

MHC 类基因逆转录病毒表达载体的构建及其在造血细胞中的表达

吴岚晓¹ 郭坤元¹ 李江琪¹ 李玉华¹ 李明² 第一军医大学¹ 珠江医院血液科 广东 广州 510282 热带病研究室 广东 广州 510515 冤

摘要 目的 构建 BALB/c 小鼠 MHC 玉类基因的逆转录病毒表达载体并探讨该基因在 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞中的表达遥方法 由逆转录病毒载体 pMSCV 介导将 BALB/c 小鼠的 H-2D^d 基因导入 C₅₇BL/6 小鼠的造血细胞中并用逆转录聚合酶链反应和流式细胞仪检测转染后基因的表达遥结果 用 EcoR 玉和 Xho 玉双酶切鉴定证实 H-2D^d 基因正确插入载体 pMSCV 遥重组逆转录病毒感染的 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞整合了 BALB/c 小鼠的 H-2D^d 基因并能转录为 mRNA 在其细胞膜上有 H-2D^d 分子的表达遥结论 成功构建小鼠 H-2D^d 编码基因的逆转录病毒载体该基因已稳定地整合进 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞的基因组内 且在细胞中得到表达遥

关键词 MHC 玉类基因 小鼠 克隆 分子 逆转录病毒科 / 遗传学 造血细胞

中图分类号 378.91; Q782 文献标识码 文章编号 000-2588 2002 2-1076-03

Construction of MHC 玉 gene retroviral expression vector and its expression in hematopoietic cells

WU Lan-xiao¹, GUO Kun-yuan¹, LI Jiang-qi¹, LI Yu-hua¹, LI Ming²

¹Department of Hematology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Department of Tropical Diseases, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To construct the retroviral expression vector of BALB/c mouse H-2D^d gene and study its expression in C₅₇BL/6 mouse hematopoietic cells (MHC). Methods A retroviral vector pMSCV encoding H-2D^d gene was transduced into the packaging cell line PT67 by lipofectin, and the hematopoietic cells of C₅₇BL/6 (H-2D^d negative) were infected by the above virus supernatant. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and flow cytometry were employed to examine the expression of H-2D^d on the infected cells. Results The cDNA encoding H-2D^d was correctly inserted into the vector pMSCV, as confirmed by restriction endonuclease digestion. The H-2D^d gene was integrated into the C₅₇BL/6 mouse hematopoietic cell genome and expressed on the cell surface. Conclusion Recombinant H-2D^d of BALB/c mouse retroviral expression vector has been successfully constructed and its expression obtained in C₅₇BL/6 mouse hematopoietic cells, which may facilitate further study of the function of MHC in transplantation immunology.

Key words: MHC-玉 gene, mice; clone, molecular; retroviral expression vector/genetics; hematopoietic cells

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 分子是机体识别自我和非我的标志性分子遥从进化角度来看 细胞生物需要有一种机制来识别自身细胞及辨认外来抗原并以某种方式清除外来抗原遥有关外来抗原如何递呈 效应细胞如何起作用的机制已经研究得较为清楚遥但是随着器官移植特别是骨髓移植在医学中的应用 原本递呈其他抗原的 MHC 分子本身成了递呈的对象 而这在自然界中是很难出现的 此时嵌合体中免疫识别就变得非常复杂遥本研究通过逆转录病毒载体介导将 BALB/c 小鼠的 MHC 玉类基因 H-2D^d 导入到 C₅₇BL/6 小鼠的骨髓造血细胞 为进一步研究 MHC 玉类分子在移植免疫中的作用提供实验基础遥

1 材料和方法

1.1 动物

雌性 BALB/c (H-2d) 尧 雌性 C₅₇BL/6 (H-2b) 近交系小鼠 尧 8 周龄 尧 体重 18~22 g 尧 由第一军医大学实验动物中心提供遥

1.2 质粒

逆转录病毒载体质粒 pMSCV 尧 病毒包装细胞 PT67 购自 Clontech 公司 尧 含 H-2D^d cDNA 的质粒 pGEM-H2D^d 为本课题组构建遥

