论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1694-04

APE/Ref-1 基因重组腺病毒的构建表达和鉴定

姜振东[1],魏运军[1],张学渊[1],邓凤莲[2],卓贤露[3] ([1]第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038; [2]重庆医科大学生物工程系,重庆 400016; [3]贵阳医学院附属医院耳鼻咽喉科,贵阳 550004)

提 要: 目的 构建表达氧化还原因子-1(APE/Ref-1)基因的复制缺陷型重组腺病毒,为进一步研究 APE/Ref-1 在耳蜗螺旋神经节氧化损伤病理过程中的作用机制提供实验基础。**方法** 应用 RT-PCR 技术从大鼠脑组织总 RNA 克隆出 APE/Ref-1 基因,将 APE/Ref-1 基因定向克隆到穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上,经与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠埃希菌 BJ5183 内同源重组后,转染 293 细胞进行包装,并反复感染 293 细胞进行扩增。对其进行安全性、滴度以及活性等检测。采用 Western blot 对 APE/Ref-1 蛋白表达进行检测和鉴定。**结果** 克隆出大鼠 APE/Ref-1 基因,经测序证实结果正确;得到高滴度的重组腺病毒,提取病毒 DNA 证实含目的基因。**结论** 成功构建了表达 APE/Ref-1 的复制缺陷型重组腺病毒。为进一步研究 APE/Ref-1 在耳蜗螺旋神经节的氧化损伤过程中作用机制奠定了实验基础。

关键词: 氧化还原因子-1;重组腺病毒;耳蜗螺旋神经节;氧化损伤

中图法分类号: Q513.1;Q782;Q764.35 **文献标识码**: A

Construction of recombinant adenovirus carrying apurinic/apyrimidimic endonuclase/redox factor 1

JIANG Zhen-dong[1], WEI Yun-jun[1], ZHANG Xue-yuan[1], DENG Feng-lian[2], ZHUO Xian-lu[3] ([1]Department of Otolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Bioengineering, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400038, [3]Department of Otolaryngology, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: Objective To construct the replicate-deficient recombinant adenovirus expressing apurinic/apyrimidimic endonuclase/redox factor 1 (APE/Ref-1) for gene therapy that protects spiral ganglion of cochlea against oxidative stress. Methods APE/Ref-1 was cloned from rat brain tissue and inserted into shuttle plasmid vector pAdTrack-CMV. Then pAdTract-APE/Ref-1 was homologously recombined with the backbone plasmid pAdEasy-1 in bacteria BJ5183. pAdEasy-GFP-APE/Ref-1 transfected in 293 cells. Results By Western blotting, restricted enzymatic digestion, DNA sequencing, the fragment inserted into pAdTrack-APE/Ref-1 was identified as APE/Ref-1. AdEasy-GFP-APE/Ref-1 could efficiently infect 293 cells. Conclusion Replicate-deficient recombinant adenovirus AdEasy-GFP-APE/Ref-1 could infect 293 cells and express APE/Ref-1 protein effectively.

Key words: APE/Ref-1; recombinant adenovirus vaccine; spiral ganglion of cochlea; oxidative stress

无嘌呤/无嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子-1(Apurinic/apyrimidimic endonuclease/redox factor 1, APE/Ref-1)是 1991 年 Robson 和 Hickon 首先发现的一种多功能核蛋白[1]。近年来对于 APE/Ref-1 具有的 DNA 碱基损伤修复功能和在氧化还原反应过程中调控功能的研究愈来愈受到国内外重视。我们在实验研究中发现 APE/Ref-1 在豚鼠耳蜗螺旋神经节细胞中有较明显的表达,推测它可能参与耳蜗螺旋神经节氧化损伤病理过程调节[2,3]。因此,对 APE/Ref-1 在耳蜗螺旋神经节氧化损伤过程中的作用进行深入研究,对于进一步阐明耳蜗螺旋神经节氧化损伤机制,并探索新的治疗方法具有重要的意义。本实验拟构建大鼠 APE/Ref-1 单基因表达的腺病毒穿梭载体,经与骨架质粒 pAdEasy-1 同源重组后,转染 293 细胞包装成腺病毒,并对其进行 RT-PCR、安全性、滴度以及活性等检测,为进一步研究 APE/Ref-1 在耳蜗螺旋神经节的氧化损伤过程中作用机制研究奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和主要试剂

