

# Pokemon 表达慢病毒载体的构建及鉴定

祖旭宇, 刘文, 谭晶晶

(南华大学附属第一医院临床医学研究所, 湖南 衡阳 421001)

**摘要:** **目的** 构建 Pokemon 表达慢病毒载体。 **方法** 通过 PCR 扩增 Pokemon cDNA, 将 Pokemon cDNA 连接于 GV165 载体, 经测序确认后, 将 GV165/Pokemon 与 pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 共转染至 293T 细胞中, 收获病毒, 通过 Real time PCR 测定滴度; 将 Pokemon 表达慢病毒载体感染 293T 细胞通过免疫荧光和 Western blot 检测 Pokemon 表达慢病毒载体的转染效率和 Pokemon 的表达能力。 **结果** 在感染 Pokemon 慢病毒载体 293T 细胞中能检查到 Pokemon-GFP 融合蛋白的表达。 **结论** 成功构建表达 Pokemon 的慢病毒载体。

**关键词:** Pokemon; 慢病毒载体; 基因治疗; 293T 细胞

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A

## Establishment and Identification of Lentivirus with Pokemon Expression

ZU Xuyu, LIU Wen, TAN Jingjing

(Institute of Clinical Medicine, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To obtain Lentivirus with Pokemon expression. **Methods** Pokemon cDNA was obtained from cDNA pool by RT-PCR, and the Pokemon cDNA was ligated with GV165 vector; the GV165/Pokemon plasmid confirmed by sequencing was cotransfected with pHelper 1.0 and pHelper 2.0 into 293T cells to obtain Pokemon Lentivirus; titer of Lentivirus with Pokemon expression was assessed by Real Time PCR; the infection efficiency of Pokemon Lentivirus in 293T cells was monitored by using immuno-microscope and the expression of Pokemon was detected by Western blot in Pokemon Lentivirus infected 293T cells. **Results** Pokemon Lentivirus could express Pokemon in 293T cells. **Conclusion** Lentivirus with the expression of Pokemon was successfully established.

**Key words:** Pokemon; Lentivirus; Gene therapy; 293T cell

Pokemon (又称 FBI-1<sup>[1]</sup>、OCZF<sup>[2]</sup>、LRF<sup>[3]</sup> 和 Pokemon<sup>[4]</sup>), 由 ZBTB7 基因编码<sup>[4]</sup>, 属于 POK (POZ 和 Krüppel) 蛋白家族, 它最初被鉴定为一种能够特异性结合 HIV-1 型启动子元素的蛋白质<sup>[1]</sup>。随后一系列的研究发现在破骨细胞形成的早期阶段 Pokemon 是 PLZF (早幼粒细胞白血病锌指) 的一种同系物<sup>[2]</sup>。尽管它与 PLZF 有很高的同源性, 但是 Pokemon 与 PLZF 没有关联, 而与另一种 POK 家族,

LAZ-3/BCL-6 有关联<sup>[3]</sup>。Pokemon 是一种致癌基因, 与脂肪的形成, 骨生成和肿瘤的发生有关。Pokemon 在氨基酸的 N 末端包含了一个 POZ/BTB 结构域且在 C 末端包含了 4 个 Krüppel-type C2H2 锌指结构<sup>[4]</sup>。POZ/BTB 结构域可介导同源二聚化和异源二聚化, 并可招募抑制因子和 HDAC (组蛋白去乙酰化酶) 复合物调控相关基因的表达, 而 C2H2 锌指结构主要负责介导该蛋白与 DNA 识别和连接<sup>[5]</sup>。Pokemon 是一种促肿瘤蛋白, 在肺癌、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCLs)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、肝癌、滤泡性淋巴瘤和乳腺癌中呈过表达<sup>[4,6-8]</sup>。本研究将构建表达 Pokemon 的慢病毒载体, 为阐明 Pokemon 在乳腺肿瘤发生的作用及进一步的基因治疗提供有效生物学工具。

收稿日期: 2013-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81272355)、湖南省自然科学基金 (11JJ4068) 和湖南省教育厅青年项目 (12B108)。

作者简介: 祖旭宇, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 乳腺癌侵袭转移机制, E-mail: zuxuyu0108@hotmail.com.

