

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01230

• 研究快报 •

## 胰腺癌新基因 S100P 与绿色荧光蛋白融合基因慢病毒载体的构建

李刚<sup>1</sup>, 金钢<sup>1\*</sup>, 周旭宇<sup>1</sup>, 胡先贵<sup>1</sup>, 王军<sup>2</sup>, 李铁军<sup>2</sup>

1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

**[摘要]** 目的: 构建胰腺癌新基因 S100P 与绿色荧光蛋白(GFP)融合基因慢病毒载体。方法: 实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)方法扩增获得 S100P 的全外显子片段, 使之克隆到带 GFP 荧光报告基因慢病毒表达载体质粒中, 慢病毒包装质粒和穿梭质粒共转染 293T 细胞, 包装成功后收集上清, 浓缩, 鉴定。取浓缩纯化后的病毒上清感染 293T 细胞和宿主胰腺癌细胞, 荧光显微镜观察 293T 细胞的荧光表达, RT-PCR 鉴定胰腺癌细胞中 S100P 的表达水平。结果: 电泳鉴定结果与目的基因表达条带完全吻合, 克隆测序结果与 NCBI 收录的 S100P 基因序列完全一致。重组慢病毒质粒可高效转染 293T 细胞, 荧光显微镜下可观察到大量绿色荧光。共转染后 293T 细胞上清可高效感染 293T 细胞, 感染后宿主细胞中 S100P 高表达。结论: 成功构建了 S100P 与 GFP 融合基因慢病毒表达载体, 为进一步研究 S100P 基因的相关功能提供了适合的稳定转染载体。

**[关键词]** S100P 基因; 慢病毒; 胰腺肿瘤; 绿色荧光蛋白

**[中图分类号]** R 735.9      **[文献标志码]** A      **[文章编号]** 0258-879X(2008)10-1230-04

### Construction of lentivirus carrying novel human pancreatic cancer gene S100P and green fluorescent protein gene

LI Gang<sup>1</sup>, JIN Gang<sup>1\*</sup>, ZHOU Xu-yu<sup>1</sup>, HU Xian-gui<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, LI Tie-jun<sup>2</sup>

1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct lentivirus carrying both novel human pancreatic cancer gene S100P and green fluorescent protein (GFP) gene. **Methods:** The fragments containing all the exons of S100P were amplified by RT-PCR and were cloned into the lentivirus vectors labeled with GFP. The lentivirus was packaged and was used to transfect 293T cells together with pShuttle. The supernatant of virus-producing cells was harvested, concentrated, identified, and was used to infect 293T cells and pancreatic cancer cells. Fluorescent microscopy was used to observe the fluorescence in the 293T cells; and real time-PCR was used to examine the relative contents of S100P in pancreatic cancer cells. **Results:** Electrophoresis showed that the sequence of the RT-PCR product was consistent with the data of NCBI by DNA sequencing analysis. The lentivirus effectively transfected 293T cells. Strong green fluorescence was observed by fluorescent microscopy. The supernatant of lentivirus-transfected 293T cells effectively infected 293T cells and the relative content of S100P in the transfected pancreatic cancer cells was higher than that of control group. **Conclusion:** The lentivirus vector containing S100P-GFP recombinant gene have been successfully constructed, which provides a basis for further study of S100P function.

**[KEY WORDS]** S100P gene; lentivirus; pancreatic neoplasms; green fluorescent protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1230-1233]

随着对胰腺癌发生、发展的分子生物学机制的深入研究, 已发现在胰腺癌的发病过程中涉及到多个癌基因的过度表达和抑癌基因的失活。本课题前期实验通过基因芯片技术筛选出一条胰腺癌相关的全长新基因, 克隆号为 2621d01, 我们将其命名为

S100P, 并已被收入 GenBank 数据库(登录号 AF539739)<sup>[1]</sup>。本实验的目的是构建胰腺癌新基因 S100P 与绿色荧光蛋白(GFP)融合基因慢病毒载体, 为研究 S100P 基因的相关功能研究提供高效的外源基因导入效率以及在宿主中长期稳定表达的新

