

秀丽隐杆线虫 NDX-4 蛋白的体外表达及酶学活性研究

郭 娇 徐新民 干 伟 史 飞 钱建畅 周晓阳 蔡剑平

摘 要 **目的** 构建秀丽隐杆线虫 NDX-4 基因的克隆载体和表达载体,诱导 NDX-4 蛋白表达,研究 NDX-4 的体外酶学活性。**方法** 构建 NDX-4 的克隆载体,将 NDX-4 的开放阅读框架(ORF)插入 PGEM-T 载体中扩增;采用双酶切将 NDX-4 ORF 连入表达载体 pET-30a(+)中;将连接质粒转入 BL21(DE3)感受态细胞后,用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)对 NDX-4 蛋白进行表达诱导,并进行树脂纯化;用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测以评价 NDX-4 体外表达和纯化的质量;采用高效液相色谱-紫外检测技术(HPLC-UV)检测 NDX-4 蛋白水解 8-oxodGTP 和 8-oxoGTP 的活性。**结果** SDS-PAGE 和 Western blot 检测均在经 IPTG 诱导的蛋白提纯物泳道上出现单一条带,分子质量约为 24kDa,而未诱导的和空载体均未见条带。HPLC-UV 检测结果显示加入 NDX-4 蛋白的 8-oxodGTP 和 8-oxoGTP 均被水解为相应的单磷酸和二磷酸氧化核苷,并且随着蛋白量的增加,两种产物的量逐渐增多。**结论** 秀丽隐杆线虫的 NDX-4 蛋白具有水解 8-oxodGTP 和 8-oxoGTP 的双重功能,可能对抑制 DNA 和 RNA 的氧化损伤具有重要意义。

关键词 NDX-4 HPLC-UV 8-oxodGTP 8-oxoGTP 酶活性

[中图分类号] R38 [文献标识码] A

Expression and Purification in vitro of NDX-4 Protein in *C. elegans* and its Enzymatic Activity Assay. Guo Jiao, Xu Xinmin, Gan Wei, et al. Graduate School, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, National Center for Clinical Laboratories, Beijing 100730, China

Abstract Objective To express and purify NDX-4 protein by constructing NDX-4 clone vector and expression vector, and to study its enzyme activity. **Methods** We constructed NDX-4 clone vector by inserting NDX-4 ORF into PGEM-T vector and inserted NDX-4 ORF into pET-30a(+) by the method of double digestion. IPTG was used to induce the expression of NDX-4 and carried out resin purification. After SDS-PAGE of purified protein, we performed Coomassie blue staining and Western blot to determine the quality of NDX-4 expression in vitro. We detected its hydrolytic activity of 8-oxodGTP and 8-oxoGTP by HPLC-UV technology. **Results** Coomassie blue staining and Western blot showed a single protein band after IPTG induction and its size was about 24KD. Analysis of HPLC-UV showed that both 8-oxodGTP and 8-oxoGTP were converted into corresponding disphosphate- and monophosphate-form. Moreover, with the increasing of NDX-4 protein, the two hydrolysis products were increased also. **Conclusion** NDX-4 protein in *C. elegans* has the ability to hydrolyze 8-oxodGTP, as well as 8-oxoGTP, which may be significant to inhibit the oxidative damage of DNA and RNA.

Key words NDX-4; HPLC-UV; 8-oxodGTP; 8-oxoGTP; Enzymatic activity

生物体细胞在正常代谢过程中,或在电离辐射以及各种化学物质的作用下都能产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),ROS 会造成细胞内蛋白质、脂质和核酸的氧化损伤^[1]。在暴露于氧化剂的 DNA 中目前已发现了超过 20 种的碱基氧化损伤产物,其中由于 8-oxo-dG 具有潜在的诱变特性,是迄今为止

研究最多的 DNA 氧化损伤产物^[2,3]。目前的研究表明,生物体细胞中拥有完善的核酸氧化修复机制,大肠杆菌的 MutT 蛋白具有将 8-oxodGTP 和 8-oxodGDP 水解为 8-oxodGMP 的能力,从而阻止 8-oxodGTP 在 DNA 复制时掺入 DNA^[4]。另一方面,MutT 蛋白在 RNA 转录时还能通过降解 8-oxoGTP 以及 8-oxoGDP,阻止 8-oxo-G 在 RNA 转录时掺入到 RNA 中^[5,6]。因此,MutT 蛋白在保证 DNA 复制的精确性和防止转录突变的发生中发挥着重要的作用^[6]。

