论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0144-03

Bek腺病毒表达载体的构建及其在哺乳类动物细胞中的表达

刘斌剑,王建民,陈 林,宋瑞华,赵 玲,宋维威,苟元彬 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤中心实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室临床生物技术研究室,重庆 400042)

提 要:**目的** 构建Bek腺病毒表达载体并观察该载体在成纤维细胞中转基因表达FGFR2-Ⅲc的情况,为研究骨骼发育打下基础。**方法** 利用AdEasy-1腺病毒载体系统构建Bek腺病毒表达载体;该载体感染成纤维细胞后,通过荧光定量PCR(FQ-PCR)检测Bek腺病毒表达载体转基因表达FGFR2-Ⅲc mRNA情况。**结果** Bek腺病毒表达载体感染成纤维细胞后,成纤维细胞有绿色荧光表达,荧光定量PCR检测表明Bek腺病毒表达载体转基因表达FGFR2-Ⅲc mRNA效果明显($P<0.05$)。**结论** Bek腺病毒表达载体构建成功,能够转基因表达FGFR2-Ⅲc mRNA,为研究骨骼发育和成骨机制提供了基础。

关键词:成纤维细胞生长因子受体;腺病毒载体;基因治疗

中图法分类号:R373;R394-33;R394.2 **文献标识码**:A

Construction of adenovirus expression vector of Bek and its expression in mammalian cells

LIU Bin-jian, WANG Jian-min, CHEN Lin, SONG Rui-hua, ZHAO Ling, SONG Wei-wei, GOU Yuan-bin (Lab of Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To construct adenovirus expression vector of Bek and observe its expression of FGFR2-Ⅲc mRNA in fibroblasts for ensuring easy access to the investigation of skeletal development. **Methods** The adenovirus expression vector of Bek had been constructed by using AdEasy-1 adenovirus vector system. After infecting fibroblasts, the FGFR2-Ⅲc mRNA which expressed by this vector in fibroblasts was detected by fluorescent quantitive PCR(FQ-PCR). **Results** Green fluorescence in the fibroblasts could be observed after they were infected by adenovirus expression vector of Bek. Detection of fluorescent quantitive PCR indicated that the adenovirus expression vector of Bek had a significant effect on transgenically expressing FGFR2-Ⅲc mRNA($P<0.05$). **Conclusion** The adenovirus expression vector of Bek has successfully been constructed that can express FGFR2-Ⅲc by path of transgene.

Key words: fibroblast growth factor receptor; adenovirus vector; gene therapy

Ⅱ型成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR2)在机体发育过程中担任重要角色,同FGFR1和FGFR3一样,FGFR2也存在两种剪切变构体——Ⅲb和Ⅲc[1]。FGFR2-Ⅲc即Bek在发育的早期表达在侧中胚层的肢芽和鳃状弓的间充质细胞表面和软骨雏形的骨膜环中,晚期则表达在肌肉组织和其他间质组织如软骨内和膜内成骨等部位[2]。Bek受上皮细胞旁分泌的成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)2、4、6、8、9等激活,对骨骼的发育和生长发挥重要作用[3]。为了解Bek在成骨过程中的作用机制,本研究构建了Bek基因的腺病毒表达载体,并对其转基因表达Bek效果进行了观察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及主要试剂 pRK5-FGFR2-Ⅲc质粒和腺病毒表达载体系统pAdEasy-1、pAdTrack-CMV分别由美国Glen博士和He Tongchun博士惠赠;各种限制性内切酶、T_4 DNA连接酶、DMEM、FBS、PCR试剂盒、质粒提取试剂盒、RNA提取试剂盒、转染用脂质体Lipofectamine2000分别购自New England公司、Roches公司、Takara公司、Gibco公司、Qiagen公司和Sigma公司;HEK293和3T3细胞购自中国科学院上海细胞生物所;大鼠

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271343, 30470770)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30271343, 30470770)

作者简介:刘斌剑(1970-),男,重庆市人,硕士,主治医师,现在解放军第161中心医院工作。电话:(027)50169107,E-mail:lbj312@163.com

通讯作者:王建民,电话:(023)68767146,E-mail: jmwang@cta.cq.cn

收稿日期:2005-01-15;**修回日期**:2005-03-16

抗小鼠 FGFR2-Ⅲc 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体分别购自 R&D 公司和北京中山公司。

