基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0006-03

编码小鼠 PGC1α 基因的重组腺病毒载体构建及鉴定

马仕坤,钟 立,程庆丰,李卫平,青 华,李启富
(重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建编码小鼠 PGC1α 基因的重组腺病毒载体,为进一步研究其蛋白功能提供工具。方法:穿梭质粒 pAdTrack-CMV-PGC1α 线性化后与骨架质粒 pAdeasy-1 在 BJ5183 菌中完成同源重组,筛选并提取重组正确的腺病毒质粒,*Pac* Ⅰ线性化,脂质体转染 293 细胞包装出成熟的具有感染活力的腺病毒颗粒,$TCID_{50}$ 法测定病毒滴度,Western bloting 检测 PGC1α 蛋白在 293 细胞的表达。结果:测序及酶切鉴定表明目的基因正确插入穿梭质粒,读码框未发生移位。重组腺病毒扩增后滴度约 3×10^{10} $TCID_{50}$/ml,能在 293 细胞中表达 PGC1α 蛋白。结论:利用细菌内同源重组的方法成功构建了编码小鼠 PGC1α 基因的重组腺病毒载体,并观察到其蛋白表达。

【关键词】PGC1α;腺病毒载体;同源重组
【中国图书分类法分类号】R589.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-10

Construction and Identification of adenovirus vector encoding mouse PGC1 α gene

MA Shi-kun, et al
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct an adenovirus vector encoding mouse PGC1 α gene for further study on its function. *Methods*: Recombinant shuttle plasmid pAdTrack-CMV-PGC1 α was linearized by *Pme* Ⅰ and transformed into Escherichia coli BJ5183 carrying backbone plasmid pAdeasy-1 to obtain adenovirus plasmid through homologous recombination. The recombinant adenovirus plasmid was digested by *Pac* Ⅰ and transfected into HEK293 cells to form adenvirus particles. The virus titer was determined by $TCID_{50}$ method. The expression of PGC1 α in 293 cells was detected by Western blot. *Results*: The packaging cell showed typical CPE, and the virus titer was about 3×10^{10} $TCID_{50}$/ml after amplification. The expression of PGC1 α mediated by the recombinant adenovirus vector was verified by Western blot. *Conclusion*: The adenovirus vector encoding mouse PGC1 α gene was successfully constructed, and the protein was observed in 293 cell.

【Key words】PGC1 α; Adenovirus vector; Homologous recombination

适应性产热是维持机体能量平衡的一个重要方面,也是机体对抗肥胖的一种防御措施。研究发现,过氧化物酶增殖体激活受体辅激动子-1α(Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator, PGC1α)在适应性产热中发挥了重要作用。PGC1α是一种新的核受体转录辅激动子,是由 Puigserver 等在 1998 年首先从小鼠棕色脂肪组织的 cDNA 文库中克隆得到,并发现在寒冷刺激下,小鼠的棕色脂肪、骨骼肌等产热组织中 PGC1α 的 mRNA 表达明显升高[1]。进一步研究发现 PGC1α 之所以能够引起适应性产热,是因为其能够有效增强 PPARγ 和甲状腺激素受体等核受体对解偶联蛋白-1(Uncoupling protein 1, UCP1)的转录激活作用,而 UCP1 是棕色脂肪产热的关键蛋白。此外,PGC1α 还能通过诱导 UCP2 表达和调节核呼吸因子,促进骨骼肌线粒体生物合成,增强呼吸链功能[2];而 PGC1α 在白色脂肪细胞的异位表达,能激活 UCP1 和线粒体呼吸相关酶的表达,使白色脂肪细胞具有棕色脂肪细胞的产热功能[3]。本研究拟构建编码小鼠 PGC1α 基因的重组腺病毒,为进一步研究其功能及其在肥胖基因治疗方面的应用奠定一定基础。

作者介绍:马仕坤(1980-),女,硕士,
研究方向:肥胖与胰岛素抵抗。
通讯作者:李启富,男,教授,E-mail:liqifu@yeah.net。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570876)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 AdEasy 系统由重庆医科大学基础医学院毕杨博士惠赠,穿梭质粒 pAd-Track-CMV-PGC1α 为自行构建[4],*E.coli* DH5α 由重庆医科大学儿童医院王永明博士惠

赠。293 细胞为重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 内切酶 *Pme* Ⅰ和 *Pac* Ⅰ为 New England 公司产品，DNA 多聚酶为 Takara 公司产品，质粒抽提试剂盒为 Omega 公司产品，Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司，LB 培养基、RPMI-1640 培养基为美国 GIBCO 公司产品，由重庆医科大学感染性疾病分子生物学实验室配制。

1.2 *方法*

1.2.1 BJ5183 感受态制备 取冻存菌液以 1∶20 加入 LB 液体培养基，37℃，300 r/min 剧烈振摇约 3 h，注意监测 OD_{600} 值，以不超过 0.6 为宜，冰浴 30 min，4℃，3 900 r/min 离心 30 min，弃尽上清。立即加入 0.1 mol/l $CaCl_2$/10%甘油混合物，彻底重悬菌体，以 50 μl 每管分装，-80℃保存备用。