最近,Arczewska 等^[5]的研究表明,秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)的 NDX-4 蛋白具有水解 8-oxo-dGTP

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171028)

作者单位:100730 北京协和医学院研究生院、卫生部北京医院、卫生部临床检验中心(郭娇);首都医科大学附属北京地坛医院检验科(徐新民);卫生部北京医院、卫生部北京老年医学研究所、卫生部老年医学重点实验室(干伟、史飞、钱建畅、周晓阳、蔡剑平)

通讯作者:蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com

的蛋白酶活性,能有效地将 8-oxodGTP 水解为 8-oxodGDP 和 8-oxodGMP^[2]。为了研究 NDX-4 的抗核酸氧化酶学活性,本研究利用分子克隆技术对 NDX-4 蛋白进行了体外表达,并用 HPLC-UV 技术对 NDX-4 蛋白水解 8-oxodGTP 和 8-oxoGTP 的体外酶学活性分别进行了分析,笔者的研究表明,秀丽隐杆线虫的 NDX-4 蛋白同时具有水解 8-oxodGTP 和 8-oxoGTP 的酶学活性,提示 NDX-4 蛋白对抑制 DNA 和 RNA 的氧化损伤具有重要意义。

材料与方法

1. 材料:(1)主要试剂:Taq DNA 聚合酶、dNTP Mix、DNA 相对分子质量梯度标准 Marker、EcoR I、Bgl II、2 × solution I 等(日本 TaKaRa 公司);E. Z. N. A. 胶回收试剂盒、Plamid mini kit(美国 Omega Biotek 公司);IPTG(日本 Wako 公司);BCA 蛋白定量试剂盒、Super Signal West Pico Trial Kit(美国 Pierce 公司);蛋白提取试剂盒 Bug Bustrmaster Mix、Ni-NTA His·Bind 树脂、空色谱柱、Ni-NTA 缓冲液试剂盒(美国 MERCK MILLIPORE 公司);鼠抗组氨酸标签单克隆抗体(英国 Abcam 公司);羊抗鼠辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);8-oxoGTP(美国 Dlink 公司);8-oxodGTP(德国 Jena 公司)。(2)主要仪器和耗材:普通 PCR 仪(美国 AB 公司);电泳仪及水平电泳槽(北京市六一仪器厂);半干转膜仪(美国 Biorad 公司);Waterse2695 高效液相色谱仪、Waters 2489 紫外检测器(美国 Waters 公司);分光光度计(德国 Eppendorf 公司);Beckman 22R 型台式低温高速离心机(美国 Beckman 公司)。所用常规耗材均购自 Axygen 公司。(3)引物合成:针对 NDX-4 ORF 的两条引物由 Invitrogen 公司合成,上游引物为 5'-GTATGAGATCTGATGGTCG-TAAAGCCGC-3',下游引物为 5'-GCCGCGAATTCTTAAATCCGGCCAAAA-3'。(4)XL-Blue 为含 NDX-4 ORF 质粒的菌体,为实验室之前保存菌株。

2. 方法:(1)NDX-4 表达载体的构建:将 XL-Blue 菌株接种到 LB 培养基(含卡那霉素 Kan+, 50 μg/ml)中扩大培养,抽提含 NDX-4 ORF 的质粒 pDONR-21。用合成的一对含两个限制性酶切位点的引物对上述抽提质粒进行扩增,将得到的 PCR 产物纯化回收后连入 pGEM-T 载体中,筛选阳性克隆送北京博迈德生物技术公司测序。用 EcoR I 和 Bgl II 对测序正确的质粒进行酶切,条件为:10 × Buffer H 5 μl, EcoR I 2 μl, Bgl II 2 μl, 质粒约 6 μg, 补充去离子水至 50 μl; 37℃, 5h 进行酶切;按照胶回收试剂盒说明回收目的 PCR 产物并验证。使用 EcoR I 和 Bgl II 对表达载体 pET-30a(+) 进行酶切,条件为:10 × Buffer H 5 μl, EcoR I 2 μl, Bgl II 2 μl, 质粒约 900 ng, 补充去离子水至 50 μl; 37℃, 5h 进行酶切;将酶切后产物与 NCP(产物纯化溶液)以 1:1 的比例混合(50 μl + 50 μl),将所有溶液加到核酸吸附柱(切胶回收柱)上,离心去掉洗脱液后,加 DNA wash buffer 洗涤两次,加水洗脱并验证。

