

人神经元素 3 基因重组逆转录病毒表达载体的构建及其包装细胞株的建立

楚元奎, 吕长荣, 陈冬梅, 曹晖, 窦忠英

西北农林科技大学动物医学院 陕西省农业分子生物学重点实验室 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 杨凌 712100

摘要: 为构建表达人神经元素 3 基因 (*neurogenin 3*, *ngn3*) 的重组逆转录病毒载体, 建立稳定表达 *ngn3* 的包装细胞株, 本研究以流产人胎儿胰腺组织为材料, 通过 RT-PCR 方法克隆出人 *ngn3* 基因, 将其连接到 pMD18-T 载体上并测序, 结果表明, 测序得到的基因序列与发表的人 *ngn3* 基因序列 (GenBank Accession No. BC126468) 完全一致。将 *EcoR* I 和 *Hpa* I 双酶切后的基因片段构建到 pMSCV-neo 逆转录病毒载体中, 酶切鉴定结果表明, pMSCV-*ngn3* 重组逆转录病毒载体构建成功。脂质体法将 pMSCV-*ngn3* 重组载体导入 PT67 包装细胞, G418 筛选后, 对得到的细胞株进行 RT-PCR 和免疫组化检测, 结果显示, 该细胞株在 mRNA 水平和蛋白水平均稳定表达 Ngn3; 收集该细胞株的培养上清液, 进行 RT-PCR 检测及电镜观察, 结果表明, 该细胞株将导入的重组逆转录病毒载体 pMSCV-*ngn3* 包装成了具有感染性的病毒颗粒, 并将其释放到了培养上清液中。以上结果表明 PT67-*ngn3* 包装细胞株建立成功。该细胞株的成功建立, 为下一步将 *ngn3* 基因应用于提高人胎儿胰腺祖细胞诱导分化效率方面的研究奠定了基础。

关键词: 人, 神经元素 3 基因, 逆转录病毒载体, 包装细胞株

Construction and identification of recombinant retroviral vector of human *ngn3* gene and its packaging cell line

Yuankui Chu, Changrong Lü, Dongmei Chen, Hui Cao, and Zhongying Dou

Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering & Technology Center, Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Animal Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: In order to construct the recombinant retrovirus vector of human *ngn3* gene and its packaging cell line, we successfully amplified the open reading frame (ORF) of *ngn3* gene from human fetal pancreatic tissue by RT-PCR. The PCR products of human *ngn3* gene was subcloned into pMD18-T vectors and sequenced. Results showed that its sequence was fully consistent with the *ngn3* gene published in GenBank (GenBank Accession No. BC126468). The correct fragment was digested by *EcoR* I and *Hpa* I from recombinant pMD18-T vector and inserted into the same restriction enzyme sites of retroviral vector pMSCV-neo. We got recombinant retrovirus vector pMSCV-*ngn3*, which was identified by double restriction enzyme digestion and then transfected into PT67 cells by lipofectamine 2000. We established the PT67-*ngn3* packaging cell line by G418 selection, which was detected by RT-PCR and immunohistochemistry staining. The detection results showed that the Ngn3 expressed at the mRNA and protein level

Received: November 25, 2009; **Accepted:** January 28, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30671067), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2005AA219050).

Corresponding author: Zhongying Dou. Tel: +86-29-87080068; E-mail: douzhongying@china.com

国家自然科学基金 (No. 30671067), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2005AA219050) 资助。

in the packaging cell line. RT-PCR detection and electronic microscope analysis showed that the recombinant retroviral vector pMSCV-ngn3 was packaged into infectious virus particles and released into the supernatant of the cells. These results demonstrated that a PT67-ngn3 packaging cell line was successfully established, and this could facilitate the study of differentiation of the human fetal pancreatic progenitor cells into insulin-producing cells by using the *ngn3* gene.

