

牛 *Klf4* 基因重组反转录病毒载体的构建 及产毒细胞株的建立

辛晓玲^{1,2}, 吕长荣¹, 陈冬梅¹, 窦忠英^{1*}

(1. 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; 2. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州 450002)

摘要: 为了克隆牛 *Klf4* 基因并构建重组反转录病毒载体, 得到稳定的产毒细胞株, 本研究设计了带有酶切位点的一对引物, 以接触抑制生长状态的 MDBK 细胞为材料, 用 RT-PCR 方法克隆出牛 *Klf4* 基因的开放阅读框序列, 将之插入干细胞反转录病毒载体 pMSCVneo 构成真核表达载体 pMSCV-Klf4; 采用脂质体法将 pMSCV-Klf4 转染包装细胞 PT67, 通过 G418 筛选得到稳定的产毒细胞株, 电镜观察培养液上清中的病毒颗粒, 同时病毒感染 NIH 3T3 细胞测定其病毒滴度。结果表明, 本研究克隆的牛 *Klf4* 基因开放阅读框序列与已发表序列 (NM-001105385) 比对有 99.9% 的高同源性; 构建的重组载体质粒可正常包装, 电镜下可观察到典型的病毒颗粒, 筛选出的产毒细胞株病毒滴度达 7.16×10^7 CFU · mL⁻¹。本研究成功构建的真核表达载体 pMSCV-Klf4 和得到的产毒细胞株, 为进一步开展有关牛 iPS 细胞的研究奠定了基础。

关键词: 牛; *Klf4* 基因; iPS 细胞; 反转录病毒载体

中图分类号: S813.3; Q789

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)12-1636-06

Construction of Recombinant Retroviral Vector with Bovine *Klf4* and Establishment of a Virus Producing Cell Strain

XIN Xiao-ling^{1,2}, LÜ Chang-rong¹, CHEN Dong-mei¹, DOU Zhong-ying^{1*}

(1. 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; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to construct recombinant retroviral vector containing bovine *Klf4* gene cDNA and get a stable virus producing cell strain, the primers with restriction enzyme sites were designed and the ORF (open reading frame) sequence of bovine *Klf4* gene was amplified by RT-PCR from MDBK cells. Subsequently bovine *Klf4* gene cDNA was inserted into the restriction sites of retroviral vector pMSCVneo to construct recombinant retroviral expression vector pMSCV-Klf4. The pMSCV-Klf4 was transfected into packaging cell line (PT67) by LipofectamineTM2000 to gain infectious retroviral particles which can be found under electron microscope. Then NIH 3T3 cells infected with infectious retroviral particles was used to test viral titer. The results showed that the ORF sequence was highly homologous to the published sequence (NM-001105385). RNA from the recombinant retroviral vector pMSCV-Klf4 could be packaged into infectious retroviral particles in PT67 cell line. Then we successfully got a stable virus producing cell strain whose viral titer was up to 7.16×10^7 CFU · mL⁻¹. The recombinant retroviral vector

收稿日期: 2010-03-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30671067); 陕西省重大科技计划 (2006KZ05-G1) 资助

作者简介: 辛晓玲 (1972-), 女, 河南武陟人, 副研究员, 博士生, 主要从事动物胚胎工程方面的研究, E-mail: xinxl726@163.com

* 通讯作者: 窦忠英, 教授, E-mail: douzhongying@china.com

pMSCV- *Klf4* and the stable virus producing cell strain were gained in this study, which would be helpful to the further work about bovine pluripotent stem cells induced by defined factors.

Key words: bovine; *Klf4* gene; iPS cells; retrovirus vector

Klf4(Krüppel-like factor 4, Krüppel 样因子 4)是一种锌指类转录因子,又名肠富集 Krüppel 样因子(gut-enriched Krüppel-like factor, GKLf)^[1]或上皮锌指因子(epithelial zinc finger, EZF)^[2],属于 Krüppel 样因子家族。*Klf4* 羧基端具有 3 个连续的 Cys2/His2 锌指结构,可以与特定 DNA 序列结合,在哺乳动物的多种组织,如 ES 细胞、肺、肠道、皮肤、睾丸、胸腺、角膜、心肌细胞和淋巴细胞中都有该基因的表达。

