文章编号:1000-5404(2005)21-2107-04

论著

sCD40LIg重组腺病毒载体的构建鉴定和体外表达

李钊伦[1],田普训[1],薛武军[1],吴 军[2],贺伟峰[2],易绍萱[2],陈希炜[2],张小容[2] ([1]西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科,西安 710061;[2]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,重庆器官移植基础研究室,重庆 400038)

提 要:目的 构建含有分泌型人胞外区CD40L融合蛋白(sCD40LIg)基因的重组腺病毒载体,为下一步在动物模型体内表达和基因治疗提供基础。**方法** 分别以质粒pAdCTLA4Ig和pGEM-T-easy-sCD40L为模板,通过PCR扩增获得人源IgGFc和sCD40L基因全部序列。分别回收用连接酶连接,以连接产物为模板PCR,获得sCD40LIg基因全部序列,插入到腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV的启动子下游*Bgl* Ⅱ及*Xho* Ⅰ位点之间,获得重组质粒pAdTrack-sCD40LIg。将正确重组体pAdTrack-sCD40LIg转化含腺病毒骨架质粒的pAdEasy-1-BJ5183细菌行同源重组。提取重组成功质粒,用脂质体介导转染293细胞,通过观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达及PCR扩增目的基因,Western blot分析蛋白表达等方法鉴定重组的腺病毒。**结果** 成功构建了含有sCD40LIg基因的重组腺病毒并在体外表达。**结论** 该重组腺病毒的构建为下一步研究其在哺乳动物细胞内表达及在移植排斥的基因治疗中的作用提供了一定的基础。

关键词:sCD40L融合蛋白;重组腺病毒;基因表达;免疫耐受
中图法分类号:Q782;R392.11;R394-33 **文献标识码**:A

Construction, identification and expression of recombinant adenovirus expressing the gene of the extracellular domain of sCD40LIg *in vitro*

LI Zhao-lun[1], TIAN Pu-xun[1], XUE Wu-jun[1], WU Jun[2], HE Wei-feng[2], YI Shao-xuan[2], CHEN Xi-wei[2], ZHANG Xiao-rong[2] ([1] Center of Renal Diseases of the First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; [2] State Key Laboratory of Trauma, Burns and Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the adenovirus that express the extracellular domain of secretory human CD40LIg (sCD40 ligand Ig fusion protein). Methods The extracellular domain of human CD40L and IgGFc was amplified with PCR respectively and their PCR products were recovered and ligated with ligase to obtain sCD40LIg. The sCD40LIg was inserted into adenovirus expression vector pAdTrack-CMV to produce a recombinant vector pAdTrack-sCD40LIg and the recombinant vector was transduced into AdEasy-1-XL adenoviral vector system and acquired the recombinant sCD40LIg adenovirus. Results The recombinant adenovirus sCD40LIg was established by homologous recombinant and was identified by PCR, Western blotting and nucleotide sequencing. Conclusion The constructed recombinant sCD40LIg adenovirus vector provides a potent tool for gene therapy in the inducing of immune tolerance in the organ transplantation.

Key words: sCD40 ligand Ig fusion protein; recombinant adenovirus; gene expression; immune tolerance

在器官移植中排斥反应仍是制约移植物存活的主要障碍之一,诱导稳定的免疫耐受状态也就成为器官移植领域的热点之一。目前已经报道了成功诱导耐受动物模型的许多方法,其中阻断T细胞活化的共刺激激信号理论(costimulative signal theory),通过使用共刺激分子的单克隆抗体或融合蛋白,甚至基因工程技术对抗原递呈细胞进行改造可以实现在T细胞活化的早期阻断共刺激信号,以达到诱导针对供者的特异性免疫耐受的目的。在前面成功构建pGEM-T-easy-sCD40L载体的基础上[2],我们利用腺病毒表达载体pAdEasy™ XL Adenoviral Vector系统成功构建了携带sCD40LIg基因的重组腺病毒,为进一步感染哺乳动物细胞并长期、稳定地表达,阐明sCD40LIg在诱导免疫耐受中的机制奠定了基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371416)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371416)