**[收稿日期]** 2008-01-30      **[接受日期]** 2008-03-26

**[基金项目]** 上海市浦江人才计划资助(05PJ14006). Supported by Pujiang Talent Project of Shanghai(05PJ4006).

**[作者简介]** 李刚, 博士, 主治医师、讲师. E-mail: shewa001@hotmail.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25072074, E-mail: lgsmile72@163.com

途径,从而为揭示 S100P 基因在胰腺癌的发生发展过程中的重要作用奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 慢病毒包装系为 pPACKH1 Lentivector Packaging Kit (LV500A-1); cDNA 表达载体为 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP<sup>TM</sup> (Cat. # CD511A-1) 购自美国 System Biosciences 公司。293T 细胞购自中科院细胞研究所。人胰腺癌细胞株 (SW1990, Patu8988, Patu8990) 为长海医院胰腺病研究所赠送。细胞培养基、转染试剂、Lipofectamine2000 均购于 Invitrogen 公司。SYBR(R) Premix Ex Taq<sup>TM</sup>、限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、DNA 分子量标准等,均为 TaKaRa 公司产品。0.22  $\mu\text{m}$  除菌膜为 Millipore 公司产品。琼脂粉、酵母提取物、胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品。DNA 合成及克隆测序在上海生工工程有限公司进行。去内毒素质粒抽提系统来自 Qiagen 公司。其他常规化学试剂购于上海国药集团。RNA 酶抑制剂 MMLV 反转录酶体系购于 Promega 公司。

1.2 引物设计 S100P 基因的一对扩增引物如下: S100P-F: 5'-GGAATTCGCCACC atgacggaactagag-3', S100P-R: 5'-CGGGATCC tcatttgagtctgcc-3'。上游引物均从 5' 开始,依次添加保护碱基(G)、EcoRI 酶切位点(GAATTC)、kozak 序列(GCCACC),然后与目的基因相互匹配的碱基序列: atgacggaactagag; 下游引物均从 5' 开始,依次添加保护碱基(CG)、BamH I 酶切位点(GGATCC),然后与目的基因相互匹配的碱基序列: tcatttgagtctgcc。

1.3 RT-PCR 扩增 实验前,收集胰腺患者标本液氮保存。实验时,液氮中取出标本,迅速放入干冰中,在样品冰冻的状态下,切取、称量 1 mg,添加 1 ml 4℃ 预冷的 TRIzol,在冰上进行组织研磨,进行 Total RNA 的抽提,方法和步骤见参考文献<sup>[2]</sup>。取 1  $\mu\text{l}$  RNA 溶液稀释到 99  $\mu\text{l}$  TE 中,读取其在分光光度计 260 nm 和 280 nm 处的光密度(D)值,测定 RNA 溶液浓度和纯度。逆转录反应体系和条件如下: LA Taq (10 U) 0.5  $\mu\text{l}$ , LA Buffer (10 $\times$ ) 5.0  $\mu\text{l}$ , MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu\text{l}$ , Template(plasmid DNA) 2.0  $\mu\text{l}$  (100 ng/ $\mu\text{l}$ ), Primer F (10  $\mu\text{mol/L}$ ), Primer R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , dNTP MIX (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 8.0  $\mu\text{l}$ , dH<sub>2</sub>O 31.0  $\mu\text{l}$ 。PCR 热循环仪上进行以下反应: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 40 s, 56℃ 1 min, 72℃ 10 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 8 min, 取 5  $\mu\text{l}$  反应产物进行琼脂凝胶电泳分析。