将上述的 PCR 产物与酶切载体在 16℃ 进行连接,转入 BL21(DE3)后涂至含 Kan+ 的 LB 平板并进行克隆筛选,将阳性克隆进行扩大培养并抽提质粒送至公司测序。用 Seqman 及 Chromas 软件对测序结果进行比对,保留克隆序列完全正确的质粒和单菌落。(2)NDX-4 蛋白的诱导表达:将 NDX-4 序列完全正确的阳性克隆及空载体 pET30a 分别接种于含 30 mg/ml 卡那霉素的 3 ml 液体 LB 培养基中, 37℃, 260 r/min 旋转过夜培养。两者均按照 1:100 的比例将过夜培养物转接于 200 ml 抗生素的液体 LB 培养基中, 37℃, 260 r/min 旋转培养 2 h, 至 OD₆₀₀ = 0.8。取 100 ml 培养物作为未诱导阴性对照,另 100 ml 中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 常温(23℃), 200 r/min 旋转培养,诱导 3 h 后取出,收集菌体沉淀,用蛋白提取试剂盒 Bug Buster Master Mix 提取蛋白。(3)蛋白抽提及纯化:按照 Bug Buster Master Mix 试剂的说明书分别对 IPTG 诱导的和未诱导的 NDX-4 阳性克隆菌液以及 IPTG 诱导的空载体菌液进行蛋白抽提,得到蛋白上清后进行 BCA 定量。将 1 ml 50% Ni-NTA His·Bind 树脂悬液加入到 4 ml 1 × Ni-NTA 结合缓冲液中,轻柔混匀,待树脂自然沉降后,吸去约 4 ml 上清。加入适量的蛋白上清,4 度轻柔混匀 60 min。将 Ni-NTA His·Bind 树脂混合物加入下端封闭的空色谱柱后,用 1 × Ni-NTA 漂洗缓冲液漂洗 3 次,并用 1 × Ni-NTA 洗脱缓冲液进行洗脱,BCA 检测纯化后的蛋白浓度,并进行 SDS-PAGE 电泳分析。(4)SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色:以 12% 的分离胶和 5% 的积层胶对 2 μg 纯化的以上 3 组蛋白液进行凝胶电泳,待目的条带至分离胶中间位置时停止电泳。加 5 倍于凝胶体积的 0.25% 考马斯亮蓝 G-250(溶解于 50% 甲醇和 10% 乙酸中),染色过夜,脱色 2~3 h 后拍照。(5)Western blot 检测:进行 SDS-PAGE 电泳,蛋白上样量为 0.2 μg,然后通过半干转将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭后,加入鼠抗组氨酸标签单克隆抗体(1:5000, 5% 脱脂奶粉稀释)进行过夜孵育。漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3000)室温孵育 1 h。漂洗后加入 ECL 发光液进行暗室曝光。(6)HPLC-UV 检测 NDX-4 的酶活性:配制如下终浓度的酶反应体系, 50 μl 100 mmol/L Tris-HCl, 3 μl 100 mmol/L MgCl₂, 2 μl 1 mmol/L 8-oxoGTP/8-oxodGTP, 分别加入 100、300、900 ng 纯化 NDX-4 蛋白抽提物或对照(空质粒)抽提物。37℃ 孵育 30 min 后,加 2.4 μl 10% SDS 终止反应。HPLC-UV 检测反应后的产物,采用 TSK-GELDEAE-2SW Column 色谱柱(4.6 mm × 250 mm);流动相为 90% 0.25 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 6.0)和 10% 乙腈;柱温为室温;进样体积为 20 μl,流速为 1 ml/min,整个运行时间为 20 min,检测波长为 293 nm。