作者简介:李钊伦(1973-),男,四川省南充市人,硕士,医师,主要从事肾脏移植和移植免疫共刺激通路方面的研究,现在西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科。电话:(029)85324033

收稿日期:2004-07-19;修回日期:2004-10-26

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 各种限制性内切酶、T4DNA 聚合酶、Ex-Taq 酶分别购自 NEB、MBI 和 Takara 公司。脂质体 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen™ 公司。DNA 快速连接反应试剂盒(DNA ligation kit ver.2)购自 Takara 公司。PCR 产物回收试剂盒,小量质粒提取试剂盒购自大连宝生物公司(Bio-Tec),琼脂糖凝胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction kit)购自 V-GENE 生物技术有限公司。兔抗人 CD40L 多克隆抗体和 HRP-羊抗兔 IgG 抗体均购自 Santa Cruz 生物公司。

1.1.2 质粒 pAdCTLA4Ig、pAdTrack-CMV 和 pGEM-T-easy-sCD40L 质粒由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所移植免疫组保存。

1.1.3 菌株与细胞株 293 细胞株和大肠杆菌 *E. coli* DH5α 由第三军医大学西南医院烧伤研究所移植免疫组保存。pAdEasy™ XL Adenoviral Vector System (pAdEasy-1-BJ5183, XL10-Gold) 购自 Stratagene 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计 参照已在 GenBank 上发表的 sCD40L 和 IgGFc 序列设计两对引物,根据克隆所需,在每条引物的 5′端引入相应的限制性酶切位点及保护性碱基,引物序列如下:sCD40L primer1-1(sCD40L 基因上游引物,5′端含有 *Bgl* Ⅱ位点):Forward 5′-TTT AGA TCT ACC ATG GGT CTA CTG CTC ACA CA-3′,sCD40L primer1-2 (sCD40L 基因下游引物,5′端含有 *Kpn* Ⅰ位点):Reward 5′-ACA GGT ACC AGT TTG AGT ACG CC -3′ ; IgGFc primer1-1 (IgGFc 基因上游引物,5′端含有 *Kpn* Ⅰ位点):Forward 5′-ACA GGT ACC CGA GCC CAA AT-3′, IgGFc primer1-2 (IgGFc 基因下游引物,内含有 *Xho* Ⅰ位点):Reward 5′-CT AGA AGC ATC CTC GAG CGA CCG-3′。以上引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2.2 pAdTrack-sCD40LIg 穿梭质粒的构建 以质粒 pAdCTLA4Ig 为模板,用合成的分别含有 *Kpn* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ酶切位点的 IgGFc 基因上下游引物进行 PCR 扩增获得 IgGFc 基因全部序列,以质粒 pGEM-T-easy-sCD40L 为模板,用分别含有 *Kpn* Ⅰ及 *Bgl* Ⅱ酶切位点的 sCD40L 基因上下游引物行 PCR 扩增获得 sCD40L 基因全部序列片段。按 PCR 产物回收试剂盒说明书回收 PCR 扩增产物后,IgGFc 经 *Kpn* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ酶双酶切,sCD40L 经 *Kpn* Ⅰ及 *Bgl* Ⅱ酶双酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳分别回收酶切产物(按琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书回收),并用 DNA 快速连接反应试剂盒中的Ⅰ号液和Ⅱ号液 16 ℃连接过夜(具体按说明书操作),以连接产物为模板,用含有 *Bgl* Ⅱ及 *Xho* Ⅰ酶切位点的 sCD40LIg 基因上下游引物(即 sCD40L primer1-1 和 IgGFc primer1-2)扩增获得 sCD40LIg 基因全部序列。PCR 产物回收后,用 *Bgl* Ⅱ及 *Xho* Ⅰ双酶切,获得 1.5 kb 的 CD40LIg 基因片段。腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 亦用 *Bgl* Ⅱ及 *Xho* Ⅰ双酶切,0.8% 琼脂糖电泳胶回收获得约 9.2 kb 的载体 DNA。目的基因与载体 DNA 在 16 ℃保温下经 DNA 快速连接反应试剂盒中的Ⅰ号液连接 17 h,连接产物转化新鲜感受态大肠杆菌 DH5α,接种卡那霉素 LB 平板培养 16 h,挑取阳性克隆扩增培养,用小量质粒提取试剂盒按说明书提取并纯化 pAdTrack-sCD40LIg 质粒,获得重组穿梭质粒。