Keywords: human, *ngn3* gene, retrovirus vector, packaging cell line

神经元素 3 基因 (*neurogenin3, ngn3*) 是控制胰岛早期发育的关键性转录因子之一, 它通过与胰岛素基因增强子元件结合, 在胰腺的发育过程中起着非常重要的调控作用。胚胎发育生物学研究表明, 胰腺内表达 *ngn3* 基因的细胞可分化为胰岛内所有四种类型的内分泌细胞, 被认为是胰岛内分泌祖细胞的标志之一^[1]。外源性 *ngn3* 基因的表达可以促进胰腺导管细胞向胰岛 β 细胞转化^[2]。由此可见, 导入外源性 *ngn3* 基因可作为促进干细胞向胰岛 β 细胞分化的一种有效策略。

本实验室长期从事胰腺祖细胞体外定向诱导分化为胰岛 β 细胞方面的研究, 已成功建立了表达胰腺十二指肠同源框 1 基因 (*pancreatic duodenal homeobox-1, pdx-1*) 的人胎儿胰腺祖细胞系, 并完成了相关的鉴定工作和初步诱导分化实验^[3-4]。本研究旨在建立稳定表达人 *ngn3* 基因的包装细胞株, 将其应用于随后人胎儿胰腺祖细胞体外定向诱导分化为胰岛 β 细胞的研究中, 以期能够提高其定向诱导分化效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和人胎儿胰腺组织

PT67 细胞由本中心保存; 胰腺组织取自 5~6 月龄人流产胎儿 (杨凌示范区某医院提供), 液氮中保存备用。

1.1.2 菌种与载体

大肠杆菌 DH5 α 菌种、逆转录病毒载体 pMSCV-neo 由本中心保存; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hpa* I、T4 DNA 连接酶、LA *Taq* 聚合酶 (带 2 \times GC Buffer I)、dNTPs、DL2000 DNA Marker 和 DNA Marker IV 购自 TaKaRa 公司; RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自

Fermentas 公司; Trizol Reagent 和转染试剂脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司; G418、DMEM 培养基 (高糖) 与胎牛血清购自 Gibco 公司; DNA 片段快速胶回收试剂盒购自 Bio Dev-tech 公司; 质粒小提试剂盒购自 Sangon 公司; 高纯度质粒中提试剂盒购自 Promega 公司; Ngn3 鼠多克隆抗体购自 Abcam 公司 (Lot No: ab54743); SP-9000 通用型免疫组化染色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人 *ngn3* 基因的克隆与测序

根据已发表人 *ngn3* 基因序列 (GenBank Accession No. BC126468), 应用 primer premier 5.0 软件设计合成引物。上游引物 hNgn3-F: 5'-CCGG AATTCATGACGCCTCAACCCTCGG-3', 下游引物 hNgn3-R: 5'-CCGGTAACTCACAGAAAATCTGA GAAAGCCAG-3', 在上下游引物的 5'端分别引入 *EcoR* I 与 *Hpa* I 的酶切位点, 并加入保护碱基, 由上海生工生物技术有限公司合成, 下划线部分分别为 *EcoR* I 和 *Hpa* I 的酶切位点。用 Trizol 试剂提取 5~6 月龄人流产胎儿胰腺组织总 mRNA, 反转录得到 cDNA, 以 hNgn3-F 与 hNgn3-R 为引物, 在 LA *Taq* 酶作用下进行 PCR 扩增。反应体系为 25 μ L, 各组分添加比例参照 2 \times GC Buffer I 使用说明。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 67 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物预期大小为 663 bp。PCR 产物经 DNA 片段快速胶回收试剂盒回收后, 连接到 pMD18-T 载体上 (命名为 T-ngn3), 转化后小量提取该质粒, 经酶切鉴定后送 TaKaRa 生物公司进行测序。用 BioXM 2.6 软件对测序结果序列与 GenBank 中的原序列进行同源性分析。

1.2.2 pMSCV-ngn3 重组载体的构建

用内切酶 *EcoR* I 和 *Hpa* I 将 pMSCV-neo 质粒和测序正确的 T-ngn3 质粒双酶切, 酶切产物进行 1% 琼

脂糖凝胶电泳,回收酶切后的 pMSCV-neo 载体片段(约 6.5 kb)和 *ngn3* 基因片段,用 T4 DNA 连接酶连接后得到 pMSCV-*ngn3* 重组载体,重组载体经转化和质粒提取后,进行 *EcoR*I 和 *Hpa*I 双酶切鉴定,将鉴定结果为阳性的质粒送出测序。大量提取测序正确的阳性质粒,测定其核酸浓度, -20°C 冻存备用。

