文章编号:1000-5404(2008)06-0533-03

论著

大鼠 Otos 基因重组腺病毒载体的构建和鉴定

卓贤露[1,2],姜振东[1],魏运军[1],鲁 立[3],张学渊[1],袁 伟[1] ([1]第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038; [2]贵阳医学院附属医院耳鼻喉科,贵阳 550004; [3]解放军第532医院检验科,安徽 黄山 245041)

摘 要:目的 构建表达 Otos 基因的复制缺陷型重组腺病毒。**方法** 应用 RT-PCR 技术从大鼠耳蜗螺旋韧带成纤维细胞总 RNA 中克隆出 Otos 基因,将 Otos 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,反复感染 293 细胞,并进行扩增,对其进行安全性、病毒滴度以及活性等指标的检测。**结果** 克隆出大鼠 Otos 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 Otos 的复制缺陷型重组腺病毒。

关键词:Otos;重组腺病毒;内耳
中图法分类号:R322.923;R394-33;R394.3 **文献标识码**:A

Construction of recombinant adenovirus carrying Otos

ZHUO Xian-lu[1,2], JIANG Zhen-dong[1], WEI Yun-jun[1], LU Li[3], ZHANG Xue-yuan[1], YUAN Wei[1] ([1]Department of Otolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, [3]No. 532 Hospital of PLA, Huangshan Anhui 245041, China)

Abstract: Objective To construct the replicate-deficient recombinant adenovirus containing Otos for further evaluation of its roles in cochlear. Methods pAdTrack-Otos was cloned by inserting the fragment of Otos into the shuttle plasmid vector pAdTrack-CMV. For obtaining recombinant adenovirus plasmid (Ad-Otos), the pAdTrack-Otos and the backbone plasmid pAdEasy-1 were homologously recombined in bacteria BJ5183, then pAdEasy-GFP-Otos was transfected into 293 cells for getting packaged infectious replicate-deficient adenoviruses. Results By DNA sequencing, the fragment inserted within pAdTrack-Otos was verified as Otos. Ad-Otos efficiently infected 293 cells. Conclusion Replicate-deficient recombinant adenovirus carrying Otos was successfully constructed, laying the experimental foundation for further studying the roles of Otos in inner ear.

Key words: Otos; recombinant adenovirus; cochlear

对耳聋的研究,越来越多的学者开始关注耳蜗螺旋韧带的功能。最近,研究表明一种特异性表达于内耳螺旋韧带而不表达在其他器官和组织的基因 Otos,通过下调它的表达,可以导致动物不可逆的听力损失[1],推测它在内耳病理生理过程中有十分重要的作用,但关于它功能的探讨,目前鲜见报道。本研究拟构建大鼠 Otos 单基因表达的腺病毒载体,以便进一步研究 Otos 的功能及耳聋的发病机制。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和主要试剂

T-载体 pMD18-T、限制性内切酶及 *Taq* 酶均购自 TaKaRa 公司,PmeI 及 *Pac* Ⅰ购自 NEB 公司,pAdtrack-CMV、AdEasy-1 及菌种 BJ5183 是 Stratagene 公司产品,DH5α 由本实验室保存;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 1 链合成及 Otos 基因全长扩增

提取 SD 大鼠螺旋韧带成纤维细胞的总 RNA 1 μg,然后逆转录合成 cDNA。根据 GenBank 中编码 Otos 蛋白的 cDNA 序列设计引物,上游引物:5′-TACGGCTGCGAGAAGACGACA-3′,下游引物:5′-CCCACCCGCACCCACCACT-3′。PCR 反应体系:逆转录所得 cDNA 1 μl,上下游引物各 1 μl(10 μmol/L),通过 PCR 扩增含有 Otos 的目的条带。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min,然后退火,94 ℃ 30 s,58 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,进行 30 次循环,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增片段长度为 437 bp,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-Otos 的构建和鉴定

经 RT-PCR 扩增的全长 Otos 克隆至 T 载体 pMD18-T 中,经

作者简介:卓贤露,男,贵州省贵阳市人,博士,讲师,主要从事内耳病理生理方面的研究。电话:(023)68765390
通信作者:张学渊,电话:(023)68765390
收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-11-12

蓝白斑筛选后送公司行测序鉴定。然后用 *Kpn* Ⅰ及 *Hind* Ⅲ 分别双酶切 pMD18-T-Otos 和 pAdTrack-CMV,凝胶回收。T_4 连接酶连接 Otos 片段及线性化的 pAdTrack-CMV,转化 DH5α 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,得 pAdTrack-Otos。

1.4 腺病毒质粒的同源重组

用 PmeI 将 pAdTrack-Otos 线性化后电转化含有腺病毒基因骨架质粒 pAdEasy-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 pAdTrack-Otos 和 Adeasy-1 的重组体,命名为 Ad-Otos。