1.2.2 BJEasy 获取 Omega 小抽提取骨架质粒 pAdEasy-1，氯化钙法转化感受态 BJ5183，次日挑取单克隆菌落，液体 LB（含氨苄青霉素）培养，抽提质粒，电泳观察其大小，*Hind* Ⅲ酶切鉴定其结构是否发生改变。选择正确的克隆，命名为 BJEasy，制备化学感受态备用。

1.2.3 细菌内同源重组 穿梭质粒 pAdTrak-CMV-PGC1 α 经限制性内切酶 *Pme* Ⅰ过夜酶切线性化后，转化感受态 BJEasy。卡那抗性筛选阳性克隆，提取质粒，电泳观察其大小，*Pac* Ⅰ酶切鉴定。将鉴定正确的质粒转入 DH5 α。

1.2.5 293 细胞培养及病毒包装 293 细胞生长于 RPM1640 加 10%胎牛血清中，孵箱温度 37℃，CO_2 含量 5%。细胞融合度达 90%时进行转染，*Pac* Ⅰ线性化重组腺病毒质粒，胶回收试剂盒直接纯化，紫外分光光度计定量。以 4 μg 转染 25 ml 培养瓶中的 293 细胞。24 h 后，可在荧光显微镜下观测绿色荧光表达情况并将细胞传代培养。

1.2.6 病毒收获及扩增 7 d 后，绝大部分细胞出现病变效应，离心收集细胞，保留管底约 1 ml 培养基，-80℃/37℃三冻三融，裂解细胞，离心，上清即为病毒原液。分装，-20℃冻存。以少量原液感染 80%融合度的 293 细胞，待细胞出现完全病变效应后，以同样方法收获病毒，如此反复 3 到 5 个循环，病毒不断扩增。

1.2.7 病毒滴度测定 将 293 细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种 96 孔板，培养 24 h 后，加入从 10^{-3} 个/孔到 10^{-10} 个/孔梯度稀释的病毒液，每种浓度 10 个复孔，余两孔为空白对照。$TCID_{50}$ 法测定病毒滴度。

1.2.8 Western blotting 检测目的基因表达 将重组病毒和对照病毒按 MOI=100 分别感染生长状态良好的 293 细胞，48 h 后裂解细胞提取蛋白，按《分子克隆》（第二版）操作说明进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，5%脱脂奶粉封闭，37℃孵育一抗和辣根过氧化酶标记的二抗，最后化学发光法显色。

2 结 果

2.1 重组穿梭质粒测序鉴定

测序结果经 BLAST 比对，与 GenBank 报道序列一致，未发生碱基突变，质粒与插入片断连接处的测序结果（见图 1），显示读码框正确。

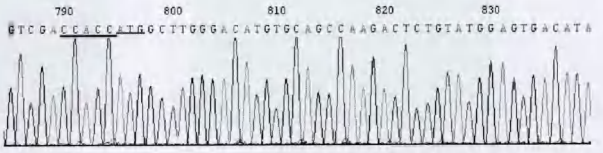


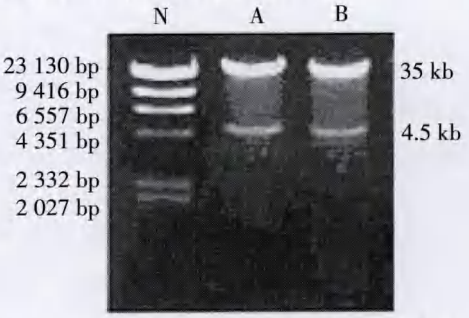
图 1 插入片断与质粒连接处的测序图

2.2 BJEasy 质粒鉴定

从 BJEasy 提取的骨架质粒与 DH5α 来源的骨架质粒，大小相同，两者经 *Hind* Ⅲ酶切后 5 条带的大小位置一致，提示 pAdEasy-1 转入 BJ5183 后未发生异常重组。

2.3 重组腺病毒质粒鉴定

经 *Pac* Ⅰ酶切，重组病毒与对照病毒酶切产物均为约 35 kb 和 4.5 kb 两条带（见图 2），说明同源重组发生在右臂和复制起始点。



M. *Hind* Ⅲ DNA Marker；A. 重组腺病毒质粒；B. 对照腺病毒质粒

图 2 腺病毒质粒 *Pac* Ⅰ酶切鉴定

2.4 腺病毒包装扩增及滴度测定

重组病毒质粒转染 293 细胞 24 h 后，倒置荧光显微镜下观察，可见少量散在的绿色荧光表达，此后，荧光逐渐增多，至第 5 d 时可见荧光成片出现，第 7 d 时绝大部分细胞胞体变圆，脱离培养瓶底部，聚集成簇（见图 3）。经过扩增的病毒按照$TCID_{50}$，根据公式 $T(titer)=10^{1+d(s-0.5)}$（d 为稀释度的常用对数，在此为 1，s 为包括 10^{-1} 和 10^{-2} 在内的每种稀释度阳性率）计算得出，重组病毒滴度约为 3×10^{10} $TCID_{50}$/ml。

