维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0561-04

β-catenin 腺病毒载体的构建及鉴定

毕 杨[1,2],黄佳祎[1,2],吴明军[1,2],张 琴[1],张任飞[2],赵迎泽[1,2],冯 涛[1]

(1.重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建人 β-catenin 基因的重组腺病毒载体,为进一步研究 Wnt/Wingless 信号通路在肿瘤发生发展中的作用机制奠定重要基础。方法:以含有 β-catenin 的 pcmv-βNS-FC 质粒为模板 PCR 获得目的基因,将目的基因定向克隆至腺病毒穿梭质粒构建阳性重组 pAd track-β-catenin, 并经 PmeI 线性化后在 BJ5183 细菌中与腺病毒骨架质粒 pAd Easy-1 同源重组获得 β-catenin 重组腺病毒载体,再将 PacI 线性化的腺病毒质粒转染 HEK293 细胞包装重组腺病毒。结果:PCR 及酶切鉴定证实目的基因正确克隆至腺病毒质粒中,目的基因序列与 GENEBANK 报道一致,荧光显微镜可观察到 GFP 的表达。结论:成功构建 pAd-β-catenin 腺病毒质粒载体,并在 HEK293 细胞中包装出重组腺病毒。

【关键词】β-catenin 基因;腺病毒载体;Wnt/Wingless 信号通路;肿瘤

【中国图书分类法分类号】Q78;R730.231+.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-06

Construction and identification of recombinant adenovirus vector containing human β-catenin

BI Yang, et al

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the recombinant adenovirus vector containing humanβ-catenin gene by homogenous recombination in E.coli for later research of the mechanism of Wnt/Wingless signal pathway in tumorigenesis. *Methods*: The target gene was amplified from pcmv-βNS-FC plasmid by PCR, then cutted by two endonucleases and directional cloned to the pAd track-cmv vector. Afterward, the correct recombinant was linearized by PmeI, following co-transformation with the backbone vector pAd Easy-1 in E.coli BJ5183. The homologous recombinant was linearized by PacI, and then transfected into HEK293 cell line to pack the adenovirus. *Results*: Through PCR, endonuclease cutting and gene sequencing, the target gene was verified to be correctly cloned in adenovirus vector. The high expression of green fluorescence protein in 293 cell line was found under fluorescent microscope. *Conclusion*: The recombinant adenovirus vector containing human β-catenin gene was successfully constructed and the adenovirus was packaged in HEK293 cell line.

【Key words】β-catenin; Adenovirus vector; Wnt/Wingless signal pathway; Tumor

Wnt/Wingless 信号传导途径在胚胎发育和肿瘤发生过程中都起着重要作用,β-catenin 是该途径中的一个重要成员,它通过与 T-细胞因子(TCF)和淋巴样增强因子家族(LEF)形成异源二聚体而激活基因转录,调节细胞的增殖分化;还可结合钙粘蛋白和膜受体(如表皮生长因子受体)蛋白,介导细胞间的粘附作用[1,2]。β-catenin 量的改变以及基因突变等,都可能导致错误激活 Wnt 信号途径, 引起食道癌、胃癌、前列腺癌、肝癌和结肠癌的发生[3]。本研究采用细菌内同源重组法, 构建了 β-catenin 基因重组腺病毒质粒, 并在 HEK293 细胞中包装出腺病毒,为进一步研究以 β-catenin 为核心的 Wnt/Wingless 信号通路在肿瘤发生发展中的作用机制奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

携带有 β-catenin 目的基因的 pcmv-βNS-FC 质粒由本校周兰教授构建并测序鉴定正确; 腺病毒骨架质粒 pAd Easy-1、腺病毒穿梭质粒 pAd track-cmv 由芝加哥大学何通川教授馈赠;大肠杆菌BJ5183、Top10 及细胞株 HEK293 均为

作者介绍: 毕 杨(1981-),女,博士研究生,
主要研究方向:肿瘤基因治疗。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO:30371274)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验室保存；内切酶 PmeI，PacI 购自 Biolabs 公司；T4DNA ligase、PCR Premix、XbaI 及 KpnI 内切酶购自 TaKaRa 公司；DNA marker、质粒抽提试剂盒购自天为时代公司，LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品；胎牛血清为 HyClone 公司产品；PCR 引物合成，基因测序均由上海英俊生物技术公司完成。

