

- 3 Wang H, Liu H, Zheng ZM, *et al.* Role of death receptor, mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in different stages of degenerative human lumbar disc[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(10):990-1003
- 4 Yamada K, Sudo H, Iwasaki K, *et al.* Caspase-3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(3):753-764
- 5 范璐,樊剑鸣,张改平,等. RNA 干扰技术及其在动物疾病研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2013, 6: 63-69
- 6 胡有谷,陈伯华. 椎间盘退变基因治疗进展[J]. *中国骨与关节外科*, 2013, 6(Suppl 1): 11-16
- 7 Huang S, Kamihira M. Development of hybrid viral vectors for gene therapy[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(2): 208-223
- 8 Felizardo TC, Wang JC, McGray RA, *et al.* Differential immune responses mediated by adenovirus- and lentivirus-transduced DCs in a HER-2/neu overexpressing tumor model[J]. *Gene Ther*, 2011, 18(10): 986-995 (收稿日期:2015-02-10)  
(修回日期:2015-04-16)

# SUMF2 基因过表达慢病毒载体的构建及鉴定

那春鑫 薛丽 梁红艳 姜晓峰

**摘要** 目的 构建硫酸酯酶修饰因子 2 (SUMF2) 基因过表达慢病毒载体,以便进一步研究 SUMF2 功能。方法 针对人 SUMF2 DNA 序列设计带酶切位点的引物,PCR 法获得目的基因片段;用 Age I 和 Nhe I 酶双酶切 SUMF2 基因片段及 PLJM1-EGFP 载体。用 T4 连接酶对两种酶切产物进行连接、PCR 鉴定、测序。将阳性克隆质粒与包装质粒及包膜蛋白质粒共转染 293T 细胞,并荧光显微镜观察 EGFP 的表达。结果 PCR 和测序证实成功构建了 SUMF2 的慢病毒表达载体,病毒效价为  $1 \times 10^8$  TU/ml。结论 成功构建 SUMF2-PLJM1-EGFP 慢病毒载体,并在 293T 细胞中得到表达。

**关键词** 硫酸酯酶修饰因子 2 慢病毒过表达载体构建

中图分类号 R3 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.012

**Construction and Identification of Lentiviral Vector Over-expressing Sulfatase-modifying Factor 2.** *Na Chunxin, Xue Li, Liang Hongyan, et al. Department of Laboratory, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China*

**Abstract Objective** To construct a human sulfatase-modifying factor 2 (SUMF2) over-expressing lentiviral vector for further functional study. **Methods** The primers of SUMF2 with restriction endonuclease sites were designed, and gene were amplified by PCR. Purified SUMF2 fragments and PLJM1-EGFP plasmid were linked by T4 ligase after they were digested by Age I and Nhe I. Positive clones of SUMF2-PLJM1-EGFP vectors were confirmed by PCR and sequencing. The lentiviral vectors containing SUMF2 gene were transfected into 293T packaging cells together with envelope plasmid and packaging plasmid by lipofectamine 2000. The recombinant lentiviruses were transfected in to 293 T cells and the expression of EGFP observed by fluorescence microscopy. **Results** PCR and DNA sequencing demonstrated that the lentiviral vector was constructed successfully. The titer of concentrated virus was  $1 \times 10^8$  TU/ml. **Conclusion** The lentiviral vector over-expressing SUMF2 gene was success fully constructed, which can be expressed in 293T cells.

**Key words** Sulfatase-modifying factor 2; Lentiviral vector construction

硫酸酯酶修饰因子 2 (sulfatase-modifying factor 2, SUMF2) 是于 2003 年首次报道的一种硫酸酯酶修饰因子,其编码基因位于人染色体 7q11.1。由于 SUMF2 缺乏酶的催化活性,因此它的具体生物学功能至今尚不明确。但最近笔者所在实验室研究发现, SUMF2 可以与 IL-13 相互作用,并能够抑制其向细胞外的分泌。SUMF2 各亚型中能与 IL-13 相互作用

的主要为 SUMF2-V2、SUMF2-V3、SUMF2-V4、SUMF2-V5、SUMF2-V7,其中以 SUMF2-V2、SUMF2-V5 亚型作用明显<sup>[1,2]</sup>。众所周知,IL-13 是 Th2 细胞产生的一种炎性细胞因子,并与多种变态反应性疾病密切相关。目前的研究认为 IL-13 是哮喘发生的始动因子<sup>[3]</sup>。IL-13 不仅可以引起气道局部的慢性炎症,造成气道高反应性,还可引起气道的重构<sup>[4]</sup>。基于上述的这些研究,笔者猜想 SUMF2 或许会以 IL-13 为中介,与哮喘的发病相关。如果二者之间真的存在相关性,那么或许可以更加准确的揭示哮喘的发病机制,同时也可以为哮喘的治疗及诊断