2.6 Western blotting 结果

重组腺病毒感染 293 细胞 PGC1α 表达量明显高于对照空病毒感染 293 细胞（见图 4）。

3 讨 论

人类 PGC1 基因定位于 4 P15.1，包括 13 个外显子，编码一段含 798 个氨基酸分子量为 91 kD 的蛋白质，人和小鼠的同源性为 94%。心脏、骨骼肌和肾脏



重组病毒包装第 1 d　　重组病毒包装第 7 d　　病毒收获前

图 3　重组病毒包装 293 细胞后不同时间荧光表达（荧光显微镜下）

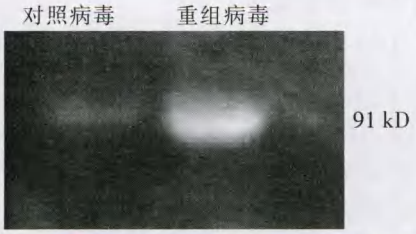


图 4　Western blotting 检测 PGC1α 在 293 细胞的表达（化学发光法）

表达丰富，而在肝脏、脑、胰腺等组织表达量相对较低[5,6]。它是一种重要的核转录因子，参与众多的生理活动过程，与能量代谢有着极其密切的关系。它能促进线粒体的生物合成，诱导呼吸链相关酶的表达，加强脂肪酸的 β 氧化，增加 UCP-1 的表达[7]，是肥胖基因治疗的重要候选靶基因。利用组织特异性的启动子驱动 PGC1 在脂肪组织特异性高表达，使白色脂肪产热，是一条值得探索的基因治疗肥胖的道路。

腺病毒载体由于其具有宿主范围广，扩增滴度高，表达能力强，载体容量大，容易制备且不与宿主基因组整合等众多优点，而被广泛用于基因转移。本研究采用细菌内高效同源重组的 AdEeasy 腺病毒构建系统[8]，并对原系统进行了如下改进：其一，将线性化腺病毒质粒转染 293 细胞的时机从细胞融合度 50%~70%提高到 90%以上，这样更加符合脂质体转染的要求，明显提高了转染效率；并且在转染第 2 d 将细胞传入大瓶培养，给予细胞足够的生长空间，使其生长状态良好，利于病毒包装。从某种意义上来说，此举在包装过程中实现了病毒的首轮扩增，使得原代病毒的滴度明显提高。其二，将原有的一步法电转改为简便易行的两步法化转，省却了要求特殊设备和需要摸索电转条件的麻烦，在一般实验室即可轻松完成。

需要注意的是，AdEasy 系统所使用的 BJ5183 细菌，为重组酶阳性菌，正是如此，带有 3 段同源序列（左臂、右臂和复制起始点）的穿梭质粒和骨架质粒得以重组为携带目的基因的腺病毒质粒，但也正因为这样，质粒在其中极不稳定，所以在筛选获得阳性重组病毒克隆后应尽快提取质粒并将其转入适于保存的菌株，如 DH5α、JM109、TOP10 等。另外，腺病毒质粒在 BJ5183 中的拷贝数极低，按照常规的抽提过程获得的质粒量较少，可在过夜培养的菌液中加入适量的氯霉素，使终浓度达到 170 μg/ml，再继续培养 6~8 h，这样可以在细菌停止增殖的情况下继续扩增质粒，从而提高产量。

本研究通过细菌内同源重组、293 细胞包装，成功构建了编码小鼠 PGC1α 基因的重组腺病毒载体，并在 293 细胞中获得高表达，为进一步研究其功能及其在肥胖基因治疗方面的应用提供了工具。

（致谢：本课题在重庆医科大学感染性分子生物学教育部重点实验室完成，得到该实验室张文露、汤华、蔡雪飞等多位老师的指导和帮助，特此致谢！）

参 考 文 献

[1] Puigserver P, Wu Z, Park C W, et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis[J]. Cell, 1998, 92(6): 829-839.

[2] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1[J]. Cell, 1999, 98(1): 115-124.

[3] Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, et al. Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes[J]. J Biol Chem, 2003, 278(35): 33370-33376.

[4] 马仕坤，程庆丰，青　华，等.重组穿梭质粒 pAdTrak-CMV-PGC1α 的构建及鉴定[J]. 重庆医学，2006，35(14)：1249-1250.

[5] Esterbauer H, Oberkofler H, Krempler F, et al. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1(PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression[J]. Genomics, 1999, 62(1): 98-102.

[6] 辛海明，刘泽军，陈　杰.iASPP 特异性 RNA 之表达载体的构建及其干扰效果鉴定[J]. 第三军医大学学报，2006，28(9)：900-902.

[7] Lowell B B, Spiegelman B M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis[J]. Nature, 2000, 404(6778): 652-660.

[8] He T C, Zhou S B, Luis T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-2514.

（责任编辑：关蕴良）