论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0880-03

大鼠微管相关蛋白4重组腺病毒载体的构建及在细胞中的表达鉴定

房亚东[1],徐 雪[2],党永明[1],郑 霁[1],张西联[1],张家平[1],陈 渝[1],张 琼[1],黄跃生[1] ([1]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]成都军区总医院普通外科,成都 610083)

提 要:目的 构建大鼠微管相关蛋白4(microtubule-ossociated protein 4, MAP4)重组腺病毒载体,并转染新生大鼠体外培养的心肌细胞进行表达和鉴定,为真核表达及有关实验研究提供基础。**方法** 设计1对引物,应用逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)技术,从大鼠心肌细胞总mRNA中扩增出MAP4 cDNA,并将MAP4 cDNA克隆到腺病毒穿梭质粒pShuttle2中,构建pShuttle2-MAP4表达质粒。将此表达质粒扩增纯化酶切获得含有目的片段MAP4 cDNA的表达盒与Adeno-X Virul DNA重组并线性化后转染HEK293T细胞,包装产生大鼠MAP4重组腺病毒。并且转染新生大鼠原代心肌细胞,应用免疫组化的方法进行表达鉴定。**结果** 扩增所得的MAP4 cDNA片段经酶切鉴定、PCR扩增、DNA测序最终确定为大鼠MAP4基因,所得大鼠MAP4重组腺病毒滴度为2.3×10^8 pfu/ml。转染原代心肌细胞48 h后MAP4表达显著增强。**结论** 为研究MAP4的生物学活性及功能的基因治疗提供了基础。

关键词: MAP4;腺病毒;cDNA;微管相关蛋白

中图法分类号: Q51; Q782; Q786 **文献标识码**: A

Construction and identification of Rattus norvegicus microtubule-associated protein 4 gene recombinant adenovirus

FANG Ya-dong[1], XU Xue[2], DANG Yong-ming[1], ZHENG Ji[1], ZHANG Xi-lian[1], ZHANG Jia-ping[1], CHEN Yu[1], ZHANG Qiong[1], HUANG Yue-sheng[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of General Surgery, General Hospital of Chengdu Military Command Area, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective To construct recombinant adenovirus vector containing Rattus norvegicus microtubule-associated protein 4 gene, and transfect it into the rat cardiac myocytes cultured *in vitro*. **Methods** A pair of primers were designed, and full length MAP4 DNA was cloned from rat total mRNA by PCR. The PCR product was double-digested with restriction endonucleases *Nhe* Ⅰ and *Noc* Ⅰ, and inserted orientationally into pShuttle2. The plasmid of pShuttle2-MAP4 was double-digested with restriction endonucleases *Nhe* Ⅰ and *Noc* Ⅰ, and inserted BD Adeno-X™ Virul DNA, named pAd2-MAP4. The non-recombinant adenovirus was screened out with *Pac* Ⅰ, pAd2-MAP4 was linerized with *Swa* Ⅰ, and the recombinant virus genome was transfected into HEK293 cell line for packaging and amplification of Ad-MAP4 virus. The recombinant adenovirus was transfected into rat cardiac myocytes and MAP4 was identified by immunohistochemistry. **Results** The recombinant adenovirus-MAP4 was constructed successfully and the titer was about 2.3×10^8 pfu/ml. The expression of MAP4 was enhanced at 48 h after the transfection. **Conclusion** We have successfully constructed a recombinant adenovirus Ad-MAP4 that has enforced the expression of MAP4 *in vivo*.

Key words: MAP4; adenovirus; cDNA; microtubule associated protein

在真核细胞内,微管细胞骨架在胞内物质构成,胞内物质运输,细胞运动,细胞极化,有丝分裂等方面发挥着作用。微管参与调节组织细胞的上述活动,并不断地在聚集态和解离态之间循环,即微管的动态不稳定性。微管在稳定状态下的功能受到微管相关蛋白(MAPs)的调节[1,2]。微管相关蛋白包含一个C末端的微管绑定区域,这个区域由3~5个含有18个氨基酸基序的不完全重复片段构成。tau蛋白和MAP2只

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB522601);国家自然科学基金资助重点项目(30430451)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522601) and the National Natural Science Foundation of China (30430451)