T-载体 pMD18-T 及限制性内切酶、LaTaque 酶均购自 TaKaRa 公司,*Pme*I及 *Pac*I购自 NEB 公司 pAdtrack-CMV、AdEasy-1及

作者简介:姜振东(1976-),男,山东省潍坊市人,博士,医师,主要从事内耳病理生理方面的研究。电话:(023)68765390

通讯作者:张学渊,电话:(023)68754405

收稿日期:2006-04-14;修回日期:2006-05-24

菌种 BJ5183 购自 Stratrgene 公司; DH5α 由本科实验室提供;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒及 PCR 产物回收试剂盒均购自 Omega 公司; Lipofectamine™2000 脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.2　总 RNA 的提取、cDNA 第一链合成及 APE/Ref-1 基因全长扩增

采用 Tripure 法提取 SD 大鼠脑组织总 RNA。提取的总 RNA 1 μg, Oligo(dT) 1 μg,加无核酸酶的水至 6.5 μl,70 ℃ 10 min,立即冰浴 10 min,然后加入 5 × RT Buffer 4 μl,10 mmol/L dNTP 8 μl,RNA 酶抑制剂 0.5 μl, AMV 逆转录酶 1 μl,加入无核酸酶的水补足总体积至 20 μl,混匀后 41 ℃逆转录 1 h,4 ℃终止反应。

根据 GenBank 中编码 APE/Ref-1 蛋白的 cDNA 序列设计引物(北京 sbs 赛百胜基因公司合成),上游引物为:5′-GGTACCGTTGGGAGGCAGCGTAGT-3′ 下游引物为: 5′-AAGCTTCCAGAAGTTTGGTTTAGAGGG-3′上下游引物 5′端分别引入 *Kpn* Ⅰ及 *Hind*Ⅲ两个限制性内切酶酶切位点。PCR 反应体系:逆转录所得 cDNA 1 μl,上下游引物各 1 μl(10 pmol/μl),5 × Reaction Buffer 10 μl,10 mmol/L dNTP 4 μl, PrimeSTARTMHS DNA 聚合酶 1 μl,加入无核酸酶的水至总体积 50 μl,混匀后进行扩增。PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 5 min,然后 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min 20 s,30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增片段长度为 1 138 bp。取 5 μl PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像仪上观察结果。

1.3　腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV-APE/Ref-1 的构建

经 RT-PCR 扩增的全长 APE/Ref-1 克隆至 T 载体 pMD18-T 中,经蓝白斑筛选、*Kpn* Ⅰ及 *Hind*Ⅲ双酶切并送 Takara 公司测序鉴定。然后用 *Kpn* Ⅰ及 *Hind*Ⅲ分别双酶切 pMD18-T-APE/Ref-1 和 pAdtrack-CMV,凝胶回收。T4 连接酶连接 APE/Ref-1 片段及线性化的 pAdTrack-CMV(16℃, 18 h),转化 $DH_{5\alpha}$ 感受态细菌,在含有卡那霉素抗性的 LB 平板上培养过夜,挑选转化的菌落,提取质粒后,同样经双酶切鉴定阳性克隆并测序分析。

1.4　腺病毒质粒的同源重组

用 *Pme* Ⅰ将 pAdTrack-Ref-1 线性化后电转化(BIORAD, 2 500 V, 200 Ω, 25 μF)含有腺病毒基因骨架质粒 AdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌,进行同源重组。在含有卡那霉素抗性的 LB 平板上培养过夜,挑取平板上较小的菌落,提取质粒后,经 *Pac* Ⅰ酶切鉴定筛选重组体 AdAPE/Ref-1。

