

# c-myb 反义 RNA 重组载体构建及其包装细胞株的建立

马会慧, 姚集鲁, 李 刚, 姚春斓, 陈雪娟, 杨绍基

(中山医科大学附属第三医院传染科, 广东 广州 510630)

**摘要:** 【目的】构建反义 c-myb 重组逆转录病毒载体并建立其包装细胞株。【方法】采用 RT-PCR 方法, 获取目的基因, 通过 TA 克隆方法克隆入 pUC19, 再反向亚克隆入逆转录病毒载体 pDOR 中。采用 DOTAP 法将重组逆转录病毒载体转入包装细胞, 以 NIH3T3 细胞为靶细胞测定产病毒滴度。【结果】序列测定结果与 GenBank 中序列一致。c-myb 基因片段已定向克隆入 pDOR。细胞转染表明, 已形成稳定的包装细胞株 PA317/pDOR-myb, 产病毒滴度达  $5.2 \times 10^4 \sim 9.5 \times 10^4$  CFU/mL。【结论】成功构建了含有反义 c-myb 的重组逆转录病毒质粒, 并建立其包装细胞株。

**关键词:** 肝纤维化; c-myb; RNA, 反义; 克隆, 分子; 转染

**中图分类号:** Q785; R575.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2001)03-0235-03

## Construction of c-myb Antisense RNA Recombinant Retroviral Vector and Establishment of Its Packaging Cell Line PA317

MA Hui-hui, YAO Ji-lu, LI Gang, YAO Chun-lan, CHEN Xue-juan, YANG Shao-ji

(Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To construct the c-myb antisense RNA recombinant retroviral vector and its packaging cell line. 【Methods】The segment of c-myb gene was cloned into pUC19 with TA cloning method after amplification by RT-PCR, and then was subcloned into retroviral vector pDOR. The recombinant retroviral vector named pDOR-myb was transfected into retroviral package cell line PA317 after selection with G418. 【Results】Sequencing data indicated that the c-myb gene was exactly identical to the sequence in the GenBank. The segment of c-myb gene was inserted directionally into pDOR. Resistant colonies were obtained and the titers of pDOR-myb were  $5.2 \times 10^4 \sim 9.5 \times 10^4$  CFU/mL. 【Conclusion】The recombinant retroviral vector containing c-myb gene is successfully constructed and its packaging cell line PA317/pDOR-myb was established.

**Key words:** liver fibrosis; c-myb; RNA, antisense; cloning, molecular; transfection

c-myb 蛋白是一种与细胞转录活性有关的 DNA 结合蛋白, 控制着细胞周期中的 G1/S 转化, 在多种细胞的增殖过程中起重要作用。反向调控 c-myb 基因表达在抗肿瘤细胞增殖, 在动脉粥样硬化过程中抑制动脉平滑肌细胞增殖转化已取得了令人瞩目的研究成果<sup>[1,2]</sup>。肝脏星状细胞的激活在肝纤维化发生、发展过程中处于中心地位<sup>[3]</sup>, c-myb 基因表达在此过程可能起着十分重要的作用。有学者发现, 慢性损伤的肝组织中 c-myb 表达增

多, 且主要在 HSC 中表达, 而在明显肝硬化的肝组织中表达反而减少<sup>[4]</sup>, 提示 c-myb 表达与 HSC 活化可能有关。但有关 c-myb 基因表达在 HSC 激活及肝纤维化发生中作用的研究仍只有零星报道<sup>[5,6]</sup>。为了进一步明确 c-myb 基因表达与 HSC 激活之间的关系, 我们克隆了含反向 c-myb 翻译起始区及 DNA 结合区的 cDNA 片段的重组逆转录病毒载体(pDOR-myb), 并进一步建立其包装细胞株(PA317/pDOR-myb)。

收稿日期: 2000-08-23

基金项目: 广东省科委重点攻关项目(1977)

作者简介: 马会慧(1968-), 女, 江苏连云港人, 博士生。

## 1 材料与方 法

### 1.1 引 物

5'、3'端分别设计了 *Sal*I 和 *Xho*I 酶切位点。序列如下: P1 5' AAGTCGACATGGCCCGGAGACCCCG 3'; P2 5' TACTCGAGTCAGCGACGCATGGT 3'。

### 1.2 组织总 RNA 的提取

SD 雄性大鼠(中山医科大学实验动物中心)大鼠脾脏组织,参照试剂盒(QIAGEN 公司产品)说明书提取 RNA。

### 1.3 第一链 cDNA 的获得

取 1  $\mu$ g RNA,按 RT 试剂盒(MBI 公司)说明进行。

### 1.4 PCR 产物的获取

50  $\mu$ L 反应体系中,分别加入 cDNA 第一链 5  $\mu$ L, 10 $\times$  PCR buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 5  $\mu$ L, P1、P2(北京赛百胜公司合成)各 1  $\mu$ L(浓度 0.1 g/L), *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 94  $^{\circ}$ C 4 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 61  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 6 min。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,切取目的条带,胶回收纯化试剂盒(QIAGEN 公司)纯化。