作者简介:房亚东(1979-),男,山西省太原市人,硕士研究生,主要从事烧伤后早期损害的防治方面的研究。电话:(023)68754148-8090

通讯作者:黄跃生,电话:(023)68754173, E-mail:yshuang@public.cta.cq.cn

收稿日期:2005-12-27;**修回日期**:2005-01-18

特异性的表达于神经细胞，MAP4 是表达于哺乳动物非神经细胞的主要微管相关蛋白。它的活性及与微管的相互作用受到微管亲和调节激酶（MARK）和微管调节蛋白（mapmodulin）的调节。MARK 所引起的 MAP4 在其 KXGS 基序的磷酸化会导致 MAP4 从微管脱离和微管的解离。此外，mapmodulin 紧密地与 MAP4 的微管绑定区域结合从而妨碍 MAP4 与微管的结合。因此，MAP4 是高效调控微管聚集和解离的Ⅱ型微管相关蛋白[3]。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　质粒，菌株和细胞　质粒克隆载体 pMD-18T（TaKaRa，大连）；大肠杆菌菌株 DH5α，重组腺病毒包装用 HEK293T 细胞由本室保存；新生大鼠原代心肌细胞由本室分离，培养。

1.1.2　酶及主要生化试剂　限制性内切酶，T_4 连接酶，LA *Taq* DNA 聚合酶（TaKaRa，大连）；腺病毒载体系统 BD Adeno-X™ Expression System 1（BD Biosciences Clontech）；mRNA 提取试剂 Trizol（Invitrogen）；质粒 DNA 抽提试剂盒（Omega）；DMEM 培养基，胎牛血清（Hyclone）；anti-MAP4 单克隆抗体（BD Biosciences Pharmingen）；FITC 标记山羊抗小鼠二抗（北京鼎国生物技术公司）。

1.1.3　引物和测序　参照 GenBank 登录的大鼠 MAP4 基因序列，自行设计引物 1 对，由上海生工生物工程公司合成，上游引物：5′-CGCCCCTCCGGCTAGCTCTGTG-3′，下游引物：5′-GGGCCACCAGGGAAGTGGGGA-3′，产物 3 497 bp。DNA 测序工作也由该公司完成。

1.2　方法

1.2.1　细菌感受态的制备，质粒提取，纯化，酶切，连接及转化　参照文献[4]的方法进行。

1.2.2　心肌细胞总 RNA 提取　依照 Trizol 试剂说明书中的步骤提取程序进行 RNA 提取，并融于 100 μl 去离子水中。取 10 μl 所提 RNA 稀释至 2 ml 用分光光度计测 $D(260)/D(280)=1.8$，总量 $=0.083\times200\times40=664$ ng/μl，纯量和量都满足要求。

1.2.3　MAP4 cDNA 的克隆、扩增制备　根据所设计的引物，扩增反应体系应用如下反应条件 94 ℃，5 min；94 ℃ 20 s，60 ℃ 20 s，72 ℃ 3 min 30 s，32 个循环；72 ℃ 延伸 7 s。扩增结束后取 2 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，鉴定 PCR 产物的大小，并及时回收 PCR 产物。室温 30 s 连接 PCR 产物至 TaKaRa 公司的 pMD-18T 载体中，转化 DH5α 感受态，LB 平板上长出克隆后，随机挑选克隆，碱裂解法小量抽提质粒 DNA，以 *Nhe*Ⅰ，*Nco*Ⅰ双酶切鉴定结果，将酶切鉴定正确的阳性克隆命名为 T-MAP4。

1.2.4　构建重组穿梭质粒 pShuttle2-MAP4　将 T-MAP4 用 *Nhe* Ⅰ，*Nco* Ⅰ分步双酶切后将 MAP4 cDNA 亚克隆到穿梭质粒 pShuttle2 中，在含有卡那霉素抗性的 LB 平板上培养出克隆后。随即挑选克隆，碱裂解法小量抽提质粒 DNA，以 *Nhe* Ⅰ，*Kpn* Ⅰ双酶切鉴定结果，应用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，鉴定正确的阳性克隆命名为 pShuttle2-MAP4。

1.2.5　构建重组腺病毒载体　大量制备 pShuttle2-MAP4 和用来进行平行对照实验的 pShuttle2-LacZ（试剂盒中提供），以 I-Ceu 和 PI-Sce 双酶切穿梭质粒和 Adeno-X Virul DNA，用 DNA 连接酶将连接目的片段与腺病毒基因组[5]。连接完成后用 *Swa* Ⅰ酶切线性化淘汰非重组产物，成功的重组产物转化 DH5α 感受态，在 LB/Amp$^+$ 平板上长出克隆后，随机挑取克隆。用试剂盒内提供的特异的引物和 MAP4 自身的引物进行 PCR 鉴定。将鉴定正确的阳性克隆命名为 pAd2-MAP4 质粒和 pAd2-LacZ 质粒。