结 果

1. SDS-PAGE 电泳的研究结果:本研究分别将 IPTG 诱导的和未诱导的 NDX-4 阳性克隆菌液以及 IPTG 诱导的空载体菌液抽提和纯化,将其纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后进行考马斯亮蓝染色,以确

定 NDX-4 蛋白的表达和纯化的效果(图 2)。带有 His 标签的 NDX-4 融合蛋白分子质量约为 24kDa,与第 2 泳道的条带位置相符,而诱导的空质粒和未诱导的 NDX-4 均未见可检测的条带,显示该研究所构建的 NDX-4 表达载体能成功的表达 NDX-4 融合蛋白分子,该蛋白的纯化产物被用于后续酶活性的检测。

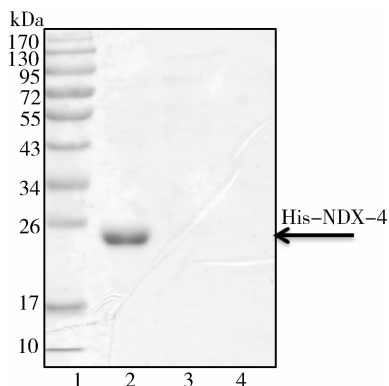


图 1 纯化 NDX-4 蛋白的 SDS-PAGE 的电泳图

1. Marker;2. 诱导的 NDX-4 蛋白抽提物;3. 未诱导的 NDX-4 蛋白抽提物;4. 诱导的空载体对照



图 2 NDX-4 蛋白的免疫印迹图

1. 诱导的 NDX-4 蛋白抽提物;2. 未诱导的 NDX-4 蛋白抽提物;3. 诱导的空载体对照

2. 免疫印迹的研究结果:本研究分别将 IPTG 诱导的和未诱导的 NDX-4 阳性克隆菌液以及 IPTG 诱导的空载体菌液抽提,将其蛋白进行 SDS-PAGE 电

泳后进行免疫印迹。结果如图 2 所示,显示该研究所构建的 NDX-4 表达载体能成功的表达 NDX-4 融合蛋白分子。

3. HPLC-UV 检测体系的建立及 NDX-4 蛋白酶学活性的研究结果:本研究分别将 100、300、900ng 的 NDX-4 阳性克隆菌液蛋白抽提物 and 对照组(空质粒)蛋白抽提物与 8-oxodGTP 孵育 30min,产物进行 HPLC-UV 检测,其 NDX-4 蛋白水解 8-oxodGTP 的酶学活性结果如图 3 所示。图 3A 为对照组蛋白提取物的酶学活性分析结果,加入不同量的蛋白质后仅见在 16.11min 时出现 8-oxoGTP 峰;图 3B 为 NDX-4 阳性克隆菌液蛋白提取物的酶学活性分析结果,加入 100ng 蛋白时在 6.59min 和 10.04min 时出现两个峰,分别代表 8-oxodGMP 和 8-oxodGDP,说明表达的 NDX-4 蛋白能将 8-oxodGTP 水解为单磷酸和二磷酸形式。随着提纯物的增加,对照组没有变化,而 NDX-4 阳性克隆菌液蛋白组代谢产物 8-oxodGDP 和 8-oxodGMP 对应的峰面积逐渐增大,而底物 8-oxodGTP (16.11min) 峰面积逐渐减小,在加入 900ng 时消失,说明随着 NDX-4 蛋白量的增加,对 8-oxodGTP 的水解活性增强,与文献报道一致^[5]。NDX-4 蛋白水解 8-oxoGTP 的酶学活性结果如图 4 所示,反应条件与前者一致,随着提取物的增加,8-oxoGMP 和 8-oxoGDP 峰面积逐渐增加,而 8-oxoGTP 峰面积逐渐减少,在加入 900ng 时,8-oxoGTP 峰面积几乎消失,说明 NDX-4 蛋白同样对 8-oxoGTP 具有水解活性,其代谢产物以单磷酸和二磷酸形式存在。