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171657)  
作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四临床医学院检验科  
通讯作者:姜晓峰,电子邮箱:jiangxiaofeng@ems.hrbmu.edu.cn

提供新的靶标。故此基于现有研究成果,笔者在本次实验中利用基因重组技术构建 SUMF2 - V2、SUMF2 - V5 亚型过表达慢病毒载体,以期对进一步研究 SUMF2 的生物学功能及与 IL - 13 相互作用关系提供实验基础。

### 材料与amp;方法

1. 材料:慢病毒包装所用的 4 质粒系统:慢病毒载体质粒 PLJM1 - EGFP,慢病毒包装质粒 pMDLg/PRRE、pRSV - Rev、pMD2. G 均购自美国 Addgene 公司。PEGFP - C3/SUMF2 质粒为本实验室先前构建,SUMF2 - V2 及 SUMF2 - V5 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成、限制性内切酶 Age I 及 Nhe I 购自美国 New England Biolabs 公司,T4 连接酶、Taq 聚合酶及 5kb DNA marker 购自 TaKaRa 公司、无内毒素质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司、DNA 凝胶回收试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司、293T 细胞有本实验室保存、DMEM 培养液购自 Gibco 公司、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)购于宝泰科技有限公司、Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司。

2. 方法:(1)SUMF2 基因片段的获取:根据 GeneBank 数据库中 SUMF2 - V2、SUMF2 - V5 亚型的 cDNA 序列,通过 primer5 软件设计引物,在上下游引物 5'端分别加入限制性内切酶 Nhe I 及 Age I 酶切位点及保护碱基(表 1)。引物设计完成后,由上海生工生物工程技术有限公司合成。以本实验室先前构建的 PEGFP - C3/SUMF2 质粒为模板,用 PCR 法获得目的基因。PCR 反应体系及条件如下:Template

(15ng/μl) 2μl、Primer - F 0.5μl 及 Primer - R 0.5μl (10μmol)、Premix Taq 10μl、ddH<sub>2</sub>O 7μl。95℃ 预变性 3min,95℃ 变性 30s,51℃ 退火 30s,72℃ 延伸 90s 共 35 个循环,72℃ 延伸 8min。用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 后产物,并用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。(2)SUMF2 - PLJM1 - EGFP 质粒构建、鉴定与测序:用限制性内切酶 Age I 及 Nhe I 分别对纯化后的 SUMF2 - V2 片段、SUMF2 - V5 片段、PLJM1 载体质粒 37℃ 双酶切 16h。用 T4 连接酶将酶切后的 SUMF2 - V2、SUMF2 - V5 分别与酶切后的 PLJM1 - EGFP 在 16℃ 下连接 16h。连接后产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态菌体中,将细菌接种于含有氨苄青霉素(Amp)的平板上。挑取阳性菌落,提取质粒经 PCR 初步鉴定后送测序。(3)慢病毒包装:将 293T 细胞接种于 15cm 细胞培养皿,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养至 80% 融合时,取慢病毒包装的质粒 pMDLg/PRRE 15μg、pRSV - Rev 10μg、pMD2. G 7.5μg 分别与 SUMF2 - V2 - PLJM1 - EGFP 重组质粒 20μg、SUMF2 - V5 - PLJM1 - EGFP 重组质粒 20μg 混匀,并加入相应体积的 Opti - MEM,调整体积至 2.5ml,室温放置 5min。取 100μl Lipofectamine 2000 试剂在另一管中与 2.4ml Opti - MEM 混合,在室温下温育 5min。把稀释后的 DNA 与稀释后的 Lipofectamine 2000 进行混合并在室温下放置 20min。将 DNA 与 Lipofectamine 2000 混合液共转染 293T 细胞。收集培养 48h 后的上清于 4℃、4000 × g 离心 10min,除去细胞碎片并以 0.45μm 滤器过滤上清液于 40ml 超速离心管中。把病毒粗提取液样品加入到过滤杯中,4℃ 4000 × g 超速离心 10min,收集病毒浓缩液,-80℃ 保存。取一支用孔稀释法测定病毒效价。