1.1.2　主要引物和荧光探针　　在 FGFR2-Ⅲc exon9 上设计引物：正义链：5′-GCATGGTTGACAGTTCTGCC-3′，反义链：5′-TGTCCGTGGTGTTAACACCG-3′；pAdEasy-1 腺病毒骨架引物：正义链：5′-CTGTGGACCGTGAGGATA-3′，反义链：5′-TGTTGGGCATAGATTGTT-3′，以上引物由上海申能博彩公司合成。FGFR2-Ⅲc 荧光 PCR 探针：5′-FAM-TGCTGGGGAATATACGTGCT-TAMARA-3′，探针用 Fam 荧光素和 Tamara 淬灭基团修饰，由上海生工生物公司合成并修饰。

1.2　方法

1.2.1　pSK-FGFR2-Ⅲc 质粒的构建　　通过 *Xba* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ两个酶切位点将 pRK5-FGFR2-Ⅲc 质粒中 FGFR2-Ⅲc 基因双酶切后，与 pSK 质粒连接，常规转化 DH5α 感受态细菌，形成 pSK-FGFR2-Ⅲc 质粒。该质粒经测序鉴定其构建的正确性。

1.2.2　腺病毒载体 pAd-Bek 的构建　　参照文献[4]将 pSK-FGFR2-Ⅲc 质粒和 pAdTrack-CMV 质粒分别进行 *Xba* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切，取 FGFR2-Ⅲc 也即 Bek 基因片段与穿梭质粒 pAdTrack-CMV 连接并于 DH10B 感受态细菌中电转化扩增，形成 pAdTrack-FGFR2-Ⅲc 质粒。用 PCR 及酶切双重鉴定正向插入的克隆，将鉴定正确的 pAdTrack-FGFR2-Ⅲc 质粒经 *Pme* Ⅰ线性化后，与重组用大肠杆菌 BJ5183 中的 pAdEasy-1 骨架载体通过同源重组形成 pAdEasy-Bek 质粒，挑选 >42 kb 者为候选克隆，用 FGFR2-exon9 f 引物与 AdEasy 骨架上的引物 AdEasy r 配对进行 PCR 和 *Bam*H Ⅰ酶切鉴定，准备转染 HEK293 细胞。

1.2.3　重组腺病毒在 HEK293 细胞中的包装及表达鉴定　　运用转染试剂盒 Lipofectamine2000，按使用说明，将 *Pac* Ⅰ酶切线性化的 pAdEasy-Bek 质粒导入 HEK293 细胞中，转染 7～15 d 后于荧光倒置显微镜观察 HEK293 细胞中 GFP 的荧光表达情况。

1.2.4　病毒扩增、纯化及效价测定　　HEK293 细胞于 75 cm^2 培养瓶中待 90% 的细胞融合后吸去培养液，取 100 μl 重组腺病毒保存液加入 1 ml DMEM 培养液，混匀后加入 HEK293 细胞中，培养 5 d 后，离心收集细胞，经过 -20 ℃和 37 ℃反复冻融 3 次使细胞完全破坏后，离心取上清即为病毒初提液。将病毒初提液经过氯化铯密度梯度离心，收集的病毒液即为纯化的病毒液。将病毒液用 DMEM 以 10^{-1}～10^{-12} 的浓度稀释，分别加入培养有 HEK293 细胞的 12 孔培养板中，培养 21 d，只观察 10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12} 4 个培养孔细胞生长情况，计数最低稀释度培养孔中病理效应细胞的数量，依据公式：（病理效应细胞数 × 稀释倍数）÷ 培养液体积 = PFU/ml，从而获得病毒效价。

1.2.5　Bek 腺病毒表达载体感染 3T3 细胞　　转基因组 3T3 细胞于 6 孔培养板中待 70%～80% 的细胞融合后吸去培养液，加入用 10 倍 DMEM 稀释的重组腺病毒液，对照组 3T3 细胞仅用 DMEM 培养，培养 72 h 后分别用荧光倒置显微镜观察转基因效果。

1.2.6　Bek 腺病毒表达载体转基因效果的观察　　将转基因组和对照组 3T3 细胞在培养 72 h 后分别运用 TriPure 提取试剂提取总 RNA，以 FGFR2 exon9 上的引物进行荧光定量 PCR 检测两组 FGFR2-Ⅲc mRNA 的表达情况。FQ-PCR 鉴定：FQ-PCR 的标准曲线参照文献[5]报道的方法制作，FQ-PCR 反应体系：1 μl DNA、5 μl 10 × buffer、1.5 mmol/L $MgCl_2$、200 μmol/L dNTP、4 μmol/L FGFR2-ⅢC 引物、2 μmol/L FGFR2-ⅢC 荧光探针、1 U *Taq* 酶。FQ-PCR 反应步骤：93 ℃ 2 min；93 ℃ 15 s，58 ℃ 1 min，40 个循环。每 1 次循环，PE5700 荧光定量 PCR 仪计数 1 次荧光值，40 次循环后自动累计荧光值并通过标准曲线计算出样本的拷贝数。