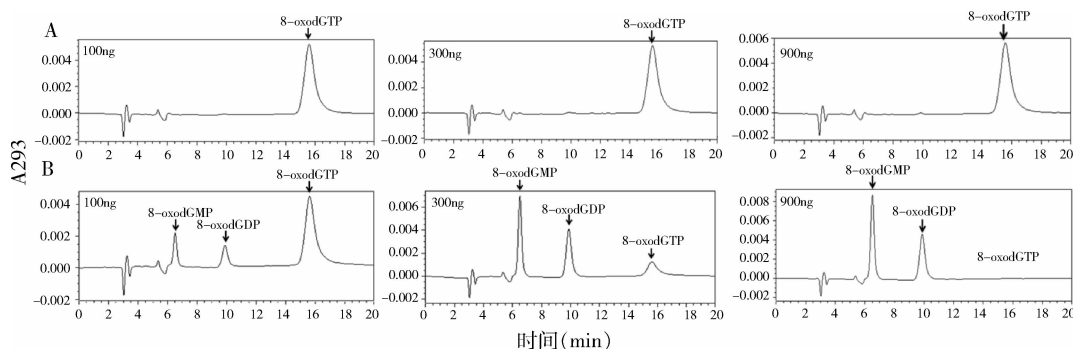


图 3 用 HPLC-UV 方法检测 NDX-4 蛋白对 8-oxodGTP 的酶学活性结果图

A. 对照组检测结果;B. NDX-4 蛋白质检测结果

讨 论

活性氧、自由基作为细胞代谢过程中的正常中间产物,可造成 DNA、脂质和蛋白质的氧化损伤^[7]。很

多研究表明,氧化应激造成的 DNA 损伤可能是人类衰老、肿瘤及神经系统退行性疾病的重要起始因素^[5]。在目前广泛研究的众多嘌呤和嘧啶氧化产物

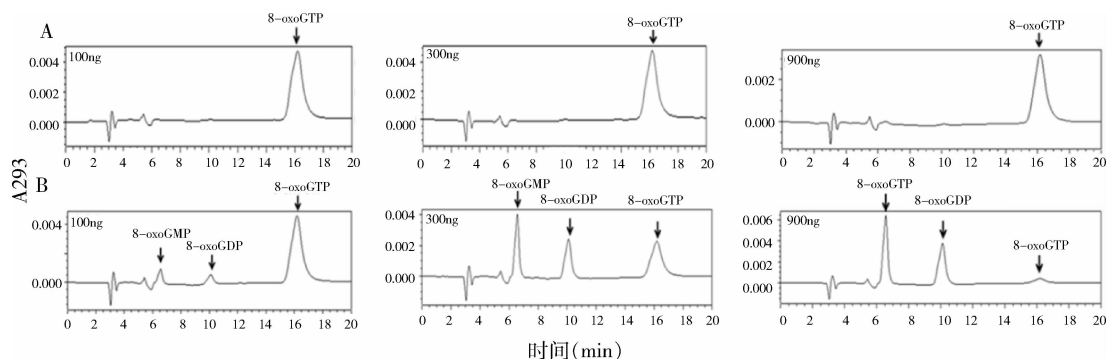


图4 用HPLC-UV方法检测NDX-4蛋白对8-oxoGTP的酶学活性结果图

A. 对照组检测结果; B. NDX-4蛋白质检测结果

中,8-氧化-7,8-二羟基鸟嘌呤(8-oxoG)由于其潜在的变异原性,而受到格外的关注。在DNA的复制过程中,8-oxoG不会阻碍DNA的合成而是产生碱基错配,这种碱基的错配会导致AT→CG和GC→TA的碱基颠换突变。如果这种错配发生在RNA转录过程中,则将会引发转录突变,进而造成变异蛋白质的产生^[6]。

