

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.13.005

大鼠 Tmub1 基因过表达慢病毒载体的构建*

赵晓彪¹,李光耀¹,刘孟刚¹,范霞²,陈平^{1△}

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所:1.肝胆外科;2.一室,重庆 400042)

[摘要] **目的** 构建 Tmub1 基因的过表达慢病毒载体(LV-Tmub1),为研究 Tmub1 蛋白在肝细胞增殖过程中的作用提供实验材料。**方法** 化学合成 Tmub1 基因序列,用 BamHI/AgeI 酶切化学合成含有目的基因的质粒及 GV287 载体,PCR 产物接入线性化表达的载体。PCR 鉴定引物,再对 PCR 鉴定阳性的克隆进行 DNA 测序和比对分析。使用构建的 LV-Tmub1,转染 293T 细胞,荧光法检测构建的慢病毒滴度。**结果** 成功构建了 LV-Tmub1,并获得相应的病毒,病毒滴度为 2×10^8 TU/mL。**结论** LV-Tmub1 为进一步研究 Tmub1 蛋白在肝细胞增殖中的作用提供了实验基础。

[关键词] Tmub1;基因;过表达慢病毒载体;大鼠**[中图分类号]** R575**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)13-1744-03

Construction of lentivirus vectors of rat Tmub1 gene overexpression*

Zhao Xiaobiao¹,Li Guangyao¹,Liu Menggang¹,Fan Xia²,Chen Ping^{1△}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery;2. Department of First Laboratory,Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University,Chongqing 400042,China)

[Abstract] **Objective** To construct the lentiviral vector with overexpression Tmub1 gene to provide the experimental materials in the research of Tmub1 protein function in the process of the hepatocyte proliferation. **Methods** The Tmub1 gene sequences was constructed through chemical synthesis,plasmid containing the purpose gene and GV287 vectors were digested with BamHI/AgeI enzyme,the PCR products were connected into the linearized expression vector. PCR confirmed the primers,the positive clones identified by PCR DNA were sequenced and performed the comparative analysis. The constructed lentiviral vectors of Tmub1 gene overexpression was used to transfect 293T cell lines. Then the lentivirus titer was detected by the fluorescence method. **Results** The lentiviral vector with Tmub1 gene overexpression was successfully constructed and the corresponding virus was obtained,the virus titer was 2×10^8 TU/mL. **Conclusion** LV-Tmub1 expressing lentiviral vector provides the experimental foundations for the further study of the role of Tmub1 protein in hepatocyte proliferation.

[Key words] Tmub1;gene;LV-Tmub1;rats

Tmub1 (transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1) 基因编码的 Tmub1 蛋白是一个含有类似泛素结构的能够在细胞核与细胞质之间穿梭的蛋白质^[1-3];在细胞周期的 G₀ 期主要位于肝细胞的细胞质内,在细胞增殖后期的 G₂~S 期则几乎全部穿梭进入肝细胞核内。Della 等^[4]发现 Tmub1 蛋白在肝部分切除术后肝再生的过程中明显高表达,它包含有一个跨膜域和一个类似泛素结构的区域(UBL),该区域包含与 UCH、E2 和 CUE 等的反应位点。所以说明它在肝细胞增殖过程中担负着复杂而又重要的功能。本研究构建 Tmub1 过表达慢病毒载体(LV-Tmub1),用来转染肝细胞系及注射入实验动物体内,为深入了解 Tmub1 基因和蛋白在肝细胞增殖和肝再生过程中的作用及分子生物学机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 Thermo Fisher Scientific Lipofectamine 2000 及 Opti-MEM 培养基,1 kp DNA ladder Marker (Fer-

mentas),Gibco 小牛血清,250 bp DNA ladder Marker(捷瑞生物公司),琼脂糖(赛百盛公司),限制性内切酶(NEB),In-Fusion® PCR Cloning (Kit clontech),Primer(捷瑞生物公司),Plasmid 抽提(Kit Promega),琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化),Taq polymerase(SinoBio),dNTP(Takara),BRL-3A 细胞(上海生命科学研究所)。