表 1 PCR 引物序列

引物	序列
SUMF2 - V2 sense	上游引物 5' - GTA <u>GCT AGC</u> ATG AGG GCG CAT GCG CAGC - 3'
	下游引物 5' - TCA <u>TGG CCA</u> TTA CAG CTC CCC TGG CCGC - 3'
SUMF2 - V5	上游引物 5' - GTA <u>GCT AGC</u> ATG AGG GCG CAT GCG CAGC - 3'
	下游引物 5' - TCA <u>TGG CCA</u> TGT CAA TAA TAC TTG GCC TCT AAC - 3'

下划线所示为酶切位点

### 结 果

1. 阳性克隆的鉴定:SUMF2 - V2 - PLJM1 - EGFP 重组质粒 PCR 产物约为 1076bp(图 1)。SUMF2 - V5 - PLJM1 - EGFP 重组质粒 PCR 产物大小约为 962bp(图 2),与预期相符合。DNA 测序的结果显示含有目的基因(图 3)。综合二者,表明成功构建重组质粒。

2. 慢病毒效价测定:用孔稀释法测定病毒效价,在荧光显微镜下观察各孔 GFP 的表达量,荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少。数出荧光细胞比例在 10% 左右的孔中的荧光细胞个数。将得到的数值除以相应的稀释倍数就得到了病毒原液的效价值,测定效价为 1 × 10<sup>8</sup> TU/ml。

