTCTTGCAGCTGTAGTCACTGGAGCTGCG
GTGCTGCTGTGCTGTGGAGAAAGAAGAGCTCAGAT
CGGGATCC。

2.2 克隆载体与 HLA-G 基因片段的双酶切 克隆载体 pLV-EF1a-EGFP-N 与 HLA-G 基因片段 EcoR I、BamH I 双酶切产物凝胶电泳可见大的 pLV-EF1a-EGFP-N 片段 (9 419 bp) 与小的 HLA-G 基因片段 (1 020 bp)。见图 2。

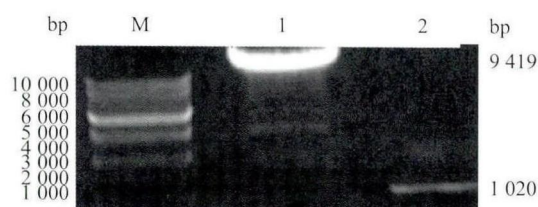


图2 克隆载体 pLV-EF1a-EGFP-N 与 HLA-G 基因酶切产物的凝胶电泳图

M: Marker; 1: pLV-EF1a-EGFP-N 片段; 2: HLA-G 基因片段

2.3 HLA-G 慢病毒载体构建 酶切好的 HLA-G 与 pLV-EF1a-EGFP-N 进行连接反应。连接反应液转化至 DH5a 感受态,涂于带有 Amp 抗性的 LB 培养皿中培养。PCR 筛选挑选阳性克隆。阳性克隆送双向测序,结果与 HLA-G 基因序列进行比对,显示构建序列与预计碱基序列完全一致并且插入方向正确(图 3),携 HLA-G 基因慢病毒表达载体 pLV-EF1a-EGFP-N-HLA-G 构建成功。

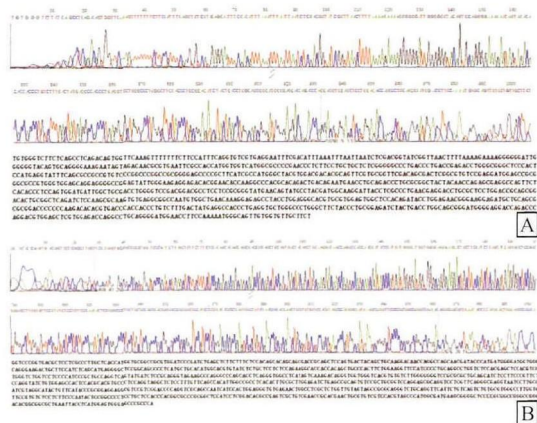


图 3 新建载体双向测序图谱及序列

A:正向测序;B:反向测序

2.4 慢病毒颗粒包装与滴度测定 构建的 pLV-EF1a-EGFP-HLA-G 和包装质粒共转染 293T 细胞,转染后 72 h 收集细胞培养上清,再以 DMEM 完全培养液十倍稀释病毒原液 4 个梯度分别转染 293T 细胞,培养 72 h 后通过 FACS 计数荧光细胞(图 4),结合稀释倍数计算病毒滴度为 1×10^9 TU/ml,感染时间均为 72 h。

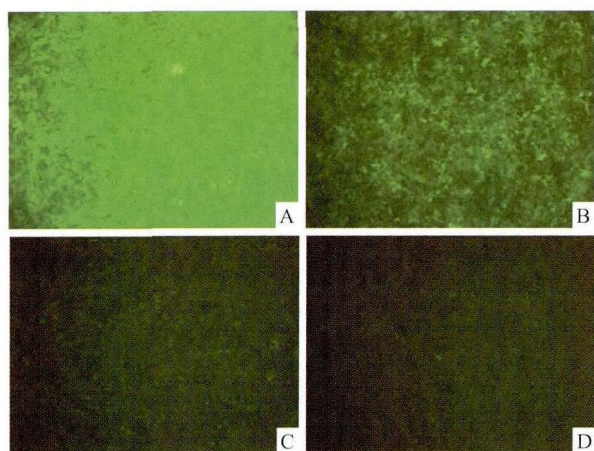


图 4 不同稀释倍数 HLA-G 慢病毒感染 293T 细胞的荧光图

A: 10^{-1} 稀释;B: 10^{-2} 稀释;C: 10^{-3} 稀释;D: 10^{-4} 稀释

3 讨论

HLA-G 特异性表达在妊娠期绒毛膜外细胞滋

养层^[1-3]、眼球、胸腺髓质间上皮细胞等免疫赦免区,也普遍表达在肿瘤细胞中参与肿瘤的免疫逃逸^[4-6],证实 HLA-G 是天然存在的、强力的免疫抑制剂。HLA-G 能与 T、B 淋巴细胞、NK 细胞和抗原呈递细胞作用产生强效广泛的免疫抑制作用,可望成为诱导免疫耐受的有效靶基因。

慢病毒载体来源于人类免疫缺陷病毒 1,目前被普遍用于研究领域,是基因转染相关研究的有力工具^[7],其能在宿主细胞内以自己的 RNA 为模板,在自身反转录酶的作用下合成 cDNA,再以此 cDNA 为模板合成双链 DNA,形成整合前复合体。然后在病毒整合酶的作用下,整合到宿主细胞的染色体上,随宿主细胞染色体的复制表达而复制表达。慢病毒载体与脂质体等其他基因转染方法相比较有多个优点^[8-9]:安全性高、转染效率高、可转染分裂期和非分裂期细胞;可整合入宿主细胞基因组内、能携带较大且多个外源基因、感染细胞后能长期稳定表达目的基因。因此选用慢病毒载体作为 HLA-G 基因的转染工具,以确保 HLA-G 基因高效、稳定、长期表达在目的细胞或器官中。

