

慢病毒载体介导 CD1d 和 GFP 融合基因转染 PANC-1 细胞的实验研究

刘为军, 王昆华, 师 义, 陈贤玉, 郭世奎, 徐 玉

(云南省第一人民医院普外一科, 云南省肠外肠内营养学研究中心, 昆明理工大学附属昆华医院, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 构建人免疫基因 CD1d 与绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 融合基因慢病毒载体并转染人胰腺癌细胞 (PANC-1)。 **方法** 实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法扩增获得 CD1d 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转染 293T 细胞, 包装成功后收集上清, 浓缩, 鉴定。通过慢病毒转染预实验确定 MOI, 进行人 CD1d 重组慢病毒载体转染胰腺癌 PANC-1 细胞株。 **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 CD1d 基因序列完全一致。重组慢病毒质粒可高效转染 PANC-1 细胞, 荧光显微镜下可观察到大量绿色荧光。 **结论** 成功构建了 CD1d 与 GFP 融合基因慢病毒表达载体并转染人胰腺癌细胞。

[关键词] CD1d 基因; GFP 基因; 慢病毒; 转染

[中图分类号] Q782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 03 - 0031 - 04

Experimental Research of CD1d and GFP Fusion Gene Transfects PANC-1 Cells Mediated by Lentiviral Vector

LIU Wei - jun, WANG Kun - hua, SHI Yi, CHEN Xian - yu, GUO Shi - kui, XU Yu

(Dept. of General Surgery, The First People's Hospital of Yunnan Province/Parenteral and Enteral Nutrition Research center of Yunnan Province, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To construct lentiviral vector of human immunogene CD1d and green fluorescent protein (GFP) fusion gene and transfect PANC-1 cell. **Methods** The fragments containing all the exons of CD1d were amplified by RT-PCR and were cloned into the lentiviral expression vectors labeled with GFP. The lentivirus was packaged and used to transfect 293T cells together with shuttle plasmid. The supernatant of virus-producing cells was collected, concentrated and identified, then was used to infect 293T cells. MOI was determined by preliminary experimental, and pancreatic cancer cell lines PANC-1 mediated by human restructured gene CD1d lentiviral vector was transected. **Results** Electrophoresis showed that the sequence of the RT-PCR product was consistent with the data of NCBI by DNA sequencing analysis. The lentivirus could effectively transfect PANC-1 cells. Strong green fluorescence was observed by fluorescent microscopy. **Conclusion** The lentivirus vector containing CD1d-GFP recombinant gene have been successfully constructed, and the fusion gene could effectively transfect PANC-1 cells.

[Key words] CD1d gene; GFP gene; Lentivirus; Transfection

CD1d 是 CD1 家族中的众多成员之一, 在胸腺细胞、B 细胞亚群、树突状细胞亚群等表达丰富, 是一类功能类似于 MHC I 类分子又独立的具有抗

原提呈作用的非多肽性跨膜糖蛋白分子。脂类、糖脂类抗原这些特殊抗原可通过 CD1d 介导特异性激活 NKT 细胞。NKT 细胞被 CD1d 分子激活后具有

[基金项目] 云南省科技厅应用基础研究联合专项基金资助项目 (2010CD196)

[作者简介] 刘为军 (1970~), 男, 安徽六安市人, 在读博士研究生, 主治医师, 主要从事普外科临床及科研工作。

[通讯作者] 王昆华. E-mail: Wangkunhua1@madmail.com.cn

抗肿瘤、抗病毒、抗细菌作用, 因此, 成为国内外学者研究热点^[1,2]. 本实验的目的是构建 CD1d 基因与绿色荧光蛋白 (GFP) 融合基因慢病毒载体, 进行人 CD1d 重组慢病毒载体转染人胰腺癌 PANC-1 细胞株, 为免疫基因 CD1d 治疗恶性肿瘤的提供新思路.

1 材料与方法

1.1 实验材料

逆转录试剂盒购自 Fermenters 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 TIANGEN 公司; 质粒 DNA 大提试剂盒购自 TIANGEN 公司; 内切酶 Xba I、Not I、T4 DNA Ligase、Ex Taq DNA polymerase、pEASY-T1 simple cloning kit、慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP、Trans109 感受态细胞均购自美国 GeneCopoeia 公司; 胰腺癌细胞株 PANC-1 购自中科院昆明动物所细胞库.

1.2 RT-PCR 扩增

应用 NCBI Primer-BLAST 软件扩增 CD1d 基因一对引物如下: Forward primer 5'-CCCCTCCGCTGC-CTCCAGAT-3' Reverse primer 5'-CAAGCACGCCAG-GACTGCCA-3'.

液氮中取出实验前收集保存的小肠组织标本, 迅速放入干冰中, 冰冻的状态下切取、称量 1 mg, 添加 1 mL 4℃预冷的 TRIzol, 冰上研磨, 同时进行总 RNA 的抽提. 取 1 μL RNA 溶液稀释到 99 μL TE 中, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度, 总 RNA 纯度: $1.80 < A_{260}/A_{280} < 2.00$. PCR 反应体系共 50 μL 总反应体系; 快速离心混匀; 加入 Taq DNA 聚合酶 1 μL, 再次快速离心混匀. 进行热循环扩增, 循环条件: 94℃变性 45 s; 61℃退火 45 s; 72℃延伸 45 s; 共 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min.

