

## 多西环素调控的重组杆状病毒载体 Ac-EGFP 及 Ac-HGF 的构建

潘志敏<sup>1△</sup>, 罗叶婷<sup>2△</sup>, 郭菲<sup>3</sup>, 郑超<sup>3</sup>, 马勇<sup>3</sup>, 李广生<sup>2</sup>, 程细高<sup>1\*</sup>

1. 南昌大学第二附属医院骨科, 南昌 330006

2. 赣州市人民医院神经内科, 赣州 341000

3. 南昌大学第一附属医院骨科, 南昌 330006

**[摘要]** **目的** 将 Tet-On 系统与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)或肝细胞生长因子(HGF)共同构建于一新型重组杆状病毒载体,并以不同浓度的多西环素(DOX)调控 EGFP 及 HGF 表达。**方法** 酶切重组质粒 pFast-Tet、pTRE-EGFP 和 pTRE-HGF,回收目的片段后连接 pFast-Tet,分别转化含有 AcMNPV Bacmid 和 helper 质粒的 DH10Bac 感受态细胞,筛选后提取 Bacmid DNA 并鉴定(命名为 Ac-EGFP 和 Ac-HGF)。将 Ac-EGFP 和 Ac-HGF 感染骨髓间充质干细胞,加入不同浓度的 DOX 调控 EGFP(DOX 浓度为 0、200、500、1 000 ng/mL)和 HGF(DOX 浓度为 0、10、100、500、1 000、1 200 ng/mL)的表达。在荧光显微镜下观察 EGFP 的表达,用 ELISA 法检测 HGF 的表达量。**结果** 经鉴定 EGFP、HGF 与 Tet-On 系统成功构建在同一杆状病毒载体,且在骨髓间充质干细胞中具有较高的感染率。在较高浓度 DOX 调控下改造后的重组杆状病毒可高表达 EGFP 和 HGF,低浓度或无 DOX 时表达量逐渐减低。**结论** 本研究证实可将 Tet-On 系统与 EGFP 或 HGF 共同构建于一新型重组杆状病毒载体,改造后的重组杆状病毒能稳定、高效感染骨髓间充质干细胞,不同浓度的 DOX 可调控 EGFP 及 HGF 的表达,无 DOX 时呈低本底。

**[关键词]** 增强型绿色荧光蛋白;肝细胞生长因子;Tet-on 系统;骨髓;间质干细胞;杆状病毒**[中图分类号]** R 394.8**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)08-0904-05

### Construction of recombinant baculovirus carriers of Ac-EGFP and Ac-HGF regulated by doxycycline

PAN Zhi-min<sup>1△</sup>, LUO Ye-ting<sup>2△</sup>, GUO Fei<sup>3</sup>, ZHENG Chao<sup>3</sup>, MA Yong<sup>3</sup>, LI Guang-sheng<sup>2</sup>, CHENG Xi-gao<sup>1\*</sup>1. Department of Orthopaedic Surgery, the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

2. Department of Neurology, the People's Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000, Jiangxi, China

3. Department of Orthopaedic Surgery, the 1<sup>st</sup> Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

**[Abstract]** **Objective** To construct novel recombinant baculoviruses with Tet-On system and enhanced green fluorescent protein (EGFP) or hepatic growth factor (HGF) which could be regulated by different concentrations of doxycycline (DOX). **Methods** The recombinant plasmids pFast-Tet, pTRE-EGFP and pTRE-HGF were digested. The target fragments were collected and connected to pFast-Tet, the resultants were used to transform DH10Bac competent cells containing AcMNPV Bacmid and helper plasmid, and the Bacmid DNA were identified (named Ac-EGFP and Ac-HGF) after selection and extraction. Ac-EGFP and Ac-HGF were then transfected into bone mesenchymal stem cells (BMSCs), and the expression of EGFP and HGF were regulated by different concentrations of DOX (EGFP: 0, 200, 500, and 1 000 ng/mL; HGF: 0, 10, 100, 500, 1 000, and 1 200 ng/mL); EGFP expression was observed under fluorescence microscope and the level of HGF expression was detected by ELISA. **Results** It was verified that Tet-On system was successfully constructed in a baculovirus vector with EGFP or HGF, and they were highly transfected into BMSCs. EGFP and HGF were highly expressed when exposed to high concentrations of DOX. And the expression of EGFP and HGF were gradually decreased at low concentration or absence of DOX. **Conclusion** Tet-On system can be used to construct a new recombinant baculovirus vector containing EGFP or HGF and it can stably and highly transfect BMSCs; different concentrations of DOX can lead to different expression of EGFP and HGF, and they are in low background expression without DOX.