# 1 材料与方法

## 1.1 细胞培养

293T 由 DMEM 培养(Hyclone, UT)维持。培养基中均含 10% 小牛血清(四季青)、2 mmol/L glutamine 和 100 U 青霉素。细胞在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下进行培养。

## 1.2 Pokemon 过表达质粒载体构建

由 293T 细胞获得总 RNA, 经 RT-PCR 获得 Pokemon cDNA, 引物序列如下: Pokemon-P1: 5' - GAGGATCCCCGGGTACCGTCCGCCACCATGGCCGGCGGCGTGGAC - 3'; Pokemon-P2: 5' - TCACCATGCTGGCGACCGGGGCGAGTCCGGCTGTGAAGT - 3' (捷瑞生物合成)。Pokemon cDNA 经酶切后与 GV165 载体(上海吉凯基因化学技术有限公司)连接。取 5 μL 连接产物转化 Top10 感受态大肠杆菌, 铺琼脂平板(含 50 μg/mL 卡那霉素), 37 °C 过夜培养。次日挑取单菌落, 经小量扩增, 提取质粒并纯化后送美季生物技术公司测序鉴定。

## 1.3 Pokemon 过表达慢病毒在 293T 细胞内的包装

将 Pokemon 过表达慢病毒表达载体质粒和 pHelper 1.0 与 pHelper 2.0 通过阳离子脂质体 LipofectamineTM2000 (Invitrogen 公司)介导的方法共转染入病毒包装细胞 293T 中, 细胞置于 CO<sub>2</sub> 孵箱内, 37 °C 孵育过夜后改换 DMEM 完全培养基(含丙酮酸钠和非必需氨基酸)继续培养, 72 h 后收集细胞培养基, 4 °C 3 000 r/min 离心 15 min, 去除沉淀, 收获含有假病毒颗粒的上清液分装后, -80 °C 冻存备用。

## 1.4 Real time 定量 PCR 法测定病毒滴度

检测前一天, 每个 24 孔中加 1 × 10<sup>5</sup> 个 293 T 细胞, 体积为 500 μL。次日, 准备 7 个无菌 Ep 管, 在每个管中加入 90 μL 培养基(DMEM + 10% FBS); 将待测定病毒原液 10 μL 加入到第一个管中, 混匀后, 取 10 μL 加入到第二个管中, 继续相同操作直到最后一管。选取所需细胞孔, 吸去 90 μL 培养基, 加入稀释好病毒溶液将细胞放入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 24 h 后, 加入新鲜培养基 500 μL; 继续培养 24 h 后抽提 RNA 进行 RT-qPCR 检查细胞中目的基因的拷贝数。Real time 定量 PCR 目的基因引物序列如下: GFP1: 5' - TGCTTCAGCCGCTACCC - 3'; GFP2: 5' - AGTTCACCTTGATGCCGTTT - 3'。内参引物序列如下: Actin1: 5' - GTGGACATCCG-

CAAAGAC - 3'; Actin2: 5' - AAAGGGTGTAAACG-CAACTA - 3'。反应结束后得到 Ct 值(C: Cycle, t: threshold, Ct: 每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数)。

## 1.5 Western blot 分析

293T 细胞经 Pokemon 表达慢病毒感染后 72 h, 将 MCF-7 细胞于裂解液(10 mol/L HEPES, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 0.1% NP-40, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF 和 0.5 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)中置冰上 30 min 制备细胞抽提物。30 μg 可溶性蛋白于 12% SDS-PAGE 胶分离, 然后蛋白在 260 mA 下经 2 h 转移至纤维膜。膜由 5% 牛奶在室温下封闭 45 min 后, 孵育 GFP 一抗(1:500)1 h, 而后孵育羊抗兔 IgG(1:2 000)1 h。抗体结合由化学荧光系统(Pierce, IL)检测。

# 2 结 果

## 2.1 成功构建 Pokemon 过表达载体

成功构建出了 Pokemon 载体, 并通过基因测序验证其正确性(图 1)。结果显示: 针对 Pokemon 序列成功地插入到 GV165 载体的预计位点, 所获得的序列与实验设计的碱基序列一致。