1.1.2 主要仪器 Applied Biosystems 公司 PCR 仪,美季生物技术 ABI3730 型 positive clone 测序仪,BioRad 稳压 DNA 电泳仪,天能公司凝胶成像仪,上海实验设备有限公司细菌摇床,Thermo 细菌培养箱,Gibco 水浴箱,Gilson 移液器,日立高速离心机。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获取 首先在美国国立图书馆查找大鼠 Tmub1 基因序列,基因编号:362301。PCR 扩增目的基因片段(图 1),5'端 GGA TCC 为 BamHI 酶切位点,3'端 ACC GGT 为 AgeI 酶切位点。其中蓝色标记为美国国立图书馆的大鼠 Tmub1 基因编码区。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81270523)。 作者简介:赵晓彪(1979—),硕士,主治医师,主要从事肝切除术后肝再生的相关研究。 △ 通讯作者,E-mail:chenping@263.com。

1.2.2 酶切载体工具 载体购自吉凯基因,载体名称:GV287;10.4 kb;元件顺序:Ubi-MCS-3FLAG-SV40-EGFP;克隆位点:BamHI/AgeI。酶切反应温度 37 °C,时间 2 h。

1.2.3 重组质粒构建

1.2.3.1 PCR 产物交换入线性化表达载体 反应条件为 25 °C 反应 30 min,然后 42 °C 反应 15 min。

1.2.3.2 CaCl₂ 制备大肠杆菌感受态细胞 (1)从新鲜细菌培养皿中选取一个单菌落,转到含有 100 mL 小牛血清培养基的 1 L 烧瓶中,在 37 °C 条件下剧烈振荡摇匀培养 3 h。(2)将培养后的大肠埃希菌转移到无菌的 60 mL 离心管中,在冰上放置 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,回收离心后的细胞。(3)缓慢倒出上层培养液,然后用 10 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬细胞。(4)在 40 °C 条件下,4 000 r/min 离心 10 min,回收沉淀细胞。(5)倒出培养液,每 50 mL 初始培养细胞用 2 mL 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬每份细胞沉淀。

```

61  CACCTCTGGCAACACAGGTCGCATGCGCTTGATGAAAGCGTATGGGGATGAGGTGACTGT
    .....ATGSCCTTGATGAAAGCGTATGGGGATGAGGTGACTGT
    .....-M--A--L--I--E--G--V--G--D--E--V--T--V

121 CCTTTTTCGGTGCTTGCCITGCTGCTGCTGCGCCCTGCGCTGGGTCTCAACACATAC
39  CCTTTTTCGGTGCTTGCCITGCTGCTGCTGCGCCCTGCGCTGGGTCTCAACACATAC
13  --L--F--S--V--L--A--C--L--L--V--L--A--L--A--W--V--S--T--H--T

181 GACTGAGAGTACAGATCCCCTACACAGTCGTCAGGGACCACARCCAGCAGCCCAG
99  GACTGAGAGTACAGATCCCCTACACAGTCGTCAGGGACCACARCCAGCAGCCCAG
33  --T--E--S--T--D--P--L--P--Q--S--S--G--T--T--T--P--A--Q--P--S

241 TGAAGCCATGACAGCCATTGATAGCATCAGAGAGGAGGCCCCAGGACTGAGAGTCCCAG
159 TGAAGCCATGACAGCCATTGATAGCATCAGAGAGGAGGCCCCAGGACTGAGAGTCCCAG
53  --E--A--M--T--A--I--D--S--I--R--E--E--A--P--G--A--E--S--P--S

301 CCTGAGGCACAGAGGTCCATCTGCACAGCCAGAGCCTGAGGCCAGGGTCCACAGCATCAAC
219 CCTGAGGCACAGAGGTCCATCTGCACAGCCAGAGCCTGAGGCCAGGGTCCACAGCATCAAC
73  --L--R--H--R--G--P--S--A--Q--P--E--P--E--A--G--V--T--A--S--T

361 ACCTCCAGACTCTCCACAGGAACCCCTTACTGCTACGGTTGAAATTTCTCAATGACTCTGA
279 ACCTCCAGACTCTCCACAGGAACCCCTTACTGCTACGGTTGAAATTTCTCAATGACTCTGA
93  --P--P--D--S--P--Q--E--P--L--L--L--R--L--K--F--L--N--D--S--E

421 ACAGGTGGCCAGGSCCTGGCCTCAGGACACCATTTGGCTCCTTGAAGAAGAACCCAGTTTCC
339 ACAGGTGGCCAGGSCCTGGCCTCAGGACACCATTTGGCTCCTTGAAGAAGAACCCAGTTTCC
113 --Q--V--A--R--A--W--P--Q--D--T--I--G--S--L--K--R--T--Q--F--P
    
```