**[收稿日期]** 2012-09-26**[接受日期]** 2013-02-19**[基金项目]** 国家自然科学基金(81060147). Supported by National Natural Science Foundation of China (81060147).**[作者简介]** 潘志敏, 硕士. E-mail: jasonpum@sina.com; 罗叶婷, 硕士. E-mail: 710288604@qq.com

△ 共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0791-86311590, E-mail: cxgyaf1004@sina.com

[Key words] enhanced green fluorescent protein; hepatocyte growth factor; Tet-On system; bone marrow; mesenchymal stem cells; baculovirus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8):904-908]

杆状病毒载体系统已广泛应用于表达外源性重组蛋白, 在杆状病毒表达系统内构建绿色荧光蛋白(GFP)或其他外源基因的转移载体和重组病毒已有报道<sup>[1-2]</sup>, 但目前尚未有在同一杆状病毒内共同构建四环素开关系统 Tet-On 与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)或肝细胞生长因子(HGF)的可调节杆状病毒载体的相关报道。含有哺乳动物细胞启动子元件的重组杆状病毒可有效地感染多种哺乳动物原代和传代细胞<sup>[3]</sup>。借助于杆状病毒载体, 已成功实现了外源基因在哺乳动物细胞内的瞬时或稳定表达。外源基因可通过两种途径插入到杆状病毒, 即同源重组和转座。研究发现杆状病毒表达系统既可以感染昆虫类宿主, 又可感染多种哺乳动物细胞并转导外源基因在其内表达<sup>[4]</sup>。杆状病毒本身不能在哺乳动物细胞中复制, 因此对哺乳动物是安全的, 且转导成功的细胞可以稳定传代并能有效表达外源基因<sup>[5]</sup>, 可用于体内外基因的表达、真核蛋白的表面展示及肿瘤治疗等<sup>[4]</sup>。本研究以 EGFP 作为报告基因构建重组杆状病毒, 其易于检测、灵敏度高且不受假阳性干扰, 可预判该重组载体是否构建成功, 也可以作为重组载体构建及调控效果的对照。本研究所选的目的基因 HGF 通过自分泌和旁分泌作用于多种组织细胞, 能促进血管内皮细胞增殖和新生血管生成, 还能诱导骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)向成骨分化, 且对 BMSCs 有趋化作用, 即使在缺氧条件下也能阻止细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。因此, HGF 若能与 BMSCs 协同作用治疗缺血环境下的骨坏死是种理想疗法。但 HGF 过表达存在致瘤风险, 本研究把 Tet-On 系统与 HGF 共同构建于一新型重组杆状病毒载体, 取合适时间点用不同浓度多西环素(doxycycline, DOX)调控 HGF 表达, 以避免 HGF 持续表达而引起致瘤等不良反应。

## 1 材料和方法

1.1 材料 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xba* I、*Xho* I、*Hind* III (Invitrogen 公司); pEGFP-N1、pTRE-Tight、pFastBac<sup>TM</sup> 1、pTet-On Advanced、helper 质粒 (TaKaRa 公司); 人 HGF 基因

