

· 论 著 ·

BMP2 基因重组慢病毒载体质粒的构建及鉴定*

林昭伟, 李奇[△], 林荔军, 刘云龙, 帅明, 谢小波

(南方医科大学珠江医院骨科中心, 广州 510282)

摘要:目的 构建重组慢病毒载体质粒 pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP-2/T2A/EGFP 并进行鉴定。方法 从 Genbank 获得 BMP2 基因序列, 结合载体上的酶切位点需要, 设计上下游引物, 通过 PCR 方法扩增目的基因片段, 利用 Gateway 技术 BP 反应构建 pDown-BMP2-T2A-EGFP, 并进行阳性克隆测序, 应用 LR 反应把 pDown-BMP2-T2A-EGFP 重组入慢病毒目的载体质粒 pLV. Des2d. P/neo, 进行阳性克隆测序。结果 获得长度为 1 191 bp 的 BMP2 目的基因片段, 质粒 pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP2/T2A/EGFP 经双酶切后凝胶电泳鉴定正确, 测序结果与 Genbank 报道序列一致。结论 成功构建重组慢病毒载体质粒 pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP2/T2A/EGFP。

关键词:骨形态发生蛋白 2; 慢病毒载体; 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.09.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)09-0971-03

Construction and identification of lentiviral vector plasmid recombined by BMP2 gene*

Lin Zhaowei, Li Qi[△], Lin Lijun, Liu Yunlong, Shuai Ming, Xie Xiaobo

(Orthopedic Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

Abstract: Objective To construct and identify a lentiviral vector carrying human BMP2 gene. **Methods** BMP2 gene was obtained from Genbank directly. Primers were designed according to the BMP2 gene sequences reported in Genbank and the restriction sites of the vector. The BMP2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). pDown-BMP2-T2A-EGFP was constructed with the BP reaction of Gateway technology, then positive cloning was sequenced. pDown-BMP2-T2A-EGFP was inserted into destination vector plasmid pLV. Des2d. P/neo with the LR reaction of Gateway technology. The positive cloning was sequenced. **Results** 1 191 bp BMP2 gene fragment was obtained, pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP2/T2A/EGFP was identified with double digestion and sequencing, the result was completely in accordance with the BMP2 gene sequences reported in Genbank. **Conclusion** Recombination lentiviral vector plasmid pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP2/T2A/EGFP is constructed successfully.

Key words: bone morphogenetic protein 2; lentiviral vector; gene

骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 是促进骨化的主要因子, 可在骨损伤局部及异位促进细胞增殖, 提高其碱性磷酸酶活性, 也是惟一能够单独在异位诱导骨化形成的信号分子, 这使其在骨关节疾病特别是骨折、骨缺损的临床治疗中具有极大的潜在应用价值^[1-5]。将 BMP2 复合载体材料在特定部位释放, 存在体内半衰期短, 容易被体液冲走或稀释等缺点, 很难保持局部有效治疗浓度。慢病毒载体对非分裂细胞能进行高效的转导, 携带目的基因整合到靶细胞基因组, 使之能长期、稳定和安全地在全身或局部表达, 成为目前较理想的基因转移载体^[6-8]。为此, 本研究尝试构建重组慢病毒载体质粒 pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP2/T2A/EGFP, 为骨缺损的基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 慢病毒载体质粒 pLV. Des2d. P/neo, pDONR221, 模板 DNA, 大肠杆菌 Stbl3 购自 Cyagen 公司, Gateway BP ClonaseTM II Enzyme Mix, Gateway LR ClonaseTM II Plus Enzyme Mix 购自 Invitrogen 公司, QIAquick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司, 质粒小提试剂盒购自 Tiangen 公司, Taq DNA Polymerase, dNTP Mix, GeneRuler[®] 1kb DNA Ladder 购自 Fermentas 公司, PrimeSTARTM HS DNA Polymerase 购自 Takara 公司, Xma I 和 EcoRV 限制性内切酶购自 Neb 公司。

其他试剂均为进口或国产。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 attB1-Kozak-BMP2-T2A-EGFP-attB2。