1.2.6　重组腺病毒液的制备　HEK293 细胞以 1×10^5 接种于 6 cm 培养皿，待长至 50% ~ 70% 融合时，以脂质体法进行转染，以 PBS 清洗细胞 1 遍后，分别加入 30 μl 脂质体，pAd2-MAP4，pAd2-LacZ 的 *Pac* Ⅰ酶切线性化产物 5 μg，每孔补足含 5% 胎牛血清的 DMEM 至 2 ml，3 h 补足培液至 4 ml，继续培养，约 10 ~ 14 d 后出现细胞病理效应，即原来贴壁的细胞变圆、脱落。5 000 r/min 离心收集病理细胞，加入 500 μl PBS，-20 ℃ ~ 37 ℃ 反复冻融 3 次，即为细胞裂解液，-70 ℃ 保存备用。另取 2 μl 细胞裂解液用前述方法进行 PCR 鉴定[6]。

1.2.7　重组腺病毒的扩增　接种条件同上，加入上述制备的重组腺病毒液 250 μl/皿，病毒吸附 2 ~ 3 h 后，加入含 5% 胎牛血清的 DMEM，约 5 ~ 7 d 后出现 CPE，将细胞刮落后与培养液一起离心去除上清，将细胞沉淀重悬于适量 PBS 中，反复冻融 3 ~ 5 次后，-70 ℃ 保存[7]。

1.2.8　病毒滴度测定　293 细胞以 1×10^5 每孔接种于 6 孔板，24 h 后依次加入按 10 倍倍比稀释的待测病毒 200 μl/孔，每个浓度设复孔，并设对照。37 ℃ 感染 60 min 后，每孔加 2 ml 含 0.5% 琼脂糖的 DMEM（10% 胎牛血清），37 ℃，5% CO_2 培养，7 ~ 10 d 后出现噬斑，按以下公式计算病毒滴度：病毒滴度（pfu/ml）= 噬斑数/稀释倍数 × 每孔加入病毒体积。

1.2.9　重组腺病毒 Adeno-MAP4 转染新生大鼠原代心肌细胞的实验　取新生大鼠心脏组织，剪为 1 ~ 3 mm 大小的组织块，用 0.1% 胰酶消化 5 min 后，终止反应，取上清离心收集细胞，以 1×10^5/孔的密度接种于 6 孔板（孔内铺灭菌盖玻片一张），37 ℃，5% CO_2 培养 48 h 后弃培养液，将 Adeno-MAP4 以感染复数（MOI）30 感染细胞，2 h 后补足含 10% 胎牛血清的 DMEM，每一 MOI 设复孔，另设空白对照。37 ℃，5% CO_2 培养 48 h，细胞漂洗固定，用 3% 牛血清白蛋白组分Ⅴ进行封闭，一抗（1∶500）于 4 ℃ 下孵育过夜，漂洗后用 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗（1∶300）室温下孵育 1 h，漂洗后于倒置荧光显微镜下进行的检测。

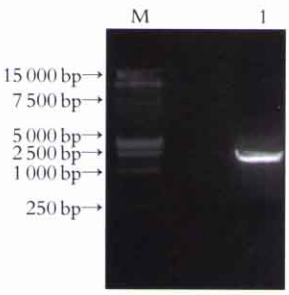
2　结果

2.1　质粒载体的构建

应用 PCR 方法将大鼠 MAP4 基因，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳，可见约在 3 500 bp 处有一特异性条带，与预期的结果一致（图 1）。将该目的片段连入 T 载体后，转化 DH5α，随机挑取两个克隆，经 *Nhe* Ⅰ，*Nco* Ⅰ双酶切鉴定，测序，结果证实重组质粒 T-MAP4 构建正确（图 2）。将含目的基因的片段与穿梭质粒 pShuttle2 重组，转化 DH5α，随机挑取 3 个克隆，经 *Nhe* Ⅰ，*Kpn* Ⅰ双酶切鉴定，均证实重组质粒 pShuttle-MAP4 构建正确。

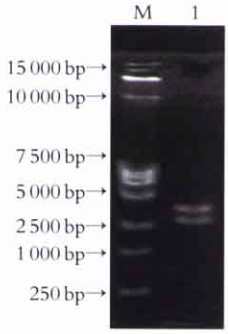
2.2　包装及扩增后的病毒滴度检测

pAd2-MAP4 与 pAd2-LacZ 经 293 细胞包装后产生的 Adeno-MAP4 和 Adeno-lacZ 病毒，测定滴度均为 1.3×10^7 pfu/ml，扩增后的滴度达到 2.3×10^8 pfu/ml。