1.5　重组腺病毒 AdRef-1 的包装、扩增和纯化

Pac Ⅰ线性化 Ad APE/Ref-1 后,经 PCR 产物回收试剂盒回收线性化片段约 8 μg。将 20 μl Lipofectamine™2000 以无血清 DMEM 培养基稀释至 500 μl,室温下静置 5 min,将线性化的 AdAPE/Ref-1 加入脂质体稀释液中轻轻混合,室温下静置 20 min,使其充分结合形成复合物。将混合物加入 1 d 前更换培养液、已达 70%~80% 融合的 293 细胞中,轻轻混合。继续培养 8 h后更换培养基,18 h 后观察细胞形态变化及荧光出现情况。12 d 后至 90% 以上细胞出现细胞病变(cytopathic effect, CPE),收集细胞反复冻融 3 次后离心,收集病毒上清,继续感染 293 细胞以扩增病毒。收集的病毒以 0.22 μm 滤膜过滤后分装, -80 ℃保存。

1.6　重组腺病毒 Ad APE/Ref-1 转染 293 细胞后 RT-PCR 鉴定

Tripure 法提取重组腺病毒转染 293 细胞和未感染 293 细胞的总 RNA,经逆转录为 cDNA。分别以 5′-GGTACCGTTGGGAGGCAGCGTAGT-3′ 和 5′-AAGCTTCCAGAAGTTTGGTTTAGAGGG-3′为上下游引物,进行 PCR 反应,扩增片段长度为 1.138×10^3,反应体系及参数同 1.2。

1.7　重组腺病毒 AdRef-1 的病毒滴度测定

以 CPE 法进行测定病毒滴度,按如下公式计算:

腺病毒滴度 = 稀释倍数 × 稀释度$^{(CPE阳性细胞孔数-4)/8}$

1.8　野生型病毒的检测

Hela 细胞和 293 细胞分别接种于两个 24 孔培养板中,培养 24 h 后,更换培养基,并加入重组腺病毒 APE/Ref-1 50 μl/孔,轻轻混匀。同时以培养基设空白对照。培养并每天观察细胞形态的变化和生长情况,连续 4 d。

1.9　Western blot 鉴定 APE/Ref-1 蛋白在转染后的 AD-293 细胞中的表达

1.9.1　细胞核蛋白的提取　根据梁国栋主编《最新分子生物学实验技术》方法提取培养细胞核蛋白。用 PBS (含 0.05 mmol/L PMSF)洗 2 次,刮板刮下细胞,收集于离心管,加含 0.5% NP-40 的 BufferA 缓冲液,玻璃研磨器打成匀浆,冰浴 10 min, 1 000 × *g*/min,4 ℃离心 10 min,弃上清,加无 NP-40 的 Buffer A ,振荡混匀,1 000 × *g*/ min,4 ℃离心 10 min,弃上清,再加入 Buffer B,涡旋器混匀,冰浴摇动 1 h, 15 000 × *g*/min, 4 ℃离心 15 min,上清液即为核蛋白提取物。进行考马斯亮蓝蛋白定量。并将样品保留于 -70 ℃。

1.9.2　Western blot 分析　将试验组与对照组核蛋白,经 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,半干式电转膜致醋酸纤维素膜,室温下 2% 脱脂奶粉封闭 2 h ,兔抗大鼠 APE/Ref-1 单克隆抗体孵育,4 ℃过夜,TBS-0.5% Tueen20 (TTBS) 洗膜 3 次,每次 10 min ,再用相应的 HRP2 标记的二抗 37 ℃孵育 1 h ,TBS 洗膜后 DAB 显色,扫描条带。

2　结果

2.1　APE/Ref-1 基因全长扩增

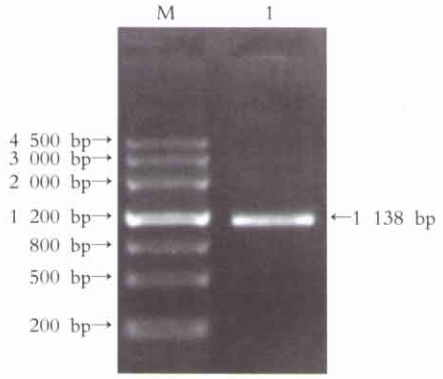
以 SD 大鼠脑组织提取的总 RNA 为模板,经逆转录反应得到 cDNA 为模板,以 APE/Ref-1 的特异性引物为引物,PCR 反应获得 APE/Ref-1 全长基因(图 1)。