1.3 主要试剂

脂质体尧 418 (geneticin) 尧 造血细胞生长因子尧 DMEM 培养基和限制性内切酶均购自 Gibco 公司遥 胎牛血清购自 Hyclone 公司遥 逆转录试剂盒购自 Promega 公司遥 异硫氰酸荧光素 (ITC) 标记抗小鼠 H-2D^d 单克隆抗体购自 PharMingen 公司遥 DNA 相对分子量标准 DL-2000 及 Hind 芋 Marker 购自大连宝生物工程公司遥

收稿日期 2002-07-15

基金项目 广东省自然科学基金 01043 冤

作者简介 吴岚晓 1975 尧 女 尧 福建福州人 尧 1997 年毕业于第一军医大学 尧 硕士 尧 医师 尧 电话 20-85143190 尧 e-mail 院 ulx75@yahoo.com

1.4 逆转录病毒表达质粒 pMSCV-H2D^d 的构建

EcoR 玉和 Xho 玉双酶切质粒 pGEM-H2D^d 后袁低熔点琼脂糖凝胶回收酶切的 H-2D^d cDNA 片段遥回收的 H-2D^d cDNA 片段与经同样双酶切的 pMSCV 载体用 T4DNA 连接酶连接袁转化入 JM109 钙化菌中袁提取重组质粒 pMSCV-H2D^d 进行 EcoR 玉和 Xho 玉双酶切鉴定及测序遥

1.5 重组病毒的包装及病毒滴度的测定

参照脂质体说明书袁用脂质体介导逆转录病毒表达质粒 pMSCV-H2D^d 转染包装细胞 PT67 遥筛选抗性克隆并用 NIH3T3 细胞测定病毒滴度遥

1.6 逆转录病毒对 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞的感染

方法见文献咱咱以 1伊0⁶/ml C₅₇BL/6 小鼠骨髓细胞接种到 25ml 的培养瓶中遥加入含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液袁同时加入造血细胞生长因子(重组人干细胞因子(SCF) 50ng/ml 尧粒系巨系集落刺激因子渊M-CSF) 200 U/ml 尧白细胞介素 -3渊L-3)200 U/ml 遥将培养瓶置 37 益尧% CO₂ 培养箱中培养 3 d 遥 1000r/min 尧min 离心收获细胞遥用含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞袁调整浓度至 1伊0⁶/ml 遥加入多聚季胺 8mg/ml 尧ml 滴度为 3.4伊0⁶ cfu/ml 的病毒液及新鲜的造血因子遥置 37 益尧% CO₂ 培养箱中培养 2 d 遥

1.7 反转录聚合酶链反应渊RT-PCR) 检测病毒感染后造血细胞 H2D^d 基因的转录

根据文献咱咱设计 RT-PCR 引物 5'-TAATGAATTCATGG GGGCGATGGCTCCG-3' 和引物 5'-TATCTCGAGTTATCACACACT TTACAA-3' 袁提取病毒感染后细胞 mRNA 袁参照逆转录试剂盒进行 RT-PCR 袁 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测遥

1.8 流式细胞术检测造血细胞表面 H2D^d 分子

病毒感染后造血细胞与 FITC 标记的抗小鼠 H2D^d 单抗 37 益下孵育 1 h 后袁上流式细胞仪检测细胞表面的 H2D^d 表达遥

2 结果

2.1 重组质粒 pMSCV-H2D^d 的酶切及测序鉴定

根据插入片段上的 EcoR 玉和 Xho 玉位点袁用 EcoR 玉加 Xho 玉双酶切后袁琼脂糖电泳可见 1100bp 大小片段渊图 1) 袁表明目的基因插入载体重组成功遥 pMSCV-H2D^d 经大连宝生物工程公司测序表明袁与文献咱咱报道序列完全相同袁阅读框与设计相符遥

2.2 重组病毒的包装及病毒滴度的测定

用脂质体将 pMSCV-H2D^d 质粒 DNA 转染 PT67 病毒包装细胞袁 4h 后加 500 滋/ml G418 进行选择培养遥 3 d 后细胞开始死亡袁 6 d 后大部分细胞死亡袁袁见