1.2.1.1 引物设计与合成 根据 Genbank 的 BMP2 基因编码区 (CDS) 和 Gateway 技术设计相应引物。attB1-Kozak-BMP2-F 基因引物: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG CCA CCA TGG TGG CCG GGA CCC GC-3'。BMP2-T2A-R-1 基因引物: 5'-AAG ACT TCC CCT GCC CTC TCC GGA GCC GCG CAC CCA CAA CCC TCC-3'。T2A-R-2 基因引物: 5'-GGC CGG GAT TTT CCT CCA CGT CCC CGC ATG TTA GAA GAC TTC CCC TGC CCT CT-3'。T2A-EGFP-F 基因引物: 5'-CGT GGA GGA AAA TCC CGG CCC CAT GGT GAG CAA GGG CGA GG-3'。attB2-EGFP-R 基因引物: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG-3'。引物由广州赛业生物公司合成。PCR 融合过程示意图 (图 1)。

1.2.1.2 PCR 反应体系及扩增程序 取一高压灭菌 0.2 mL EP 管, 并建立以下反应体系: 5×Primer STARTM Buffer (Mg²⁺ Plus): 10 μL; dNTP Mixture (2.5 μmol): 4 μL; 引物-F (10 μmol): 1 μL; 引物-R (10 μmol): 1 μL; 模板 DNA: 1 μL; Primer STARTM HS DNA Polymerase: 0.5 μL; 补加双氧水至总体积 50 μL。98

℃预变性 3 min,98 ℃变性 20 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1.5 min 共 30 个循环,72 ℃延伸 5 min,6×loading Buffer 终止反应,用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳,DNA 琼脂糖凝胶电泳回收参照 QIAquick 的琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒进行回收,-20 ℃冰箱保存。

1.2.2 利用 Gateway Technology 构建 pDown-BMP2-T2A-EGFP 在 25 ℃的条件下 BP 反应 1 h,反应体系:attB1-K-BMP2-T2A-EGFP-attB 2 : 100 ng;pDONR 221 : 100 ng;BP clonase:1 μL;TE buffer:up to 5 μL。加入 0.5 μL 蛋白酶 K 于 37 ℃终止反应 10 min,转化 BP 反应产物到大肠杆菌 Stbl3,把 100 μL 转化物涂到含有 50 μg/mL Kan 的 LB 平板上 37 ℃孵育过夜。Xma I 和 EcoRV 双酶切鉴定筛选阳性克隆,挑取阳性克隆质粒,并将阳性克隆的质粒送赛业生物公司测序,测序引物:pUpDo-flank-F:CGG CCA GTC TTA AGC TCG GG;pUpDo-flank-R: AAT ACG ACTC ACT ATA GGG GA;W1F:ACA CCA GGT TGG TGA ATC AG。

1.2.3 利用 Gateway Technology 构建 pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP2/T2A/EGFP 在 25 ℃条件下 LR 反应 16 h,反应体系:pDown-BMP2-T2A-EGFP: 15.02 ng;pUp-EF1A: 12.89 ng;母载体 pLV. Des2d. P/neo:60.28 ng;LR clonase:1 μL;TE buffer:up to 5 μL。加入 0.5 μL 蛋白酶 K 于 37 ℃终止反应 10 min。转化 LR 反应产物到大肠杆菌 Stbl3,菌落 PCR 筛选阳性克隆,反应体系:10×Taq Buffer with(NH₄)₂SO₄:3 μL;dNTP Mixture(2 μmol):3 μL;MgCl₂:2 μL;引物-F(10 μmol):1.2 μL;引物-R(10 μmol):1.2 μL;Taq DNA polymerase:1.5 μL;模板 DNA:2 μL;灭菌水:16.1 μL;总体积 30 μL。94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1.5 min 共 29 个循环,72 ℃延伸 5 min。挑取阳性克隆质粒,阳性克隆送交赛业生物公司测序,测序引物:pLV-Final-internal-F:CAA GTT TGT ACA AAA AAG CAG GCT;pLV-Final-internal-R:AGC CTG CTT TTT TGT ACA AAC TTG。