1.2.3 pAdTrack-sCD40LIg 穿梭质粒的鉴定 酶切鉴定:分别对重组 pAdTrack-sCD40LIg 穿梭质粒和空载体 pAdTrack-CMV 进行 *Bgl* Ⅱ及 *Xho* Ⅰ双酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR 鉴定:分别以重组质粒和空载体为模板,用前面合成的上下游引物进行 PCR 扩增,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。测序鉴定:送上海博亚生物技术有限公司进行测序鉴定。

1.2.4 pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg 同源重组 将正确重组的 pAdTrack-sCD40LIg 穿梭质粒用 *Pme* Ⅰ酶切线性化,转化含腺病毒骨架质粒的感受态 pAdEasy-1-BJ5183 细菌。卡那霉素选择培养基和 PCR 筛选阳性克隆,扩增培养,提纯质粒。鉴定成功的重组子转化超感受态 XL10-Gold 菌,筛选阳性克隆并提取纯化,得到 sCD40LIg 的重组腺病毒。

1.2.5 pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg 的鉴定 酶切鉴定:用 *Pac* Ⅰ酶切腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg ,0.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR 鉴定:以重组质粒 pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg 为待鉴定模板,以 pAdTrack-sCD40LIg 为阳性对照模板,pAdTrack-CMV 为阴性对照模板,用前面合成的 sCD40LIg 上下游引物进行 PCR 扩增,产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.6 sCD40LIg 重组腺病毒的产生和鉴定 用含 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基,37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养 293 细胞,融合至 80% 左右转染:将重组质粒 pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg 用 *Pac* Ⅰ酶切线性化,回收约 30 kb 的大片段 8 μg;取 LipofectamineTM2000 脂质体 10 μl,按说明书操作,转染后第 1 天便可在荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白的表达;4 d 后便可观察到细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。收集完全病变培养孔中的细胞及培养液, -20 ℃和 37 ℃反复冻融 3 次,上清加入 293 细胞中继续感染。收集病变的 293 细胞及培养液,按上述方法反复冻融 3 次,离心,上清加入蛋白酶 K 1 mg, 1% SDS 2 ml, EDTA 10 mmol/L 和 Tris-HCl 20 mmol/L 消化 2 h。离心取上清,酚氯仿抽提,无水乙醇沉淀,获得病毒的 DNA,以此为模板,sCD40LIg 上下游引物进行 PCR 鉴定。

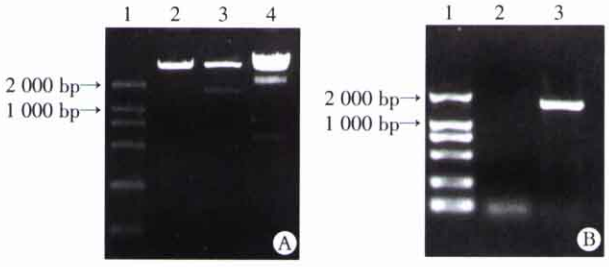
1.2.7 腺病毒滴度的测定 将 293 细胞按 1×10^6 接种于 6 孔板,长至融合度为 70% 时,把 20 μl 腺病毒原液稀释为 1 ml, 37 ℃感染 1 h。24 h 后收获细胞,调细胞浓度为 $(1\sim2)\times10^6$/ml,以正常未感染细胞为对照,行流式细胞仪检测,按下列公式计算腺病毒滴度:病毒滴度(pfu/ml) = 绿色荧光蛋白阳性细胞数(感染后 24 h) × 稀释倍数/感染用体积 数(ml)[3]。

1.2.8 sCD40LIg 在 293 细胞的表达 用前面获得的 sCD40LIg 腺病毒感染 293 细胞,72 h 后提取细胞总蛋白,Western blot 检测分析 sCD40LIg 的表达参见文献[4]方法。