Klf4 不仅表达部位极其广泛,而且其在细胞内的调节机制也非常复杂,在胚胎发育、组织分化、细胞周期调控和肿瘤发生等许多不同的生理过程中都发挥着重要作用^[3]。对 *Klf4* 的研究最初是从胃肠道开始的,它的表达在生长抑制的状态下明显增高。随着研究的深入,人们认识到 *Klf4* 是一种双功能转录因子,它可以根据细胞环境,通过不同的分子作用机制,选择激活或抑制其靶基因,比如在不同类型的肿瘤中,它既可以作为一种原癌基因,也可作为肿瘤抑制基因。

2006 年, Takahashi 等^[4]发现 *Klf4* 与其它 3 个转录因子(Oct-3/4、Sox2 和 c-Myc)结合,用反转录病毒载体导入小鼠成纤维细胞使之过表达,可将小鼠成纤维细胞转化成类似胚胎干细胞(ES 细胞)的诱导型多能干细胞(iPS cells, induced pluripotent stem cells)。随后,这 4 个因子作为一种经典组合,相继成功诱导人^[5]、猕猴^[6]、大鼠^[7-8]、猪^[9]等物种的体细胞转变为 iPS 细胞,但牛 iPS 细胞的诱导迄今未见报道。本研究拟克隆出牛的 *Klf4* 基因开放阅读框序列,与干细胞反转录病毒载体 pMSCV-neo 共同构建重组真核表达载体,转染包装细胞后筛选出能稳定产生高滴度病毒上清的细胞株,为下一步牛 iPS 细胞研究做部分准备工作。

1 材料与方法

1.1 材料

PT67 细胞、NIH3T3 细胞、大肠杆菌 TG I 和干细胞反转录病毒载体 pMSCV-neo 由本中心保存;胎牛肾上皮细胞系 MDBK 由杨凌绿方生物工程有限公司李健强教授惠赠;pMD18-T 载体、内切酶 *EcoR* I, *Bgl* II, T4 DNA 连接酶, LA *Taq* 聚合酶

(带 GC buffer), DL2000 DNA Marker 和 λ -*EcoRT*14 I digest DNA Marker 购自 TaKaRa (大连)公司;反转录试剂盒购自 Fermentas 公司;DNA 片段回收试剂盒购自 BioDev-tech 公司;质粒抽提试剂盒购自 Vigrous 公司;Trizol 和转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;G418、DMEM 干粉(高糖)与胎牛血清等购自 Gibco 公司。

1.2 牛 *Klf4* 基因的克隆

根据 GenBank 公布的牛 *Klf4* 基因序列(NM-001105385),在其编码区的起始密码子和终止密码子处设计相应的上、下游引物。为了目的基因酶切和插入载体的方便,分别在上、下游引物的 5' 末端引入 *EcoR* I 与 *Bgl* II 的酶切位点,并加入保护碱基。上游引物 b*Klf4*-F 5'- gGAATTCATGGCT-GTCAGCGACGC-3', 下游引物 b*Klf4*-R 5'- ggaAGATCTTTAAAGTGCCTCTTCATGTGTAAG-3', 由上海生工生物技术有限公司合成,其中小写字母为保护碱基,划线部分分别为 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切位点,预期 *Klf4* 基因开放阅读框序列长度为 1 434 bp。

MDBK 为建系的胎牛肾上皮细胞,于 15% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养液、37 °C、5% CO₂ 条件下常规培养,在 MDBK 细胞生长达到接触抑制状态时,收获细胞,用 Trizol 法按说明书步骤提取总 RNA,按照逆转录试剂盒要求的标准条件合成 cDNA 用作 PCR 模板,以 b*Klf4*-F 与 b*Klf4*-R 为引物进行 PCR 反应,反应参数为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环;72 °C 再延伸 10 min。扩增产物于 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶成像仪观察结果。

1.3 T 载体克隆与测序

目的片段经切胶回收纯化,与 pMD18-T 载体连接后,转化感受态菌 TG I, 蓝白斑筛选,挑取白斑少量摇菌,按照质粒抽提试剂盒说明书提取质粒,然后用 *EcoR* I 与 *Bgl* II 双酶切和 *EcoR* I 单酶切鉴定,将鉴定正确的质粒(命名为 pT-*Klf4*)送 TaKaRa (大连)生物公司测序。应用 DNASTAR 软件对所克隆 *Klf4* 基因序列与已公布序列进行同源性分析。