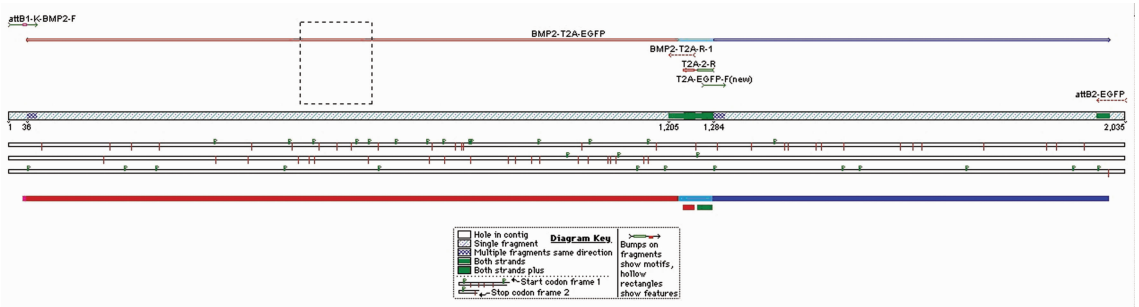


图 1 PCR 融合过程示意图

2 结 果

2.1 pDown-BMP2-T2A-EGFP 的构建(图 2) 随机挑取 2 个克隆,pDown-BMP2-T2A-EGFP 用限制性内切酶 Xma I 和 EcoRV 双酶切后,酶切条带理论大小为 1 100 bp,与目的条带大小相符的克隆即为阳性克隆,测序结果同 GenBank 中报道序列一致,波谱未列出。

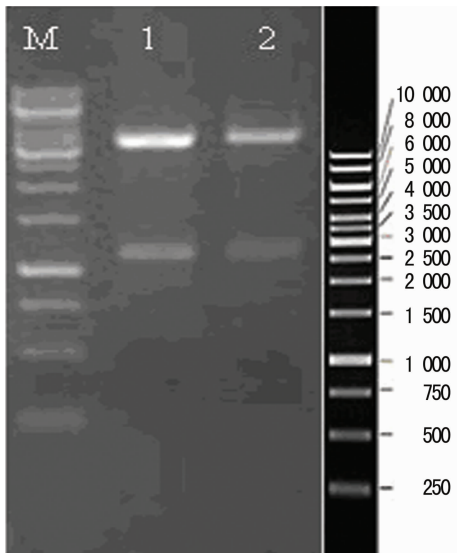


图 2 pDown-BMP2-T2A-EGFP 酶切鉴定

2.2 pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP2-T2A-EGFP 重组质粒构建(图 3) 随机挑取 6 个克隆,菌落 PCR 鉴定条带理论大小为 2 000 bp,与目的条带大小相符的克隆即为阳性克隆,测序结果同 GenBank 中报道序列一致,波谱未列出。载体结构图谱见图 4。

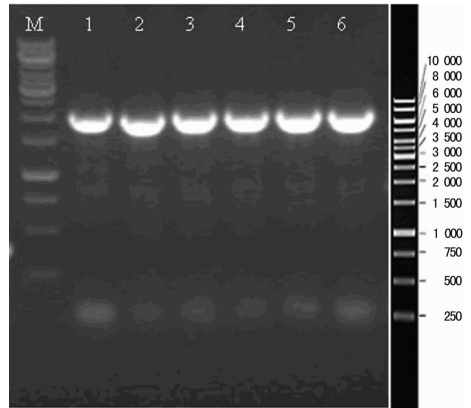


图 3 pLV. EX2d. P/neo-EF1A>BMP2-T2A-EGFP PCR 鉴定

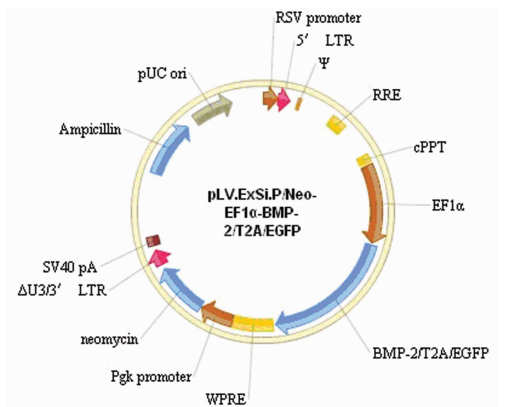


图 4 pLV. EX2d-EF1A>BMP-2/T2A/EGFP 载体结构图谱

3 讨 论

生物活性因子在促进骨缺损修复过程中发挥极其重要的作用,而促进新骨形成的活性因子显得尤为重要。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)是参与骨形成的重要活性物质,其中 BMP2 是 BMP 家族成员中作用最强的因子。BMP2 直接或通过载体局部应用可促进骨形成^[1-2]。但 BMP2 属于小分子物质,如果单纯将其于局部注射,势必被组织液稀释或血液带走,同时 BMP2 半衰期较短,在注入体内后,轻易地被体内蛋白水解酶水解释失去活性,难以发挥有效的骨诱导作用。而近年来发展的缓释技术则存在操作复杂、包封率低、价格昂贵,且有效安全的局部剂量很难达到,生物活性不能得到最大利用,难以全面满足组织工程骨体内修复这一复杂过程的需要。因此,寻找一种有效的 BMP2 局部稳定、缓慢释放方法就显得极为重要。