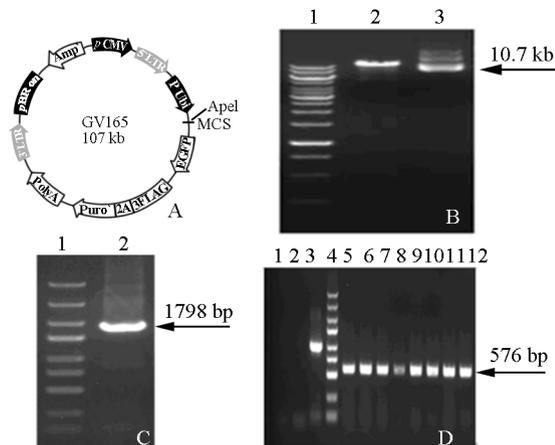


图 1 Pokemon 表达慢病毒载体构建图 A: 载体信息; B: 载体酶切电泳图。1: Marker; 2: 载体酶切产物; 3: 未酶切载体; C: 目的基因片段 PCR 电泳图。1: Marker; 2: PCR 产物; D: 重组质粒构建 PCR 鉴定电泳图。1: 阴性对照; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照; 4: Marker; 5-12: Pokemon1-8 号转化子

## 2.2 获得高滴度 Pokemon 慢病毒载体

为获得能表达 Pokemon 的慢病毒载体, 病毒包

装质粒混合物和 GV165/Pokemon 重组质粒载体通过脂质体共转染 293 T 宿主细胞,转染后 48 h 收集培养基。对收集的培养基进行病毒滴度测定,结果发现  $10^{-4}$  L 组和 Con 组样品的 Ct 值存在 2 个左右差异,所以认为在  $10^{-4}$  L 组样品中存在病毒颗粒。假定该组样品含有至少 1 个病毒颗粒,则病毒的滴度为  $2.0 \times 10^8$  TU/mL(图 2,表 1)。

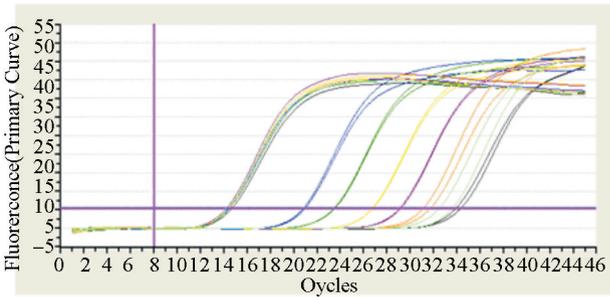


图 2 病毒滴度检测

表 1 不同浓度病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量分析

样品组	Ct Actin	Ct Target gene	Ct Target gene 均值	$\Delta$ Ct	$\Delta$ Ct Con - $\Delta$ Ct 样品组
CON	14.48	34.62	34.315	19.835	0.000
		34.01			
$1 \mu\text{L}$	14.17	20.82	20.815	6.645	13.190
		20.81			
$10^{-1} \mu\text{L}$	14.21	23.67	23.655	9.445	10.390
		23.64			
$10^{-2} \mu\text{L}$	14.25	26.8	26.78	12.530	7.305
		26.76			
$10^{-3} \mu\text{L}$	14.13	29.19	29.17	15.040	4.795
		29.15			
$10^{-4} \mu\text{L}$	14.14	31.87	31.62	17.480	2.355
		31.37			
$10^{-5} \mu\text{L}$	14.22	33.71	33.135	18.915	0.920
		32.56			

Ct Actin: Actin 循环数; Ct Target gene: 靶基因循环数; Ct Target gene 均值: 两次实验靶基因循环数的均值;  $\Delta$ Ct: Ct Target gene 均值 - Ct Actin 即两次实验靶基因循环数的均值与 Actin 循环数的差值;  $\Delta$ Ct Con -  $\Delta$ Ct 样品组: 实验组中靶基因的拷贝数