1.3 构建 CD1d 基因的 cDNA 克隆

应用 RT-PCR 试剂盒逆转录合成 cDNA, 反应体系总体 20 μL, 42℃水浴 90 min, 95℃5 min 灭活逆转录酶. 切胶回收 PCR 产物, 并将回收产物采用紫外分光光度计测定浓度为 30 ng/μL, 零下 20℃保存. pEASY-T1-CD1d 重组质粒用限制性核酸内切酶 Xba I 与 Not I 双酶切, 鉴定插入目的片段. 得到两条 DNA 片段, 一段 1 007 bp, 另一段 3 300 bp. 将 5 μL 连接产物加入 Trans109 感受态细胞, 冰浴放置 30 min; 热激 90 s 后拿出, 冰浴,

收集的菌液 100 μL 和 900 μL 并分别涂布于 LB 平板. 挑取单个菌落, 使用载体多克隆位点两端的引物进行 PCR 扩增, 检测. 将冻存的酶切鉴定阳性的含目的基因菌液送上海生工生物技术有限公司进行测序分析.

1.4 重组慢病毒颗粒的制备和鉴定

取生长状态良好且处于对数生长期的 293T 细胞, 胰酶消化计数后, 每个细胞培养皿接种 3×10^6 个细胞, 5% CO₂, 37℃培养箱中培养过夜; 重组质粒加至 1.5 mL Opti-MEM 中, Lipofectamine 2000 加至 1.5 mL Opti-MEM 中, 37℃放置 5 min; 将质粒脂质体复合物 3 mL 加入到细胞培养皿中, 5%的 CO₂, 37℃培养箱中孵育; 48 h 后收集上清; 4℃, 50 000 r/min 超速离心 2 h 浓缩病毒液; 取病毒上清感染 293T 细胞, 荧光显微镜下观察绿色荧光分布情况.

1.5 重组慢病毒载体转染胰腺癌细胞 PANC-1 (MOI = 10)

(1) 6 孔细胞培养板接种 PANC-1 细胞, 使用不含抗生素的 DMEM 培养基接种; 时间为 24 h; (2) 感染 24 h 后, 荧光显微镜观察 GFP 表达; 48 h 后, 荧光显微镜再次观察 GFP 表达, 并继续培养传代; (3) 96 h 后开始, 添加 10% FBS 的 DMEM 培养基, 经反复传代并继续观察绿色荧光蛋白 GFP 表达.

2 结果

2.1 包装前再次测序验证 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-CD1d-慢病毒载体

慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-CD1d 包装前再次对 CD1d 基因进行克隆并测序分析, 结果与 GenBank 中查出的 CD1d 基因一致 (见图 1).

2.2 CD1dcDNA 结果

从小肠组织中提取 RNA, 以经逆转录获得的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示扩增片段为 1 007 bp, 与目的基因大小完全相符 (见图 2).

2.3 慢病毒载体介导 CD1d 和 GFP 融合基因转染 PANC-1 细胞

构建的慢病毒载体系统中的质粒成分转移至包装 PANC-1 细胞中, 不同转染时间荧光显微镜下绿色荧光显示 (见图 3).

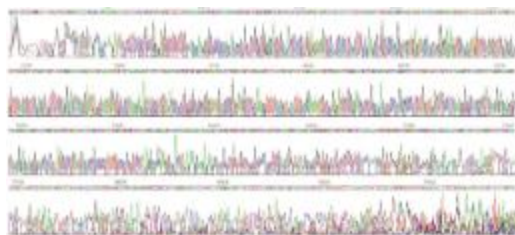


图 1 CD1d 基因克隆并测序
Fig. 1 CD1d gene cloning and sequencing

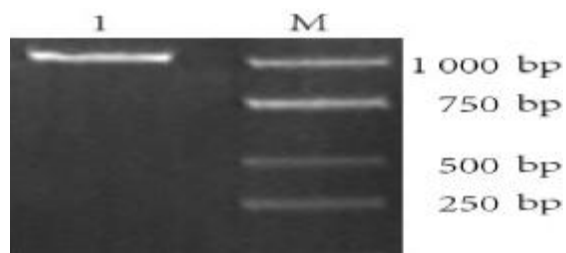
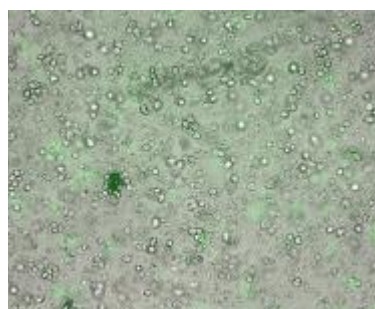


图 2 RT-PCR 结果
Fig. 2 Result of RT-PCR
M: DNA Marker; 1: Positive cell colone.