1.2.3 PT67 包装细胞 G418 最小致死量的测定

将 PT67 细胞以每孔 2×10^4 个细胞接种 24 孔板,每孔分别加入含 0、100、200、300、400、500、600、700 mg/L G418 的培养液,每个浓度梯度作 3 孔重复。期间每 3 天换液 1 次,培养 2 周后,所有细胞全部死亡的孔所对应的 G418 浓度即是 PT67 细胞的 G418 最小致死量。

1.2.4 PT67-*ngn3* 包装细胞株的建立

PT67 包装细胞扩增培养液为含 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液,细胞每 3 天按 1:5 的比例传代 1 次。转染前 1 天将 PT67 细胞按 2×10^5 个/皿的密度接种于直径为 60 mm 的细胞培养皿中,培养 24 h 后用于转染(约 70%~80% 融合)。用脂质体 2000 转染试剂将 pMSCV-*ngn3* 质粒导入 PT67 细胞。转染后 6 h 换成含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养,48 h 后按 1:10 的比例进行细胞传代,传代后 24 h 更换为 G418 筛选液对细胞进行筛选,筛选 2 周后得到许多具有 G418 抗性的细胞克隆(命名为 PT67-*ngn3* 细胞)。扩增培养后对该细胞系进行免疫组化和 RT-PCR 鉴定,并对其培养上清液进行 RT-PCR 鉴定以及透射电镜观察。

1.2.5 包装细胞株及其培养上清液的 RT-PCR 检测

应用 Trizol 试剂提取包装细胞株及其培养上清液中的总 RNA,总 RNA 经 DNase I 处理后,以 Oligo(dT)₁₈ 为引物用 M-MLV 逆转录酶进行反转录,得到 cDNA,取 1 μL cDNA 进行 RT-PCR 检测。PCR 检测引物为 hNgn3-F/hNgn3-R。反应体系及参数同上。以未转染的 PT67 细胞做阴性对照。

1.2.6 包装细胞株的免疫组化检测

参照 SP-9000 通用型免疫组化染色试剂盒说明对筛选前及筛选后的 PT67-*ngn3* 包装细胞进行免疫细胞化学染色。一抗为鼠抗 Ngn3 多克隆抗体(1:200 倍稀释),二抗为生物素标记的抗鼠多克隆

抗体,DAB 显色,镜下观察照相。并对 G418 筛选前后的 Ngn3 阳性细胞率进行比较分析。200 倍镜下分别随机选取 6 个视野,计数 Ngn3 阳性细胞数,与总细胞数比较后得到 Ngn3 阳性细胞率,取其平均值进行分析。

1.2.7 包装细胞株培养上清液中病毒颗粒的透射电镜观察

将 -70°C 保存的培养上清液取出,25 000 r/min 离心 90 min 浓缩后,迅速置于冰盒内,送往第四军医大学电镜室进行观察检测。

2 结果

2.1 人 *ngn3* 基因的克隆与测序

以流产人胎儿胰腺组织获得的 cDNA 为模板,hNgn3-F/hNgn3-R 为引物进行 RT-PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后可见大小约 663 bp 的特异性条带(图 1)。PCR 产物连入 pMD18-T 载体进行测序,测序结果经 BioXM 2.6 软件分析与 GenBank 公布的人 *ngn3* 基因序列(GenBank Accession No. BC126468)完全相同。

2.2 pMSCV-*ngn3* 重组载体的鉴定

将 pMSCV-*ngn3* 重组载体用 *EcoR*I 和 *Hpa*I 进行双酶切,结果得到 663 bp 和 6.5 kb 两个酶切片段(图 2),且测序结果证实 *ngn3* 基因序列未发生突变。该结果证明人 *ngn3* 基因重组到了 pMSCV-neo 载体中。

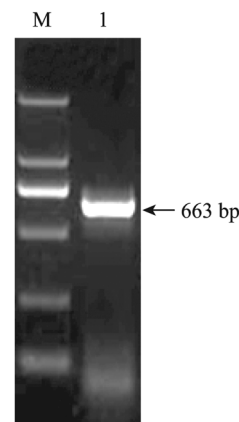


图 1 人 *ngn3* 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of human *ngn3* gene PCR products. M: DL2000 marker; 1: human *ngn3* gene PCR products.