### 2.3 Pokemon 慢病毒载体能在 293 T 细胞内表达

为确认 Pokemon 慢病毒是否可以在细胞内表达,选用 Pokemon 具有较低内源性表达的 293T 细胞作为病毒感染模型。细胞经病毒感染 72 h 后,用荧光显微镜观察 293T 细胞中病毒的感染效率,结果表明病毒感染效率超过 80% (图 3)。提取总蛋白,通过 Western blot 检测细胞内 Pokemon - GFP 融合蛋白的表达,结果表明 Pokemon - GFP 在 293T 细胞

中具有表达(图 4)。

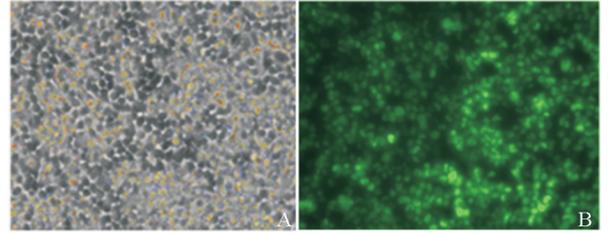


图 3 Pokemon 表达慢病毒载体感染 293T 细胞图 A: 正常光镜下放大 200 倍; B: 荧光镜下放大 200 倍

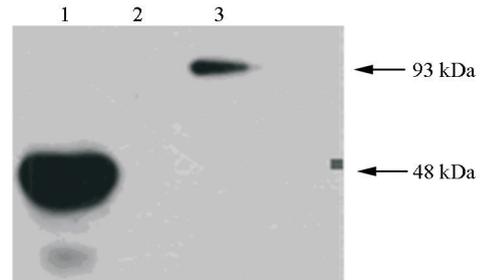


图 4 Pokemon 表达慢病毒载体在 293T 细胞中表达 Pokemon-GFP 融合蛋白 1: 阳性对照, WB 标准品——SURVIVIN-3FLAG-GFP; 2: 阴性对照, 293T 细胞; 3: Pokemon 表达慢病毒感染 293T 细胞

## 3 讨论

Pokemon 作为重要的转录调控因子参与多种生命活动,近年的研究发现其在多种肿瘤的发生发展中起到重要作用, Pokemon 在肿瘤中的高表达是对患者不良预后的一个重要指标<sup>[9]</sup>。近年来,人们对 Pokemon 与乳腺癌发生发展的关系开展了系列相关研究。乳腺癌组织 Pokemon 表达显著高于癌旁乳腺组织,乳腺癌组织中 Pokemon 的高表达可能在乳腺癌发生中起重要作用且与腋窝淋巴结转移相关<sup>[4,10]</sup>,此外研究还证实 Pokemon 和 MDM2 蛋白的表达与乳腺癌腋窝淋巴结转移相关<sup>[8,11]</sup>。本研究也表明 Pokemon 可以通过上调 Survivin 的表达促进乳腺癌的发生,组织芯片结果揭示 Pokemon 的表达与乳腺癌腋窝淋巴结转移呈正相关,与患者的 5 年生存期呈负相关<sup>[10]</sup>。这些研究数据证实 Pokemon 参与乳腺癌的发生发展过程,并与乳腺癌腋窝淋巴结转移有关。这提示 Pokemon 可作为一个有前景的乳腺癌治疗靶点,但 Pokemon 是通过何种机制参与乳

腺癌发生发展及转移过程还有待进一步阐明。

原癌基因活化、抑癌基因失活是肿瘤发生分子机制中最常见、最重要的原因。POK 红系髓性致癌因子 (POK erythroid myeloid ontogenic factor, Pokemon) 是 2005 年由 Maeda 等<sup>[4]</sup>证实的一个特殊原癌基因,其编码蛋白不仅具有一般癌基因产物的特性,能使恶变细胞获得抗老化和抗死亡的能力;更重要的是, Pokemon 还能调控其他癌基因或抑癌基因的活性,因此被认为在肿瘤的发生、发展过程中具有至关重要的作用<sup>[12]</sup>。也正因为如此, Pokemon 有望成为肿瘤基因治疗的一个有效靶标。

