技术与方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.018

转录因子 ZNF191 腺病毒表达载体的构建及鉴定

王晓鹏，李梦文，厉建中
（第二军医大学药学院生化药学教研室，上海 200433）

【摘 要】目的：构建转录因子 ZNF191 腺病毒表达载体，为进一步研究 ZNF191 的生物学功能与肿瘤的基因治疗奠定基础。方法：从 HEK293 细胞中提取总 RNA，RT-PCR 扩增 ZNF191 基因，并将 ZNF191 亚克隆到穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中，酶切及 DNA 测序鉴定后，将含 ZNF191 基因的重组穿梭质粒 pAdTrack-ZNF191 经 *Pme* Ⅰ线性化后转化 pAdEasy-1 感受态细菌。pAdEasy-ZNF191 质粒经 *Pme* Ⅰ线性化后转染 293T 细胞，包装重组腺病毒 Ad-ZNF191，并进行 PCR 鉴定、Western blot 检测受感染 MCF-7 细胞内 ZNF191 蛋白的表达。结果：证实 pAdTrack-CMV-ZNF191 及 pAdEasy-ZNF191 质粒构建正确，收获病毒后 PCR 及 DNA 测序结果证明 Ad-ZNF191 包装成功，腺病毒感染 MCF-7 细胞内 ZNF191 蛋白表达明显提高。结论：成功构建了 ZNF191 基因重组腺病毒表达载体 Ad-ZNF191，为进一步研究 ZNF191 的生物学功能与肿瘤的基因治疗奠定基础。

【关键词】ZNF191；腺病毒；表达载体；基因治疗
【中国图书分类法分类号】R392 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-08-03

Construction and identification of the recombinant adenovirus expressing the transcription factor ZNF191

WANG Xiao-peng, LI Meng-wen, LI Jian-zhong
(*Department of Biochemical Pharmacy, College of Pharmacy, the Second Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the recombinant adenovirus expression vector containing the transcription factor ZNF191 and to evaluate its potential role for gene therapy of tumor. *Methods*: The ZNF191 cDNA was amplified by RT-PCR using template mRNA isolated from the HEK293 cells. The cDNA fragments were cloned into the shuttle vector pAdTrack-CMV. The product pAdTrack-ZNF191 was linearized by *Pme* Ⅰ for homologous recombination with pAdEasy-1 in pAdEasy-1 competence bacteria. The positive clone was identified by enzyme digestion, PCR analysis and DNA sequence analysis. After linearization by *Pac* Ⅰ, the recombinant adenovirus DNA plasmid pAdEasy-ZNF191 was transfected into 293 T cells for packaging and amplifying Ad-ZNF191, which was further identified by PCR analysis and DNA sequence analysis. Western blotting was used to detect the expression of ZNF191 protein in the MCF-7 cells infected with the adenovirus. *Results*: The pAdTrack-ZNF191 and pAd-Easy-ZNF191 plasmids had been successfully constructed and they were verified by PCR analysis, enzyme digestion and DNA sequence analysis. PCR analysis and DNA sequence analysis confirmed successful packaging of the recombinant adenovirus Ad-ZNF191 in 293T cells. ZNF191 protein expression increased significantly in the MCF-7 cells after infection by the recombinant virus. *Conclusion*: We have successfully constructed the recombinant adenovirus Ad-ZNF191, which provides a basis for investigating the biological function of ZNF191 and its potential for gene therapy.

【Key words】ZNF191; adenovirus; expression vector; gene therapy

人类锌指蛋白基因 ZNF191（又称 ZNF24 或 KOX17）[1,2] 是一个编码类 Krüppel 蛋白的基因，由 4 个外显子组成，编码 368 个氨基酸的蛋白质，N 端有富含亮氨酸（Leu）的 SCAN 结构域（又称 LeR 结构域），C 端有 4 个连续的典型的类 Krüppel 锌指模体。我们研究表明 ZNF191 参与激酶转录活性调控、血管增生、脑发育与 DNA 损伤应答等，是多功能的转录因子[3]。ZNF191 mRNA 在卵巢恶性肿瘤、结肠癌和乳腺癌组织中的表达显著下调[4,5]。这些结果提示 ZNF191 可能参与乳腺癌、结肠癌等肿瘤的发生或发展的负调控，是抑癌基因。研究表明 ZNF191 可能是 PDGFR-β、VEGF 表达的调控开关[4,6]，这将通过改变 ZNF191 表达水平对 PDGFR-β 或 VEGF 异常表达引起的肿瘤的基因治疗提供新思路。本实验旨在构建重组腺病毒 Ad-ZNF191 表达载体，为进一步研究 ZNF191 的生物学功能与肿瘤的基因治疗奠定基础。

