

IRF4 逆转录病毒表达载体的构建及鉴定

何颖红, 赵文珍, 杨勇琴, 王一心

(大理学院基础医学院, 云南 大理 671000)

[摘要] **目的** 将小鼠 IRF4 基因定向克隆入 MSCV-IRES-GFP 质粒, 得到长期稳定表达 IRF4 的逆转录病毒载体. **方法** 以含 IRF4 cDNA 质粒作为模板, PCR 扩增所需目的片段; 将该片段连接入 MSCV-IRES-GFP 质粒; 以磷酸钙法转染 293T 细胞, 收集病毒上清感染 GP+E86 细胞后, 流式细胞术和蛋白印迹技术检测 IRF4 的表达. **结果** 经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 目的片段成功连接到逆转录病毒 MSCV 载体上. 逆转录病毒上清成功感染 GP+E86 细胞系. **结论** 成功构建了小鼠 IRF4 逆转录病毒表达载体, 并实现了 IRF4 在 GP+E86 细胞系中的外源性表达.

[关键词] IRF4; 逆转录病毒载体; 小鼠

[中图分类号] Q789 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 07 - 0011 - 04

Construction and Identification of Retroviral Expression Vector Harboring Murine IRF4

HE Ying - hong, ZHAO Wen - zhen, YANG Yong - qin, WANG Yi - xin
(School of Basic Medicine, Dali University, Dali Yunnan 671000, China)

[Abstract] **Objective** To construct a recombinant retroviral vector bearing murine IRF4 cDNA and establish a GP+E86 cell line for stable expression of IRF4. **Methods** IRF4 cDNA fragment was amplified from a plasmid containing IRF4 ORF by PCR, and cloned into MSCV-IRES-GFP retroviral vector. The recombinant vector was transfected into 293T. The virus from the supernatant was harvested and used to infect GP+E86 cell line. Expression of IRF4 in infected cells was analyzed by fluorescence activated cell sorter and confirmed by Western blotting. **Results** IRF4 cDNA was successfully cloned into MSCV-IRES-GFP retroviral vector. The resulting retrovirus successfully infected GP+E86 cell line. **Conclusion** The recombinant retroviral vector bearing murine IRF4 cDNA has been successfully constructed, and the expression of exogenous IRF4 gene in mouse GP+E86 cell line has been achieved.

[Key words] IRF4; Retrovirus; Mice

干扰素调节因子 (interferon regulatory factor, IRF) 是一大类能够对干扰素起调控作用的转录因子. 研究表明 IRF 作为干扰素信号通路中起调控作用的转录因子, 在病原体的免疫反应、细胞分化、凋亡和细胞周期调控和造血干细胞的发育分化等方面起到非常重要的作用. 干扰素调节因子 4 (interferon regulator factor, IRF4) 是 IRF 的成员之一, 由 450 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 52 kDa, 主要在淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞中

表达^[1,2]. 作为淋巴细胞特异性的转录调节因子, IRF4 与家族的其它成员或转录因子 PU.1 形成复合体, 调节淋巴细胞功能, 它的缺失可导致免疫缺陷, T、B 细胞的激活和适应性免疫受阻. 另外, IRF-4 还与 T 细胞瘤的形成有关^[3]. 笔者前期工作发现由于 PLC γ 2 缺失降低了 BCR- 诱导的 IRF-4 和 IRF-8 的表达, 而这两个转录因子是 Ig λ 和 κ L 链基因重排所需要的^[4]. 本实验利用 IRF4 cDNA 构建含有绿色荧光蛋白的逆转录病毒载体,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81060248); 云南省自然科学基金资助项目 (2010CD084)

[作者简介] 何颖红 (1962~), 女, 云南大理市人, 医学博士, 副教授, 主要从事细胞信号传导研究工作.