本实验所构建载体携带绿色荧光蛋白基因,感染细胞后可以表达绿色的荧光,便于在荧光显微镜下直接观察。本实验成功构建 HLA-G 基因慢病毒表达载体,并包装出具有高效感染率的慢病毒颗粒,为下一步将 HLA-G 基因稳定转染肾实质细胞奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Amodio G, Mugione A, Sanchez A M, et al. HLA-G expressing DC-10 and CD4 (+) T cells accumulate in human decidua during pregnancy[J]. Hum Immunol, 2013, 74(4): 406-11.
- [2] Liu K J, Wang C J, Chang C J, et al. Surface expression of HLA-G is involved in mediating immunomodulatory effects of placenta-derived multipotent cells (PDMCs) towards natural killer lymphocytes[J]. Cell Transplant, 2011, 20(11-12): 1721-30.
- [3] van Beekhuizen H J, Joosten I, Lotgering F K, et al. Natural killer cells and HLA-G expression in the basal decidua of human placenta adhesiva[J]. Placenta, 2010, 31(12): 1078-84.
- [4] Alkhouly N, Shehata I, Ahmed M B, et al. HLA-G expression in acute lymphoblastic leukemia; a significant prognostic tumor biomarker[J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 460.
- [5] Wlasiuk P, Stec A, Piechnik A, et al. Expression of soluble HLA-G in multiple myeloma patients and patients with renal failure[J]. Leuk Res, 2012, 36(7): 881-3.
- [6] Rodriguez J A, Galeano L, Palacios D M, et al. Altered HLA class I and HLA-G expression is associated with IL-10 expression in patients with cervical cancer[J]. Pathobiology, 2012, 79(2): 72-83.
- [7] 阮 峥, 王文天, 杨 洋, 等. 第三代慢病毒包装系统优化及 Rev

输尿管软镜术前留置双J管的疗效观察

郝宗耀, 刘明, 梁朝朝, 叶元平, 张贤生, 施浩强, 周骏, 张翼飞, 樊松, 王克孝

摘要 回顾性分析术前留置双J管对输尿管软镜钬激光碎石手术效果的影响。137例手术患者中84例术前常规留置双J管2周, 53例未留置双J管行一期手术。所有患者均顺利完成手术, 两组的手术时间、结石寻及率、碎石时间、一次碎石成功率、术后住院时间、并发症发生率等指标差异均无统计学意义, 可见术前留置双J管与否对于输尿管软镜钬激光碎石术效果影响不大。对于手术中发现输尿管口狭小及输尿管狭窄的患者, 仍然建议通过留置双J管被动扩张增加手术成功率, 以提高输尿管软镜碎石术的高效性和有效性。

关键词 上尿路结石; 双J管; 输尿管软镜技术

中图分类号 R 692.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0460-03

2015-12-21 接收

基金项目: 国家临床重点专科建设项目(编号: 2012); 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH177)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科, 安徽医科大学泌尿外科研究所, 合肥 230022

作者简介: 郝宗耀, 男, 副教授, 副主任医师;

梁朝朝, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: liang_chaozhao@163.com

输尿管软镜技术以其微创、安全和有效的特点受到越来越多的关注, 在上尿路结石治疗中发挥着越来越重要的作用^[1]。通常认为在输尿管软镜手术前输尿管内留置双J管2周左右, 对输尿管被动扩张以便于后期手术顺利进行, 但也延长了手术等待时间、增加患者痛苦及医疗费用等。为研究术前放置双J管对手术效果的影响, 对137例使用输尿管软镜碎石治疗的上尿路结石患者资料进行回顾性分析。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院泌尿外科2014年1月~2015年7月使用输尿管软镜进行上尿路结石治疗的137例患者资料, 其中男86例, 女51例。年龄23~80岁, 平均49.0岁。137例患者均确诊为上尿路结石, 其中左侧62例, 右侧39例, 双侧36例。患者入院体征主要为不同程度的腰痛伴(或)血尿。术前尿常规: 白细胞: 正常或+~++ , 尿培养提示16例阳性。行B超或静脉尿路造影(intravenous urogram, IVU)检查, 示单发或多发

表达质粒对慢病毒包装效率作用初探[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(6): 770-4.

[8] 徐丽娟, 张云巍, 胡亚卓, 等. FGF4基因慢病毒表达载体的构建、包装及鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(17): 2768-

73.

[9] 张晓宇, 秦宜德, 张文晓, 等. 牛乳铁蛋白肽基因LfeinB的慢病毒载体的构建与鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(7): 709-12.

Construction of lentiviral vector carrying HLA-G gene and packing of the lentiviruses

Liao Guiyi, Zhong Jinbiao, Zhao Fei, et al

(Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract The human leucocyte antigen-G (HLA-G) gene was synthesized. According to gene sequencing, the lentiviral vector carrying HLA-G was constructed successfully on the basis of cloning plasmid pLV-EF1a-EGFP-N. The constructed lentiviral vector was transferred into 293T package cell with pGag/Pol, pRev and pVSV-G and the lentiviruses with high infection efficiency were produced. The virus titer was 1×10^9 TU/ml. Construction of lentiviral vector carrying HLA-G gene and packing of the lentiviruses laid the material foundations for the study of HLA-G gene in inducing immune tolerance of transplanted kidney.

Key words HLA-G; lentivirus; gene engineering; immune tolerance