文章编号:1000-5404(2006)17-1765-03

论著

连环蛋白P120基因重组腺病毒载体的构建及表达

张 毅,杨占宇,朱 瑾,杨世忠,李晓武,董家鸿 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 构建携带HA-tag的连环蛋白P120(P120ctn)基因重组腺病毒载体,并观察腺病毒感染后P120ctn在HepG-2细胞中的表达情况。**方法** 把HA-tag和P120ctn基因克隆入腺病毒穿梭载体pAdTrack-CMV中,与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1共转染大肠杆菌BJ5183,获得腺病毒重组质粒。再将获取的腺病毒重组质粒转染入293细胞进行包装,获取P120ctn重组腺病毒并进一步感染HepG-2细胞株。**结果** P120ctn基因成功克隆到腺病毒载体中,该腺病毒可高效介导P120ctn在HepG-2细胞中表达。**结论** 成功地构建了含P120ctn基因的重组腺病毒载体,为进一步研究其功能奠定了基础。

关键词:腺病毒载体;P120ctn;基因
中图法分类号:Q513;Q782;Q785 **文献标识码**:A

Construction and expression of a recombinant adenovirus vector containing P120ctn gene

ZHANG Yi, YANG Zhan-yu, ZHU Jin, YANG Shi-zhong, LI Xiao-wu, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant adenovirus vector containing P120ctn gene (C-terminal HA-tag) and observe expression of P120ctn in HepG2 cell line after P120ctn adenovirus infection. **Methods** HA-tag and P120ctn cDNA from plasmid were subcloned into pAdTrack-CMV vector. The resultant plasmid was linearized and subsequently cotransformed into *E. coli*. BJ5183 containing adenovirus backbone plasmid pAdEasy-1. The adenovirus vector was then transferred into 293N cells by liposome to get recombinant adenovirus particles. Finally, P120ctn adenovirus were used to infect HepG-2 cell line. **Results** P120ctn cDNA was successfully inserted into the adenovirus vector and the recombinant adenovirus encoding P120ctn cDNA was obtained from this vector. It could infect HepG2 cell line with high efficiency. **Conclusion** The recombinant adenovirus encoding p120ctn cDNA was successfully constructed, which provides a foundation for the future study.

Key words: adenovirus vector; P120ctn; gene

上皮钙粘连素(E-cadherin)的主要生物学功能是介导同种细胞间粘附,其表达缺失与肿瘤细胞的转移密切相关。E-cadherin通过α-catenin、β-catenin与细胞骨架连接,P120ctn则结合在E-cadherin胞内肽段近膜端。

正常情况下P120ctn主要分布在细胞膜上。但目前发现在结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、胰腺癌等十几种肿瘤中,均有不同程度的P120ctn细胞膜表达减少或缺失,并常伴有细胞质的异常分布[1]。业已证实细胞质分布的P120ctn可以经Rho A途径的活化而诱导肿瘤细胞的侵袭活性[2]。

近年还发现P120ctn是核内转录抑制因子kaiso的唯一结合蛋白[3],提示P120ctn可能参与调控某些基因的表达。最近已经证实P120ctn可以通过与Kaiso的结合关系,参与Wnt通路中wnt11基因的调控,在脊椎动物胚胎发育的原肠胚形成中起着关键作用[4]。而P120ctn是否参与某些癌基因的调控,尚待进一步研究。

本实验旨在构建携带P120ctn基因(HA标记)的重组腺病毒载体,为进一步探讨P120ctn在肿瘤转移中的作用机制提供可靠的基因转移工具。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞株和菌株

含有目的基因P120ctn的pRcCMV-p120-1A由Albert. B. Reynolds教授(Vanderbilt University, USA)惠赠;大肠杆菌DH5α、DH10B、BJ5183、腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV(含GFP)、骨架质粒pAdEasy-1(在BJ5183中)、对照腺病毒Ad-GFP、人胚肾293细胞(293N)均为西南肝胆外科实验室保存;肝癌细胞株HepG-2来自American Type Culture Collection (ATCC)。