近年来,慢病毒载体在基因治疗、转基因动物等研究中越来越引起人们的关注,慢病毒载体可来源于多个物种,如人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV - 1)、2 型 (HIV - 2),猴免疫缺陷病毒 (SIV),马传染性贫血病毒 (EIAV),猪免疫缺陷病毒 (FIV),公山羊关节炎脑炎病毒 (CEAV) 以及牛免疫缺陷病毒 (BIV) 等,目前常用慢病毒载体主要是 HIV 和 FIV。慢病毒载体是以慢病毒基因组作为骨架,除去其复制所需的基因并替代以治疗性基因构建而成,具有转移基因片段容量大,无毒性且不易诱发宿主免疫反应,安全性较好,不仅能感染分裂细胞,且能转染终末分化细胞和非分裂细胞,可整合于靶细胞基因组,目的基因能够长期稳定性表达等特点<sup>[13-14]</sup>。基于以上特点,慢病毒载体已成为当前基因转移载体研究的热点,并广泛应用于肿瘤治疗、神经系统疾病的治疗、新药物的研发以及转基因动物模型的建立等多个领域。

本研究通过选择猪免疫缺陷病毒 (FIV) 作为载体以期获得表达 POKEMON 基因的慢病毒载体系统。本实验成功构建并获得了较高滴度 FIV/POKEMON 重组病毒,并证实在 239T 细胞中该重组病毒可成功表达 Pokemon - GFP 融合蛋白,由于该病毒载体具有 GFP 和 Puromycin 抗性筛选标记,FIV/Pokemon 重组病毒可进一步用于动物和细胞模型的建立。FIV/Pokemon 重组病毒的获得为进一步构建稳定性表达 Pokemon 乳腺癌细胞株和获得 Pokemon 转基因动物模型奠定了基础,同时也为深入探索 Pokemon 乳腺癌发生发展及转移过程中的作用机制提供了强有力的生物学工具。

#### 参考文献:

[1] Pessler F, Pendergrast PS, Hernandez N. Purification and characterization of FBI-1, a cellular factor that binds to

the human immunodeficiency virus type 1 inducer of short transcripts [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(7):3786-3798.

- [2] Kukita A, Kukita T, Ouchida M, et al. Osteoclast-derived zinc finger (OCZF) protein with POZ domain, a possible transcriptional repressor, is involved in osteoclastogenesis [J]. *Blood*, 1999, 94(6):1987-1997.
- [3] Davies JM, Hawe N, Kabarowski J, et al. Novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, LRF, is a potential target of the LAZ-3/BCL-6 oncogene [J]. *Oncogene*, 1999, 18(2):365-375.
- [4] Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression [J]. *Nature*, 2005, 433(7023):278-285.
- [5] Melnick A, Carlile G, Ahmad KF, et al. Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(6):1804-1818.
- [6] Wei CL, Wu Q, Vega VB, et al. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome [J]. *Cell*, 2006, 124(1):207-219.
- [7] Apostolopoulou K, Pateras IS, Evangelou K, et al. Gene amplification is a relatively frequent event leading to ZBTB7A (Pokemon) overexpression in non-small cell lung cancer [J]. *J Pathol*, 2007, 213(3):294-302.
- [8] Aggarwal A, Hunter WJ 3rd, Aggarwal H, et al. Expression of leukemia/lymphoma-related factor (LRF/POKEMON) in human breast carcinoma and other cancers [J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 89(2):140-148.
- [9] 崔明,徐海,杨彦. Pokemon 蛋白在乳腺癌中的表达及意义 [J]. *临床外科杂志*, 2007, 15(6):399-401.
- [10] Zu X, Ma J, Liu H, et al. Pro-oncogene Pokemon promotes breast cancer progression by upregulating survivin expression [J]. *Breast Cancer Research*, 2011, 13(2):R26.
- [11] 刘海峰,曲宏岩. Pokemon,mdm2 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2008, 42(6):601-604.
- [12] 蔡思,于永春. 特殊的原癌基因 Pokemon [J]. *国际外科学杂志*, 2006, 33(6):464-467.
- [13] Ringpis GE, Shimizu S, Arokium H, et al. Engineering HIV-1-Resistant T-Cells from Short-Hairpin RNA-Expressing Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Humanized BLT Mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e53492.
- [14] Ellis S, Fong-Wong L, Iqbal S, et al. Assessment of Integration-defective HIV-1 and EIAV Vectors In Vitro and In Vivo [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2012, 1(12):e60.