生物体细胞中拥有完善的核酸氧化修复机制。大肠杆菌的MutT蛋白可将核酸池中的8-oxodGTP水解成单磷酸形式,对8-oxoGTP也具有一定的降解能力^[6]。随着对哺乳动物细胞核酸氧化修复机制研究的深入,目前在哺乳动物细胞已发现了MTH1、MTH2、MTH3、Nudt5等MutT的同源蛋白,具有与MutT蛋白相同或相近的酶学活性^[6,8-14]。近年来,Arczewska等^[5]和Sanada等^[2]先后报道了*C. elegans*中存在MutT类似蛋白NDX-4和NDX-1,不仅具有水解8-oxodGTP的蛋白酶活性,而且对2-oxodATP、dATP和dGTP具有同样的水解能力。但是,*C. elegans*的NDX-4蛋白是否存在其他的蛋白酶活性是我们感兴趣的焦点。本研究将NDX-4进行了克隆表达,并优化了HPLC-UV检测NDX-4酶学活性的方法,首先开展了NDX-4蛋白对水解8-oxodGTP的酶学活性研究,结果如图3所示,笔者发现NDX-4具有明显的水解8-oxodGTP能力,水解产物为8-oxodGDP和8-oxodGMP,与文献报道一致^[5],而且随着NDX-4的增加,水解能力逐渐增强。

与DNA相比,RNA是单链核酸而且无组蛋白的保护,同时RNA聚合酶缺乏校正功能,更易被氧化^[15]。大肠杆菌MutT蛋白不仅具有水解8-oxodGTP及8-oxodGDP的能力,而且还具有水解8-oxoGTP及8-oxoGDP的能力。最近Takagi等^[6]发

现人的MTH3蛋白具有水解8-oxoGDP和8-oxodGDP的功能,且两者的酶学活性基本相同。笔者实验室前期通过RNA干扰技术成功建立MTH1基因表达敲减细胞株,发现细胞RNA氧化水平明显升高,证明MTH1具有抑制哺乳动物8-oxoG掺入RNA中的功能^[16]。本研究还开展了NDX-4蛋白对水解8-oxoGTP的酶学活性研究。如图4所示,NDX-4纯化产物与8-oxoGTP共同孵育后,出现了8-oxoGDP和8-oxoGMP两种产物,随着蛋白的增加,其水解能力逐渐增强。这说明NDX-4蛋白还具有水解8-oxoGTP的酶学活性。综上所述,笔者推断NDX-4蛋白很可能是一种重要的抗核酸氧化酶。本研究仅是对NDX-4蛋白抗核酸氧化酶学活性研究的一个开端。

*C. elegans*作为一种多细胞真核生物,经常作为发育和衰老机制研究的模式生物,也是很好的研究氧化应激和衰老关系的模式生物。本研究对线虫NDX-4酶学活性的研究,将为应用线虫作为模型生物开展氧化应激和衰老关系的研究提供新的思路。

参考文献

- 1 Song XN, Zhang LQ, Liu DG, *et al.* Oxidative damage to RNA and expression patterns of MTH1 in the hippocampi of senescence-accelerated SAMP8 mice and Alzheimer's disease patients[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(8): 1558-1565
- 2 Sanada U, Yonekura S, Kikuchi M, *et al.* NDX-1 protein hydrolyzes 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine-5'-diphosphate to sanitize oxidized nucleotides and prevent oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Biochem*, 2011, 150(6): 649-657
- 3 郑君德, 宋晓宁, 蔡剑平. MTH2蛋白在快速老化P8小鼠海马中表达的增龄性变化[J]. *中华老年医学杂志*, 2008, 27(7): 537-540
- 4 Zheng JD, Hei AL, Zuo PP, *et al.* Age-related alterations in the expression of MTH2 in the hippocampus of the SAMP8 mouse with learning and memory deterioration[J]. *J Neurol Sci*, 2009, 287(1-2):