旨在为下一步的研究工作提供有效的分子工具。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 EcoR I、Xho I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 1kb PLUS DNA Ladder Marker 购自 New England Biolabs 公司; ProofStart DNA 聚合酶、小量质粒抽提试剂盒、大量质粒抽提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; 质粒: MSCV-IRES-GFP, pQEPAM3, IRF4 cDNA (pCR-II-IRF4) 和 GP+E86 细胞由威士康辛医学院提供; DH5 α 感受态细胞购自 invitrogen 公司; RPMI1640、DMEM 培养基, 小牛血清购自 Gibco 公司; 聚凝胺 (Polybrene) 购自 sigma 公司; anti-IRF4 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.1.2 仪器 流式细胞仪 (LSRII, Becton Dickinson)。

1.2 方法

1.2.1 逆转录病毒载体的构建及鉴定 (1) PCR 扩增 IRF4 基因片段: 根据 GenBank 小鼠 IRF4 的 cDNA 序列设计 PCR 引物, 由 invitrogen 公司合成。上游引物: 5'-CGAATTC CGCACGCGTCATG-AACTTGGAGACGGGCAGCCG., 含 EcoR I 酶切位点; 下游引物: 5'-CCCTCGAGTCACTCTTGATG-GAAGAATGACGGAG, 含 Xho I 酶切位点。用含 IRF4 cDNA 质粒为模板进行 PCR 反应。扩增参数: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定; (2) PCR 产物和 MSCV-IRES-GFP 载体的双酶切、纯化: 将 PCR 产物及 MSCV-IRES-GFP 载体用 EcoR I 和 Xho I 双酶切后, 酶切产物经 1% 琼脂糖电泳分离, 而后按胶回收试剂盒说明对目的片段进行回收、纯化。回收产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定纯度; (3) DNA 重组连接: 分别取回收目的片段和线性化 MSCV-IRES-GFP 载体后, 加入 T4 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 条件下水浴中连接过夜; (4) 重组质粒的细菌转化扩增: 连接产物转化感受态 DH5 α 菌互补筛选。挑选阳性克隆, 提取质粒后, 用限制性酶切分析和 DNA 序列测定进行鉴定。序列测定由 invitrogen 公司完成。

1.2.2 病毒包装及检测 (1) 逆转录病毒上清的收集: 在 10 cm 培养皿中接种 293T 细胞, 培养 24 h

后, 配置如下反应混合液: 逆转录病毒质粒 DNA 10 μ g, pQEPAM3 质粒 10 μ g, 2.5 mol/L CaCl₂ 50 μ L, 加无菌水补至 500 μ L; 将此混合液缓慢旋转加入 500 μ L 2 \times HBS 中, 吹泡混匀, 室温孵育 20 min 后, 加入 10 mL DMEM 并混匀。之后吸去 293T 细胞的培养液, 将上述反应混合液轻轻滴加至 10 cm 培养皿中, 轻摇培养板混匀, 于置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 继续培养; 第 3 天将 293T 细胞消化后分到 3~4 个 10 cm 培养皿再培养 24 h。第 4 天收集上清, 用 0.45 μ m 的滤器过滤, 获得的上清中含有产生的病毒, 将病毒上清分装, -80 $^{\circ}$ C 储存备用。(2) 逆转录病毒上清体外感染包装细胞 GP+E86: 选择生长状态良好包装细胞 GP+E86, 用胰蛋白酶消化后以 5 \times 10⁴ 细胞数接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱培养。24 h 后弃旧培养液, 加入病毒上清 10 mL, 同时加入 polybrene 6 mg/mL 继续培养。每天 2 次, 持续 5~6 d。之后收集细胞, 用 0.05% EDTA 消化细胞, 重悬在含 2% 胎牛血清 DMEM 并制成单细胞悬液, 流式细胞仪检测转染效率, 同时无菌分选 GFP 阳性 GP+E86 细胞继续培养, 得到稳定产毒 GP+E86 细胞系, 扩增并冻存。

1.2.3 Western blot 检测 IRF4 在 GP+E86 细胞中的表达 集感染后 GP+E86 细胞, 加入细胞裂解液并充分裂解后, 在 4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min 离心 10 min, 取总蛋白上清, 煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳, 之后将蛋白转移至 PVDF 上, 用 5% BSA 在室温封闭 1 h 后, 加入抗 IRF4 抗体 (1:1 000) 和抗 β -actin 抗体 (1:5 000) 在室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, 再分别加 HRP 标记的兔抗山羊 IgG 和 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗, 室温作用 1 h, PBST 洗涤 3 次, 按试剂说明书用 Pierce ECL 化学发光底物进行化学发光显影, 用 X 光片曝光。 β -actin 作为内参调节不同样品的上样量。转染 pMSCV-IRES-GPF (空载) 的 GP+E86 细胞作为对照。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增