2.2　腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV-APE/Ref-1 的构建和鉴定

APE/Ref-1 基因经 T/A 克隆后,挑取白色克隆,提取质粒 pMD18-T-APE/Ref-1 并经 *Kpn* Ⅰ及 *Hind*Ⅲ双酶切,得到约 2.7×10^3 和 1.138×10^3 两个片段,同时进行测序分析,测序结果和 NCBI GenBank(NM024148)中 APE/Ref-1 序列一致。表明已成功获得 APE/Ref-1 全长基因。

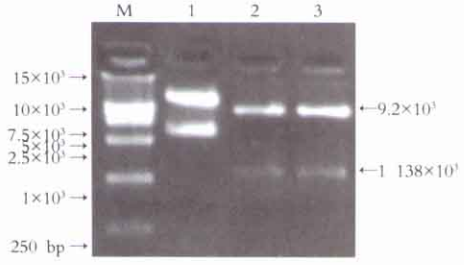
用 *Kpn* Ⅰ及 *Hind*Ⅲ双酶切 pMD18-T-APE/Ref-1 获得的 APE/Ref-1 DNA 片段,定向插入到经同样内切酶双酶切的 pAdTrack-CMV 中。挑取阳性转化克隆,提取质粒 pAdtrack-CMV-APE/Ref-1,同样经 *Kpn* Ⅰ及 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定,得到约

9.2×10^3 和 1.138×10^3 的两个片段，证明插入片段正确，穿梭质粒构建成功（图2）。



M：D4500 标准；1：PCR 反应获得 1 138 bp APE/Ref-1 全长基因片段

图1 全长 APE/Ref-1 的 PCR 结果

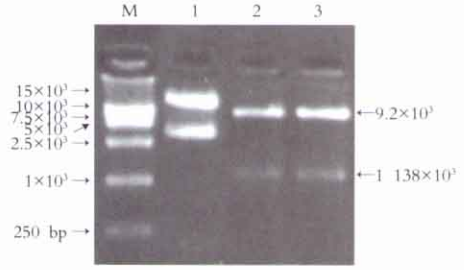


M：D15000 标准；1：质粒 pAdTrack-APE/Ref-1；2，3：pAdTrack-APE/Ref-1 质粒 *Kpn* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切片段

图2 重组载体 pAdTrack-APE/Ref-1 的酶切分析鉴定图

2.3 腺病毒质粒的同源重组及鉴定

pAdTrack-CMV-APE/Ref-1 经 *Pme* Ⅰ线性化后，电转入含有腺病毒基因组质粒 AdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌，进行同源重组。经 *Pac* Ⅰ酶切后，可见 30×10^3 和 4.5×10^3 的电泳带各1条（图3），证明同源重组成功。重组后的重组体命名为 AdAPE/Ref-1。



M：D15000 标准；1：质粒 AdAPE/Ref-1；2：AdAPE/Ref-1 质粒

图3 重组腺病毒质粒 AdAPE/Ref-1 的酶切鉴定图

2.4 重组腺病毒 AdAPE/Ref-1 感染 AD-293 细胞的鉴定

2.4.1 AD-293 细胞的形态学改变 转染 1～2 d 后，光镜下见空斑形成，AD-293 细胞肿胀、变圆、脱壁，细胞核变大等典型的细胞病变效应。

2.4.2 增强型绿色荧光（EGFP）的表达情况 荧光显微镜下见转染后 1～2 d，AD-293 细胞出现亮绿色的荧光，并随时间延长，荧光逐渐增多增强，而在未转染组 293 细胞未见荧光出现（图4）。