2 结果

2.1 pAdTrack-sCD40LIg 穿梭质粒的鉴定

用 *Bgl* Ⅱ及 *Xho* Ⅰ双酶切 pAdTrack-sCD40LIg 穿梭质粒和空载体 pAdTrack-CMV,0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,在约 1.5 kb 的地方得到目的片段(图 1A)。以 pAdTrack-sCD40LIg 为模板扩增出约 1.5 kb 的目的片段(图 1B)。提示 sCD40LIg 已经正确克隆并和载体 pAdTrack-CMV 正确连接。



A: Enzyme digestion; 1: DL2000 marker; 2: pAdTrack-CMV digested by *Bgl* Ⅱ and *Xho* Ⅰ; 3: Recombinant plasmid digested by *Bgl* Ⅱ and *Xho* Ⅰ; 4: λ*Hind* Ⅲ marker

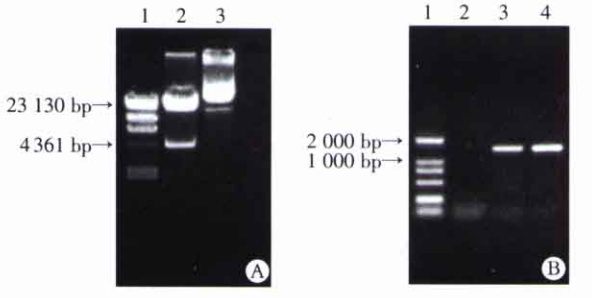
B: PCR; 1: DL2000 marker; 2: Negative control (pAdTrack-CMV); 3: PCR product of recombinant plasmid pAdTrack-sCD40LIg

图 1　pAdTrack-sCD40LIg 穿梭质粒的鉴定

Fig 1　Identification of recombinant shuttle plasmid pAdTrack-sCD40LIg

2.2　腺病毒同源重组的鉴定结果

将线性化的 pAdTrack-sCD40LIg 穿梭质粒转化含腺病毒骨架质粒的感受态 pAdEasy-1-BJ5183 细菌，卡那霉素平板筛选，挑取其中较小的克隆，提取质粒，用 *Pac* Ⅰ酶切重组质粒，0.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，酶切后有约 30 kb 和 4.5 kb 左右的两条带，再转化超感受态 XL10-Gold 菌，挑取克隆，提取质粒，*Pac* Ⅰ酶切，0.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，同样可以得到约 30 kb 和 4.5 kb 左右的两条带（图 2A），提示重组成功。PCR 鉴定示重组质粒 pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg 和 AdTrack-sCD40LIg 模板均可以扩出约 1.5 kb 大小的目的片段，而阴性对照没有扩出片段来（图 2B）。



A: Enzyme digestion; 1: λ*Hind* Ⅲ marker; 2: pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg digested by *Pac* Ⅰ; 3: Control (pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg plasmid)

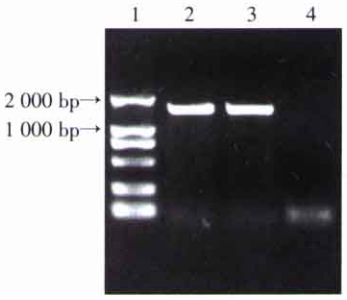
B: PCR; 1: DL2000 marker; 2: Negative control (pAdTrack-CMV); 3: Positive control (PCR product of recombinant pAdTrack-sCD40LIg); 4: PCR product of recombinant pAdEasy-1- pAdTrack-sCD40LIg