(NM 000601.4, 上海生博医学生物工程有限公司); 苜蓿根纹夜蛾多核型多角体病毒杆粒 (AcMNPV Bacmid), 感受态细胞 DH5 $\alpha$ 、DH10Bac (Invitrogen 公司); 人 BMSCs (南昌大学第一附属医院烧伤实验室提供); pMD19-T (Promega 公司); LB 平板培养基 (TaKaRa 公司); 氨苄青霉素、庆大霉素、卡那霉素、DOX、四环素 (Sigma 公司); F-12 及 DMEM 培养基 (Hyclone, Invitrogen 公司); 脂质体 2000、胶回收试剂盒 (Qiagen 公司); BX43-32NC01-FLB1 型荧光显微镜 (Olympus 公司)。

1.2 目的基因的扩增、鉴定及连接 pMD19-T 和 pTRE-Tight 以 pEGFP-N1 为模板, 行 PCR 扩增 EGFP (719 bp), 引物及酶切设计: EGFP-F 5'-AGG ATC CAT GGT GAG CAA GGG CGA G-3' (*Bam*H I); EGFP-R 5'-GTC TAG ATT ACT TGT ACA GCT CGT CC-3' (*Xba* I)。用人 HGF (2 187 bp) 基因进行扩增, 引物及酶切设计: HGF-F 5'-AGG ATC CAT GTG GGT GAC CAA ACT CC-3' (*Bam*H I); HGF-R 5'-GTC TAG ACT ATG ACT GTG GTA CCT TAT A-3' (*Xba* I)。扩增产物行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。回收 PCR 产物胶连接于 pMD19-T 并转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 挑取阳性菌落, 提取质粒。酶切 pMD19-T 载体, 回收目的基因片段与 pTRE-Tight 连接, 生成的质粒命名为 pTRE-EGFP 和 pTRE-HGF, 再转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 提取质粒行 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。

1.3 pTet-On Advanced 酶切后连接 pFastBac<sup>TM</sup> 1 pTet-On Advanced (图 1A) 用 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切后产生两部分 (5.1 kb + 2 kb), 回收约 2 kb 的部分 (即图 1A 中 rtTA2<sup>s</sup>-M2 片段) 并连接经 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切后的 pFastBac<sup>TM</sup> 1 (图 1B 中标示插入处)。然后转化感受态细胞, 提取质粒并行酶切鉴定, 命名为 pFast-Tet。

1.4 目的基因片段与 pFast-Tet 的连接 将重组质粒 pFast-Tet、pTRE-EGFP 和 pTRE-HGF 分别用 *Xho* I 单酶切。将目的基因片段连接 pFast-Tet, 转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 提取质粒行 *Xho* I 酶切鉴定,