### 1.5 T 载体的制备及 TA 克隆

pUC19 用 *Sma*I 酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,切取线性片段,胶回收纯化试剂盒纯化。在 50  $\mu$ L 反应体系中,含有 dTTP 2  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 线性质粒模板 1  $\mu$ g, 72  $^{\circ}$ C 3 h, 电泳,回收纯化。20  $\mu$ L 的连接反应体系中分别加入 10 $\times$ 连接 Buffer 2  $\mu$ L, 纯化的 PCR 产物 10  $\mu$ L, T 载体 5  $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 2 U, 12~16  $^{\circ}$ C 16 h。连接产物转化 DH5 $\alpha$  菌株。酶切、克隆、阳性重组子的鉴定及质粒的提取具体方法见参考文献<sup>[7]</sup>。

### 1.6 DNA 序列测定

采用双脱氧链末端终止法,以 DNA 全自动测序仪测定核苷酸序列,同一片段经正反两个方向重复测定。

### 1.7 亚克隆及鉴定

由于 *c-myb* cDNA 819 nt~824 nt 为 *Eco*RI 位点,故 pUC-*myb* 经 *Sal*I、*Eco*RI 双酶切,定向克隆入逆转录病毒载体。阳性重组子经 *Sal*I、*Eco*RI 及 *Sal*I、*Xho*I 双酶切鉴定,质粒纯化采用试剂盒(宝灵曼公司)纯化。

### 1.8 pDOR-*myb* 包装细胞株的建立

以 DO TAP 法将上述纯化的 pDOR-*myb* 转染至逆转录包装 PA317 细胞,以含 400 mg/L G418 的 DMEM 培养基选择 14 d,获 G418 抗性克隆 PA317/pDOR-*myb* 细胞。以 NIH3T3 细胞为靶细胞,在 polynrene 存在条件下测定产病毒滴度。病毒滴度=(克隆数/孔) $\times$ (细胞稀释倍数) $\times$ (病毒悬液量  $\mu$ L)/100。以每毫升克隆形成单位(CFU/mL)表示。

## 2 结 果

### 2.1 *c-myb* cDNA 片段的克隆及测序

从大鼠脾脏提取总 RNA,以 oligo dT 为引物,逆转录获得第一链 cDNA,以此为模板, P1、P2 为引物,PCR 扩增后,获得含 *c-myb* 翻译起始区和 DNA 结合区的 cDNA 片段。琼脂糖电泳可见 1 条约 590 bp 的单一扩增条带,与预期大小一致。回收该片段,插入 pUC19, pUC-*myb* 经 *Sal*I、*Xho*I 双酶切,切出一条约 590 bp 的条带,见图 1。双酶切鉴定正确的重组质粒,经序列测定进一步证实,命名为 pUC-*myb*。测序结果证实与 GenBank 中的 *c-myb* 序列一致。

### 2.2 *c-myb* 反义 RNA 重组病毒质粒的构建及鉴定

pUC-*myb* 经 *Sal*I、*Eco*RI 双酶切,定向克隆入 pDOR 中,获得 pDOR-*myb*,经 *Sal*I、*Eco*RI 双酶切,切出一条约 590 bp 的条带,与目的基因大小一致。见图 1。经鉴定正确的阳性克隆,命名为 pDOR-*myb*。

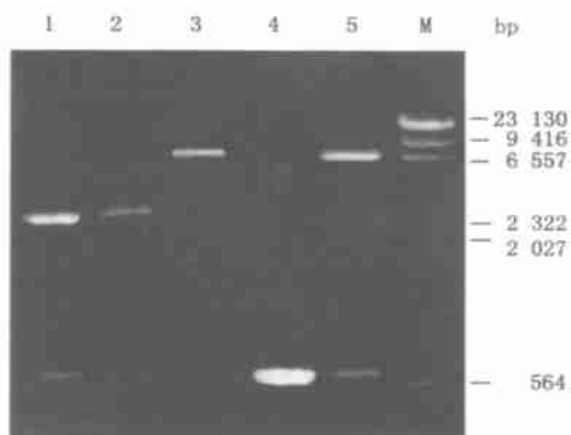


图 1 *c-myb* 重组质粒的限制性内切酶鉴定

Fig. 1 Restrictive enzyme analysis of recombinant plasmids with *c-myb* gene segment