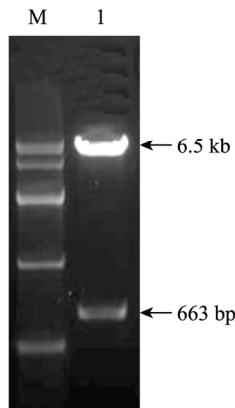


图 2 pMSCV-ngn3 重组载体的双酶切鉴定

Fig. 2 Detection of pMSCV-ngn3 recombinant vector by double restriction enzyme digestion. M: DNA marker IV; 1: double restriction enzyme digestion products of pMSCV-ngn3 recombinant vector.

2.3 PT67-ngn3 包装细胞株的建立及鉴定

PT67 细胞经不同浓度 G418 筛选, 确定其最小致死浓度为 600 mg/L, 选取该浓度的 G418 用于随后的细胞筛选。将 pMSCV-ngn3 重组载体导入 PT67 细胞内, 传代后待细胞生长至 70%~80% 融合时进行 G418 筛选 (图 3A)。筛选 3 d 后细胞开始出现大量死亡, 第 6 天时局部出现小的细胞克隆 (图 3B), 随着筛选的继续进行细胞克隆逐渐增大 (图 3C、D)。2 周后停止筛选, 对其进行传代扩增及相关检测, 将扩增后的细胞株命名为 PT67-ngn3 细胞株。

RT-PCR 检测结果显示, 转染后的包装细胞内有目的基因 *ngn3* 的表达, 而未转染的包装细胞内则检测不到该基因表达 (图 4)。表明导入的目的基因在包装细胞内已经开始转录。

免疫组化结果显示, 转染后的包装细胞内有目的蛋白 Ngn3 的表达, 其定位于细胞核内 (图 5), 并且经过 G418 筛选, Ngn3 阳性细胞率由筛选前的 34.8% 增加到了 78.7% (图 6)。表明目的基因转录后翻译成了蛋白, 表达于细胞核内; 该包装细胞株经过 G418 筛选得到了进一步的纯化。

对 G418 筛选后的包装细胞培养上清液分别进行 RT-PCR 检测和透射电镜分析。透射电镜检测结果显示, 培养上清液中含有包装后的病毒颗粒, 该病毒颗粒呈圆形或椭圆形, 具有典型的病毒颗粒形态 (图 7 箭头所示); RT-PCR 检测结果显示, 包装后的病毒颗粒中含有目的基因 (图 4)。

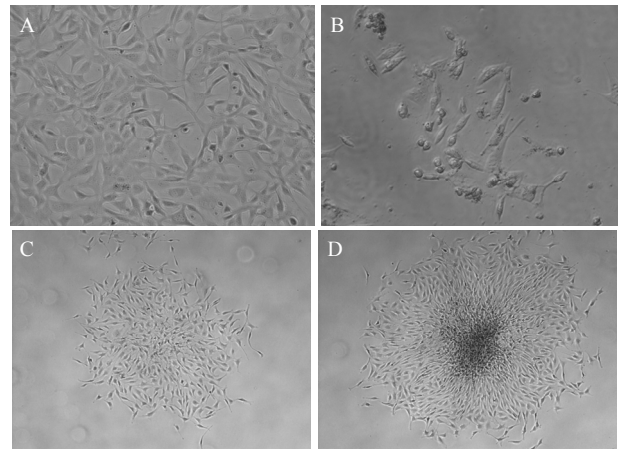


图 3 PT67-ngn3 包装细胞株的筛选

Fig. 3 Screening of PT67-ngn3 packaging cells. (A) Before screening. (B) 6 days after screening. (C) 11 days after screening. (D) 14 days after screening. A, B magnifying 100×; C, D magnifying 50×.

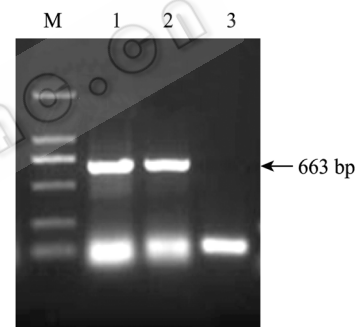


图 4 PT67-ngn3 包装细胞株及其培养上清液的 RT-PCR 检测

Fig. 4 RT-PCR detection of PT67-ngn3 packaging cells and its supernatant. M: DL2000 DNA marker; 1: RT-PCR products of PT67-ngn3 packaging cells; 2: RT-PCR products of PT67-ngn3 packaging cells's supernatant; 3: RT-PCR products of PT67 cells.

