技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)04-0579-03

大鼠血清淀粉样物质 P(SAP)基因的克隆及重组腺病毒制备

娄小丽,黄 英,舒 畅,陈 洁,罗 庆,王莉佳,吴雪郡
(重庆医科大学儿童医院呼吸中心,重庆 400014)

【摘 要】目的:制备能够表达大鼠血清淀粉样物质 P (Serum amyloid P component, SAP)的重组腺病毒。方法:采用 RT-PCR 扩增的方法获取大鼠 SAP,并将该基因采用定向克隆的方法克隆进入穿梭质粒 pAdTrace-TO4 中,进一步采用同源重组的方法将该质粒和腺病毒骨架质粒 Adeasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 中同源重组,然后用脂质体介导的方法导入包装细胞 HEK293 中,产生表达目的基因的重组腺病毒,扩增病毒后用倍比稀释法测定其滴度。结果:通过 PCR 技术从重组穿梭质粒和重组腺病毒质粒中扩增出 700 bp 左右插入片段,测序结果和基因库中的基因序列一致。扩增后的重组腺病毒滴度为 2.8×10^8 pfu/ml。结论:成功构建了携带 SAP 基因的重组腺病毒载体 Adeasy-1-SAP,为探讨 SAP 对肺纤维化的作用及其机制打下基础。

【关键词】血清淀粉样物质 P;腺病毒;肺纤维化;分子克隆
【中国图书分类法分类号】R394.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-01

Cloning of rat serum amyloid P component gene and preparation of its recombinant adenovirus vector

LOU Xiao-li, et al
(*Center of Respiratory Diseases, Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the recombinant adenovirus vector carrying rat serum amyloid P component (SAP) as preparation for later use. *Methods*: Rat SAP was obtained by using RT-PCR amplification and then cloned into the shutter plasmid pAdTrace-TO4. Subsequently, this newly constructed plasmid pAdTrace-TO4-SAP was followed by homologous recombination with bone plasmid pAdEasy-1 in BJ5183. Recombinant adenovirus was obtained after being packaged in human embryonic kidney cells HEK293 by lipofectAmineTM2000 mediation. After amplification the recombined adenovirus, we determined its titer by end-point dilution assay. *Results*: In recombinant shuttle plasmid and recombinant adenovirus, a fragment of 700 bp detected by PCR was identical with that included in Genbank. The titer of recombinant adenovirus reached 2.8×10^8 pfu/ml. *Conclusion*: The recombinant adenovirus containing SAP gene was constructed successfully. This will provides a good basis for further study about the influence of SAP on lung fibrosis.

【Key words】SAP; Adenovirus; Lung fibrosis; Clone

大鼠血清淀粉样物质 P(Serum amyloid P component,SAP)是由肝脏分泌入血的一种 27 kDa 大小的糖蛋白,并在循环中以稳定的 135 kDa 大小的五聚体形式存在[1],能够与凋亡细胞,DNA 以及某些特定微生物相结合并被巨噬样细胞从体内清除[2],提高其体内水平对大鼠、人类、以及小鼠没有毒副作用[3,4]。自从被发现能够明显抑制外周血单核细胞向成纤维细胞转化以来[5],SAP 对纤维化性疾病的影响越来受到关注。SAP 能够抑制心脏的纤维化[6],增加大鼠血清 SAP 水平能够抑制博来霉素诱导的大鼠肺纤维化的发生[7]。肺纤维化是由多种原因引起的慢性肺疾病的共同结局,是否 SAP 能够抑制各种因素导致的肺纤维化特别是特发性肺纤维化是我们关注的焦点。本研究构建针对 SAP 重组腺病毒,为探讨 SAP 对肺纤维化疾病的影响及机制提供重要的研究工具。

作者介绍:娄小丽(1982-),女,硕士,
研究方向:肺纤维化。
通讯作者:舒 畅,女,博士,E-mail: maggiechangshu@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700915)。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

腺病毒穿梭质粒 pAdTrace-TO4(携带 mRFP 报告基因)由重庆医科大学附属儿童医院儿研所肿瘤实验室提供,含腺病毒骨架质粒 Adeasy-1 的 E. coil DH5α 菌由重庆医科大学分子生物实验室提供,DH5α 大肠杆菌与 BJ5183 大肠杆菌购自上海杰美基因公司,包装细胞 293HEK 由重庆医科大学儿童医院儿研所营养室提供。限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ和 T4 DNA 连接酶均购自 New England Biolabs