1.4 构建 S100P 基因的 cDNA 克隆 对 PCR 产物进行切胶回收,使用天根公司的凝胶回收试剂盒。回收产物采用 Eppendorf BioPhotometer 紫外分光光度计测定浓度为 30 ng/ $\mu\text{l}$ , -20℃ 保存。对回收的目的基因进行 BamH I 单酶切处理, 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳,切胶回收酶切后目的基因片段,对表达载体进行线性化处理: BamH I (10 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , EcoR I (10 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , K Buffer (1 $\times$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ , 质粒 DNA (500 ng/ $\mu\text{l}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , dH<sub>2</sub>O 6.5  $\mu\text{l}$ , 37℃, 4 h。0.5% 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收酶切后的载体片段。连接目的基因和线性化的载体: 质粒 DNA 1.0  $\mu\text{l}$ , 目的片段 6.0  $\mu\text{l}$ , T4 连接酶 (5 U) 0.5  $\mu\text{l}$ , Buffer (10 $\times$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ , dH<sub>2</sub>O 1.5  $\mu\text{l}$ , 22℃, 2 h。重组质粒的转化: 将 5  $\mu\text{l}$  连接产物加入感受态细胞,用移液枪缓慢混匀,冰浴放置 30 min; 将混合物快速放入 42℃ 水浴中进行热激, 90 s 后拿出,冰浴 2 min, 将转化产物加入 900  $\mu\text{l}$  的 SOC 培养基中, 37℃ 150 r/min 摇床培养 1 h, 收集菌液, 分 100  $\mu\text{l}$  和 900  $\mu\text{l}$  涂布 LB 平板。挑取数个单菌落,使用载体多克隆位点两端的引物进行 PCR 扩增,检测阳性菌落。测序,使用 QIAGEN plasmid mini kit (Cat. No: 12123) 试剂盒进行不含内毒素质粒的提取。

1.5 慢病毒颗粒的制备和鉴定 培养 293T 细胞,并于感染前 1 d 接种到直径 10 cm 培养皿,进行共转染实验。即使用慢病毒包装质粒混合物和构建好的慢病毒穿梭质粒共转染 293T 细胞,转染后 24 h 使用含 1% FBS 的 DMEM 对细胞进行换液处理,转染 48 h 后,收集细胞上清, 4 000 $\times g$  离心 5 min, 然后使用 0.45  $\mu\text{m}$  的 PVDF 膜过滤上清液,冰浴保存。测定病毒滴度; 取病毒上清,按照 MOI=10 感染 293T 细胞和胰腺癌细胞 SW1990, Patu8988, Patu8990, 荧光显微镜观察 293T 细胞,待胰腺癌细胞荧光表达稳定后,收集细胞, Real time-PCR 鉴定胰腺癌细胞中 S100P 的表达水平 (仪器型号: TaKaRa TP800), 引物见表 1。反应条件: 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共 40 个循环。

## 2 结果

2.1 S100P cDNA 的鉴定结果 分光光度检测结果表明 D 值均在 1.8~2.1, 样本抽提的 RNA 纯度完全合格,琼脂凝胶电泳结果条带清晰、完整, RNA 无降解。RT-PCR 产物的琼脂凝胶电泳可见一清晰的特异扩增条带,其大小与理论值相符合。使用重组表达载体质粒 DNA 为模板,载体多克隆位点两端的引物,进行 PCR 反应,获得 PCR 产物进行电泳

凝胶分析,条带清晰且大小正确(图 1)。DNA 测序结果表明,我们获得的 S100P cDNA 与目的基因相

应序列正向相符,无碱基缺失或错误。

表 1 引物的序列  
Tab 1 Sequence of primers

Gene	Two-way sequence of primer	Length (bp)
GAPDH	Forward primer: 5'-AAG AAG GTG GTG AAG CAG GC-3' Reverse primer: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	203
S100P	Forward primer: 5'-GCT GCC AGT GGG ACA TTT TCT CG-3' Reverse primer: 5'-CAC GGC ATC CTT GTC TTT TCC ACT-3'	229

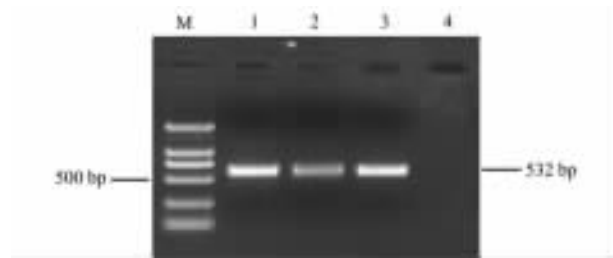


图 1 RT-PCR 结果  
Fig 1 Result of RT-PCR

M: DNA Marker;1-3;Positive cell clone;4;Negative control

2.2 慢病毒载体系统的鉴定 构建的慢病毒载体系统中的质粒成分转移至包装 293T 细胞中,荧光显微镜下见大量绿色荧光(图 2)。取病毒上清感染 293T,荧光显微镜下观察到大量绿色荧光分布(图 3)。有荧光表达的细胞数量和细胞总数相比较后,确定病毒滴度为  $1.0 \times 10^4$  ifu/ $\mu$ l ( $1.0 \times 10^8$  ifu/10 ml)。