通过 PCR 扩增, 得到约 1.35 kb 的扩增片段。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 与 DNA 分子 Marker 相比较, 其分子质量大小与预期值相符 (见图 1)。

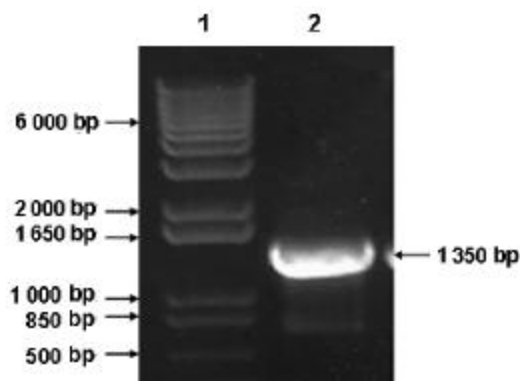


图 1 PCR 扩增 IRF4

Fig. 1 PCR products of IRF4

1: Marker; 2: PCR 扩增产物

2.2 重组质粒 pMSCV-IRES-GFP-IRF4 的鉴定

重组质粒 pMSCV-IRES-GFP-IRF4 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切, 1% 凝胶电泳, 紫外透射仪上观察可见一条 1.35 kb 目的片段和约 6.57 kb 的载体片段 (见图 2), 与预期的结果相符, 表明 IRF4 已被成功地插入到载体中, 初步证明获得构建正确重组质粒. 进一步的序列测定表明, 重组子中目的片段序列与报道的基因序列一致.

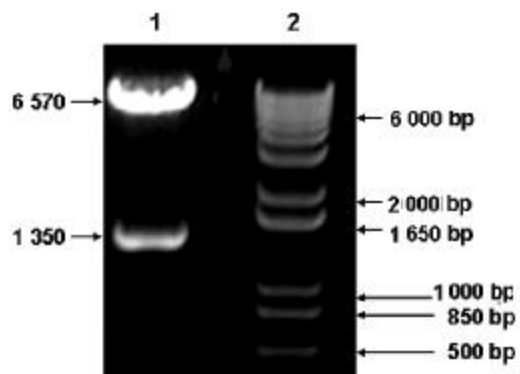


图 2 重组质粒 pMSCV-IRES-GFP-IRF4 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid MSCV-IRES-GFP-IRF4 by restriction enzyme digestion

1:IRF4 cDNA (1350bp) 和载体 (6570bp); 2:Marker.

2.3 转染效率检测

重组逆转录病毒载体经磷酸钙转染法导入 293T 细胞 24 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察, 可见细胞内绿色荧光. 同样被逆转录病毒上清感染包装细胞 GP+E86, 24 h 后镜下也可见到绿色荧光蛋白表达. 重组病毒感染 48 h 后, 收集被病毒上清感染的 GP+E86 细胞, PBS 洗 3 次, 流式细胞

仪检测绿色荧光蛋白表达情况. 与未感染的 GP+E86 细胞相比其荧光强度明显增加, GFP 阳性细胞可达 34.9% (见图 3), 显示了较高的感染效率.

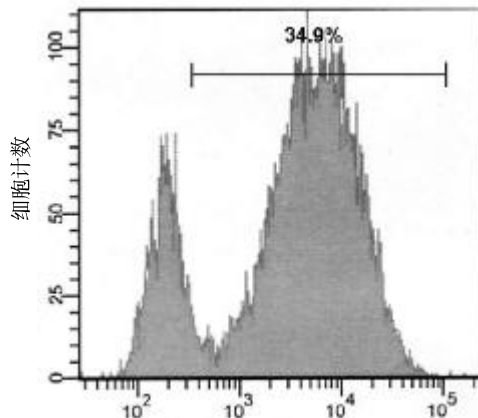


图 3 转染后流式细胞仪检测 GP+E86 细胞 GFP 的表达

Fig. 3 Flow cytometric analysis of GFP expression in transfected GP+E86 cells

2.4 Western blot 检测 IRF4 蛋白表达

用 anti-IRF4 抗体对转染重组质粒 pMSCV-IRES-GFP-IRF4 的 GP+E86 细胞进行 Western blot 检测, 结果显示在 52 kDa 处有特异蛋白条带 (见图 4), 证明构建的逆转录病毒表达质粒能够成功表达 IRF4 蛋白.