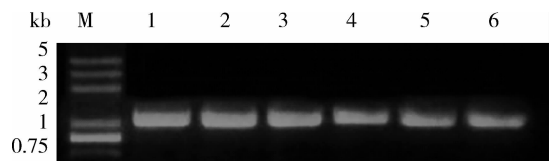


图 1 SUMF2 - V2 - PLJM1 - EGFP 重组质粒 PCR 鉴定  
M. marker;1 - 6. 重组质粒的 PCR 产物

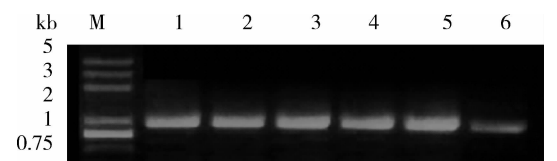


图 2 SUMF2 - V5 - PLJM1 - EGFP 重组质粒 PCR 鉴定  
M. marker;1 - 6. 重组质粒的 PCR 产物

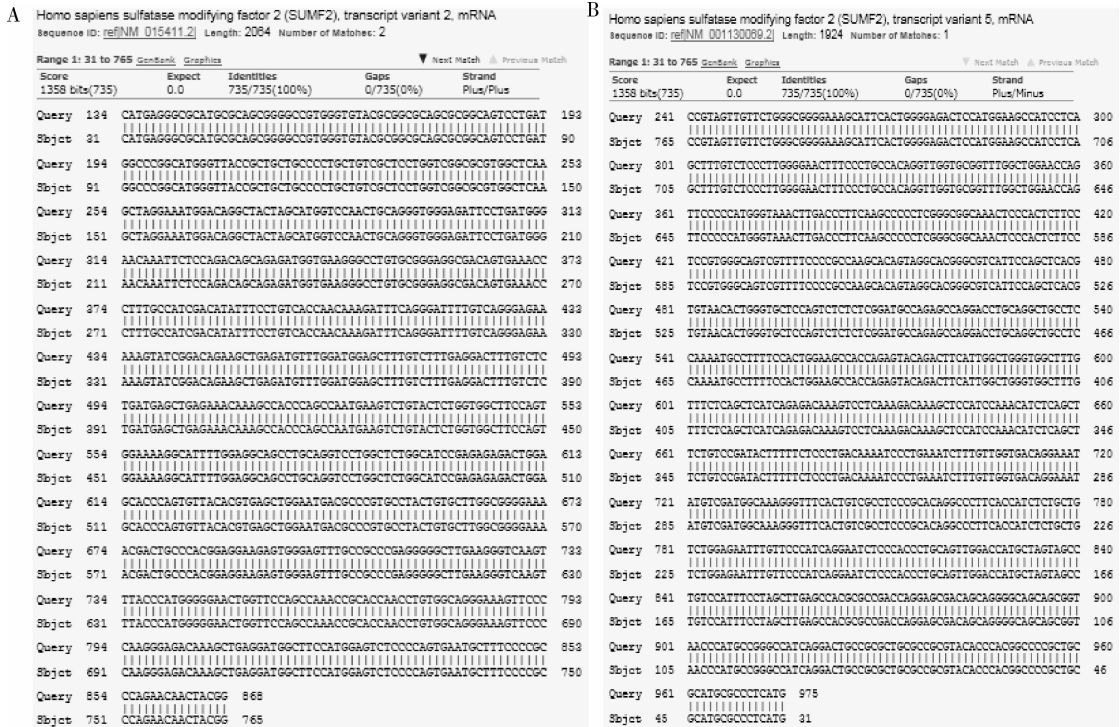


图3 重组质粒测序

A. SUMF2 - V2; B. SUMF2 - V5

3. 慢病毒转染 293T 细胞效率的鉴定: 用慢病毒转染 293T 细胞, 转染后的 48h 在荧光显微镜下观察, 发

现经过慢病毒转染的 293T 细胞内存在明显的绿色荧光, 这表明慢病毒对 293T 细胞的转染效率较高(图 4)。

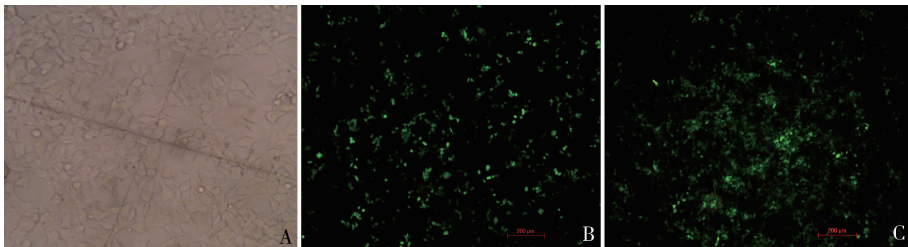


图4 慢病毒转染 293T 细胞效率鉴定

A. 对照组; B. 慢病毒感染组 SUMF2 - V2; C. 慢病毒感染组 SUMF2 - V5

4. Western blot 法验证 SUMF2 的蛋白表达: 用慢病毒转染 293T 细胞, 转染后的 48h 后收集细胞, 检测 SUMF2 蛋白表达, 发现经慢病毒感染后, 细胞 SUMF2 蛋白表达水平明显高于对照组(图 5)。

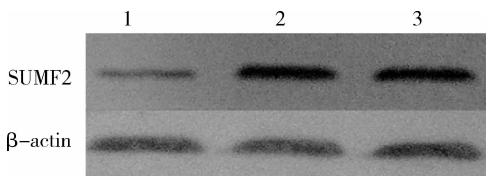


图5 对照组与慢病毒感染组 SUMF2 蛋白表达

1. 对照组; 2. 慢病毒感染组 SUMF2 - V2;  
3. 慢病毒感染组 SUMF2 - V5

### 讨 论

哮喘是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等)和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。这种慢性炎症导致气道高反应性的产生, 通常出现广泛多变的可逆性气流受限, 并引起反复发作的喘息、气急、胸闷或咳嗽等症状。最近的一些临床研究表明其发病与 Th2 细胞所产生的多种细胞因子密切相关, 尤其是 IL - 13<sup>[5]</sup>。然而关于调控 IL - 13 分泌的机制尚不清楚。

SUMF2 基因是硫酸酯酶修饰因子家族的一员, 其表达的蛋白质具有 DUF323 结构域。具有该结构域的蛋白质定位于内质网的腔内。虽然 SUMF2 催化

生成 C- $\alpha$ -甲酰甘氨酸(FGly)的活性较低,但是它能与催化 FGly 生成活性较高的其他家族成员 SUMF1 形成异二聚体,进而调节 FGly 结构<sup>[6]</sup>。只有在 FGly 存在时,硫酸酯酶才具有催化活性<sup>[7]</sup>。

最近有研究发现,SUMF2 能抑制 IL-13 的分泌,笔者推测 SUMF2 或许与哮喘的发作相关。因此本次实验构建 SUMF2 基因过表达慢病毒载体,为进一步研究 SUMF2 与 IL-13 相互作用及与哮喘的关系奠定实验基础。

慢病毒载体以人类免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)为基础,将 HIV-1 重要的原件拆分在不同的质粒中,如携带目的基因的载体质粒、包装质粒及包膜质粒。慢病毒载体是在原有病毒载体的基础上删除了病毒 3'LTR 的 U3 区增强子和启动子序列的片段,该区域发生突变后则无法复制出完整长度的病毒基因组,因此慢病毒载体是一种自身失活型载体,具有很高的安全性。慢病毒对分裂期细胞和非分裂期细胞均具有感染能力,而且能使目的基因整合到宿主细胞基因组中,使目的基因可以长期稳定表达。上述这些优点使慢病毒技术在多领域得到广泛的应用<sup>[8-10]</sup>。