M：DL15000 标准；1：PCR 产物

图1 PCR 扩增结果电泳分析

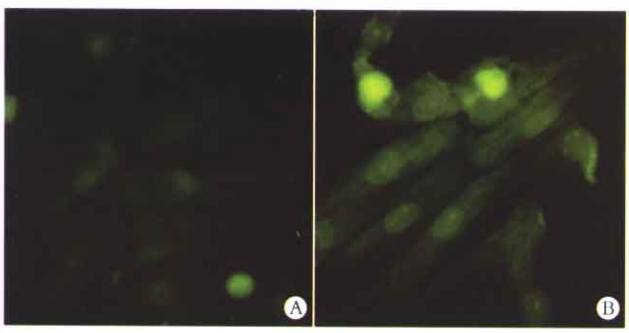


M：DL15000 标准；1：T-MAP4

图2 T-MAP4 限制酶切分析

2.3 重组腺病毒 Adeno-MAP4 转染新生大鼠原代心肌细胞的免疫组化鉴定

重组腺病毒载体 Adeno-MAP4 和 Adeno-LacZ 以安全感染复数(MOI)30[10]，感染新生大鼠心肌细胞，48 h 后漂洗固定，运用免疫组化技术，在倒置荧光显微镜下看到 Adeno-MAP4 感染心肌细胞后荧光强度明显比阴性对照组增高，说明 MAP4 重组腺病毒载体成功构建并有效表达，见图3。



A：Adeno-LacZ；B：Adeno-MAP4

图3 感染 48 h 后大鼠心肌细胞免疫荧光染色

(倒置荧光显微镜 ×400)

3 讨论

本实验中，大鼠 MAP4 基因的成功克隆和腺病毒表达载体的构建，为在细胞骨架等相关领域的研究中利用更为恰当的生物分子进行实验提供了充分的准备。复制缺陷型腺病毒载体，不整合宿主细胞染色体，转染谱广，转染效率高，可制备获得高滴度，在生物实验尤其是细胞实验中副作用小，安全可靠。在腺病毒载体表达系统的选择上，本实验选择了目前较先进的 BD Adeno-X™ Expression system 1，携带的目的基因只有蛋白质编码区，而无启动子等其他元件。MAP4 是表达于哺乳动物非神经细胞的主要微管相关蛋白。它的活性及与微管的相互作用受到微管亲和调节激酶(MARK)和微管调节蛋白(mapmodulin)的调节。MARK 所引起的 MAP4 在其 KXGS 基序的磷酸化会导致 MAP4 从微管脱离和微管的解离。此外，mapmodulin 紧密地与 MAP4 的微管绑定区域结合从而妨碍 MAP4 与微管的结合。MAP4 的过度表达能够刺激细胞微管蛋白二聚体总量的增加[8]。另外，有研究报道，在哺乳动物受到外界精神刺激增大的同时，动物海马回部分会出现 MAP4 mRNA 的表达[9]，虽然 MAP4 重新在成年动物中枢神经系统内开始表达的具体机制尚且不明朗，但是这种现象提示，在哺乳动物应激状态下，MAP4 参与了中枢神经系统的调节，进而对应激状态发挥了作用。因此，MAP4 不仅仅是高效调控微管聚集和解离的Ⅱ型微管相关蛋白，在机体应激反应方面也可能发挥着重要作用。

参考文献：

[1] CHAPIN S J, LUE C M, YU M T, *et al*. Differential expression of alternatively spliced forms of MAP4: a repertoire of structurally different microtubule-binding domains[J]. Biochemistry, 1995, 34(7): 2289 - 2301.

[2] ULITZUR N, HUMBERT M, PFEFFER S R. Mapmodulin: a possible modulator of the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(10): 5084 - 5089.

[3] DREWES G, EBNETH A, PREUSS U, *et al*. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption[J]. Cell, 1997, 89(2): 297 - 308.

[4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京：科学技术出版社, 1993: 34 - 36.

[5] BECKER T C, NOEL R J, COATS W S, *et al*. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells[J]. Methods Cell Biol, 1994, 43PtA: 161 - 189.

[6] BUTTGEREIT P, WEINECK S, ROPKE G, *et al*. Efficient gene transfer into lymphoma cells using adenoviral vectors combined with lipofection[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(8): 1145 - 1155.

[7] YAO Q, WANG S, GLORIOSO J C, *et al*. Gene transfer of p53 to arthritic joints stimulates synovial apoptosis and inhibits inflammation [J]. Mol Ther, 2001, 3(6): 901 - 910.

[8] CALAGHAN S C, LE-GUENNEC J Y, WHITEA E. Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2004, 84(1): 29 - 59.

[9] YANG H J, LI Y F, ZHANG H T, *et al*. Up-regulation of microtubule-associated protein 4 and drebrin A mRNA expression by antidepressants in rat hippocampus following chronic stress[J]. Neurosci Lett, 2003, 351(3): 206 - 208.

[10] 李晓鲁，彭毅志，袁志强，等. 热休克蛋白70基因重组腺病毒载体微胶囊化及口服转染的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(3): 145 - 147.

(编辑 陈聪连)