

使用AD-A-Gene腺病毒载体: EGFP-GCCR (EGFP-糖皮质激素受体)和GRE-NTR (糖皮质激素应答因子-NTR)进行双因子的含量测定

R. Ismail

GE Healthcare, The Maynard Centre, Cardiff, U.K.

AD-A-Gene腺病毒基因传递系统使用病毒转染的方式快速地递送融合了增强绿色荧光蛋白(EGFP)或硝基还原酶(NTR)报告基因的腺病毒载体。在这里,我们将描述两个成功将Ad-A-Gene腺病毒载体递送进入细胞的例子,并且在此之后成功地检测到了其对已知激动剂和拮抗剂的受体应答。

在早期药物发现的过程中,基于细胞的含量测定是药靶定位和化合物功能确认的关键因素,而且在许多不同的阶段被使用。^[1]为了符合逐渐增加的对细胞含量数据测定的要求,需要一种分析方法能够同时进行多因子测定。联合的载体可能被用来研究单一或多个的信号通路、细胞过程,或进行所有这些事件的综合研究。如此方法的一个实例就是两种腺病毒载体系统的联合使用,一种是包含了绿色荧光蛋白EGFP的传感因子,另一种是包含报告基因NTR的表达系统。

这里的数据显示了在双因子载体的联合使用过程中,如果需要测定相同时间点的数据,那瞬时应答是必须被考虑的重要因素。同样地,我们也要考虑每个传感因子作用于其他因子上的效应,以及每个延长的化合物孵育过程对于应答作用的影响。

表 1. 逐渐增加Dexamethasone 的浓度时, EGFP-GCCR 和 GRE-NTR 感应因子的瞬时应答效应

EGFP-GCCR translocation assay	Incubation period	EC ₅₀ (nM) dexamethasone
EGFP-GCCR: Single Ad-A-Gene Vector	30 min	8.0
EGFP-GCCR: Single Ad-A-Gene Vector	24 h	0.40
EGFP-GCCR and GRE-NTR: Multiplexed Ad-A-Gene Vectors	24 h	0.46
GRE-NTR gene reporter assay	Incubation period	EC ₅₀ (nM) dexamethasone
GRE-NTR: Single Ad-A-Gene Vector	24 h	2.22
EGFP-GCCR and GRE-NTR: Multiplexed Ad-A-Gene Vectors	24 h	0.28

方法

• 病毒转染

AD-A-Gene EGFP-GCCR和GRE-NTR在融解后,配制生长培养基溶液,使其包含了单个或两种腺病毒载体。加入处于对数生长期的 HeLa 细胞,使其终浓度为 15×10^4 个细胞/毫升,以提供足够的感染复数(MOI)。对于双因子测定,对每个腺病毒载体进行优化,使得在下一个腺病毒载体被感染前能观察到足够的应答信号。为双因子测定所优化的MOI也可用于单一的腺病毒载体测定并且能直接进行比较。细胞和病毒悬浮液以100 μ l/孔被分装入96孔板,在37°C, 5% CO₂下孵育24 h。

注意:所有的腺病毒载体相关试剂均为BSL-2安全级别的试剂。在使用之前必须由当地的安全性评估机构授权。产品说明中包含了详细的操作指导。

• 功能测定

在以地塞米松(Dexamethasone)或RU486感染细胞前30min或24h,将细胞血清饥饿处理1h。细胞以福尔马林固定,以Hoechst™ 33342进行细胞核染色。

表 2. 使用RU486作为拮抗剂时, EGFP-GCCR 和 GRE-NTR 感应因子的瞬时应答效应

EGFP-GCCR translocation assay	Incubation period	IC ₅₀ (nM) RU486
EGFP-GCCR: Single Ad-A-Gene Vector	30 min	-
EGFP-GCCR: Single Ad-A-Gene Vector	24 h	3.53
EGFP-GCCR and GRE-NTR: Multiplexed Ad-A-Gene Vectors	24 h	6.25
GRE-NTR gene reporter assay	Incubation period	IC ₅₀ (nM) RU486
GRE-NTR: Single Ad-A-Gene Vector	24 h	1.80
EGFP-GCCR and GRE-NTR: Multiplexed Ad-A-Gene Vectors	24 h	8.5

结果

Dexamethasone对于EGFP-GCCR蛋白转运和NTR报告基因诱导的作用

将30min的药物孵育过程(图1A)和24h的孵育过程(图1B)相比较,用以测定Dexamethasone对于EGFP-GCCR转运的影响。对于单一载体的测量,在EC₅₀值中发现Dexamethasone的作用效应是依赖于时间的(表1)。然而,对于24h孵育的方法而言,在单一的载体或双因子测定中,观察到其EC₅₀值是相似的(图1B,表1)。