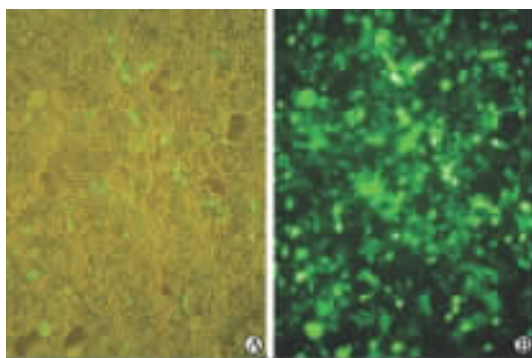


图 2 共转染 24 h 后荧光检测结果  
Fig 2 Fluorescent analysis of 293T cells 24 h after co-transfection

A:Control;B;Co-transfected. Original magnification:  $\times 100$

2.3 S100P 在慢病毒感染的胰腺癌细胞中的表达 慢病毒感染胰腺癌细胞后,RT-PCR 检测 S100P 表达含量结果:与对照胰腺癌细胞组相比,病毒感染细胞中 S100P 的表达量明显上调(表 2)。

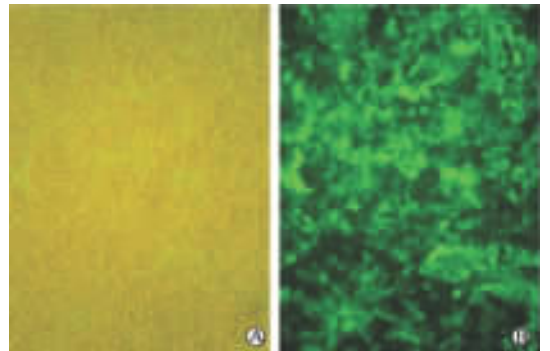


图 3 上清感染 293T 细胞后 24 h 荧光检测结果  
Fig 3 Fluorescent analysis of 293T cells 24 h after infected by supernatant

A:Control;B;Effected by supernatant. Original magnification:  $\times 100$

表 2 S100P 基因在宿主细胞中表达的检测  
Tab 2 Analysis of S100P expression in pancreatic cancer cells

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	SW1990	PaTu8988	PaTu8990
Control	0.198 $\pm$ 0.016	0.183 $\pm$ 0.013	0.281 $\pm$ 0.016
Effected	0.812 $\pm$ 0.013**	0.517 $\pm$ 0.025*	0.500 $\pm$ 0.023*

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 3 讨论

S100P 是我们前期实验中利用基因芯片技术在 11 条胰腺癌相关的全长新基因中挑选出的,克隆编号为 2621d01。芯片杂交结果显示在胰腺癌组织中高表达,而在正常胰腺组织中低表达,二者差异显著,平均 Cy5/Cy3 值为 4.92。我们对这条新基因在多种人体组织中的表达差异进行了 Northern 杂交验证,结果表明这条基因芯片检测结果完全正确,证实了芯片杂交的可靠性<sup>[3]</sup>。

我们选用复制缺陷型 HIV-1 作为载体,制备了携带 S100P 基因的重组慢病毒颗粒。慢病毒是逆转录病毒的一种,具有逆转录病毒的基本结构,也有不同于逆转录病毒的组分和特性<sup>[4]</sup>。复制的缺陷型

HIV-1 载体由 3 部分组成:目的基因载体成分、包装结构成分和包膜结构成分。目的基因载体成分是将 HIV 3' 端 LTR 中的 U3 部分切短,使之丧失启动病毒复制功能,同时插入 CMV 启动子调控,即成为复制缺陷型载体;包装结构成分是由 HIV-1 基因组去除了包装、逆转录和整合所需要的序列而构建,但能够提供产生病毒颗粒所必需的蛋白。这样极大降低了其自我复制能力,使安全性大大提高<sup>[5]</sup>。慢病毒载体最大的优势是不仅能高效感染处于分裂期的靶细胞,而且能够感染静止期的细胞,同时不产生嵌合体动物<sup>[6]</sup>。慢病毒基因组逆转录后能整合到宿主染色体上,由于病毒载体改构后,不在宿主细胞内繁殖,不会导致宿主细胞的死亡,被它感染或转化的细胞能够连续传代。因此,利用慢病毒载体制备转基因动物近年来始终是基因治疗的热点,以 HIV-1 为基础构建的这类慢病毒载体有望成为理想的基因转染载体<sup>[7-8]</sup>。