图 1 化学合成的基因片段

1.2.3.3 转化 (1)取 200 μL 感受态细胞悬液转移到 500 μL 离心管中,管中各加入 10 μL 连接溶液,放置冰上 30 min。(2)然后将每个离心管放到 42 °C 的恒温水箱中放置 90 s。(3)将离心管快速放置到冰上冷却细胞 1~2 min。(4)每管中各加入 800 μL 小牛血清培养基,放置到 37 °C 摇床上培养 45 min。(5)分别将 150 μL 已转化的各种感受态细胞转移到 AMP 抗性的 LB 琼脂培养基上。(6)将平板置于室温条件下直至液体被完全吸收。(7)倒置培养皿,于 37 °C 细胞培养箱中培养 16 h。

1.2.3.4 阳性克隆的 PCR 测定 采用 20 μL 反应体系,取 2 μL 菌液作为模板,选择合适的引物对其进行 PCR 扩增,再用琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物。阳性克隆结果测序及分析。

1.2.4 慢病毒包装 (1)使用 2%胰酶消化培养于 50 mL 培养瓶中对数生长期的 293T 细胞,DMEM 培养基调整细胞密度,光学显微镜下计数,当细胞密度为 6×10⁵/mL 时将细胞密度重新接种于 25 mL 细胞培养皿中,37 °C 细胞培养箱中培养

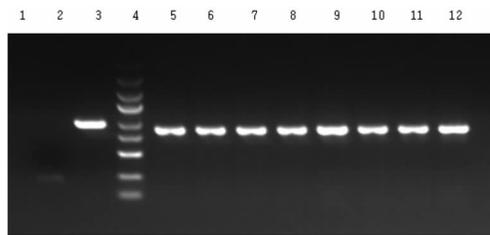
24 h 后显微镜下观察,待细胞密度达到 75%~80%时即可用于转染。(2)灭菌 10 mL 离心管中加入所制备的各 DNA 溶液,与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀,室温下温育 5 min。(3)取 200 μL Lipofectamine 2000 转染试剂与 4.8 mL Opti-MEM 培养基混合后在室温下温育 5 min。(4)将 Opti-MEM 培养基稀释后的 DNA 溶液与稀释后的 Lipofectamine 2000 转染试剂充分混合均匀,在室温下温育 20 min。(5)将 DNA 溶液与 Lipofectamine 2000 转染试剂的混合液快速转移至 293T 细胞的培养液中,充分混合均匀,放置入 37 °C,5%CO₂ 细胞培养箱中培养 8 h 后倒去含有转染混合物的培养基,各细胞中加入 20 mL PBS 缓冲液洗涤 3 次,然后将每瓶细胞中加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基 25 mL 后继续放置于 37 °C,5%CO₂ 细胞培养箱内培养 48 h。

1.2.5 病毒的收获及浓缩 (1)收集转染培养 48 h 后的 293T 细胞上清液,在 4 °C,4 000 r/min 条件下离心 10 min 后除去下层沉淀,上清液使用 0.45 μm 过滤器过滤于 50 mL 超速离心管中得到病毒提液。(2)将得到的病毒提液样品加入到过滤杯中,然后将过滤杯插到滤过液收集管中,4 000 r/min 离心,时间为 10~15 min。(3)得到病毒浓缩液后将其分别收集于 1.5 mL 无菌 Ep 管中,-80 °C 冰箱保存,随机取出其中一支,进行病毒生物学滴度测定。