鉴定正确的分别命名为 pFast-Tet-EGFP 和 pFast-Tet-HGF。同时用 BamH I 鉴定方向,选取目的基

因与 Tet-On 插入方向相反的克隆。

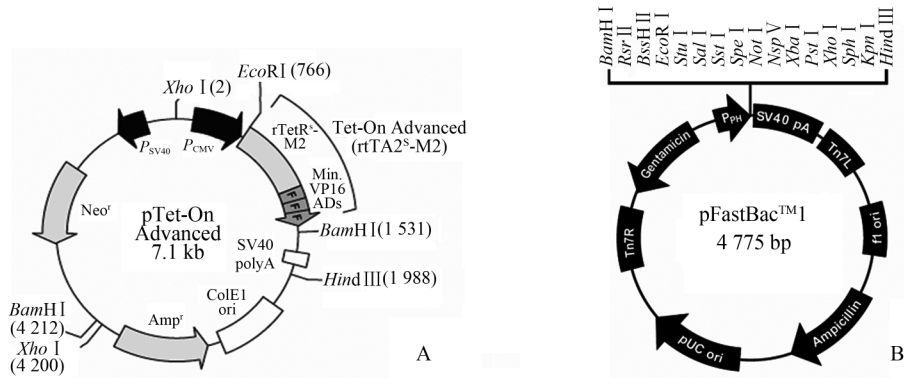


图 1 pTet-On Advanced 酶切后连接 pFastBac™1

A: 四环素调控的反式激活子 (rtTA2<sup>s</sup>-M2) 和 pTRE-Tight 中的四环素相应元件 (TRE) 特异结合可启动下游目的基因的表达; B: P<sub>PH</sub> 启动子可启动下游插入的片段, 通过位点特异性重组在大肠杆菌中产生重组杆状病毒, 可显著提高重组杆状病毒的重组效率. 图片由 TaKaRa 公司及 Invitrogen 公司提供

1.5 重组 Bacmid 的构建 分别取 3 μL 鉴定正确的重组质粒 pFast-Tet-EGFP 与 pFast-Tet-HGF 转化含有 AcMNPV Bacmid 和 helper 质粒的 DH10Bac 感受态细胞, 37℃ 培养 4 h 后取 100 μL 涂布于含有 IPTG、X-gal、7 μg/mL 庆大霉素、50 μg/mL 卡那霉素和 10 μg/mL 四环素的 LB 固体培养基上, 37℃ 培养 20 h。挑取白色单菌落扩大培养后提取 Bacmid DNA。取 1 μL Bacmid DNA 为模板行 PCR 鉴定, 命名为 Ac-EGFP 及 Ac-HGF。

1.6 重组杆状病毒滴度测定 于 96 孔板内每孔培养 BMSCs 至 5 × 10<sup>4</sup> 个。病毒液中加入 F-12 培养液并稀释至 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 等浓度, 使终容积为 1 mL。细胞弃上清后加入上述的不同浓度病毒液, 并设培养液空白对照组 (无病毒液), 培养 36 h。结晶紫染色法测定病毒滴度, 计数蓝染克隆数。

1.7 鉴定正确的 Bacmid 感染 BMSCs 及 DOX 调控 EGFP 和 HGF 表达 用鉴定正确的 Ac-EGFP 感染 BMSCs, 5 d 后收取病毒, 再感染细胞, 再收集。感染方法: 接种 BMSCs 至 96 孔板中, 待细胞贴壁长至约 80% 融合时将 Ac-EGFP 加入细胞液中。加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液与不同浓度的 DOX 继续培养 (每孔溶液体积为 300 μL), 使加入的 DOX 终浓度为 0、200、500、1 000 ng/mL。DOX 作用 72 h 时荧光显微镜下观察 EGFP 的表达。

同法, 用鉴定正确的 Ac-HGF 感染 BMSCs 后加入 200 μL 不同浓度 (0、10、100、500、1 000、1 200

ng/mL) 的 DOX, 以含 8% FBS 的 F-12 培养液培养 72 h。设复孔对照组。用 ELISA 法检测 HGF 的表达。

## 2 结果

2.1 pTRE-EGFP 与 pTRE-HGF 酶切鉴定 pTRE-EGFP 与 pTRE-HGF 分别用 BamH I 和 Xba I 双酶切, 结果得到预期大小的目的基因 EGFP (719 bp) 和 HGF (2 187 bp)。

2.2 Xho I 酶切 pTRE-EGFP 与 pTRE-HGF 结果 pTRE-EGFP 用 Xho I 单酶切后产生 1 319 (719+600) bp 的目的带条。pTRE-HGF 中含有 2 个 Xho I 酶切位点, 不完全酶切后回收 2 790 (2 190+600) bp 左右目的条带。

2.3 目的片段连接 pFast-Tet 后单酶切结果 目的片段回收后连接 pFast-Tet, 转化感受态细胞, 提取质粒, 行 Xho I 酶切鉴定, 鉴定正确后分别命名为 pFast-Tet-EGFP 和 pFast-Tet-HGF (图 2)。同时用 BamH I 鉴定方向。