基因治疗可使生物活性因子在局部稳定地释放,在骨缺损修复领域中显示出良好的运用前景。许多研究证实,基因治疗可有效促进骨再生^[9-12]。目前,基因治疗的载体主要分为病毒载体和非病毒载体。由于病毒基因组结构简单,易于改造和操作,且感染效率高,有较高靶细胞特异性,这些都是其他载体系统无法比拟的。慢病毒载体是一类逆转录病毒载体,它既能够感染分裂细胞,也能够感染非分裂细胞,由于慢病毒载体能够感染大多数非分裂细胞,以及具有高效地整合和稳定地表达目的基因于靶细胞的能力,所以,已被广泛应用于各种基因治疗实验研究^[13-15]。Gateway 技术是基于 λ 噬菌体位点专一重组系统的一种通用的克隆技术,能够快速、高特异性地将异源 DNA 片段克隆到不同的载体中。这一技术在插入的目的 DNA 片段两端整合 att L1 和 att L2 两个侧端重组序列,来构建一个类似通道的结构并称之为入门克隆。本研究显示,直接调取 BMP2 基因,能与数据库序列保持高度一致,减少变异,利用 BP 反应构建入门克隆 pDown-BMP2-T2A-EGFP,以 pLV.Des2d.P/neo 为目的载体利用 LR 反应构建 pLV.EX2d.P/neo-EF1A>BMP2/T2A/EGFP。

经过测序证明,本研究成功构建了携带 BMP2 基因的慢病毒载体质粒,同时加入了与之共表达的报告基因 EGFP 和 NEO 抗性基因,有利于感染后细胞的观察和筛选,为下一步进行病毒包装及转染奠定基础。

参考文献:

- [1] Dean DB, Watson JT, Moed BR, et al. Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture[J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 2878-2888.
- [2] Seol YJ, Kim KH, Park YJ, et al. Osteogenic effects of bone-morphogenetic-protein-2 plasmid gene transfer[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 49(Pt 1): 85-96.
- [3] Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, et al. Micro CT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(3): 501-512.
- [4] Jiang J, Fan CY, Zeng BF. Experimental construction of BMP2 and VEGF gene modified tissue engineering bone

in vitro[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(3): 1744-1755.

- [5] Castro-Govea Y, Cervantes-Kardasch VH, Borrego-Soto G, et al. Human bone morphogenetic protein 2-transduced mesenchymal stem cells improve bone regeneration in a model of mandible distraction surgery[J]. *J Craniofac Surg*, 2012, 23(2): 392-396.
- [6] Luo J, Ye XW, Jiang W, et al. Construction and identification of SPARC shRNA lentiviral vector and its expression in human SKM-1 cells[J]. *Xibao Yufen Zimian Yixue Zazhi*, 2012, 28(5): 466-469.
- [7] Macsai CE, Derrick-Roberts AL, Ding X, et al. Skeletal response to lentiviral mediated gene therapy in a mouse model of MPS VII[J]. *Mol Genet Metab*, 2012, 106(2): 202-213.
- [8] Dropulic B. Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research[J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(6): 649-657.
- [9] Shoji T, Ii M, Mifune Y, et al. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis[J]. *Lab Invest*, 2010, 90(4): 637-649.
- [10] Xiao C, Zhou H, Liu G, et al. Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration[J]. *Biomed Mater*, 2011, 6(1): 015013.
- [11] Ramazanoglu M, Lutz R, Ergun C, et al. The effect of combined delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and recombinant human vascular endothelial growth factor 165 from biomimetic calcium-phosphate-coated implants on osseointegration[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2011, 22(12): 1433-1439.
- [12] Sheyn D, Kallai I, Tawackoli W, et al. Gene-modified adult stem cells regenerate vertebral bone defect in a rat model [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(5): 1592-1601.
- [13] Liu Y, Hao Y, Zhan YQ, et al. Construction of a lentiviral vector for RNA interference of glycerol kinase gene in human hepatocytes in vitro[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2012, 32(5): 614-617.
- [14] Moiani A, Paleari Y, Sartori D, et al. Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(5): 1653-1666.
- [15] Srouji S, Ben-David D, Fromiguet O, et al. Lentiviral-mediated integrin alpha5 expression in human adult mesenchymal stromal cells promotes bone repair in mouse cranial and long-bone defects[J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(2): 167-172.