公司。小提质粒提取试剂盒和 PCR 试剂盒购自天根公司,反转录试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒购自 Promega 公司,脂质体 L lipofectAmineTM2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因 SAP 的基因片断的克隆 提取 4 周大小 SD 大鼠的肝脏组织的 RNA,逆转成 cDNA 作为模板,应用如下引物: 上游 5'-GCCGTCGACACCATGGACAAGCTGCTGCTTTGGATG -3';下游 5'-CGCTCTAGATCATGAGCTTTTGTTGTCCCACATAC -3'。其中上游引物插入 *Sal* Ⅰ酶切位点序列,下游引物插入 *Xba* Ⅰ酶切位点序列。PCR 反应程序设定为 94℃变性 3 min 1 个循环,94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,共 20 个循环,72℃延伸 60 s,最后 70℃延伸 5 min。电泳 PCR 产物,紫外光灯下检测 SAP 的 DNA 条带,判断 PCR 产物的大小, 纯度及浓度, 用 PCR 产物纯化回收试剂盒纯化 PCR 产物。

1.2.2 重组穿梭质粒 pAdTrace-TO4-SAP 用限制性内切酶 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切腺病毒穿梭质粒 pAdTrace-TO4 和纯化回收后的 PCR 产物 4 h,65℃ 20 min 灭活酶活性, 直接加 T4 连接酶反应 30 min。将纯化后的连接产物转化入感受态细胞 DH5α,在卡那抗性 LB 平板上挑取单克隆并扩增,提取质粒。PCR 筛选,上游引物 5'-GCCGTCGACACCATGGACAAGCTGCTGCTTTGGATG -3'; 下游引物 5'-CGCTCTAGATCATGAGCTTTTGTTGTCCCACAT AC -3'。反应程序设定为 94℃变性 3 min 1 个循环,94℃变性 30 s,57℃退火 30 s, 共 20 个循环,72℃延伸 60 s,最后 70℃延伸 5 min。阳性质粒送测序,测序正确的重组质粒记为 pAdTrace-SAP, 保存于 -20℃待用,并保存其 DH5α 菌液于 -80℃。

1.2.3 重组腺病毒 Adeasy-1-SAP 的构建及鉴定 *Pme* Ⅰ酶切线形化重组质粒 pAdTrace-SAP,酶切产物纯化回收后转化入含有 Adeasy-1 的 BJ5183 感受态细胞, 在卡那抗性平板进行克隆筛选。20 h 后挑选最小的单克隆并扩增,提出质粒,用限制性内切酶 *Hind* Ⅲ和限制性内切酶 *Pac* Ⅰ分别酶切鉴定。

1.2.4 重组腺病毒的包装和扩增 用脂质体介导将经限制性内切酶 *Pac* Ⅰ酶切的 Adeasy-1-SAP 质粒转染入病毒包装细胞 293HEK。在转染后 3、5、7、11、13 d 观察荧光表达情况,待大部分细胞漂浮,将细胞收集通过反复冻溶的方法收获病毒。含病毒的上清用以感染准备好的 293 细胞,将重组腺病毒大量扩增 3 轮,采用稀释法测定其滴度。

1.2.5 重组腺病毒的滴度测定 测定前 12~16 h,在 24 孔板中接种 293 细胞(10^5 个/孔),第 2 d 依次加入按 10 倍比稀释的待检病毒悬液 400 ml,37℃感染 60 min 后,吸去 400 ml 上清,加入 1 ml DMEM 培养基继续培养,24 h 后在荧光倒置显微镜下观察红色荧光蛋白表达情况,并按下列公式计算病毒滴度[8],病毒滴度(pfu/ml)=(RFP 阳性细胞数 X 病毒上清稀释倍数)/0.4。

2 结 果

2.1 获取目的基因 SAP 的基因片断

将所得 PCR 产物通过琼脂糖凝胶上电泳后看到单一条带,位置在 700 bp 左右和我们的目的基因大小相吻合,见图 1。

2.2 鉴定重组穿梭质粒 pAdTrace-TO4-SAP

用 PCR 的方法从所提的 5 份质粒中扩增目的基因,得到两个阳性质粒,见图 2,测序后发现二者均为成功连接的重组质粒, 且核酸序列与 GenBank 登录的序列完全相符,表明获得重组穿梭质粒 pAdTrace-TO4-SAP。