作者简介:张 毅(1975-),男,重庆市人,硕士,医师,主要从事肝细胞癌侵袭、转移的分子机制方面的研究。电话:(023)68765813
通讯作者:董家鸿,电话:(023)68754168
李晓武,电话:(023)68754168
收稿日期:2006-04-06;修回日期:2006-06-05

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ和 T_4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品；限制性内切酶 *Pac* Ⅰ和 *Pme* Ⅰ为 New England Biolab 公司产品；质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒为 Omega 公司产品；H-DMEM 培养基及胎牛血清为 Hyclone 公司产品；脂质体转染试剂 Transfast Transfection Reagent 为 Promega 公司产品；小鼠抗 HA 单克隆抗体 anti-HA 为北京天根生化科技公司产品。

1.3 目的基因 P120ctn 的鉴定

将 pRcCMV-p120-1A 转化到 DH5α 感受态，氨苄青霉素抗性筛选，挑取克隆，扩增，提取质粒，将提纯的质粒送上海生工生物技术有限公司测序；测序结果证实 P120ctn cDNA 序列完全正确；通过 Premier 5.0 软件分析，发现用限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ和 *Kpn* Ⅰ可以将该质粒切为 1.1 kb（*Bgl* Ⅱ/ *Bgl* Ⅰ）、2.5 kb（*Bgl* Ⅱ/ *Kpn* Ⅰ）、4.6 kb（*Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ）三段。其中 2.5 kb 的片段包含了完整的 P120ctn3A 亚型，而且 *Bgl* Ⅱ/*Kpn* Ⅰ的酶切位点适合克隆到 pAdtrack-cmv 中。

1.4 pAdtrack-cmv- HA 载体构建

为方便后续实验，设计在 P120ctn 的 C 端加入分子标记 HA-tag（HA 单链 1：CATGCTCTACCCATACGATGTTCCTGACTATCTCGAGTATCCATATGACG TTCCAGATTACTAAGCA；HA 单链 2：CATGGTACGAGATGGGTATGCTACAAGGACTGATAGAGCTCATAGGTATACTGCAAGGTCTAATGATTCGTTCGA）。两条单链聚合后，两端形成 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切位点，便于克隆到 pAdtrack-cmv 的 *Kpn* Ⅰ与 *Hind* Ⅲ之间。分子标记 HA-tag 交由上海生工生物技术有限公司合成。

HA-tag 互补的两条单链各取 1 μg，用 T4 连接酶附带的 Ligase buffer 作为反应 buffer，经退火后形成双链。反应条件如下：94 ℃ 2 min→68 ℃ 10 min→37 ℃ 10 min（在 PCR 仪上操作）。

腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 经 Kpn 和 Hind 双酶切，胶回收，克隆入分子标记 HA-tag，形成 pAdtrack-cmv- HA，并用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 pAdtrack-cmv- P120ctn-HA 载体构建

测序正确的 pRcCMV-p120-1A 用 *Bgl* Ⅱ和 *Kpn* Ⅰ双酶切，回收约 2.5 kb 的片段，克隆到同样经 *Bgl* Ⅱ和 *Kpn* Ⅰ双酶切的 pAdtrack-cmv- HA，形成 pAdtrack-cmv- P120ctn-HA，并用 *Bgl* Ⅱ和 *Kpn* Ⅰ酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.6 pAdtrack-cmv-P120ctn-HA 与 pAdeasy 重组

将鉴定正确的 pAdtrack-cmv-P120ctn-HA 质粒用 PmeI 酶切线性化，转化至包含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的感受态 BJ5183 菌。卡那霉素选择性培养基筛选阳性克隆，选择最小的克隆扩增培养，提纯质粒。用 *Pac* Ⅰ酶切鉴定质粒，鉴定成功的重组子再次转化感受态 DH10B，筛选阳性克隆并提取纯化，得到含 P120ctn 基因的重组腺病毒质粒，命名为 AdP120ctn-HA。