本次研究以实验室先前构建的 PEGFP-C3/SUMF2 为模板,获取目的基因。慢病毒采用 4 质粒系统,其中 PLJM1-EGFP 为载体质粒,同时该质粒能表达 GFP 用于宿主细胞感染效率的检测。pMDlg-pRRE 携带了 gag/pol 编码序列,gag 基因编码病毒的核心蛋白,pol 基因编码病毒复制所需的酶。pRsv-REV 包含了编码 rev 的序列,主要调节 gag、pol、env 的表达水平。pMD2G 含有 VSVG 基因,提供蛋白包装所需的包膜蛋白。

目前应用 4 质粒慢病毒系统构建过表达 SUMF2 的研究尚无报道,本次实验首次成功构建了 SUMF2 -

V2-PLJM1-EGFP、SUMF2-V5-PLJM1-EGFP 慢病毒载体,为进一步研究 SUMF2 与 IL-13 的相互作用及哮喘的关系奠定了重要的实验基础。

#### 参考文献

- Liang H, Li Z, Xue L, *et al.* SUMF2 interacts with interleukin-13 and inhibits interleukin-13 secretion in bronchial smooth muscle cells [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108:1076-1083
- Zhang WY, Liang HY, Yang C, *et al.* Sos recruitment system for the analysis of the interaction between sulfatase-modifying factor 2 subtypes and interleukin-13 [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12 (4): 5664-5672
- Hussein YM, Ahmad AS, Ibrahim MM, *et al.* Interleukin 13 receptors as biochemical markers in atopic patients [J]. *J Int Allergol Clin Immunol*, 2011, 21:101-107
- Nagashima H, Nakamura Y, Kanno H, *et al.* Effect of genetic variation of IL-13 on airway remodeling in bronchial asthma [J]. *Allergol Int*, 2011, 60:291-298
- Li YY, Liu XS, Liu C, *et al.* Role of extracellular signal-regulated kinase in regulating expression of interleukin 13 in lymphocytes from an asthmatic rat model [J]. *Chin Med J; Engl*, 2010, 123: 1715-1719
- Zito E, Fraldi A, Pepe S, *et al.* Sulphatase activities are regulated by the interaction of sulphatase-modifying factor 1 with SUMF2. [J]. *EMBO Rep*, 2005, 6(7): 655-660
- Buono M, Cosma MP. Sulfatase activities towards the regulation of cell metabolism and signaling in mammals [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67: 769-780
- Lei CJ, Yao CH, Pan QY, *et al.* Lentivirus vectors construction of SiRNA targeting interference GPC3 gene and its biological effects on liver cancer cell lines Huh-7 [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7 (10): 780-785
- 李旭,江建新,王敏,等.慢病毒介导 Vimentin 基因沉默抑制胰腺癌细胞侵袭和粘附的机制 [J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2013, 42 (3): 247-253
- 刘星星,范恒,唐庆,等. CXCR4 基因过表达慢病毒载体的构建及鉴定 [J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2014, 43 (1): 1-5  
(收稿日期:2015-04-07)  
(修回日期:2015-04-17)
- Cosgrove D, Piscaglia F, Bamber J, *et al.* EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 2: clinical applications [J]. *Ultraschall Med*, 2013, 34 (4): 238-253
- Kim H, Kim JA, Son EJ, *et al.* Quantitative assessment of shear-wave ultrasound elastography in thyroid nodules: diagnostic performance for predicting malignancy [J]. *Eur Radiol*, 2013, 23 (9): 2532-2537
- Kim JK, Baek JH, Lee JH, *et al.* Ultrasound elastography for thyroid nodules: a reliable study? [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2012, 38 (9): 1508-1513  
(收稿日期:2015-01-22)  
(修回日期:2015-03-22)
- Merino S, Arrazola J, Cardenas A, *et al.* Utility and interobserver agreement of ultrasound elastography in the detection of malignant thyroid nodules in clinical care [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2011, 32 (11): 2142-2148
- Cantisani V, Lodise P, Di Rocco G, *et al.* Diagnostic accuracy and interobserver agreement of quasistatic ultrasound elastography in the diagnosis of thyroid nodules [J]. *Ultraschall Med*, 2014, 23: 1-6
- Kwak JY, Kim EK. Ultrasound elastography for thyroid nodules: recent advances [J]. *Ultrasonography*, 2014, 33 (2): 75-82
- Lee SH, Chang JM, Cho N, *et al.* Practice guideline for the performance of breast ultrasound elastography [J]. *Ultrasonography*, 2014, 33 (1): 3-10

(上接第 5 页)