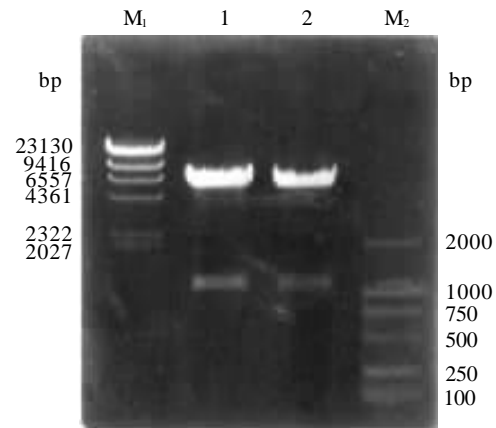


图 1 重组质粒 pMSCV-H2D^d 酶切鉴定

Fig.1 Identification of pMSCV-H2D^d plasmid by EcoR 玉 and Xho 玉

Line M: DL-2000 marker; Line M₂: 姿 Hind 芋 Marker; Line 1, 2: pMSCV-H2D^d plasmid digested by EcoR 玉 and Xho 玉

散在的抗 G418 细胞团袁 周后逐渐形成肉眼可见的抗性细胞克隆遥所得病毒滴度最高可达 3.4伊0⁶ cfu/ml 遥

2.3 病毒感染后 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞 H2D^d 基因转录的检测

转染后 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞 mRNA RT-PCR 扩增产物为 1100bp (图 2) 袁说明其整合了 H2D^d 基因袁且可以转录为 mRNA 遥

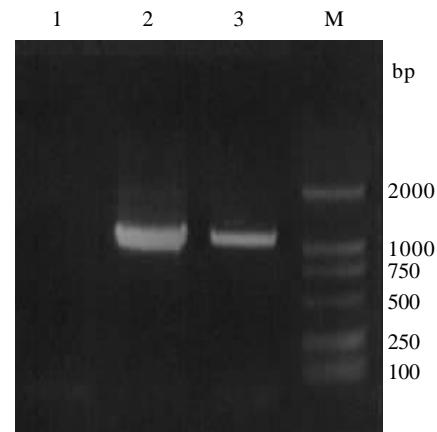


图 2 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the reverse transcriptase-PCR products

Line M: DL-2000 marke; Line 1: C₅₇BL/6 mouse hematopoietic cells infected by blank viral vector; Line 2, 3: C₅₇BL/6 mouse hematopoietic cells infected by reconstructed viral vector

2.4 流式细胞术检测细胞表面 H2D^d 抗原的表达

空载体 pMSCV 转染及未转染的 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞的荧光染色分别为 1.7% 和 1.9% 袁 pMSCV-H2D^d 转染后的 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞荧光染色为 47.2% 渊图 3) 袁说明转染后的 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞细胞膜上有 H2D^d 抗原的表达遥

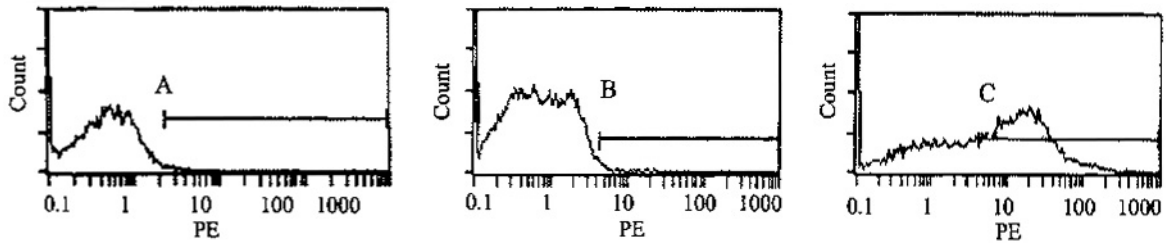


图 3 造血细胞表面 H-2D^d 的表达

Fig.3 Expression of H-2D^d molecule on the surface of hematopoietic cells

A: Non-infected C₅₇BL/6 mouse hematopoietic cells; B: C₅₇BL/6 mouse hematopoietic cells infected by blank viral vector; C: C₅₇BL/6 mouse hematopoietic cells infected by reconstructed viral vector with H-2D^d gene