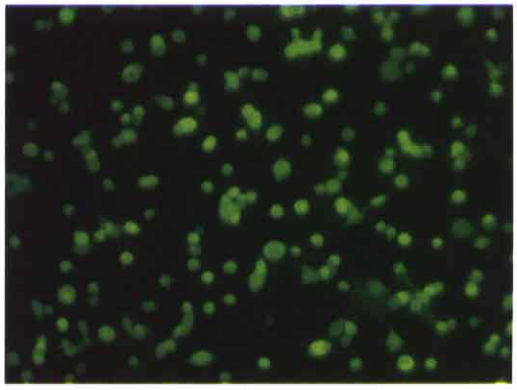
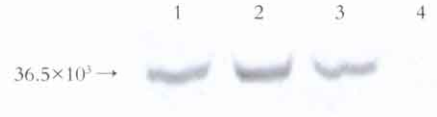


图4 感染后 6 d 293 细胞绿色荧光表达情况（荧光显微镜×200）

2.4.3 重组腺病毒滴度测定的结果 CPE 法测得的病毒滴度为 7×10^9 PFU/ml.

2.4.4 Western blot 鉴定 APE/Ref-1 蛋白在转染后 AD-293 细胞中的表达 AdRef-1 重组腺病毒感染的 AD-293 细胞，经 Western blot 检测可见一条约 36.5×10^3 条带，而对照组 AD-293 细胞中未见其表达，表明 AdAPE/Ref-1 感染 AD-293 细胞成功（图5）。



1～3：转染 293 细胞组；4：未转染 293 细胞

图5 APE/Ref-1 蛋白在 AdAPE/Ref-1 转染 293 细胞中的表达

3 讨论

重组腺病毒载体是目前应用最广泛的生物病毒载体之一，它具有较高的感染力，宿主范围广，可感染分裂和非分裂细胞[4]。

由于重组腺病毒载体缺乏病毒复制所必需的早期基因 E1 区，故其为复制缺陷型病毒[5]，将其 DNA 整合进入 AD-293 中，AD-293 的 E1 早期基因的表达可以反式供给复制缺陷型病毒的增殖，而且重组腺病毒载体介导的基因转染细胞后 DNA 游离于宿主基因组外，因此其基因毒性低，安全性高。此外，它在体外稳定，易于制备与纯化；属大容量载体，可以携带 $6\sim8\times10^3$ 的外源性 DNA，是一种可高效地转染和表达基因的基因表达系统[6]。

由于耳蜗螺旋神经节属于不分裂细胞，体外存活时间有限，不能够传代培养，因此，本实验中我们选择

构建重组腺病毒载体来表达我们的目的基因 APE/Ref-1，希望利用其高效的转染和表达能力，将目的基因直接导入体外培养的螺旋神经节细胞中，进一步探讨具有的 DNA 碱基损伤修复功能和氧化还原调节作用的双功能基因 APE/Ref-1 在螺旋神经节细胞氧化损伤过程中的作用。

APE/Ref-1cDNA 由 1441 个核酸组成，蛋白质含有 318 个氨基酸，表达于多种组织，在正常组织中 APE/Ref-1 在细胞浆、细胞膜和细胞核均有表达，在神经细胞主要分布于胞核[2]。在我们的实验研究中，通过 Western blot 鉴定转染后 AD-293 细胞中 APE/Ref-1 的表达时，AdAPE/Ref-1 重组腺病毒感染的 AD-293 细胞显示 1 条清晰的约 36.5×10^3 大小的条带，而对照组 AD-293 细胞中未见其表达，这一方面表明 AdRef-1 感染 AD-293 细胞成功，另一方面表明了 APE/Ref-1 在 AD-293 没有表达。我们用重组腺病毒转染非包装细胞 Hela 细胞后，对其生长无明显影响，表明经包装后的重组腺病毒无野生型病毒存在，这就为后续细胞和动物体内实验的安全性提供的保障。本实验成功的成功构建了表达 APE/Ref-1 的复制缺陷型重组腺病毒，为进一步研究 APE/Ref-1 在耳蜗螺旋神经节的氧化损伤过程中作用机制研究奠定了实验基础。

参考文献：

[1] FRITZ G, GROSCH S, TOMICIC M, *et al*. APE/Ref-1 and the mammalian response to genotoxic stress[J]. Toxicology, 2003, 93(1-2): 67-78.