2.4 重组杆状病毒滴度测定结果 计数蓝染克隆数, 结晶紫染色法测得重组杆状病毒滴度为 9.5 × 10<sup>7</sup> TU/mL。

2.5 DOX 对 EGFP 表达的影响 浓度为 0、200、500、1 000 ng/mL 的 DOX 作用 72 h 时的 EGFP 表达结果见图 3。

2.6 DOX 对 HGF 表达的影响 浓度为 0、10、100、500、1 000、1 200 ng/mL 的 DOX 作用 72 h 的

HGF 表达量分别为: 0、(2 684. 37 ± 378. 12)、(3 437. 71 ± 334. 76)、(6 931. 16 ± 257. 84)、(7 544 ± 300. 37)、(6 264. 17 ± 542. 91) pg/mL, 结果显示, DOX 浓度为 1 000 pg/mL 时, HGF 的表达量最高。

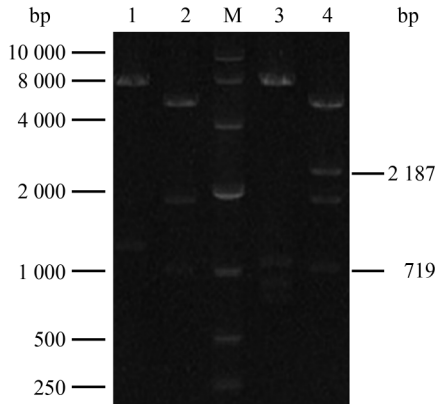


图 2 pFast-Tet-EGFP 与 pFast-Tet-HGF 的酶切鉴定图

1: pFast-Tet-EGFP/BamH I ; 2: pFast-Tet-EGFP/Xho I ; M: DL10 000 marker; 3: pFast-Tet-HGF/BamH I ; 4: pFast-Tet-HGF/Xho I

### 3 讨论

杆状病毒是一种 DNA 双链病毒, 基因组约 80~180 kb<sup>[8]</sup>。人 HGF 序列较长, 加上本实验需 DOX 来调控 EGFP 和 HGF 的表达, 所以载体上还需要加入 Tet-On 系统的 rtTA 结构, 杆状病毒因高载量的优点能同时包容目的(或报告)基因与调控系统。AcMNPV 和 BmNPV 是两种主要的杆状病毒表达系统, 前者可通过重组和转座获得携带外源基因的重组病毒, 后者主要通过同源重组获得重组病毒。通过 AcMNPV 高效的位点特异性转座, 已开发出能高表达外源蛋白的 Bac-to-Bac 系统<sup>[9-10]</sup>。与腺病毒相似, 杆状病毒宿主细胞范围广, 感染效率高, 因其在哺乳动物细胞内不能复制所以更安全<sup>[11-12]</sup>。与反转录病毒、慢病毒等相比, 杆状病毒表达系统不仅表达量高且对脊椎动物无致病性, 同样具备对表达的外源蛋白进行糖基化、蛋白折叠磷酸化翻译后修饰等优点, 在多肽制备等方面得到广泛使用<sup>[13-14]</sup>, 是今后用于基础及临床研究很有前景的载体。