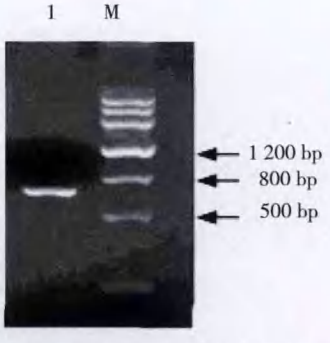
2.2 鉴定重组腺病毒质粒 Adeasy-1-SAP

所提质粒经 *Hind* Ⅲ酶切质粒 DNA 得到 6 个片断:大于 8 000 bp 2 条,5 000 bp 左右 2 条,3 000 bp 左右 1 条,2 000 bp 左右 1 条;经 *Pac* Ⅰ 酶切后得到约 4 500 bp 和大于 23 000 bp 大小的两条片断, 见图 3, 说明获得成功重组的 Adeasy-1-SAP。

2.4 重组腺病毒 Adeasy-1-SAP 的包装和扩增

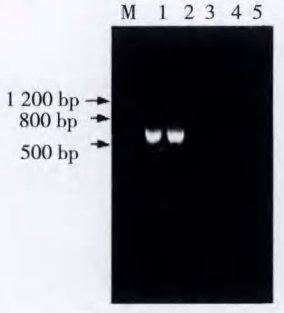
在转染后 3、5、7、11 d 观察到红色荧光越来越多,13 d 时大部分细胞漂浮收获病毒。重组腺病毒大量扩增 3 轮收获到滴度达到 1×10^{10} pfu/L 的 Adeasy-1-SAP 腺病毒,于-80℃保存待用,见图 4。

2.5 重组腺病毒滴度测定实验中应用荧光计数法以及倍比稀释法测定重组病毒滴度,最后求得纯化后病毒的滴度约为 2.8×10^8 pfu/ml。



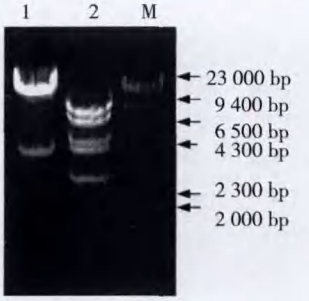
1. SAP gene segment; M. DNA Marker

图 1 SAP 基因 PCR 产物的凝胶电泳鉴定



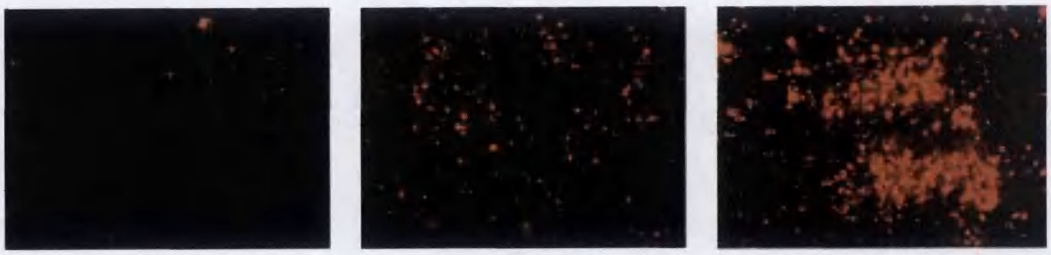
M. DNA Marker; 1、2. SAP gene segment; 3~5. negative controls

图 2 重组穿梭质粒 pAdTrace-TO4-SAP 的质粒 PCR 鉴定



1. *Pac* Ⅰ digested; 2. *Hind* Ⅲ digested; M. *Hind* Ⅲ λ DNA Marker

图 3 重组腺病毒质粒 Adeasy-1-SAP 的鉴定



3 d　　7 d　　14 d

图 4　转染后 3、7、11 d 观察到的红色荧光

3　讨　论

肺纤维化被称为“不是癌症的癌症”，主要表现为逐渐加重的呼吸困难，以其逐年增长的发病率引起广泛的重视。它是由多种原因引起的慢性肺疾病的共同结局，目前已查明病因的约占 35%，如吸入各种粉尘，有毒气体，木屑，环境污染如汽油烟雾，某些动物羽毛，继发于某种疾病如慢阻肺、结缔组织并肿瘤、某些化疗药物等。近年来病因未明的特发性肺纤维化发病率明显上升，因其疗效差，5 年生存率低于 50%，而对患者的生存造成极大威胁。目前肺纤维化主要使用糖皮质激素与免疫抑制剂进行治疗，但疗效不理想副作用却非常明显，需要寻求新的治疗方法来提高肺纤维化的治疗效果。近有报道 SAP 能够抑制博来霉素诱导的肺纤维化[7]，且提高人体和大鼠的血清 SAP 水平对人体和大鼠没有毒副作用[3,4]，我们将要进一步深入研究 SAP 对肺纤维化的作用及其机制。