1.4 pMSCV-*Klf4* 的构建与鉴定

将干细胞反转录病毒载体质粒 pMSCVneo 和

pT-Klf4 分别用内切酶 *EcoR* I 与 *Bgl* II 双酶切,于 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶中电泳,切胶回收所需的 DNA 片段;反转录病毒载体 pMSCVneo 片段和 *Klf4* 基因片段,然后将两个 DNA 片段连接,转化感受态大肠杆菌 TG I, $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄筛选培养,挑取大小适中的菌斑,少量摇菌,提取的质粒用 *EcoR* I 与 *Bgl* II 双酶切和 *EcoR* I 单酶切鉴定,再次送 TaKaRa(大连)生物公司测序。测序正确的菌株大量摇菌,提取质粒,即为重组干细胞反转录病毒表达载体阳性质粒,命名为 pMSCV-Klf4(简写 pMK),测定其核酸浓度,备用。

1.5 病毒包装及阳性克隆筛选

包装细胞 PT67 是贴壁生长的成纤维细胞,培养液为含双抗和 15% 胎牛血清的高糖 DMEM,转染前按照 $2 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 接种于 6 孔板,培养 24 h 后用脂质体转染法(按 LipofectamineTM 2000 说明书步骤操作)将 pMK 质粒转染 PT67 包装细胞,转染 24 和 48 h 分别收集病毒上清,用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后可直接用于牛 iPS 细胞诱导。为了筛选稳定的高滴度产毒细胞株,在转染 48 h 收获上清后,按 1 : 10 传代,第 2 天培养液中添加 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 G418 进行筛选,2 周后选取形态良好的细胞克隆,用细胞刮子刮去杂散细

胞,将阳性克隆扩增至一定数量时,及时冷冻保存。在细胞生长到完全融合时收集病毒上清,部分上清 $25\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 超速离心浓缩后,扫描电镜观察病毒颗粒的形态;其余病毒上清按照文献[10]所述方法用 NIH3T3 细胞测定重组病毒滴度,滴度用克隆形成单位(colony forming units, CFU $\cdot \text{mL}^{-1}$)表示。

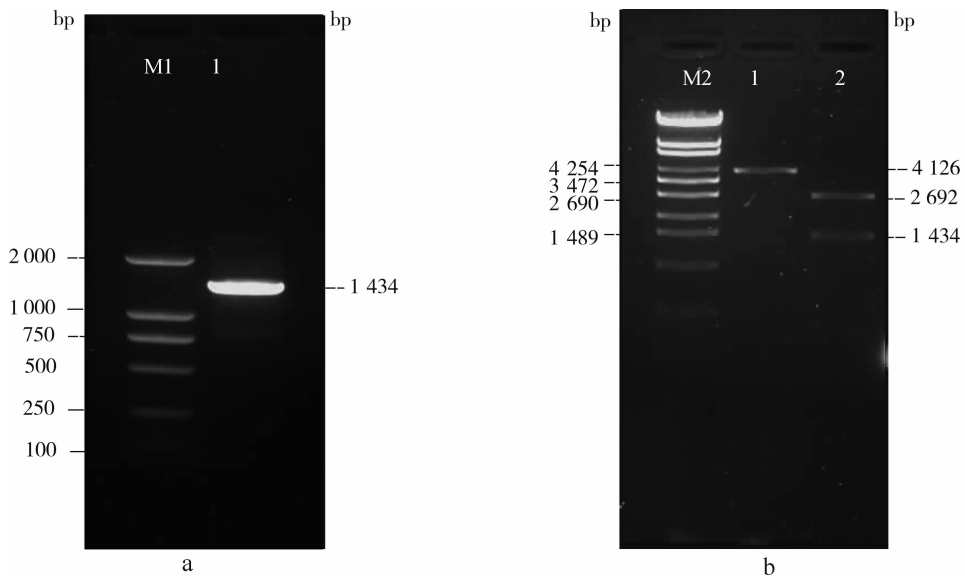
2 结果

2.1 牛 *Klf4* 基因的克隆

用 MDBK 为材料克隆牛 *Klf4* 基因开放阅读框序列,预期 PCR 产物长度应为 1 434 bp。由于牛 *Klf4* 基因序列中 G、C 碱基含量达到 66.3%,所以采用扩增复杂二级结构模板专用的 LA *Taq* 聚合酶(带 GC buffer, TaKaRa 公司)进行 PCR 扩增,得到预期长度的扩增片段(图 1a)。