1.7 重组腺病毒的包装、鉴定、扩增、纯化

①包装细胞的培养：25 cm^2 培养瓶，含 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养基，37℃、5% CO_2 培养箱中培养 293N 细胞，细胞汇合至 70% ~ 80% 时转染。②重组质粒 AdP120ctn-HA 转染 293N 细胞：约 5 μg 的 AdP120ctn-HA 质粒用 *Pac* Ⅰ酶切线性化，酚氯仿抽提后重新溶解在 20 μl 的去离子水中，按照 Promega 说明书转染包装细胞，37℃、5% CO_2 培养箱中孵育，24 h 后在荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白（GFP）的表达。③每日观察细胞生长和病变状况，7 d 后包装细胞出现变圆、脱壁甚至呈“葡萄串”样等典型的病变效应（CPE），将细胞及其上清收集到 15mL 离心管中，反复冻融 3 次收获病毒。④反复进行上述“收集病变细胞—冻融裂解—感染另一批 293N 细胞”的过程，大量扩增病毒。⑤CsCl 梯度离心法纯化病毒。

1.8 重组腺病毒滴度的测定

将纯化的病毒液按不同比例稀释，取 200 μl 稀释液加至 6 孔板培养的 293N 细胞中，继续培养 36 h，在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数。病毒滴度（pfu/ ml）= GFP 阳性细胞数 × 稀释倍数/ 0.5 ml 计算。

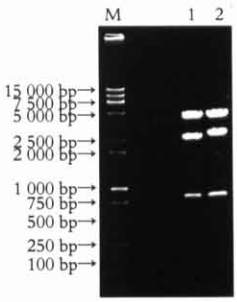
1.9 重组腺病毒感染 HepG-2 细胞株

用制备的重组腺病毒感染肝癌细胞株 HepG-2，在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况，确定感染效率；以抗体 anti-HA 通过 Western Blot 的方法检测目的基因 P120ctn 在肝癌细胞的表达情况。

2 结果

2.1 目的基因 P120ctn 的鉴定

pRcCMV-p120-1A 质粒经 *Bgl* Ⅱ和 *Kpn* Ⅰ酶切可以得到约 1 kb（*Bgl* Ⅱ/*Bgl* Ⅱ）、2.5 kb（*Bgl* Ⅱ/*Kpn* Ⅰ）、4.6 kb（*Kpn* Ⅰ/*Bgl* Ⅱ）3 个片段。其中 2.5 kb 的片段包含了完整的 P120ctn3A 亚型（图 1）。基因测序结果提示 pRcCMV-p120-1A 质粒包含的 P120ctn 基因序列完全正确。



M：DNA 标准；1，2：pRcCMV-p120-1A

图 1 pRcCMV-p120-1A 酶切鉴定

2.2 pAdTrack-CMV-HA 的鉴定

pAdTrack-CMV-HA 用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切。由于 HA-tag 连接到 pAdtrack-cmv 后 *Sal* Ⅰ酶切位点消失，而 pAdTrack-CMV 质粒上的 *Eco*R Ⅰ酶切位点距多克隆位点约 4 kb，所以没有切出约 4 kb 的片段即表明 HA-tag 成功连接到 pAdTrack-CMV（图 2）。

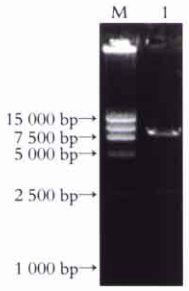


M：DNA 标准；1：pAdtrack-cmv；2：pAdtrack-cmv-HA

图 2 pAdtrack-cmv- HA 酶切鉴定

2.3　重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-P120-HA

重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-P120-HA 用 *Bgl* Ⅱ 和 *Kpn* Ⅰ 双酶切,可以得到约 9 kb 和 2.5 kb 两个片段,证明插入片段正确(图 3)。

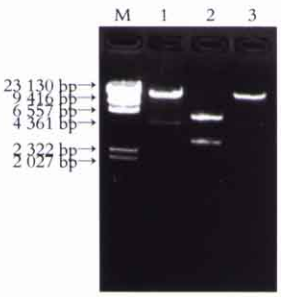


M:DNA 标准;1: pAdtrack-cmv-P120ctn-HA

图 3　pAdtrack-cmv-P120ctn-HA 酶切鉴定

2.4　穿梭质粒和骨架质粒同源重组的鉴定

用 *Pac* Ⅰ 酶切同源重组后的质粒 AdP120ctn-HA,得到约 33 kb 和 4.5 kb 两个片段,证实穿梭质粒和骨架质粒同源重组成功(图 4)。