1.2.7　统计学分析　　计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.0 软件 t 检验。

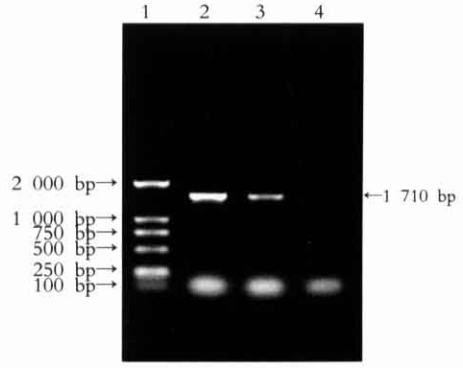
2　结果

2.1　pSK-FGFR2-Ⅲc 测序结果

由于 pRK5-FGFR2-Ⅲc 的质粒骨架多克隆位点区域没有公共引物用于测序，为鉴定 FGFR2-Ⅲc DNA 编码组成情况，故将 FGFR2-Ⅲc DNA 克隆到 pSK 质粒中，利用 pSK 的公共引物进行测序。结果表明，该 FGFR2-Ⅲc DNA 是从 FGFR2-Ⅲc exon3 到 exon15 区间的 DNA 片断，它涵盖编码了 FGFR2-Ⅲc 从胞外区 3 个 Ig 样结构域到胞内区 2 个酪氨酸激酶结构域的全部功能区，证明该 DNA 片断为 Bek 编码基因。

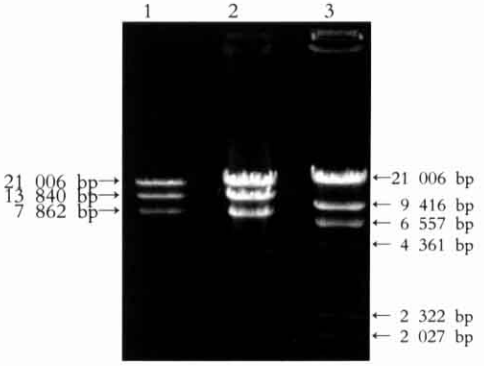
2.2　腺病毒载体 AdEasy-Bek 的构建及病毒效价测定

用 PCR 和 *Bam*H Ⅰ酶切同时鉴定 pAdEasy-Bek 质粒。PCR 阳性产物大小为1 710 bp，与理论大小（1 702 bp）一致（图 1）。将上述 PCR 筛选为阳性的菌落提取 pAdEasy-Bek 质粒，再用 *Bam*H Ⅰ酶切进一步确证其构建成功。酶切结果表明，该质粒切出与理论条带大小基本符合的 3 个条带，说明 pAdEasy-Bek 质粒构建成功（图 2）。



1：DNA 标准；2，3：以 FGFR2-exon9 f / AdEasy r 为引物进行 PCR；4：无阳性条带

图 1　PCR 筛选 pAdEasy-Bek 质粒菌落



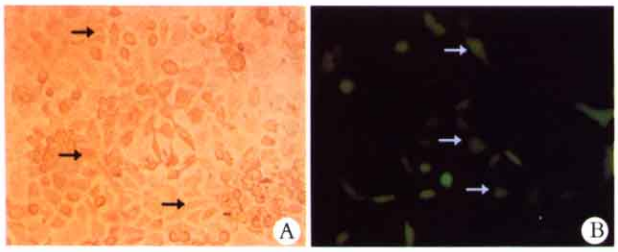
1，2：PCR 筛选为阳性的 pAdEasy-Bek 质粒；3：DNA 标准

图 2　*Bam*H Ⅰ酶切筛选 pAdEasy-Bek 质粒

AdEasy-Bek 腺病毒效价测定：培养 21 d 后，10^{-9} 孔的 HEK293 细胞观察到 46 个病理效应细胞，其它更低的浓度孔未发现病理效应细胞。依据公式可以计算出 AdEasy-Bek 腺病毒效为 2.3×10^{10} PFU/ml。

2.3 AdEasy-Bek 腺病毒在 3T3 中表达

AdEasy-Bek 腺病毒感染 3T3 细胞 72 h 后，可见感染后的 3T3 细胞形态完整，胞核清晰，相互间融合生长，没有因感染 AdEasy-Bek 腺病毒而出现死亡的现象（图 3A）。大量的 AdEasy-Bek 腺病毒在 3T3 细胞质内表达绿色荧光蛋白，使得 3T3 细胞在荧光显微镜下产生强烈的绿色荧光。表明此腺病毒载体成功地将 FGFR2-Ⅲc DNA 转基因到 3T3 细胞中，并使其表达（图 3B）。