[2] VASKO M R, GUO C, KELLEY M R. The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress[J]. DNA Repair (Amst), 2005, 4(3): 367-379.

[3] KIM C S, SON S J, KIM E K, *et al*. Apurinic/apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1 inhibits monocyte adhesion in endothelial cells [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(2): 520-526.

[4] SADEGHI H, HITT M M. Transcriptionally targeted adenovirus vectors [J]. Curr Gene Ther, 2005, 5(4): 411-427.

[5] MURAKAMI P, HAVENGA M, FAWAZ F, *et al*. Common structure of rare replication-deficient E1-positive particles in adenoviral vector batches[J]. J Virol, 2004, 78(12): 6200-6208.

[6] GONCALVES M A, VAN-DER-VELDE I, KNAAN-SHANZER S, *et al*. Stable transduction of large DNA by high-ca*Pac* I by adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors[J]. Virology, 2004, 321(2): 287-296.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2006)16-1697-01

个案与短篇

492 例心内科慢性病住院患者的幸福感和情绪特征调查分析

王叶丽[1]，曾群丽[2]，李 静[1]（[1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科，重庆 400042；[2]广州军区武汉医院呼吸内科，武汉 430070）

现代医学认为冠心病、高血压、糖尿病、慢性心功能不全等疾病均是与心理社会因素有关的疾病，因此生物-心理-社会医学模式应成为心内科护理护理的重要模式，心理护理应为其重要内涵。为此，我们调查了心内科不同慢性疾病住院患者的心理健康状况，以期有针对性地进行护理干预，提高护理质量。

1 资料与方法

问卷调查我科从 2004 年 6 月至 2005 年 10 月收治住院的慢性病患者，共 492 例，分高血压组（84 例），冠心病组（252 例）（含糖尿病 75 例），慢性心功能不全组（156 例）。如存在病情交叉归于病情重一组，有慢性心功能不全时则归于慢性心功能不全组。人口社会学调查：包括性别、年龄、婚姻状况、教育程度、职业、收入、付费方式、近两年所花医疗费用及所患疾病。心理健康状况测量：1 应用幸福感指数测查被试者目前所体验到的幸福程度[1]。2 应用焦虑自评量表（SAS）了解患者的焦虑症状，特质焦虑问卷（T-AI）评定患者经常的情绪体验，抑郁自评量表（SDS）反映患者抑郁状态的有关症状及其严重性和变化。专人发放调查表，在统一指导用语的条件下，对被调查者进行必要解释，当场发放问卷，填完后当场收回，有效回收率 100%。所测数据在 SPSS 10.0 统计软件包上进行 χ^2 检验。

2 结果与分析

一般资料：有效样本 492 例，男性 284 例，女性 208 例，年龄 22～90 岁，平均年龄 58.33 岁，经 χ^2 检验各组患者的一般资料无显著性差异（$P>0.05$）。

幸福感指数：492 例患者的幸福感指数最低 2.04，最高 13.98，平均 6.63。多因素比较示高血压组与冠心病组及 CHF 组幸福感指数差异有统计学意义（$P<0.01$）。

焦虑、特质焦虑及抑郁：SAS 得分 26～74 分，平均 36.89 分；T-AI 得分 24～71 分，平均 39.06 分；抑郁指数得分 0.37～0.81，平均 0.59。轻度抑郁者（251 例）占 51.02%，中度抑郁者（216 例）占 18.9%，重度抑郁者（25 例）占 6.28%。各组间焦虑、特质焦虑、抑郁得分无统计学意义（$P>0.05$）。

（下转 1700 页）

作者简介：王叶丽（1964－），女，山西省定阳市人，副主任护师，主要从事心血管内科护理研究，发表论文 18 篇，电话：023-68757246。

收稿日期：2006-01-15；修回日期：2006-04-22