M:  $\lambda$ -DNA/ *Eco*RI + *Hind*III 1. pUC-*myb*/ *Sal*I + *Xho*I; 2. pUC19/ *Eco*RI; 3. pDOR/ *Eco*RI; 4. PCR 产物; 5. pDOR-*myb*/ *Sal*I + *Eco*RI

### 2.3 PA317/pDOR-myb 细胞产病毒滴度的测定

PA317/pDOR-myb 细胞经多次传代、冻存、复苏,在含 G418 的 DMEM 培养基中生长良好。应用 NIH3T3 进行病毒滴度测定,病毒滴度为  $5.2 \times 10^4$  CFU/mL  $\sim 9.5 \times 10^4$  CFU/mL。

## 3 讨论

本实验中采用的 TA 载体克隆方法简单易行,而先将目的基因插入测序载体,有助于更准确了解目的基因两端的序列。采用 DOTAP 阳离子脂质体,具有转染效率高,对细胞损害小等优点。实验结果表明,pDOR-myb 经 DOTAP 方法转染病毒包装细胞后可达到较高的病毒滴度,也说明 pDOR-myb 经 PA317 包装后已形成了具有感染能力的重组逆转录病毒。这有助于进一步研究 c-myb 在 HSC 激活的复杂网络中的作用,探索 HSC 激活的关键环节,最终为研究抗肝纤维化治疗的有效途径打下基础。

#### 参考文献:

[1] Macejak D G, Lin H, Webb S, *et al.* Adenovirus-mediated expression of a ribozyme to c-myb mRNA inhibits

smooth muscle cell proliferation and neointima formation *in vivo* [J]. *J Virology*, 1999, 73(9):7745.

- [2] Moon I J, Lee Y, Kwak C S, *et al.* Target site search and effective inhibition of leukaemic cell growth by a covalently closed multiple anti-sense oligonucleotide to c-myb [J]. *Biochem J*, 2000, 346 (pt 2): 295.
- [3] Friedman S L. The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328 (25): 1828.
- [4] Kitada T, Seki S, Nakatani K, *et al.* Hepatic expression of c-myb in chronic human liver disease [J]. *Hepatology*, 1997, 26(6): 1506.
- [5] Buck M, Kim D J, Houghlum K, *et al.* C-myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278(2): G321.
- [6] Lee K S, Buck M, Houghlum K, *et al.* Activation of hepatic stellate cells by TGF $\alpha$  and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(5): 2461.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 16~69.

(编辑 黄小延)

(上接第 186 页)

闭 CDK 激酶活性而中止细胞周期,最终达到抑制肿瘤的作用<sup>[7]</sup>。本实验显示复发癌阳性表达率及高表达率均明显低于原发癌,说明 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白不表达或低表达有利于鼻咽癌复发。进一步分析不同复发间期患者该蛋白在复发癌与原发癌之间的表达状况,两组复发癌 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白表达水平均明显低于原发癌,尤其是在较短期复发组 (< 34 个月),复发癌的 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白阴性表达率更高达 60%,从另一角度提示该蛋白有抑癌作用。因此,当 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白水平阴性或低下时鼻咽癌较易复发。

我们的研究结果显示 p53 等 4 个调节因子的阳性表达率无论是原发癌或复发癌均在 50% 以上,再次证明这些调节因子在鼻咽癌发生中的重要作用;同时还提示它们可能在鼻咽癌复发中发挥作用。

#### 参考文献:

[1] 李锦添,云径平,萧振德,等. p21<sup>ras</sup> 和 p53 蛋白在鼻咽癌发生过程的表达和意义 [J]. *癌症*, 1997, 16(增刊):

[2] 李锦添,龙江斌,梁启万,等. 鼻咽癌 p53 蛋白表达与 p53 基因结构改变及 MDM<sub>2</sub> 蛋白表达的关系和意义 [J]. *癌症*, 1999, 18(2): 176.

[3] Carcangiu M L, Chambers J T, Voynick I M, *et al.* Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part 1: Clinical and histological correlations [J]. *Am J Clin Pathol*, 1990, 94(3): 247.

[4] Zauberman A, Flusberg D, Haupt Y, *et al.* A functional responsive p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(14): 2584.

[5] Lane D P. Exploiting the p53 Pathway for cancer diagnosis and therapy [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(suppl 1): 1.

[6] Bos J L. p21<sup>ras</sup>: An oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction [J]. *Eur J Cancer*, 1995, 31A(7-8): 1051.

[7] 粟厚仪,梁立治. 细胞周期调控基因 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 与肿瘤 [J]. *国外医学肿瘤学分册*, 1998, 25(6): 323.

(编辑 黄小延)