3 讨论

逆转录病毒载体作为携带外源 DNA 的工具之一因其高效转导和稳定的特性而发展迅速已广泛应用于基因的组织特异性转移尧 DNA 的表达尧 动物实验模型及携带人类基因等多方面的研究遥 但以往的逆转录病毒载体只能把克隆到的基因稳定地整合于有丝分裂相细胞的基因组中尧 对一些增殖能力差的细胞尧 如人的造血细胞尧 胚胎干细胞尧 胚胎癌性细胞等尧 转导效率往往很低尧 这些细胞通常很难建立稳定的表达细胞系遥 本研究组应用的逆转录病毒 MSCV 克服了这些限制尧 MSCV 是一种鼠类的干细胞逆转录病毒尧 MSCV 载体上构建了一段特殊的长末端重复序列 LTR 尧 它来自鼠类的 PVMV 病毒尧 不同于常见的 MoMuLV 病毒的 LTR 序列尧 并经过点突变和缺失修饰尧 能消除干细胞中的转录抑制现象尧 因此能够侵染许多复合功能的细胞遥 同时尧 要提高转染效率尧 必须用多种细胞因子刺激造血细胞增殖遥 已知重组 IL-3 作用于早期祖细胞尧 是促进多向造血祖细胞增殖所必需的生长因子遥 GM-CSF 作用于晚期造血细胞遥 SCF 是一种多系刺激因子尧 直接作用于造血干细胞和多向造血祖细胞尧 促进其增殖尧 同时还与上述造血细胞生长因子具有协同作用遥 本研究组用 IL-3+SCF+ GM-CSF 三种细胞因子可明显刺激造血细胞增殖尧 在骨髓造血细胞加入上述细胞因子 10 d 后检测发现细胞数量明显增加遥 实验结果显示重组逆转录病毒载体转染后的 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞能转录为 mRNA 尧 并在细胞膜上有 H2D^d 抗原的表达尧 提示 H2D^d 基因已稳定地整合进 C₅₇BL/6 小鼠造血细胞的基因组内尧 且在造血细胞中得到稳定表达遥

不少研究观察到袁用逆转录病毒载体构建的重组体被转移到受体细胞后袁有时会在细胞传代 10 代以上后发生不明原因的和无规则性的外源基因或载体的部分丢失尧 往往增加了筛选工作的难度遥 不过袁本研究中细胞传代 15 代后仍未遇到此现象遥

BALB/c 小鼠的 MHC 基因逆转录病毒表达载体的构建成功及其在 C₅₇BL/6 造血细胞中获得表达为进一步研究 MHC I 类分子在移植免疫中的作用奠定了基础遥

参考文献

咱暂 Karger BD, Felgner PL, Gadek TR, et al. Evaluation of procedures for transfection using lipofectin reagent. 咱暂 Focus, 1990, 12(1):25-9.
 咱暂 Lu L, Ge Y, Li ZH, et al. CD34 stem/progenitor cells purified from cryopreserved normal cord blood can be transduced with high efficiency by retroviral vector and expanded ex vivo with stable integration and expression of Fanconi anemia complementation C gene. 咱暂 Cell Transplant, 1995, 4(5):493-503.
 咱暂 Margulies DH, Evens GA, Ozato K, et al. Expression of H-2D^d and H-2L^d mouse major histocompatibility antigens in L cells after DNA-mediated gene transfer. 咱暂 Immunol, 1983, 130(1):463-70.
 咱暂 Hawley RG, Hawley TS, Fong AZ, et al. Thrombopoietic potential and serial repopulating ability of murine hematopoietic stem cells constitutively expressing interleukin 11. 咱暂 Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(19):10297-302.
 咱暂 Keller G, Wall C, Fong AZ, et al. Overexpression of HOX11 leads to the immortalization of embryonic precursors with both primitive and definitive hematopoietic potential. 咱暂 Blood, 1998, 92(3):877-87.
 咱暂 Nienhuis AW, McDomagh KT, Bodine DM, et al. Gene transfer into hematopoietic stem cell. 咱暂 Cancer, 1991, 67(10 Suppl):2700-4.
 咱暂 Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. 咱暂 Pharmacol Ther 1998, 80(1):35-47.