作者介绍：王晓鹏（1988-），男，
研究方向：基因工程。
通信作者：厉建中，男，讲师，Email：lijianzhong1234@yahoo.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30871353）。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾 HEK293 细胞、293T 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞、大肠杆菌 DH5a、腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV、含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌株为本实验室保存。质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒(Axygen)；限制性内切酶、T4 连接酶(TakaRa)；TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000(Invitrogen)；反转录试剂盒(Promega)；KOD-Plus 高保真 PCR 试剂(Toyobo)；小鼠抗人 ZNF191 单抗(Santa cruz)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增 ZNF191cDNA 收集 1×10^6 个 HEK293 胚肾细胞，Trizol 提取总 RNA，以 1 μg 总 RNA 为模板在反转录反应体系中以随机引物合成 cDNA，取 1 μl cDNA 产物为模板进行 PCR 扩增。扩增引物根据 ZNF191 序列，用 Primer Premier 5.0 软件设计引物，并分别于正义链 5'端加 *Xho* Ⅰ酶切位点，反义链 5'端加 *Hind* Ⅲ酶切位点，ZNF191 正义链引物：5'-GAACTCGAGCCACCATGTCTG CACAGTCAG -3'，反义链引物：5'-GGAAAGCTTTTAAACTTTCACAACATTCAGA-3'，预期产物片段长度约 1.1 kb。引物由上海生工生物工程公司合成。ZNF191 基因 PCR 扩增条件：94℃热启动 5 min 后，94℃变性 1 min，55℃退火 50 s，72℃延伸 1 min，30 个循环后，72℃反应 5 min。

1.2.2 穿梭质粒 pAdTrack-CMV-ZNF191 的构建及鉴定 用 *Xho* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切 PCR 产物，胶回收 1.1 kb 片段。与 *Xho* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切的 pAdTrack-CMV 载体相连接，转化感受态 DH5α 菌。经酶切鉴定的阳性克隆，并进一步测序鉴定。

1.2.3 重组腺病毒载体 pAdEasy-ZNF191 的构建 pAdTrack-CMV-ZNF191 经 *Pme* Ⅰ酶切线性化，转化含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌株。挑取形态较小的单菌落，提取质粒进行质粒 PCR 验证和酶切鉴定，将鉴定正确的质粒转入 DH5α 中扩大培养，碱法抽提大量制粒备用。

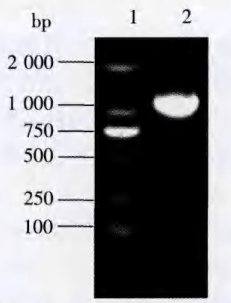
1.2.4 重组腺病毒 Ad-ZNF191 的包装和扩增 293T 细胞(2×10^6 个)接种于 6 cm 的培养皿中培养过夜，达 50%~70%融合度时进行转染。取 4 μg 重组腺病毒质粒 pAdEasy-ZNF191，用限制性内切酶 *Pac* Ⅰ进行酶切线性化，纯化后溶于 20 μl 水中。按 Lipofectamine 2000 操作说明书转染 293 T 细胞。定期用荧光显微镜监测 GFP 表达。转染后 7~10 d 用细胞刮匙刮取细胞转入 10 ml 离心管中，反复冻融 4 次裂解细胞，短暂离心后收集病毒上清-80℃保存。取病毒上清的 30%~50%两次感染 293 细胞，荧光显微镜监测 GFP 表达。转染后 3~5 d 即可收集重组腺病毒上清，可反复感染 293 细胞中扩增病毒至所需滴度。

1.2.5 重组腺病毒 Ad-ZNF191 的鉴定 收集感染重组腺病毒 Ad-ZNF191 48 h 后的 MCF-7 细胞，并提取细胞蛋白。BCA 法进行蛋白定量，加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液，沸水浴 5 min，按照蛋白定量结果进行加样，SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，采用半干法将蛋白转移至硝酸纤维素(Nitrocellulose，NC)膜上。NC 膜用 50 g/L 脱脂奶封闭 2 h，加入 ZNF191 小鼠抗人一抗(1:200)或 GAPDH 小鼠抗人一抗(1:1 000)工作液，4℃过夜，兔抗鼠二抗(1:4 000)于室温下孵育 1 h，用 ECL 发光，胶片显色，分析结果。