为了方便观察,慢病毒包膜结构成分以新型报告基因——绿色荧光蛋白基因(copGFP)为标志基因,copGFP 是来源于海藻的新一代增强型绿色荧光蛋白,在亮度方面大大优于普通的增强型绿色荧光蛋白。通过克隆目的基因-copGFP 的融合表达体,无论细胞中还是活体内都可以通过显微镜清晰观察到靶基因的表达水平<sup>[9-10]</sup>,可以直观、方便地观察实验结果,大大缩短了实验流程。

在检测胰腺癌细胞中的目的基因时,我们采用了 RT-PCR 的技术和方法,其原理<sup>[11]</sup>是在 PCR 反应体系中加入荧光嵌合染料,由于染料可以嵌合到双链 DNA 的沟状区域。因此,通过观察荧光强度即可知道反应体系中双链 DNA 产物的多少,进而可以求得待测样本中目的基因 mRNA 的原始拷贝数或者相对含量。在后续的工作中,我们打算制作 S100P 的抗原及抗体,以便在蛋白水平进行必要的统计和分析。

本实验构建的 S100P 基因重组载体,经酶切后获得与目的基因大小一致的清晰条带,表明构建成功。使用慢病毒包装质粒混合物和构建好的慢病毒表达质粒共转染 293T 细胞 24 h 后,荧光显微镜下可见大量绿色荧光,证实已有大量质粒转染入 293T 细胞。取病毒上清感染 293 细胞,荧光显微镜下可见绿色荧光分布,表明慢病毒具有感染活性;感染后

72 h,进行细胞传代,传代后不同代数细胞,荧光显微镜下也可见绿色荧光,表明经传代后仍能表达目的基因。慢病毒感染胰腺癌细胞后,S100P 的表达量显著上调,表明慢病毒可高效感染胰腺癌细胞,同时目的基因可成功表达。因此 S100P 基因慢病毒载体为进一步研究 S100P 基因的相关功能提供了适合的稳定转染载体。

## [参 考 文 献]

- [1] Jin G, Hu X G, Ying K, Tang Y, Liu R, Zhang Y, et al. Discovery and analysis of pancreatic adenocarcinoma genes using cDNA microarrays[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 6543-6548.
- [2] Sambrook I, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄觉培 译. 北京: 科学出版社, 2002: 516-540.
- [3] Gribenko A, Lopez M M, Richardson J M, Makhatadze G I. Cloning, overexpression, purification, and spectroscopic characterization of human S100P[J]. *Protein Sci*, 1998, 7: 211-215.
- [4] Naldini L, Blomer U, Gage F H, Verna I M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 11382-11388.
- [5] Philippe S, Sarkis C, Barkats M, Mammeri H, Ladroue C, Petit C, et al. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 17684-17689.
- [6] Bainbridge J W, Stephens C, Parsley K, Demaison C, Halfyard A, Thrasher AJ, et al. *In vivo* gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector: efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium [J]. *Gene Ther*, 2001, 8: 1665-1668.
- [7] Hall S L, Lau K H, Chen S T, Felt J C, Gridley D S, Yee J K, et al. An improved mouse Sca-1<sup>+</sup> cell-based bone marrow transplantation model for use in gene- and cell-based therapeutic studies[J]. *Acta Haematol*, 2007, 117: 24-33.
- [8] Shinohara E T, Kaminski J M, Segal D L, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, et al. Active integration: new strategies for transgenesis[J]. *Transgenic Res*, 2007, 16: 333-339.
- [9] 欧阳为明, 张继帅, 金伯泉. PCDM8-GFP 报告载体的构建及鉴定[J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24: 131-132.
- [10] Pang J, Cheng M, Haire S E, Barker E, Planelles V, Blanks J C, et al. Efficiency of lentiviral transduction during development in normal and rd mice[J]. *Mol Vis*, 2006, 12: 756-767.
- [11] Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, et al. Quantitative of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 2899-2903.

[本文编辑] 李丹阳