白光视野

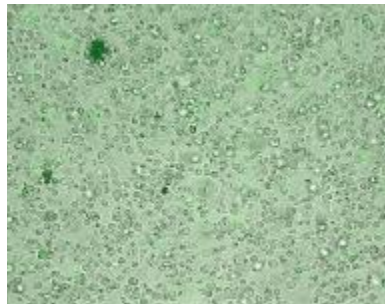


绿色荧光视野

转染 48 h

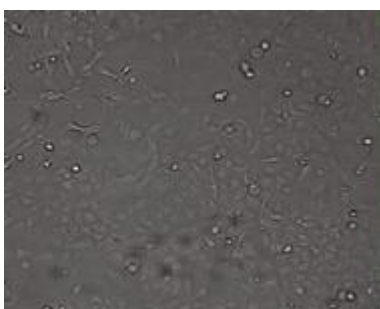


白光视野

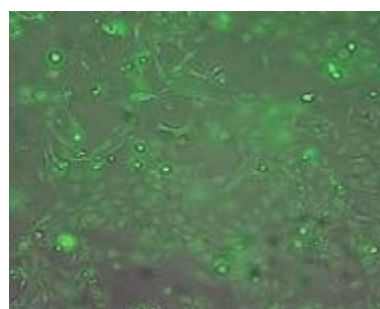


绿色荧光视野

转染 72 h



白光下



绿色荧光下

转染 96 h

图 3 不同时间感染 PANC-1 细胞后荧光检测结果
Fig. 3 Fluorescent analysis of PANC-1 cells infected within different time

3 讨论

CD1d 是 CD1 家族中的众多成员之一, 在胸腺细胞、B 细胞亚群、树突状细胞亚群等丰富表达, 是一类功能类似于 MHC I 类分子又独立的具有抗原提呈作用的非多肽性跨膜糖蛋白分子。脂类、糖脂类抗原这些特殊抗原可通过 CD1d 介导特异性激活 NKT 细胞。NKT 细胞被 CD1d 分子激活后具有抗肿瘤、抗病毒、抗细菌作用^[3], 因此, 成为国内外学者研究热点。

笔者选择复制缺陷型 HIV-1 作为载体, 是因为该载体系第 3 代慢病毒载体, 具有的自身特点和优点, 不但可转染分裂细胞, 也可转染非分裂细胞, 转染效率高, 免疫反应小, 相对安全性高, 目的基因可自行整合至靶细胞基因组并长期稳定表达等优点^[4,5], 避免了由于部分非病毒载体转染效率低、毒性大等缺陷, 非常适于基础和临床的基因治疗研究。同时为了方便观察, 笔者采用新型报告基因——新一代增强型绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein, GFP) 为标志基因, 在亮度和对比度方面均优于过去使用的普通荧光蛋白。通过克隆目的基因和 GFP 基因的表达融合体, 无论是在体内还是体外实验均可以清晰观察到目的基因的表达^[6], 为实验研究带来极大的便利。

本实验成功构建了 CD1d 基因重组慢病毒表达载体, 转染胰腺癌 PANC-1 细胞 48 h 后, 荧光显微镜下可见大量绿色荧光, 72 h 后, 荧光显微镜

下绿色荧光明显增强, 96 h 后, 继续进行细胞传代, 荧光显微镜下仍可见绿色荧光, 表明慢病毒具有感染活性并长期稳定表达。因此, 本研究利用基因克隆、慢病毒载体构建、细胞转染等方法使人 CD1d 基因稳定转染胰腺癌细胞株 PANC-1, 为探讨胰腺癌的基因治疗提供新视角, 为后期以 CD1d-NKT 为桥梁, 进行细胞免疫原性变化, 免疫通路上下游的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] BALATO A, ZHAO Y, HARBERTS E, et al. CD1d-dependent, iNKT-cell cytotoxicity against keratinocytes in allergic contact dermatitis [J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21(12): 915 - 920.
- [2] WUN K S, ROSS F, PATEL O, et al. Human and mouse type I natural killer cell antigen receptors exhibit different fine specificities for CD1d-antigen complex [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(46): 39 139 - 39 148.
- [3] RAGHURAMAN G, GENG Y, WANG C R. IFN- γ -mediated Up-Regulation of CD1d in Bacteria-Infected APCs [J]. *J Immunol*, 2006, 177(11): 7 841 - 7 848.
- [4] QASIM W, VINK C A, THRASHER A J. Hybrid lentiviral vectors [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(7): 1 263 - 1 267.
- [5] SHINOHARA E T, KAMINSKI J M. Active integration: new strategies for transgenesis [J]. *Transgenic Res*, 2007, 16: 333 - 339.
- [6] KOO B, KWON M, ROH J, et al. 336 quantitative analysis of tetracycline-inducible expression of the green fluorescent protein gene in transgenic chickens, 2012, 25(1): 315-316. (2013-02-20 收稿)