图 2　pAdEasy-1-pAdTrack-sCD40LIg 同源重组的鉴定

Fig 2　Identification of homologous recombinant pAdTrack-sCD40LIg

2.3　重组腺病毒转染 293 细胞结果

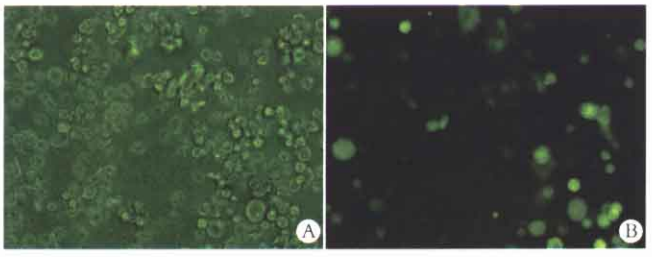
12 d 后，常规方法裂解细胞提取病毒 DNA，PCR 反应进一步鉴定，结果成功扩增出 1.5 kb 的目的条带（图 3）。同源重组体转染 293 细胞，培养 7 d 左右开始出现细胞病变效应，表现为细胞间出现裂隙，继而聚集，体积稍增大，形态变圆。在荧光显微镜下可以看到绿色荧光蛋白表达（图 4）。



1: Negative control; 2: PCR product of recombinant sCD40LIg adenovirus; 3: positive control (PCR product of recombinant pAdTrack-sCD40LIg); 4: DL2000 marker

图 3　重组 sCD40LIg 腺病毒的 PCR 鉴定

Fig 3　Identification of recombinant sCD40LIg adenovirus



A: GFP expression under ordinary microscope; B: GFP expression under fluorescence microscope

图 4　转染 293 细胞后绿色荧光蛋白的表达（Fluorescence microscope ×200）

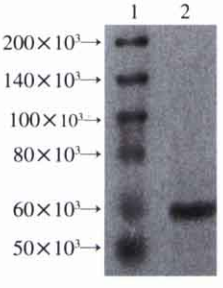
Fig 4　GFP expression after homologous recombinant pAd-CD40LIg transfected into 293 cells for 7 d（Fluorescence microscope ×200）

2.4　腺病毒滴度的测定结果

单孔细胞计数为：2.25×10^{6}，绿色荧光蛋白阳性细胞占比例为 21.5%，因此根据 FCM 的检测结果，计算病毒滴度为：$2.25\times10^{6}\times21.5\%\times50=2.42\times10^{7}$ pfu/ml。

2.5　sCD40LIg 在 293 细胞的表达结果

Western blot 分析表明，感染后的 293 细胞有约 60×10^{3} 的特异性蛋白表达，与预期相符，为构建好的基因 sCD40LIg 的蛋白表达（图 5）。



1: Protein marker; 2: The total protein expressed by 293 cells

图 5　Western blot 分析 293 细胞感染后 sCD40LIg 的表达

Fig 5　sCD40LIg protein expression by Western blotting

3 讨论

T 细胞的完全活化除需 CD3-TCR/MHC-Ag 提供的抗原特异性信号外，还需共刺激分子提供辅助信号即共刺激信号。目前共刺激通路家族中主要有 B7-CD28/CTLA4 家族成员和 CD40-CD40L（CD154）受体-配体系。尤其是 CD40-CD40L 共刺激通路是继 CD28 通路后又一重要的共刺激通路。CD40-CD40L 相互作用对 B 细胞增殖、免疫球蛋白的产生、记忆 T 细胞的增长、保持 CTL 记忆[3]都有重要的作用。因为 CD40-CD40L 共刺激通路在移植肾排斥的发生、发展过程中起重要作用[5]，故而干预共刺激分子 CD40-CD40L 的相互作用可能有效地预防和治疗移植排斥反应。Jin 等[7]发现通过腺病毒介导的 CD40Ig 基因的局部产物可以延长异种胰岛移植的存活时间，而且有明显的剂量依赖性，Kanaya 等[8]报道腺病毒介导的 CTLA4Ig 或 CD40Ig 基因治疗可以阻止同种异体组织移植中急性排斥反应的发生，而且没有并发症。用抗 CD40L 的单克隆抗体也可以阻断共刺激通路，但其半衰期太短，而且有要重复给药的不利。我们将人源的 IgG Fc 和 CD40L 嵌合在一起，改变整个融合蛋白的结构，而且我们成功地将致瘤素信号肽 cDNA 连接在 CD40L 胞外区的 cDNA 上，可使其呈分泌型表达[2]。另外，IgG Fc 还可以用作鉴定标志，便于用 protein A 亲和柱纯化。同时，表达的融合蛋白本身是一种免疫粘附分子，在体内代谢较慢，便于观察其在体内的效应。