1.5 重组腺病毒 Ad-Otos 的包装、扩增

Pac Ⅰ线性化 Ad-Otos 后,经 PCR 产物回收试剂盒回收线性化片段与无血清 DMEM 培养基稀释后的 Lipofectamine™2000 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 前更换的培养液、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。至 90% 以上细胞出现病变时,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。

1.6 重组腺病毒 Ad-Otos 转染 293 细胞后 RT-PCR 鉴定

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′-TACGGCTGCGAGAAGA-CGACA-3′和 5′-CCCACCCGCACCCACCACT-3′为上下游引物,进行 PCR 反应,扩增片段长度为 437 bp,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

采用氯化铯密度梯度离心法纯化重组腺病毒 Ad-Otos 并进行分装和保存。病毒滴度的测定参考文献[2]的方法进行,按照下面公式计算:病毒滴度(PFU/ml) = GFP 阳性细胞数 × 病毒稀释倍数/0.06 ml。

1.8 野生型病毒的检测

HeLa 细胞和 293 细胞分别接种于 2 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 Ad-Otos 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,连续观察 4 d。

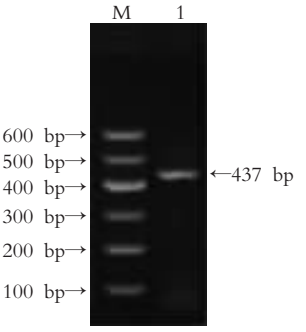
2 结果

2.1 Otos 基因全长扩增

以 SD 大鼠培养的耳蜗螺旋韧带成纤维细胞提取的总 RNA 为模板,经逆转录反应得到 cDNA 模板,以 Otos 的特异性引物为引物,PCR 反应获得 Otos 的全长基因,扩增片段长 437 bp (图 1)。

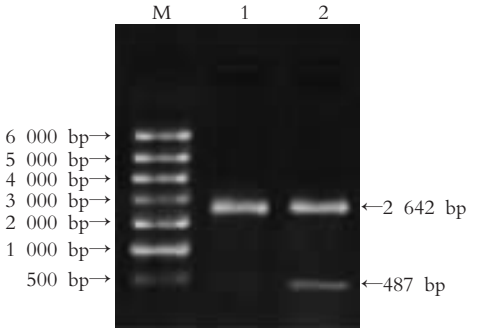
2.2 腺病毒穿梭质粒

2.2.1 pAdTrack-CMV-Otos 的构建和鉴定 Otos 基因经 T/A 克隆后,挑取白色克隆,提取质粒 pMD18-T-Otos,并经 *Kpn* Ⅰ及 *Hind* Ⅲ 双酶切,得到 2 642 bp 和 487 bp 2 个片段(图 2)。



M: DNA 标准; 1: Otos 基因

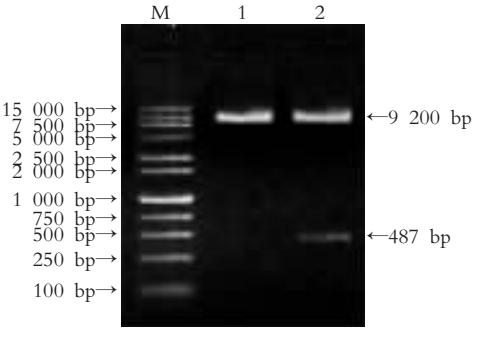
图 1 全长 Otos 的 PCR 结果



M: DNA 标准; 1:质粒 pMD18-T-Otos; 2: pMD18-T-Otos 质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ 双酶切结果

图 2 质粒 pMD18-T-Otos 的酶切鉴定图

2.2.2 穿梭质粒的构建和鉴定 用 *Kpn* Ⅰ及 *Hind* Ⅲ 双酶切 pMD18-T-Otos 获得的 Otos 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-Otos,同样经 *Kpn* Ⅰ及 *Hind* Ⅲ 双酶切鉴定,得到 9.2 kb 和 487 bp 的 2 个片段,证明插入片段正确,穿梭质粒构建成功(图 3)。

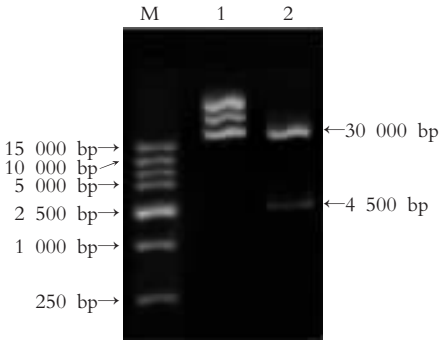


M: DNA 标准(DL 15000); 1:质粒 pAdTrack-Otos;2: pAdTrack-Otos 质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ 双酶切结果

图 3 重组载体 pAdTrack-Otos 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-Otos 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 kb 大小的腺病毒基因组片段和4.5 kb 的 ori 及卡那霉素抗性编码基因片段的电泳带各 1 条(图 4),证明同源重组成功。重组后的重组体命名为 Ad-Otos。