1.2.6 荧光法慢病毒滴度测定 (1)调整 293T 细胞浓度为 4×10⁵,使用 96 孔细胞培养板培养细胞,每个孔加体积为 100 μL。(2)10 个无菌的 Ep 管中分别加入 90 μL 无血清的 DMEM 培养基。(3)取待测定的病毒原液 10 μL 加入到第一个 Ep 管中,标记为 1 管,2 管中的病毒原液比 1 管稀释 10 倍,3~10 管依次稀释 10 倍。(4)在 96 孔培养板中选取所需的细胞孔,吸去其中 90 μL 培养基后加入 90 μL 稀释好的病毒溶液,放入培养箱 37 °C,5%CO₂ 培养 24 h 后加入完全培养基 100 μL 继续培养 96 h 后在荧光显微镜下观察慢病毒荧光表达情况。

2 结 果

2.1 阳性克隆结果 阳性转化子 PCR 产物大小 921 bp,阴性转化子 PCR 产物大小 185 bp,见图 2。

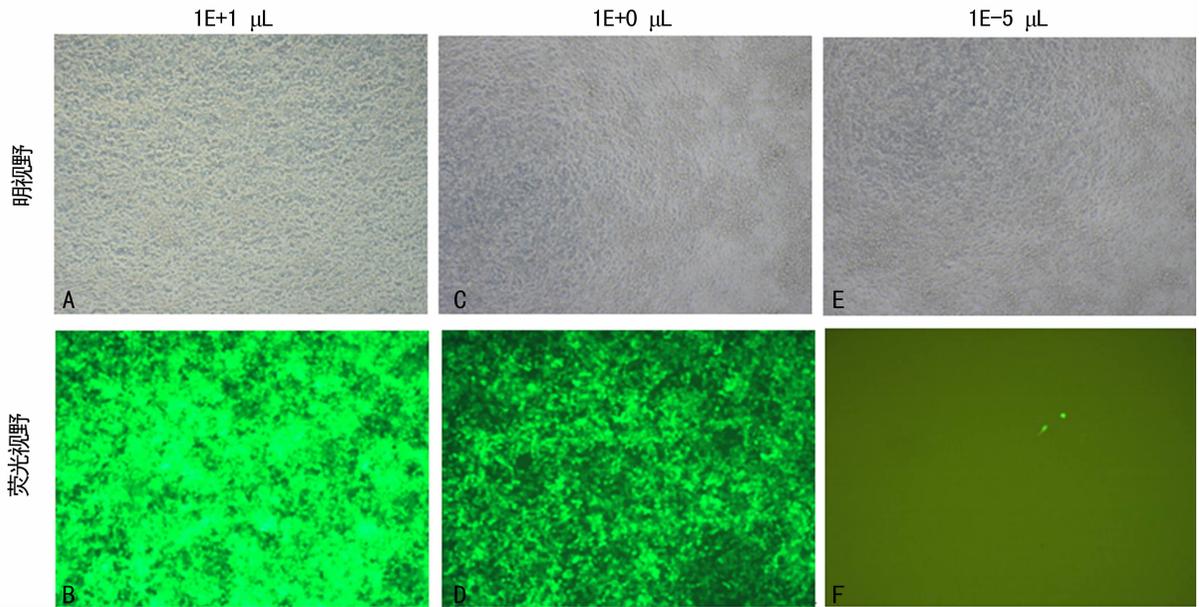


1:阴性对照 ddH₂O;2:空载自连对照组;3:阳性对照 GAPDH;4:Marker,自上而下依次为 5.0、3.0、2.0、1.5、1.0 kb,750、500、250、100 bp;5~12:Tmub1 基因 1~8 号转化子。

图 2 PCR 产物电泳图

2.2 阳性克隆结果测序 同一性为 100%,测序结果与目标序列完全一致。

2.3 荧光法慢病毒滴度测定结果 荧光法测定慢病毒滴度为 2×10⁸ TU/mL,见图 3。



A、B:加入病毒 10 μL ;C、D:稀释 10 倍后的荧光表达情况;E、F:稀释 10^5 倍后的荧光表达情况。

图 3 荧光法慢病毒滴度测定 ($\times 100$)