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增 ZNF191

RT-PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，可见大小约为 1.1 kb 的 DNA 片段(图 1)，大小与预期结果相一致。

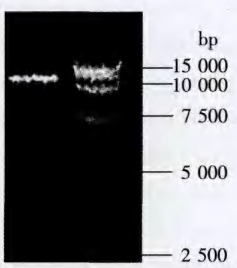


1. DL2000 DNA Marker；2. RT-PCR product of ZNF191

图 1 RT-PCR 结果

2.2 腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-ZNF191 的构建与鉴定

取 RT-PCR 扩增的目的基因产物和质粒 pAdTrack-CMV，经 *Xho* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切后，分别胶回收 1.1 kb 的 ZNF191 基因和约 9.2 kb 的 pAdTrack-CMV 骨架，然后用 T4 DNA 连接酶连接，转化 DH5α 大肠杆菌。重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-ZNF191，经 *Hind* Ⅲ酶切后，琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 2)，结果符合预期。阳性克隆进一步经测序鉴定，其序列与预期序列完全一致。



1. pAdTrack-CMV-ZNF191 digested with *Hind* Ⅲ；
2. DL15000 DNA marker

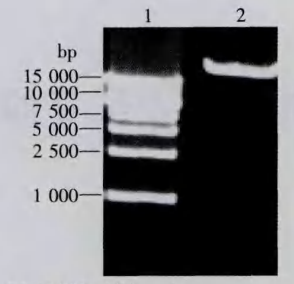
图 2 穿梭载体 pAdTrack-CMV-ZNF191 酶切鉴定

2.3 重组腺病毒载体 pAdEasy-ZNF191 的构建与鉴定

线性化的 pAdTrack-CMV-ZNF191 转化感受态 BJ5183 菌，18 h 可观察卡那抗性平板上分布着大小不一的白色菌落。挑取较小的克隆，抽提质粒后用 *Pac* Ⅰ酶切，0.8%的琼脂糖凝胶电泳鉴定，切出 1 条约 30 kb 的大片段和 1 条 4.5 kb 的片段(图 3)。进一步 PCR 鉴定，大小符合预期，表明腺病毒载体 pAdEasy-ZNF191 重组成功。

2.4 Western blot 检测 MCF-7 细胞 ZNF191 蛋白表达

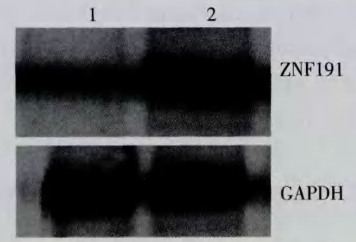
Western blot 分析显示，感染重组腺病毒 AdEasy-ZNF191 组比对照组(pAdEasy-1)ZNF191 蛋白水平有显著的提高(图 4)。