- 188 – 196
- 5 Arczewska KD, Baumeier C, Kassahun H, *et al.* Caenorhabditis elegans NDX – 4 is a MutT – type enzyme that contributes to genomic stability[J]. DNA Repair (Amst), 2011, 10(2): 176 – 187
- 6 Takagi Y, Setoyama D, Ito R, *et al.* Human MTH3 (NUDT18) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates: comparison with MTH1 and MTH2[J]. J Biol Chem, 2012, 287(25): 21541 – 21549
- 7 宋晓宁, 郑君德, 刘东戈, 等. MTH2 蛋白与 8 – 氧鸟嘌呤脱氧核苷在阿尔茨海默病患者海马组织中的表达变化[J]. 中日友好医院学报, 2009, 5: 287 – 290
- 8 Ishibashi T, Hayakawa H, Ito R, *et al.* Mammalian enzymes for preventing transcriptional errors caused by oxidative damage[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(12): 3779 – 3784
- 9 Kakuma T, Nishida J, Tsuzuki T, *et al.* Mouse MTH1 protein with 8 – oxo – 7, 8 – dihydro – 2' – deoxyguanosine 5' – triphosphatase activity that prevents transversion mutation. cDNA cloning and tissue distribution[J]. J Biol Chem, 1995, 270(43): 25942 – 25948
- 10 Cai JP, Kawate H, Ihara K, *et al.* Significance of the conserved amino acid sequence for human MTH1 protein with antimutator activity [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(6): 1170 – 1176
- 11 Cai JP, Ishibashi T, Takagi Y, *et al.* Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8 – oxoguanine nucleotides [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(4): 1073 – 1077
- 12 蒙茗, 黑爱莲, 姜平, 等. MTH2 和 MTH3 蛋白在快速老化模型鼠 SAMP8 胸腺中增龄性表达的比较研究[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(5): 34 – 37
- 13 Ishibashi T, Hayakawa H, Sekiguchi M. A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides [J]. EMBO Rep, 2003, 4(5): 479 – 483
- 14 Zhang LQ, Dai DP, Gan W, *et al.* Lowered nudix type 5 (NUDT5) expression leads to cell cycle retardation in HeLa cells [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1 – 2): 377 – 384
- 15 郑君德, 宋晓宁, 林静, 等. 氧化应激与老年性痴呆发病的相关性研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2008, 4: 301 – 304
- 16 戴大鹏, 干伟, 张立群, 等. MTH1 基因的低表达对 HeLa 细胞内 RNA 氧化程度的影响[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(6): 35 – 38

(收稿日期: 2013 – 11 – 19)

(修回日期: 2013 – 12 – 02)

人 FAM172A 基因慢病毒载体的构建及其在巨噬细胞中的表达

李梅芳 张 蓉 李连喜 俞立波 屠印芳 陆俊茜 包玉倩 贾伟平

摘 要 目的 构建人 FAM172A 基因慢病毒载体, 并包装慢病毒 FAM172A 感染人巨噬细胞予以鉴定。方法 以 PDC315 – FAM172A 为模板扩增 FAM172A 基因全长序列后, 与慢病毒载体 pLenti6. 3/V5 – GFP 经酶切、连接转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆, 行菌液 PCR、酶切及测序鉴定。将鉴定正确的 FAM172A 基因慢病毒载体和病毒包装质粒共转染 FT293 细胞包装慢病毒 FAM172A, 测定病毒效价。Western blot 和 QPCR 验证慢病毒 FAM172A 感染巨噬细胞效果。结果 菌液 PCR、酶切及测序结果显示 FAM172A 基因成功插入到慢病毒载体中。病毒包装后荧光显微镜观察到 FT293 细胞中有大量绿色荧光, 病毒效价为 1.2×10^8 TU/ml。Western blot 和 QPCR 结果显示, 慢病毒 FAM172A 侵染靶细胞后可明显增加目的基因 FAM172A 的表达。结论 成功构建慢病毒 FAM172A, 为后续 FAM172A 基因功能研究奠定了基础。

关键词 FAM172A 基因 慢病毒载体 巨噬细胞

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Construction of the Lentivirus Vector of Human FAM172A Gene and Its Expression in Human Macrophages. Li Meifang, Zhang Rong, Li Lianxi, *et al.* Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Jiaotong University Affiliated the Sixth People's Hospital, Shanghai Clinical Center for Diabetes, Shanghai Diabetes Institute, Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus, Shanghai 200233, China

Abstract Objective To construct the lentivirus vector of human FAM172A gene, package corresponding virus and identify its expression in human macrophages. **Methods** After PDC315 – FAM172A being taken as a template to amplify overall length of FAM172A

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81170759)

作者单位: 200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科、上海市糖尿病临床医学中心、上海市糖尿病研究所、上海市糖尿病重点实验室

通讯作者: 李连喜, 电子信箱: lilx@sjtu.edu.cn