近年以来，经 E1a 和 E3 区缺失的重组复制缺陷型腺病毒载体作为基因转移载体并到重视，这是因为腺病毒作为载体有诸多优势：易于制备，好操作，可携带较大的外源 DNA 片段，可感染的宿主细胞多，导入效率高，理化性质稳定，易于分离纯化，不整合到宿细胞的基因组，故而遗传毒性低，没有明显的副作用[8]。本实验所使用的 pAdEasy™ XL Adenoviral Vector 系统骨架质粒 pAdeasy-1（氨苄青霉素抗性）带有病毒的大部分基因组，穿梭质粒 pAdTrack-CMV（卡那霉素抗性）具有左右臂同源区，借助 *E. coli* BJ5183 细菌内高效的同源重组机制并进行抗生素筛选，可以在短时间内得到重组腺病毒质粒。再在人工创建的 *Pac*I 位点切去此质粒上的 ori 和卡那霉素抗性基因，暴露其 ITR 序列，即可用来转染适当的 293 包装细胞，得到表达外源基因的重组腺病毒。本次所用 pAdEasy™ XL Adenoviral Vector 系统，*E. coli* BJ5183 细菌内有骨架质粒 pAdeasy-1，不需要同时转化穿梭质粒和 pAdeasy-1 质粒，降低了操作的难度。pAdTrack-CMV 质粒中带有 GFP 报告基因，可用来直接观察转染及测定重组病毒的滴度，无需细胞固定和抗体标记，便可以在活细胞状态下直接测定重组腺病毒对靶细胞的感染效率。这种快速高效的构建方法使得研究人员可以将主要精力集中在目的基因本身的性质和功能，而不必花费太多精力在构建过程[9]。本研究成功构建了携带 sCD40LIg 基因的重组腺病毒载体，原代腺病毒滴度为 2.42×10^7 pfu/ml，我们经过几次扩增后，未经纯化浓缩，病毒滴度可以达到约 5.0×10^9 pfu/ml，基本满足下一步实验要求，这对利用腺病毒载体进行活体内基因治疗十分重要。下面我们将会用构建的重组腺病毒转染哺乳动物真核细胞并植入动物体内，期望可以在多种移植物（如心脏，肾脏，肝脏等器官）的局部有持续而高效的表达，达到降低移植排斥反应的目的。

参考文献：

[1] Didier A M, Mohamed H S, Mohamed H, *et al*. Role of novel T-cell costimulatory pathways in transplantation[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2003, 8(1): 25-33.

[2] 田普训，张寅生，薛武军，等. 人 CD40L 胞外区腺病毒分泌表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报，2003，25(21)：1961-1963.

[3] 张 华，寿成超. 人源分泌型血管内皮细胞生长因子受体 flt-1(Ⅰ~Ⅳ区)的基因克隆及其腺病毒载体的构建和表达[J]. 生物化学与生物物理进展，2002，29(4)：625-630.

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al*. Molecular cloning[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 852-898.

[5] Bachmann M F, Hunziker L, Zinkernagel R M, *et al*. Maintenance of memory CTL responses by T helper cells and CD40-CD40 ligand: antibodies provide the key[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(2): 317-326.

[6] 周广臣，许纯孝，张怀强，等. 大鼠移植慢性排斥组织中 CD40 和 CD40L 表达研究[J]. 中国免疫学杂志，2003，19(1)：49-53.

[7] Jin Y Z, Xie S S. Bicistronic adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig gene and CD40Ig gene result in indefinite survival of islet xenograft[J]. Transplant Proc, 2003, 35(8): 3165-3166.

[8] Kanaya K, Tsuchida Y, Inobe M, *et al*. Combined gene therapy with adenovirus vectors containing CTLA4Ig and CD40Ig prolongs survival of composite tissue allografts in rat model[J]. Transplantation, 2003, 75(3): 275-281.

[9] 郭小黄，邓宇斌，陆才生，等. CTLA4Ig 重组腺病毒载体的构建与体外表达[J]. 中国病理生理杂志，2003，19(5)：585-589.

（编辑 陈聪连）