1. DL 15 000 DNA marker;

2. pAdEasy-ZNF191 digested with *Pac* I

图 3 重组腺病毒载体 pAdEasy-ZNF191 酶切鉴定



1. ZNF191 expression in the MCF-7 cells infected with AdEasy-1;

2. ZNF191 expression in the MCF-7 cells infected with AdEasy-ZNF191

图 4 ZNF191 的 Western blot 检测结果

3 讨 论

锌指蛋白作为一类转录因子而广泛地参与基因表达的调控。这种表达调控作用主要是通过它与特定的 DNA 序列（如启动子）、RNA 和蛋白质的结合而实现的。研究表明，锌指蛋白与胚胎发育、细胞分化以及人类多种疾病相关[7-9]。ZNF191 定位于 18q12.1[2]，该区域的缺失常在人类多种肿瘤中发现，如浸润性乳腺癌[10]，结肠癌[11,12]，胃贲门腺癌[13]，睾丸生殖细胞瘤[14]，造血恶性肿瘤[15]；复旦大学余龙教授课题组的研究表明，该基因在肝组织中高丰度地表达，且在肝癌组织中表达明显下调（私人交流）；此外，ZNF191 mRNA 在卵巢恶性肿瘤、结肠癌和乳腺癌组织中的表达显著下调[4,5]。这些结果提示ZNF191 可能参与乳腺癌结肠癌等肿瘤的发生或发展的负调控。最近文献报导令人感兴趣的是，ZNF191 与血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）表达的负相关性：人的结肠癌和乳腺癌组织ZNF191基因表达水平与其癌旁组织相比有显著下调而 VEGF 表达显著上调；ZNF191 的过表达导致 VEGF 表达下调，而用siRNA干扰沉默ZNF191导致 VEGF表达上调；ZNF191 与 VEGF 启动子报告基因共转染 MDA-MB-231乳腺瘤细胞导致VEGF启动子活性显著下调[4]；在 CHO 和 NIH3T3 细胞中锌指蛋白 ZNF191 具有 GAL4 启动子转录抑制活性[2]。这些结果提示 ZNF191 参与 VEGF 的负调控[4]。同样，我们通过ZNF191过表达与siRNA干扰实验提示ZNF191参与 PDGFR-β（Platelet-derived growth factor receptor-β）的负调控[6]。大量研究表明 VEGF 和 PDGFR-β 的异常表达与多种肿瘤相关[16,17]，我们通过构建重组腺病毒AdEasy-ZNF191 调控 PDGFR-β、VEGF 的表达，探讨对PDGFR-β 或 VEGF 异常表达引起的肿瘤的基因治疗的可能性。

参 考 文 献

[1] 厉建中，李 坚，傅继梁.锌指蛋白基因 ZNF191[J].生命的化学，2001，21(2)：116-117.

[2] Han Z G，Zhang Q H，Ye M，et al.Molecular cloning of six novel Kruppel-like zinc finger genes from hematopoietic cells and identification of a novel transregulatory domain KRNB[J].J Biol Chem，1999，274(50)：35741-35748.

[3] Li J，Chen X，Gong X，et al.A transcript profiling approach reveals the zinc finger transcription factor ZNF191 is a pleiotropic factor[J].BMC Genomics，2009，10：241.

[4] Harper J，Yan L，Loureiro R M，et al.Repression of vascular endothelial growth factor expression by the zinc finger transcription factor ZNF24[J].Cancer Res，2007，67(18)：8736-8741.

[5] 张 慧，崔 英，余 龙. ZNF191 mRNA 在卵巢恶性肿瘤中的表达及临床意义[J].第二军医学学报，2003，24(12)：1381-1382.

[6] Li J，Chen X，Liu Y，et al.The transcriptional repression of platelet-derived growth factor receptor-beta by the zinc finger transcription factor ZNF24[J].Biochem Biophys Res Commun，2010，397(2)：318-322.

[7] Brown R S. Zinc finger proteins：getting a grip on RNA[J].Curr Opin Struct Biol，2005，15(1)：94-98.

[8] Ganss B，Jheon A. Zinc finger transcription factors in skeletal development[J].Crit Rev Oral Biol Med，2004，15(5)：282-297.

[9] Pearson R，Fleetwood J，Eaton S，et al.Kruppel-like transcription factors：A functional family[J].Int J Biochem Cell Biol，2008，40(10)：1996-2001.

[10] Richard F，Pacyna-Gengelbach M，Schluns K，et al.Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer[J].Int J Cancer，2000，89(3)：305-310.

[11] Kern S E，Fearon E R，Tersmette K W，et al.Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma[J].JAMA，1989，261(21)：3099-3103.

[12] Vogelstein B，Fearon E R，Hamilton S R，et al.Genetic alterations during colorectal-tumor development[J].N Engl J Med，1988，319(9)：525-532.

[13] Van Dekken H，Alers J C，Riegman P H，et al.Molecular cytogenetic evaluation of gastric cardia adenocarcinoma and precursor lesions[J].Am J Pathol，2001，158(6)：1961-1967.

[14] Skotheim R I，Kraggerud S M，Fossa S D，et al.Familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors show frequent genetic changes at loci with suggestive linkage evidence[J].Neoplasia，2001，3(3)：196-203.

[15] Tune C E，Pilon M，Saiki Y，et al.Sustained expression of the novel EBV-induced zinc finger gene，ZNFEB，is critical for the transition of B lymphocyte activation to oncogenic growth transformation[J].J Immunol，2002，168(2)：680-688.

[16] Kuwai T，Nakamura T，Sasaki T，et al.Targeting the EGFR，VEGFR，and PDGFR on colon cancer cells and stromal cells is required for therapy[J].Clin Exp Metastasis，2008，25(4)：477-489.

[17] George D.Platelet-derived growth factor receptors：a therapeutic target in solid tumors[J].Semin Oncol，2001，28(5)：27-33.

（责任编辑：关蕴良）