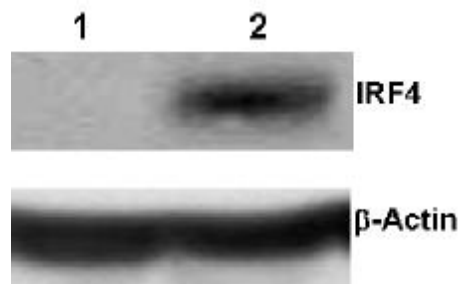


图 4 蛋白印迹鉴定 IRF4 蛋白的表达

Fig. 4 Western blot analysis of IRF4 protein

1:空载对照组 (pMSCV-IRES-GFP);
2:pMSCV-IRES-GFP-IRF4.

3 讨论

IRF4 基因定位于第 13 号染色体上, 由 9 个外显子组成, 全长 4 683 kb, 该基因开放阅读框架为 1 350 bp, 编码产物约 52 kDa. IRF4 在 B 细胞、T 细胞和巨噬细胞的功能中发挥重要的作用. IRF4 缺陷鼠表现为 B 和 T 细胞功能的严重缺陷,

外周 B 细胞发育阻断在生发中心阶段。血清免疫球蛋白水平大幅度下降，活化的淋巴细胞和浆细胞数量明显减少，产生抗体和 T 淋巴细胞细胞毒作用或抗肿瘤反应的能力下降^[5,6]。IRF 4 还参与控制浆细胞的分化和免疫球蛋白基因链转换重组 (class switch recombination)，抗体的成熟和分泌。IRF4 缺失可使记忆性 B 细胞不能分化成为浆细胞，揭示了 IRF4 在浆细胞产生过程中起重要的转换作用^[7,8]。

逆转录病毒载体作为真核表达载体，以其能够整合到受体细胞染色体上并能够长久稳定地表达目的蛋白^[9]，被人们广泛用于基因工程的研究。本实验笔者选用 pMSCV-IRES-GFP 载体，通过双酶切和基因重组技术在载体的多克隆位点中插入目的基因 IRF4，构建了携带 GFP 的逆转录病毒载体。绿色荧光蛋白 (GFP) 作为一种报告基因，以它作为转染细胞标记，应用流式细胞仪可快速分离转染细胞。目的基因与 GFP 基因之间通过内部核糖体进入位点 (IRES) 相连接，可使表达出来的目的蛋白和 GFP 相互独立，避免 GFP 对目的蛋白活性的影响。因此在实验中笔者用逆转录病毒上清感染包装细胞 GP+E86，流式细胞仪分选 GFP 阳性 GP+E86 细胞后继续培养，从而得到高效表达 IRF4 细胞系。笔者将利用已获得高滴度和感染性的 pMSCV-GFP-IRF4 逆转录病毒感染 PLC γ 2 缺失小鼠的骨髓 B 细胞，以进一步探讨 IRF4 在小鼠 B 细胞发育中的作用，相关研究正在进行之中。

[参考文献]

- [1] TAMURA T, YANAI H, SAVITSKY D, et al. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 535 - 584.
- [2] LEHTONEN A, VECKMAN V, NIKULA T, et al. Differential expression of IFN regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175(10): 6 570 - 6 579.
- [3] LOHOFF M, MAK T W. Role of interferon regulatory factors in helper cell differentiation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(2): 125 - 135.
- [4] BAI L, CHEN Y, HE Y, et al. Phospholipase cgamma2 contributes to light-chain gene activation and receptor editing [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(17): 5 957 - 5 967.
- [5] MITTRUCHER H W, MATSUYAMA T, GROSSMAN A, et al. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function [J]. *Science*, 1997, 275(5 299): 540 - 543.
- [6] CALAME K L, LIN K I, TUNYAPLIN C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 205.
- [7] KLEIN U, CASOLA S, CATTORETTI G, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination [J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(7): 773 - 782.
- [8] FILLATREAU S, RADBRUCH A. IRF4 - a factor for class switching and antibody secretion [J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(7): 704 - 706.
- [9] BLM, MICKLEM D R AND LORENS J B. Enhanced gene expression from retroviral vectors [J]. *BMC Biotechnology*, 2008, 8: 19 - 25.

(2012 - 03 - 10 收稿)

[1] TAMURA T, YANAI H, SAVITSKY D, et al. The IRF fa-