2.2 重组 pT-Klf4 质粒的酶切鉴定与测序

目的基因 *Klf4* 和 pMD18-T 载体连接后得到 pT-Klf4 质粒,经 *EcoR* I 单酶切得到一条约 4 126 bp 的目的条带,*EcoR* I 与 *Bgl* II 双酶切后显示两条带(图 1b),与预期的 2 692 bp 载体片段和 1 434 bp 基因片段大小相符。



a: M1, DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1, PCR 产物。b: M2, λ -EcoRT14 I; 1, pT-Klf4/*EcoR* I 单酶切; 2, pT-Klf4/*EcoR* I + *Bgl* II 双酶切
 a: M1, DL2000 DNA Marker; 1, PCR production. b: M2, λ -EcoRT14 I digest DNA Marker; 1, pT-Klf4/*EcoR* I; 2, pT-Klf4/*EcoR* I + *Bgl* II

图 1 牛 *Klf4* 基因 PCR 产物电泳图谱(a)和重组质粒 pT-Klf4 的酶切鉴定结果(b)

Fig. 1 Mapping of bovine *Klf4* gene PCR product (a) and digested results of recombinant plasmid pT-Klf4(b)

所克隆的牛 *Klf4* 基因片段测序后,与已发表的牛 *Klf4* 基因序列进行同源性比较分析,发现有 2

个碱基的点突变,其中 655 位 A→G, 677 位 T→C, 核苷酸同源性达 99.9%;该基因序列编码 477 个氨

基酸,对应氨基酸序列也有两处改变,219 位 Lys→Glu,226 位 Leu→Pro,同源性同样为 99.9%。

2.3 pMK 的构建与鉴定

pT-Klf4 质粒和干细胞反转录病毒载体 pMSCVneo 分别双酶切后,将牛 *Klf4* 目的基因片段插入载体得到 pMK 阳性质粒(图 2a),经再次酶切鉴

定, *EcoR* I 单酶切后显示一条 7 934 bp 的条带,用 *EcoR* I 与 *Bgl* II 双酶切则显示 6 500 bp 干细胞反转录病毒载体片段和 1 434 bp 的基因片段(图 2b)。pMK 阳性质粒再次测序,发现其插入基因序列与 pT-Klf4 质粒中的 *Klf4* 基因序列完全吻合。

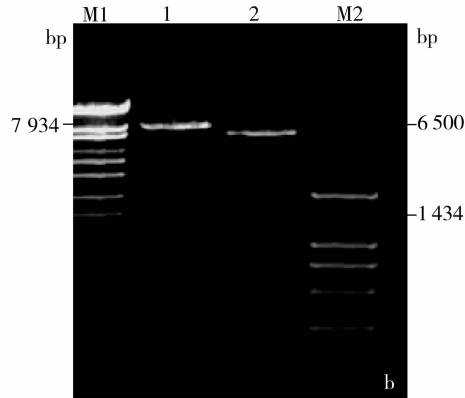
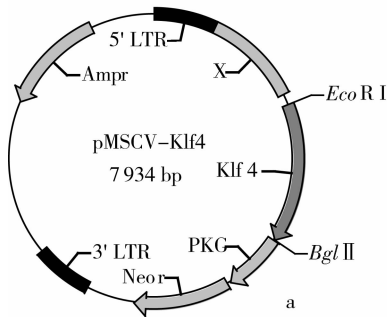


Fig. 2 The structure(a) and the digested results(b) of recombinant plasmid pMK
M1. λ -*EcoRT14* I digest DNA Marker; 1. pMK/*EcoR* I; 2. pMK/*EcoR* I + *Bgl* II; M2. DL2000 DNA Marker