3 讨论

慢病毒载体是以人类免疫缺陷病毒 I 型 (HIV-1) 为基础发展起来的基因治疗载体,它对分裂细胞和非分裂细胞具有感染能力,能够稳定的转染多种哺乳动物细胞系和原代细胞^[5-8]。目前在实验室和临床前研究中以及临床治疗中已广泛使用。

肝部分切除术后,刺激体内生物信息系统及物理学反馈信号系统使处于静止期的肝细胞分裂,进入增殖周期,此时体内各种细胞因子、生物因子以及多个脏器参与其调控^[9]。其中, Tmub1 蛋白在肝部分切除术后肝再生过程中明显高表达,能够在增殖的肝细胞质与细胞核之间穿梭,且具有明显的生物学规律,说明 Tmub1 蛋白可能在肝细胞增殖过程中发挥作用^[10-11]。为了研究 Tmub1 蛋白在肝细胞增殖中的作用及其分子生物学机制,需要通过现代基因工程学的方法,构建 Tmub1 基因过表达的慢病毒载体,用来转染肝细胞系及注射肝部分切除术后的大鼠。首先在美国国立图书馆网站查到目标基因大鼠 Tmub1 序列,然后通过基因扩增技术克隆该目标序列,再利用已有的质粒载体,把 Tmub1 目标序列整合到该质粒中,所得到的阳性克隆序列经过基因测序与目标序列完全一致。再经过过度检测及分装保存,收获了 Tmub1 过表达慢病毒载体。

Tmub1 基因过表达慢病毒载体的成功构建,对下一步研究 Tmub1 基因及蛋白在大鼠肝部分切除术后肝再生和体外 BRL-3A 肝细胞系增殖中的作用提供实验依据及实验基础,并且为了解生物体内的其他细胞增殖的分子生物学机制提供帮助。通过对其更加深入的研究,还可能为临床预防和治疗肝切除术后肝功能衰竭提供基因治疗的新思路。

参考文献

- Castelli M, Pieroni S, Brunacci C, et al. Hepatocyte odd protein shuttling (HOPS) is a bridging protein in the nucleophosmin-p19 (Arf) network [J]. *Oncogene*, 2013, 11, 32(28): 3350-3358.
- Liu M, Liu H, Wang X, et al. IL-6 induction of hepatocyte proliferation through the Tmub1-regulated gene pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(6): 1106-1112.
- Zhang W, Savelieva KV, Suwanichkul A, et al. Trans-

membrane and ubiquitin-like domain containing 1 (Tmub1) regulates locomotor activity and wakefulness in mice and interacts with CAMLG [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (6): e11261.

- Della FM, Castelli M, Bartoli D, et al. HOPS: a novel cAMP-dependent shuttling protein involved in protein synthesis regulation [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (Pt 14): 3185-3194.
- Krzysztof P, Marta MK. Use of HIV as a gene transfer vector [J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(4): 531-595.
- Vijaykumar TS, Avindra N, Ashok C, et al. Chloroquine mediated molecular tuning of astrocytes for enhanced permissiveness to HIV infection [J]. *Virology*, 2008, 381(1): 1-5.
- Ng CT, Jaworski JP, Sutton WF, et al. Passive neutralizing antibody controls SHIV viremia and enhances B cell responses in infant macaques [J]. *Nat Med*, 2010, 16(10): 1117-1119.
- Concalves MAFV, Janssen JM, Holker M, et al. Rapid and Sensitive Lentivirus Vector-Based Conditional Gene Expression Assay to Monitor and Quantify Cell Fusion Activity [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(6): e10954.
- Fujiyoshi M, Ozaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2011, 18(1): 13-22.
- Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, et al. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor [J]. *Hepatology*, 1998, 28(4): 959-970.
- Teoh N, Leclercq I, Pena AD, et al. Low-dose TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implication for preconditioning [J]. *Hepatology*, 2003, 37 (1): 118-128.