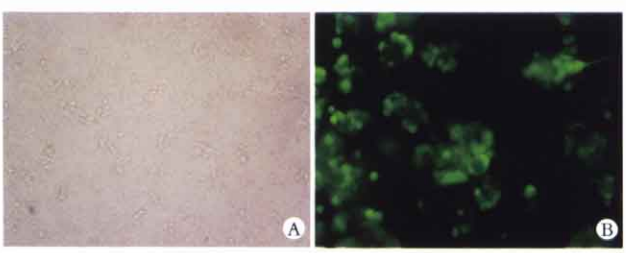


M:DNA 标准;1、3: AdP120ctn-HA 重组成功;2:重组失败

图 4　AdP120ctn-HA 酶切鉴定

2.5　重组腺病毒的包装、纯化与滴度测定

含重组腺病毒的质粒转染包装细胞 293N,24 h 后即可在荧光显微镜下观察到绿色荧光,7 d 后包装细胞出现典型的细胞病变效应(CPE)(图 5)。病毒滴度测定为 1.87×10^{9} pfu/ml。

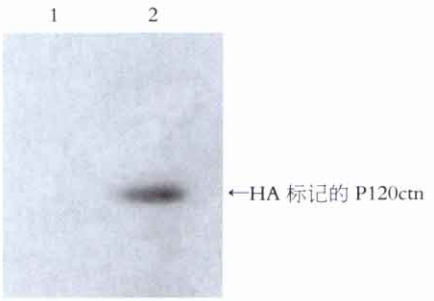


A:正常贴壁的 293N 细胞　(×250);B:转染后 7 d 出现 CPE　(荧光显微镜×400)

图 5　pAd-P120ctn-HA 转染 293N 细胞

2.6　Western Blot 检测 P120ctn 基因在 HepG-2 细胞株中的表达

重组 P120ctn 腺病毒感染肝癌细胞株 HepG-2 后,可以在荧光显微镜下看到 GFP 表达,感染效率达到 100%。利用抗体 anti-HA,通过 Western Blot 可以检测到 P120ctn 表达(图 6)。



1: No P120ctn-HA; 2: P120ctn-HA

图 6　Western blot 鉴定 HepG2 细胞中 P120ctn 的表达

3　讨论

腺病毒载体作为外源性 DNA 转入真核细胞的工具,具有载体包装容量大、不与宿主细胞的染色体整合等许多优点[5]。本实验所使用的 AdEasy 腺病毒载体系统是一种利用细菌进行重组的腺病毒系统,跟早期腺病毒系统相比,还具有如下优点:腺病毒质粒的同源重组在细菌中高效进行,从根本上克服了细胞内同源重组率低的缺陷;②腺病毒中可插入 10kb 的基因片段或同时插入多个基因片段;③腺病毒骨架中含 GFP 报告基因,便于监测病毒包装是否成功以及检测病毒滴度和感染效率等[6]。

本实验成功构建了携带分子标记 HA-tag 的 P120ctn 基因重组腺病毒载体,为进一步研究 P120ctn 在肿瘤转移中的作用提供了可靠的基因转移工具。

参考文献:

[1] THORESON M A, REYNOLDS A B. Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression[J]. Differentiation, 2002, 70(9-10): 583-589.

[2] ANASTASIADIS P Z, MOON S Y, THORESON M A, *et al*. Inhibition of RhoA by p120 catenin[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(9): 637-644.

[3] KELLY K F, SPRING C M, OTCHERE A A, *et al*. NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 13): 2675-2686.

[4] KIM S W, PARK J I, SPRING C M, *et al*. Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(12): 1212-1220.

[5] SEINO K, KAYAGAKI N, OKUMURA K, *et al*. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand[J]. Nat Med, 1997, 3(2): 165-170.

[6] 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.

(编辑　薛国文)