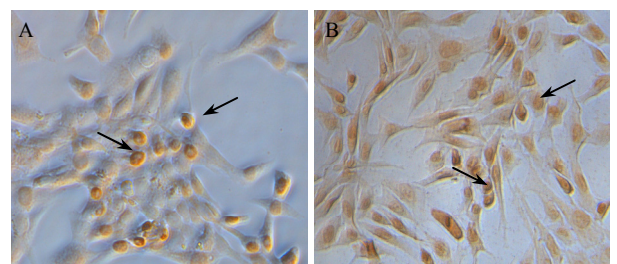


图 5 PT67-ngn3 包装细胞 G418 筛选前及筛选后的免疫组化染色 (Ngn3 阳性细胞为核着色, 如箭头所示, 200×)

Fig. 5 Immunohistochemical staining of PT67-ngn3 packaging cells before and after G418 screening. (A) Immunohistochemical staining of PT67-ngn3 packaging cells before G418 screening. (B) Immunohistochemical staining of PT67-ngn3 packaging cells after G418 screening. (Ngn3 positive cells are nucleus coloring, black arrows, magnifying 200×).

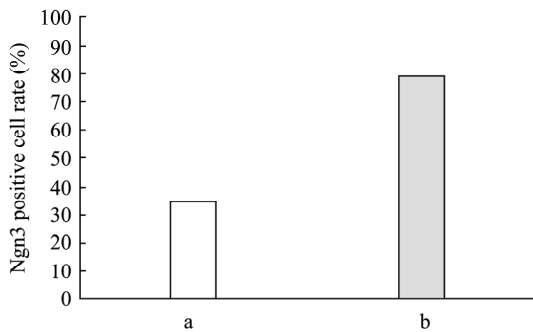


图6 G418 筛选前后 Ngn3 阳性细胞的表达变化

Fig. 6 Analysis of Ngn3 positive cell expression before and after G418 screening. a: Ngn3 positive cell rate before G418 screening; b: Ngn3 positive cell rate after G418 screening.

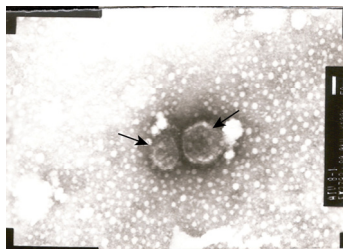


图7 pMSCV-ngn3 逆转录病毒颗粒在透射电镜下的形态 (100 000 \times , 箭头所示)

Fig. 7 Morphology of retroviral pMSCV-ngn3 particles under transmission electron microscope. Magnifying 100 000 \times , black arrows.

以上结果综合表明, PT67-ngn3 包装细胞株建立成功。

3 讨论

近些年来, 干细胞体外定向诱导分化为功能性的胰岛素分泌细胞主要是采取添加可溶性诱导因子的方式, 已经取得了一定的进展, 但是仍然存在诱导分化效率不高, 细胞未完全成熟分化等问题^[5-6]。随着基因工程技术的发展, 将与胰腺内分泌细胞发育和 β 细胞分化以及功能完善相关的转录因子应用于干细胞体外定向诱导分化迅速成为了研究的热点, 并为提高干细胞向胰岛 β 细胞的分化效率提供了新的途径。近几年, *pdx-1*、*ngn3* 和 *mafa* 等胰腺转录因子在该领域的应用已经取得了一些可喜的进展^[7-8]。本实验选用的 *ngn3* 基因属于碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 结构型转录因子, 是启动胰腺内分泌细胞分化所必需的关键转录因子, 是 β 细胞分化所必需的转录因子 *neuroD* 的激活因子^[9]。*ngn3* 通过启

动下游一系列相关转录因子的表达, 从而在胰岛内分泌细胞的定向分化过程中发挥着重要作用。

本实验从流产人胎儿胰腺组织成功克隆出了人 *ngn3* 基因开放阅读框序列, 其测序结果与 GenBank 公布的人 *ngn3* 基因序列 (GenBank Accession No. BC126468) 完全相同, 与之前所用的普通 *Taq* 聚合酶和 Buffer 相比, GC buffer I 和 LA *Taq* 聚合酶的应用不仅大大提高了扩增效率, 而且得到了高度保真的人 *ngn3* 基因。这主要是由于 *ngn3* 基因是通过与胰岛素基因增强子元件结合来发挥作用的, 其本身具有很高的 GC 含量, 因此对扩增条件的要求也较高, GC buffer I 和 LA *Taq* 聚合酶的应用很好地解决了这一问题。