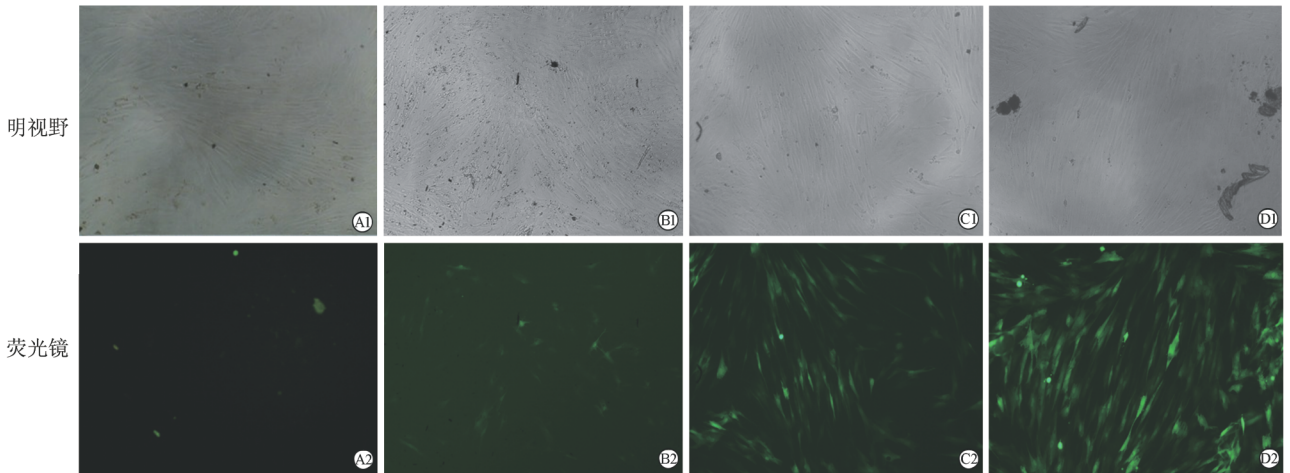


图 3 倒置荧光显微镜下观察不同终浓度 DOX 作用下的 EGFP 表达

A1, A2: 0 ng · mL<sup>-1</sup> DOX; B1, B2: 200 ng · mL<sup>-1</sup> DOX; C1, C2: 500 ng · mL<sup>-1</sup> DOX; D1, D2: 1 000 ng · mL<sup>-1</sup> DOX. Scale bar: 20 μm(明视野); 50 μm(荧光镜)

间质干细胞分布于人体多种组织, 是一种异质细胞群<sup>[15]</sup>。其中 BMSCs 是体内参与组织修复与再生的多潜能干细胞, 具备向成骨细胞分化的潜能。BMSCs 增殖能力强, 能分泌大量的促细胞与促血管生长因子, 也易于分离培养和导入外源基因, 其还有归巢等特性, 因此常应用于骨组织工程实验。有实验证实 BMSCs 能修复坏死股骨头<sup>[16]</sup>。然而, 缺血的股骨头内 BMSCs 易于凋亡, 难以发挥其修复坏死股骨头的作用。HGF 恰能改善其缺血的环境。

DOX 作为诱导剂, 是对哺乳动物基本无害的抗生素, 其脂溶性使其容易渗透细胞和组织而被充分利用<sup>[17]</sup>。

本实验将 Tet-On 系统与 EGFP 或 HGF 共同构建于同一杆状病毒, 这样的结构改造既有利于提高 DOX 调控报告基因或目的基因的表达效率, 也利用了杆状病毒的高载量优点。本研究发现经改造的杆状病毒载体系统有如下优势: 可高效感染人 BMSCs; 有效利用了杆状病毒高载量的优点, 将 Tet-On

系统及 EGFP 或 HGF 共同构建在同一载体上,且 EGFP 及 HGF 能被稳定诱导表达; DOX 可快速开启或关闭目的基因或报告基因的表达,不同浓度的 DOX 可调控不同程度的 EGFP 及 HGF 表达,且本底表达很低。该系统已成功应用于多种病毒载体,实现了不同基因的表达调控<sup>[18]</sup>。本研究实现了运用 Tet-On 系统,以 DOX 调控报告基因及目的基因表达的预期目标,为本课题体内实验拟用杆状病毒载体携带 HGF 感染 BMSCs 治疗股骨头缺血坏死的研究做了铺垫。HGF 过表达存在致畸致瘤等风险<sup>[19]</sup>,若能通过体外定时定量给予 DOX 调控体内 HGF 的不同程度表达,则有望实现安全且有效治疗股骨头坏死的目标,也可为拟用同法其他基因治疗相关疾病的研究提供理论依据。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 朱 应,齐义鹏. 新型杆状病毒穿梭载体及绿色荧光蛋白在棉铃虫中的表达[J]. 科学通报,1998,43:2178-2183.