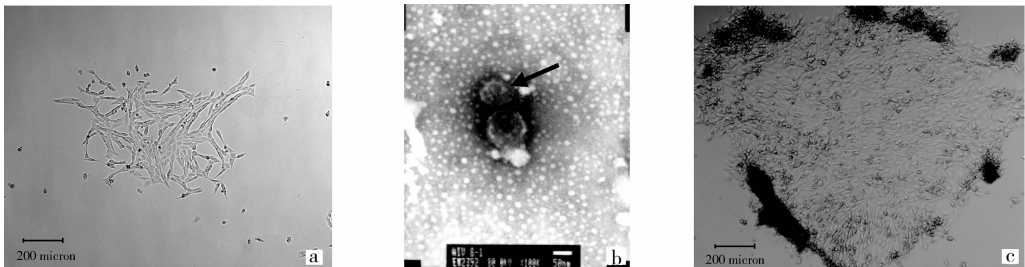
图 2 重组质粒 pMK 结构示意图(a)和其单、双酶切鉴定结果(b)

Fig. 2 The structure(a) and the digested results(b) of recombinant plasmid pMK

2.4 阳性克隆筛选及病毒滴度测定

pMK 质粒转染 PT67 细胞后,经 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ G418 筛选 2 周,选择生长状态良好的阳性克隆细胞片(图 3a),经传代扩增后得到稳定的产毒细胞株;电镜观察超离心后的病毒上清,可以看到典型的干细胞反转录病毒颗粒形态(图 3b)。用病毒上清感

染 NIH3T3 细胞, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ G418 筛选 2 周后,出现细胞克隆的最大稀释度培养孔中的克隆数有 43 个,这些克隆一般边缘卷起(图 3c),呈不规则的圆饼状,与病毒包装细胞筛选后呈发散状的克隆不同,经计算,MSCV-Klf4 病毒滴度为 7.16×10^7 CFU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。



a. PT67 细胞经 G418 筛选 2 周后得到的阳性克隆; b. 重组反转录病毒颗粒 MSCV-Klf4 的扫描电镜图(100 000 \times); c. 病毒感染后的 NIH3T3 细胞经 G418 筛选 2 周后形成的阳性克隆(标尺:a,c 为 200 μm)

a. The positive clones of PT67 cells by G418 selection for two weeks; b. The Scanning electron micrographs of recombinant retroviral granule MSCV-Klf4 (100 000 \times); c. The positive clones of infected NIH3T3 by G418 selection for 2 weeks. Scale bars, 200 μm , (a, c)

图 3 产毒细胞株的建立

Fig. 3 The establishment of cell strain which can packages retrovirus granules

3 讨论

Klf4 基因在哺乳动物的多种组织中广泛表达,

尤其在上皮细胞生长抑制的状态下表达水平明显增高^[2],因此,本研究选用建系的胎牛肾上皮细胞 MDBK 为材料,在其生长达到接触抑制状态时,提取总 RNA,成功克隆出长 1 434 bp 的牛 *Klf4* 基因

开放阅读框序列,与已发表的牛 *Klf4* 基因序列(序列号 NM-001105385)进行同源性比较分析,发现仅有 2 个碱基的点突变,核苷酸同源性达 99.9%。GenBank 中发表的牛 *Klf4* 基因核苷酸序列长 2 398 bp,开放阅读框 1 434 bp,编码一个 477 个氨基酸的蛋白质,其 389 至 474 氨基酸残基处为功能性锌指区域。经过比对,本研究克隆的牛 *Klf4* 基因开放阅读框序列两个点突变位于第 655 和 677 位,对应氨基酸序列的 219 与 226 位氨基酸发生改变,但未处于锌指区域和其它功能区。

反转录病毒载体 pMSCVneo 由小鼠胚胎干细胞病毒和 LN 反转录病毒载体重组构建而来,能感染多种动物和人类各种不同类型的细胞,没有严格的组织特异性,是一种理想的多嗜性反转录病毒载体。本研究将牛 *Klf4* 基因片段插入 pMSCVneo 相应的酶切位点,成功构建了包含有牛 *Klf4* 基因的真核表达载体 pMSCV-Klf4。转染包装细胞 PT67 后,获得的病毒上清用电镜观察,可以看到典型的干细胞反转录病毒颗粒形态,说明载体质粒在包装细胞中能够正常表达。