腺病毒载体法是基因治疗中最有前途的基因转移方法之一，也是目前应用最广泛的一种病毒载体，它不整合到染色体中无插入致突变性，且其介导的过表达克服了通过用质粒作为载体转染效率低的缺陷。Rosenfeld 等[9]把 α 1 抗胰蛋白酶（α 1-An-titrypsin，α 1-AT）基因转动到肺上皮细胞中，证实重组腺病毒载体和其野生型病毒一样，易感染宿主上皮组织，特别是呼吸道上皮组织。腺病毒载体的这种特性使其成为研究呼吸系统疾病的最佳选择。本实验中，我们参考 He[8]等创建的 Adeasy 腺病毒载体系统，通过细菌体内同源重组的方法，构建了针对 SAP 的重组腺病毒载体，为研究 SAP 对肺纤维化以及其它纤维性疾病的影响提供工具，为以后的研究奠定基础。

本实验中有两处实验过程与传统实验方法不同，能够达到实验目的且简单高效。第一个不同在于：本试验为了将目的基因片断与腺病毒穿梭质粒 Trace-TO4 连接，首先分别双酶切目的片断与腺病毒穿梭质粒，再分别热失活，最后将目的基因片断与腺病毒穿梭质粒按不同的比率混合进行连接反应。这个改进方法的前提是内切酶和连接酶的反应缓冲液可以兼容。避免切胶回收使用热失活的方法方便的除去限制性内切酶对连接反应的影响，只需要使用最小的反应体系既最少的限制性内切酶就能够保证足够的进行连接反应所需要的 DNA 的量。第二个不同在于：为了判断腺病毒穿梭质粒与腺病毒骨架质粒是否同源重组成功，本试验增加了 *Hind* Ⅲ进行酶切鉴定，得到多条较小的确定大小的片断。由于重组是在细菌中发生的，微小的基因组变化不易发现，传统的 *Pac* Ⅰ酶切鉴定方法只能得到两条片断，且大片断非常大很难识别有部分片断丢失的重组质粒，导致腺病毒包装的失败。用 *Hind* Ⅲ酶切同源重组后质粒得到多条小片断，容易发现有片断丢失的同源重组质粒，这就大大降低了腺病毒包装失败的风险。

本研究不仅成功构建针对 SAP 的腺病毒载体，为以后 SAP 对纤维化疾病的研究奠定基础，还探索实践了更方便高效的重组腺病毒穿梭质粒的方法，以及更准确的重组腺病毒质粒的鉴定方法，优化了传统的构建重组腺病毒质粒的方法。

参　考　文　献

[1] Steel D M, Whitehead A S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein [J]. Immunol Today, 1994, 15(2): 81-88.

[2] Mold C, Gresham H D, Du Clos T W. Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs [J]. J Immunol, 2001, 166(2): 1200-1205.

[3] Armstrong G D, Mulvey G L, Marcato P, et al. Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs[J]. J Infect Dis, 2006, 193(8): 1120-1124.

[4] Pilling D, Buckley CD, Salmon M, et al. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P[J]. J. Immunol, 2003, 171(10): 5537-5546.

[5] Hawkins P N, Tennent G A, Woo P, et al. Studies in vivo and in vitro of serum amyloid P component in normals and in a patient with AA amyloidosis [J]. Clin Exp Immunol, 1991, 84(2): 308-316.

[6] Pilling D, Roife D, Wang M, et al. Reduction of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by serum amyloid P[J]. J Immunol, 2007, 179(6): 4035-4044.

[7] Haudek SB, Trial J, Xia Y, et al. Fc receptor engagement mediates differentiation of cardiac fibroblast precursor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(29): 10179-10184.

[8] 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.

[8] Rosenfeld M A, Siegfried W, Yoshimura K, et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(8-9): 1643-1651.

（责任编辑：关蕴良）