[2] Wu Y L, Liu C Y, Wu C P, Wang C H, Lee S T, Chao Y C. Cooperation of *ie1* and *p35* genes in the activation of baculovirus AcMNPV and HzNV-1 promoters[J]. *Virus Res*,2008,135:247-254.

[3] Wu Y L, Chao Y C. The establishment of a controllable expression system in baculovirus: stimulated overexpression of polyhedrin promoter by LEF-2[J]. *Biotechnol Prog*,2008,24:1232-1240.

[4] Hu Y C. Baculovirus vectors for gene therapy[J]. *Adv Virus Res*,2006,68:287-320.

[5] Kost T A, Condreay J P, Jarvis D L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells[J]. *Nat Biotechnol*,2005,23:567-575.

[6] Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis[J]. *Cell Transplant*,2011,20:205-216.

[7] Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, Luttun A, Jiang Y, Vander Heyden Y, et al. Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for *in vitro* differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells[J]. *Toxicol Sci*,2006,94:330-341.

[8] 潘志敏,马 勇,程细高. 常用病毒载体的基础研究及

临床应用[J]. *中国生化药物杂志*,2011,32:408-411.

[9] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, Olins P O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*[J]. *J Virol*,1993,67:4566-4579.

[10] Polayes D, Ciccarone V, Anderson D, Harris R, Donahue R, Gerard G, et al. Rapid generation of recombinant baculoviruses, expression of foreign genes, and protein-purification using the bac-to-bac™ expression systems[J]. *FASEB*,1996,10:726.

[11] Ciccarone V C, Polayes D A, Luckow V A. Generation of recombinant baculovirus DNA in *E. coli* using a baculovirus shuttle vector[J]. *Methods Mol Med*,1998,13:213-235.

[12] 陈可和,韩泽龙,李建军,潘金飞,刘安玲. *Akt* 重组腺病毒载体的构建及其对肝癌细胞生存的影响[J]. *第二军医大学学报*,2012,33:332-335.

Chen K H, Han Z L, Li J J, Pan J F, Liu A L. Construction of recombinant adenovirus vector containing *Akt* gene and its effect on survival of hepatic cancer cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*,2012,33:332-335.

[13] Breitbach K, Jarvis D L. Improved glycosylation of a foreign protein by Tn-5BI-4 cells engineered to express mammalian glycosyltransferases[J]. *Biotechnol Bioeng*,2001,74:230-239.

[14] Jarvis D L. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production[J]. *Virology*,2003,310:1-7.

[15] 关晓明,马 迅,张 丽,冯皓宇,赵 胜,宋文慧,等. 不同来源椎间盘髓核间质干细胞特性及其多向分化能力研究[J]. *中华骨科杂志*,2012,32:686-692.

[16] 常廷杰,唐康来,陶 旭,曹洪辉,李 辉,陈前博,等. 自体血清培养 BMSCs 移植结合髓芯减压治疗早期股骨头缺血性坏死的初步应用[J]. *中国修复重建外科杂志*,2010,24:739-743.

[17] 周 明,石新艳,田少奇,王 丽,张积华,孙 康,等. 可诱导表达 *hBMP-2* 的慢病毒载体构建及其在人脐血间充质干细胞中的表达[J]. *中国修复重建外科杂志*,2011,25:482-487.

[18] Vieyra D S, Goodell M A. Pluripotentiality and conditional transgene regulation in human embryonic stem cells expressing insulated tetracycline-ON transactivator[J]. *Stem Cells*,2007,25:2559-2566.

[19] Wen Q, Ma L, Chen Y P, Yang L, Luo W, Wang X N. Treatment of avascular necrosis of the femoral head by hepatocyte growth factor-transgenic bone marrow stromal stem cells[J]. *Gene Ther*,2008,15:1523-1535.