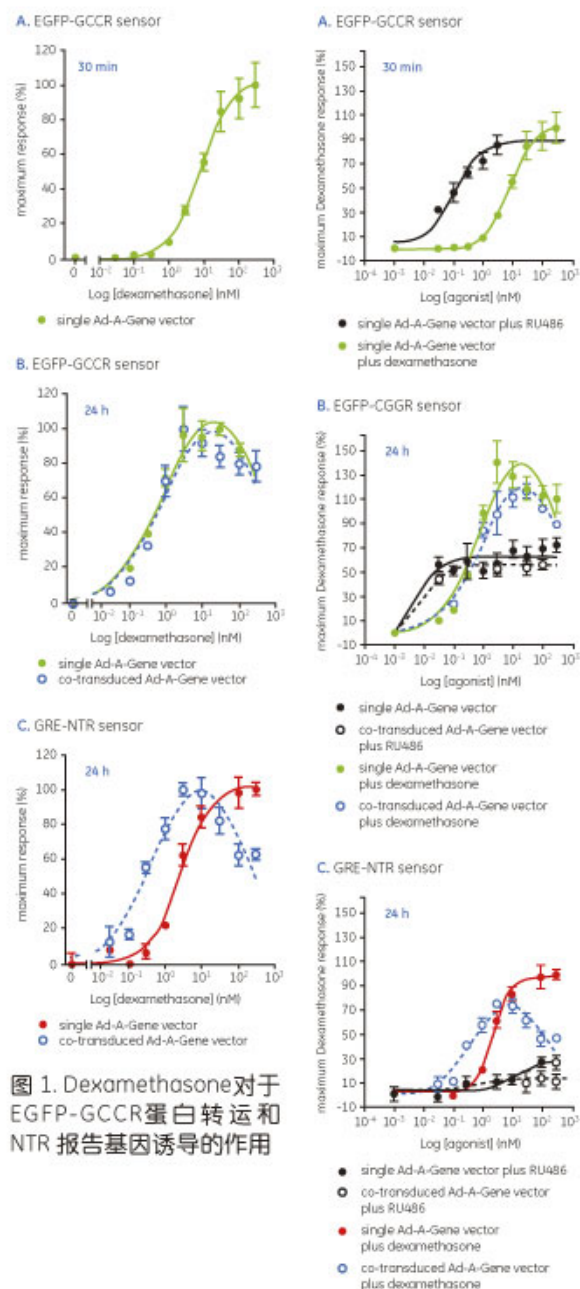


图1. Dexamethasone对于EGFP-GCCR蛋白转运和NTR报告基因诱导的作用

图2.比较Dexamethasone和RU486作为激动剂时对于EGFP-GCCR蛋白转运和NTR报告基因诱导的作用

RU486对于5 nM Dexamethasone的拮抗作用

将RU486和Dexamethasone混合后进行短期孵育将增加EGFP-GCCR的转运效率。然而,在持续长时间的混合孵育之后,RU486反而对Dexamethasone诱导的EGFP-GCCR转运产生了拮抗作用。在延长的孵育时间下使用相同的方法测定,对于RU486而言,IC₅₀值是类似的,无论是单一载体的浓度(3.53 nM)或是双因子载体联用浓度(6.25 nM)(表2)。而且无论对于单一载体还是双因子载体联用,报告基因NTR的活性均和RU486的加入剂量呈反比。在双因子载体联用的方法中添加糖皮质激素受体(以EGFP-GCCR形式表达),将提高RU486的IC₅₀值(表2)。

比较RU486和Dexamethasone作为EGFP-GCCR和GRE-NTR的激动剂的活性

在30分钟孵育后,Dexamethasone和RU486能促进EGFP-GCCR的细胞核积聚。(图2A)使用这一方法,对于保持细胞核形态而言,RU486(EC₅₀=0.12 nM)较Dexamethasone(EC₅₀=10.08 nM)是更好的激动剂。然而,如果将孵育过程延长至24h,则会对EGFP-GCCR的在细胞中的分布产生明显的影响。(图2B)RU486具有非常弱的激动剂活性(图2C),能够诱导NTR的活性,但是只有Dexamethasone最高水平的30%。在双因子测定结果中进一步观察,发现在Dexamethasone处于较高浓度时,(图1C和图2C),存在钟形剂量应答(bell-shaped dose response)。在高Dexamethasone浓度和受体密度的作用下,应答信号降低,与此相应,对于EGFP-GCCR转运检测,在高激动剂浓度的情况下,能够观察到明显的脱敏现象(图1B和图2B)。

结论

激动剂和拮抗剂对于EGFP-GCCR感应因子的效应和其联合孵育时间有显著关系。然而,在同样的测定方法下,无论使用单一载体还是双因子载体联用,对于EGFP-GCCR的转运,激动剂和拮抗剂的作用均十分类似。对于GRE-NTR报告基因检测,添加EGFP融合的GCCR受体能同时增加激动剂和拮抗剂的效应。