A：自然光照片，部分 3T3 细胞没有感染上 AdEasy-Bek 腺病毒（箭头所示）；B：同一位置的荧光照片，3T3 细胞质产生强烈的绿色荧光（箭头所示）

图 3 AdEasy-Bek 腺病毒颗粒感染 3T3 细胞 （×400）

2.4 Bek 腺病毒表达载体转基因效果的测定

运用 FQ-PCR 技术对 AdEasy-Bek 腺病毒颗粒感染 3T3 细胞的转基因组与对照组的 Bek mRNA 表达情况进行定量分析，发现转基因组 Bek mRNA 表达为 $(5.17\pm0.77)\times10^{8}$ copies/μl，对照 Bek mRNA 表达为 $(7.02\pm1.13)\times10^{6}$ copies/μl。两组比较差异显著（$P<0.05$），说明 AdEasy-Bek 腺病毒颗粒转基因表达 Bek 效果显著。

3 讨论

4 种 FGFR 酪氨酸激酶受体与成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）超家族的 22 个 FGF 配体具有不同的亲和性和特异性[3]。配体结合受体的特异性由受体胞外结构域的特异性和编码受体胞外区第 3 个 Ig 样环型结构的 C-端的不同外显子的剪接形式控制[6]。除 FGFR4 以外，FGFR1、2、3 均有不同的 mRNA 剪接体，一般地，外显子Ⅲb 表达在上皮细胞系的膜表面，而外显子Ⅲc 则表达在间质细胞细胞系的膜表面[7]。FGFR2 具有组织特异性，其产生于上皮细胞的变构体为 FGFR2-Ⅲb，而产生于间质细胞的变构体为 FGFR2-Ⅲc[5]。配体结合研究表明，FGF-7、10 可激活 FGFR2-Ⅲb，FGF2、4、6、8、9 激活 FGFR2-Ⅲc。FGFR2-Ⅲc 对成骨细胞的分化作用不大，但能刺激成骨细胞的增生并保持其增殖功能[8]。为明确 FGFR2-Ⅲc 在成骨过程中扮演的具体角色，本研究构建了 FGFR2-Ⅲc 腺病毒表达载体，并以此为工具探索成骨机制。

由于本研究选择了 AdEasy 腺病毒表达载体系统，它表达的绿色荧光蛋白有助于我们很直观地观察靶细胞的荧光情况，便于我们区别感染和未感染上 AdEasy-Bek 腺病毒转基因载体的 3T3 细胞。从形态上判断出转基因效果。因此，对照自然光和荧光照片，可以发现不是所有的 3T3 细胞都感染上了 AdEasy-Bek 腺病毒，这说明此腺病毒载体真实的将 FGFR2-Ⅲc DNA 转基因进入 3T3 细胞，达到了预期的转基因效果。运用 FQ-PCR 定量检测转染前后 3T3 细胞表达 Bek mRNA 的差异。实验结果表明，由于转基因作用，3T3 细胞转基因组的 Bek mRNA 表达明显高于对照组（$P<0.05$），这说明 Bek 腺病毒载体在体外细胞培养的转基因效果是明显的，AdEasy-Bek 腺病毒表达载体能成功地将 FGFR2-Ⅲc 编码基因转入靶细胞中，使靶细胞 FGFR2-Ⅲc 的 mRNA 表达水平得以提高，证明该表达载体具备转基因能力，为研究骨骼发育和成骨机制打下了基础。

参考文献：

[1] ORNITZ D M, XU J, COLVIN J S, *et al*. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family[J]. J Biol Chem, 1996, 271(25): 15292－15297.

[2] ORR URTREGER A, BEDFORD M T, BURAKOVA T, *et al*. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2)[J]. Dev Biol, 1993, 158(2): 475－486.

[3] ORNITZ D M, ITOH N. Fibroblast growth factors[J]. Genome Biol, 2001, 2(3): reviews 3005.

[4] HE T C, ZHOU S, DA COSTA L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509－2514.

[5] 李 影，何蕴韶，程 刚，等. 用荧光定量 PCR 方法检测转染细胞中外源基因的拷贝数[J]. 中山医科大学学报，2001，22(1)：8－10.

[6] NASKI M C, ORNITZ D M. FGF signaling in skeletal development[J]. Front Biosci, 1998, 3: D781－D794.

[7] GILBERT E, DEL GATTO F, CHAMPION ARNAUD P, *et al*. Control of BEK and K－SAM splice sites in alternative splicing of the fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(9): 5461－5468.

[8] YU K, XU J, LIU Z, *et al*. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth[J]. Development, 2003, 130(13): 3063－3074.

（编辑 薛国文）