M: DNA 标准(DL 15000); 1: 质粒 Ad-Otos; 2: Ad-Otos 质粒经 *Pac* Ⅰ 酶切结果

图 4　重组腺病毒质粒 Ad-Otos 的酶切鉴定图

2.4　重组腺病毒 Ad-Otos 感染 AD-293 细胞的鉴定

2.4.1　AD-293 细胞的形态学改变和增强型绿色荧光(EGFP)的表达情况　　转染 1 ~ 2 d 后,AD-293 细胞空斑发生肿胀、变圆、脱壁,细胞核发生变大等典型的细胞病变效应,细胞出现亮绿色的荧光,并随时间延长,荧光逐渐增多增强(图 5),而在未转染组,293 细胞未见荧光出现。

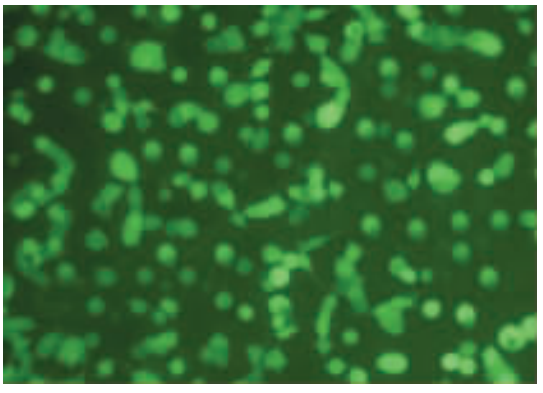


图 5　感染后 6 d 293 细胞绿色荧光表达情况　(荧光显微镜 ×200)

2.4.2　重组腺病毒 Ad-Otos 转染 293 细胞后 PCR 鉴定　　重组腺病毒 Ad-Otos 转染的 AD-293 细胞,经过 PCR 鉴定得出长度为 437 bp 的条带,而对照组 AD-293 细胞未见明显条带,表明 Ad-Otos 转染的 AD-293 细胞成功。

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　野生型病毒检测　　所有的重组腺病毒对 HeLa 细胞的生长无明显影响,而所有转染的 AD-293 细胞基本死亡,表明经包装后的重组腺病毒无野生型病毒存在。

3　讨论

随着基因工程的发展,对基因功能的研究,可以通过载体携带该基因进入细胞来进行。所以,找到一种既能高效率转染,又对细胞其他生理功能影响小的载体显得十分必要。重组腺病毒载体是目前应用最广泛的生物病毒载体之一[3],腺病毒是一种线状双链 DNA 病毒,基因组内有 14 个基因。它具有较高的感染力,宿主范围广,既可感染分裂细胞也可以感染非分裂细胞,它以附加体的形式游离在宿主细胞基因以外,不整合进宿主基因[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,将其 DNA 整合进入 AD-293 细胞中,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 ~ 8 kb 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[5]。

Otos 是一种新发现的特异性表达于内耳螺旋韧带成纤维细胞的基因,其编码的蛋白 Otospiralin 被认为和听觉的维持密切相关。噪声可以引起其 mRNA 的表达下调[6],而用反义寡核苷酸抑制该基因的表达,可以导致不可逆的听力损失,并观察到毛细胞有形态学改变[1],故推测该基因在耳聋病理生理过程中具有十分重要的作用。为深入探讨该因子的功能,我们成功构建了该基因的重组腺病毒载体。在我们的实验研究中,通过 PCR 鉴定转染后 AD-293 细胞中 Otos 的表达,Ad-Otos 感染的 AD-293 细胞显示 Otos 条带,而对照组 AD-293 细胞中未见其表达,表明 Ad-Otos 感染 AD-293 细胞成功,腺病毒载体构建成功。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存在,为后续细胞和动物体内实验的安全性提供了保障。

Ad-Otos 的成功构建可望对揭示耳聋的发病机制提供新的观点和思路。

参考文献:

[1] Delprat B, Boulanger A, Wang J, *et al*. Downregulation of otospiralin, a novel inner ear protein, causes hair cell degeneration and deafness [J]. J Neurosci, 2002, 22(5): 1718 – 1725.

[2] 江千里, 王健民, 温丽敏, 等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(9): 1034 – 1035.

[3] 蒋春华, 高钰琪, 黄庆愿, 等. 人 HIF-1α 基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(20): 2040 – 2043.

[4] Miller-Jensen K, Janes K A, Wong Y L, *et al*. Adenoviral vector saturates Akt pro-survival signaling and blocks insulin-mediated rescue of tumor necrosis-factor-induced apoptosis[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt18): 3788 – 3798.

[5] 姜振东, 魏运军, 张学渊, 等. APE/Ref-1 基因重组腺病毒的构建表达和鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1694 – 1697.

[6] Caravelli A, Pianese L, Saulino C, *et al*. Down-regulation of otospiralin mRNA in response to acoustic stress in guinea pig[J]. Hear Res, 2004, 198(1 – 2): 36 – 40.

(编辑　薛国文)