实验中所使用的逆转录病毒载体 pMSCV-neo 来源于 Moloney 小鼠白血病病毒, 拥有鼠干细胞 PCMV 病毒来源的 5' 长末端重复序列 (5' LTR), 可使目的基因在干细胞和其他哺乳动物细胞中高效表达^[10]。然而, 逆转录病毒载体 pMSCV-neo 本身不具有感染能力, 其感染能力需要经过包装细胞的包装才能获得。实验中所用的 PT67 细胞是目前较为广泛使用的包装细胞, 用它制备的逆转录病毒可以感染人和其他哺乳动物的细胞, 并且由它包装的病毒感染靶细胞后不能进行复制, 因此具有很高的生物安全性^[11]。本实验成功构建出了表达人 *ngn3* 基因的重组逆转录病毒载体 pMSCV-ngn3, 通过脂质体法将其导入 PT67 包装细胞内, 经 G418 筛选后, 得到 1 株具有 G418 抗性的细胞株, RT-PCR 及免疫组化检测证实该细胞株在 mRNA 水平和蛋白水平均稳定表达 Ngn3, 表明 PT67-ngn3 包装细胞株建立成功。对其培养上清液的 RT-PCR 检测及电镜观察结果表明, 该包装细胞株将导入的重组逆转录病毒载体 pMSCV-ngn3 包装成了具有感染能力的病毒颗粒, 并将其释放到了培养上清液中, 表明得到的细胞株为高效表达人 *ngn3* 基因的产毒细胞株。

总之, PT67-ngn3 高效产毒包装细胞株的成功建立, 为下一步将 *ngn3* 基因应用于人胎儿胰腺祖细胞的体外定向诱导分化, 提高其定向诱导效率奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Gu G, Dubauskaite J, Melton DA, *et al.* Direct evidence for the pancreatic lineage: Ngn3⁺ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*, 2002, **129**(10): 2447–2457.
- [2] Heremans Y, Van De Castele M, in't Veld P, *et al.* Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin3. *J Cell Biol*, 2002, **159**: 303–312.
- [3] Xiao M, An LL, Yang XY, *et al.* Establishing a human pancreatic stem cell line and transplanting induced pancreatic islets to reverse experimental diabetes in rats. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2008, **38**(8): 699–707.
效梅, 安立龙, 杨学义, 等. 人胰腺干细胞建系及移植诱导胰岛治疗大鼠糖尿病. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, **38**(8): 699–707.
- [4] Zhao T, Qiao H, Wang Y, *et al.* Differentiation of human pancreatic stem cells into islet-like cell clusters in the treatment of diabetic rats. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2007, **11**(7): 1259–1262.
赵婷, 乔海, 王贇, 等. 人胰腺干细胞诱导胰岛样细胞团及其治疗大鼠糖尿病的效果. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, **11**(7): 1259–1262.
- [5] Ayse GK, Luis EF, Ana DL, *et al.* Limited capacity of human adult islets expanded *in vitro* to redifferentiate into insulin-producing β cells. *Diabetes*, 2007, **56**: 703–708.
- [6] Andreas L, Anna LN, Robyn AB, *et al.* Redifferentiation of insulin-secreting cells after *in vitro* expansion of adult human pancreatic islet tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **327**: 581–588.
- [7] Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, *et al.* Pdx-1/VP16 fusion protein, together with NeuroD or Ngn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. *Diabetes*, 2005, **54**: 1009–1022.
- [8] Qiao Z, Juliana B, Andrew K, *et al.* *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β cells. *Nature*, 2008, **455**: 627–632.
- [9] Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, *et al.* Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 1607–1611.
- [10] Miller AD, Chen F. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J Virol*, 1996, **70**(8): 5564–5571.
- [11] Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(21): 11407–11413.

本 期 广 告 索 引

企业	版位	企业	版位
通用电气 (中国) 有限公司 GE health-care Bio-science	封底	生物谷网站	内页
杰能科生物工程有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
赛默飞世尔科技有限公司	封三	镇江东方生物工程公司	内页