2006 年, Takahashi 等^[4]首次发现外源性 *Klf4* 与其它 3 个转录因子(Oct4、Sox2 和 c-Myc)结合,可以将小鼠体细胞诱导为 iPS 细胞。Yamanaka 提出一个模型^[11],对 iPS 细胞诱导中 4 个转录因子可能起到的作用提出了假设,他认为 c-Myc 起到打开染色体结构的作用,同时导致细胞的衰老和凋亡,而 *Klf4* 则阻断了细胞衰老和凋亡的过程, Oct4 和 Sox2 协同调控体细胞一系列基因的表达,促使体细胞向 ES 细胞方向发展,最终转变为 iPS 细胞。

最近一项研究发现,*Klf4* 在胚胎干细胞自我更新中的功能是冗余性的,它和 *KLF2*、*KLF5* 的作用可互相补充,如果把 *Klf4*、*KLF2* 和 *KLF5* 一起敲除,会导致胚胎干细胞自发性分化^[12]。用 *KLF2* 代替 *Klf4*^[13]可以诱导小鼠成纤维细胞转变为 iPS 细胞,但重编程效率有所降低。同时,也有研究表明,*Klf4* 在 iPS 细胞诱导过程中并不是不可或缺的,虽然经典的四因子组合有较高的诱导效率,但选用不包含 *Klf4* 在内的其它转录因子组合一样可成功得到 iPS 细胞。比如, Yu 等^[14]用 Nanog 和 LIN28 代替 c-Myc 和 *Klf4* 成功得到人类 iPS 细胞。同样, Jaenisch 等^[15]认为 *Klf4* 只是分子催化剂,只能加速或提高体细胞重编程的效率。显然,目前对 *Klf4* 在胚胎干细胞自我更新和 iPS 细胞中所起的作用还不

是特别清楚,要对 *Klf4* 有一个深刻的理解,还需要研究进一步的研究。

4 结 论

本试验以生长接触抑制的胎牛肾上皮细胞 MDBK 为材料,成功克隆出牛 *Klf4* 基因开放阅读框序列,经测序比对,牛 *Klf4* 基因片段的核苷酸序列和对应的氨基酸序列与发表的牛 *sox2* 基因序列高度同源,将之插入干细胞反转录病毒载体 pM-SCVneo,成功构建重组真核表达载体 pMSCV-Klf4。用 PT67 细胞进行病毒包装,病毒上清中成功观察到典型的干细胞反转录病毒颗粒,病毒滴度达到 7.16×10^7 CFU · mL⁻¹,完全可以满足感染受体细胞的要求,为下一步牛 iPS 细胞的研究打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] SHIELDS J M, CHRISTY R J, YANG V W. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 20009-20017.
- [2] GARRETT S L A, EBERSPAECHER H, SELDIN M F, et al. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 31384-31390.
- [3] JAMES J B. Krüppel-like Factors: Three fingers in many pies[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34355-34358.
- [4] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676.
- [5] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131: 861-872.
- [6] LIU H, ZHU F, YONG J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult Rhesus monkey fibroblasts[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 587-590.
- [7] LIAO J, CUI C H, CHEN S Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 11-15.
- [8] LI W L, WEI W, ZHU S Y, et al. Generation of rat

- and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4:16-19 .
- [9] ESTEBAN M A, XU J Y, YANG J Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from tibetan' miniature pig [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 17634-17640.
- [10] AUSUBEL F M, BRENT R, KINGSTON R E, et al. Short protocols in molecular biology[M]. 4th ed. New York: Joho Wiley & Sons Inc, 1999:353-354.
- [11] YAMANAKA S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 39-49.
- [12] JIANG J M, CHAN Y S, LOH Y H, et al. A core KLF circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 353-360.
- [13] BLELLOCH R, VENERE M, YEN J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3): 245-247.
- [14] YU J Y, VODYANIK M A, SMUGA O K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318: 1917-1920.
- [15] JAENISCH R, YOUNG R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming[J]. *Cell*, 2008, 132: 567-582.

(编辑 郭云雁)