1.2 仪器

DYY-11 型电泳仪，可见 / 紫外分光光度计，高速冷冻离心机，倒置荧光显微镜等。

1.3 实验方法

1.3.1 获取目的基因 Primer5.0 设计扩增 β-catenin cDNA 全长的引物，上游加入 Kpn I 酶切位点（符合 Kozak 序列），下游加入 Xba I 酶切位点（up:5'-GCG GGTACC ATG GCT ACT CAA GCT GAT TT-3'(29bp)，down:5'-GGCG TCTAGA TTA CAG GTC AGT ATC AAA CCA GG-3'(33bp)）。以携带 β-catenin 基因的 pcmv-βNS-FC 质粒为模板，用上述引物 PCR 扩增获得目的基因片段（PCR 参数：94℃ 5min；94℃ 45s，63℃ 45s，72℃ 2min30s，25cycles；72℃ 7min），1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计检测 DNA 浓度。

1.3.2 构建 β-catenin 腺病毒穿梭质粒 PCR 产物纯化后经 KpnI 和 XbaI 双酶切（40μl 体系：XbaI：2μl，KpnI：2.4μl，10×M buffer：4μl，DNA：4μg，37℃ 6~8h），再次纯化后定向连接到同样经 KpnI 和 XbaI 酶切处理的 pAd track-cmv 穿梭质粒（20μl 连接体系：T4DNA 连接酶：1μl，10×link buffer：2μl，PCR 产物：质粒=10：1，4℃过夜）。连接产物 10μl 转化感受态大肠杆菌 Top10，卡那霉素抗性平板筛选，挑取最小阳性单克隆，LK 培养基 37℃，200r/min 过夜培养，质粒小抽试剂盒抽提质粒，0.8% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定并检测浓度；经 PCR 和 KpnI，XbaI 双酶切（引物及条件同前）鉴定确证后送上海英俊生物技术公司测序，获得 β-catenin 腺病毒穿梭质粒。

1.3.3 制备 BJ5183 pAd Easy-1 感受态 0.1mol%$CaCl_2$ 制备 BJ5183 化学感受态细胞，用腺病毒骨架质粒 pAd Easy-1 1μg 转化感受态细胞，氨苄青霉素和链霉素培养板筛选，挑取最小阳性菌落，5ml LA/S 培养液 37℃，200r/min 过夜培养，提取质粒，经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 *Hind*Ⅲ酶切电泳鉴定为 pAd Easy-1 质粒即是正确阳性克隆。将含有 pAd Easy-1 的 BJ5183 菌用常规氯化钙法制备感受态细胞。

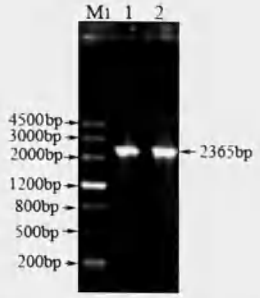
1.3.4 同源重组构建 β-catenin 重组腺病毒质粒 将正确重组的腺病毒穿梭质粒 pAd track-β-catenin 用 PmeI 酶切线性化（50μl 体系：PmeI：1μl，100×BSA：0.5μl，10×NEbuffer4：5μl，质粒：2μg，37℃ 8h），试剂盒纯化后转化入 pAd Easy-1 BJ5183 感受态细胞内进行同源重组，卡那霉素和链霉素平板筛选，挑取最小阳性单菌落，LK/S 37℃过夜培养并提取质粒，0.8% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后，用 PCR（引物及条件同前）和以 pAd Easy-1 为对照的 PacI 酶切（50μl 体系：PacI：1μl，100×BSA：0.5μl，10×NEbuffer1：5μl，质粒：4μg，37℃过夜）鉴定得到正确同源重组的 β-catenin 腺病毒质粒。将鉴定正确 pAd-β-catenin 转化 Top10 感受态细菌并提取质粒备用。

1.3.5 重组腺病毒质粒在 293 细胞中包装及滴度测定 将 1×10^7HEK293 细胞接种至 50ml 培养瓶中，用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养 24h，待细胞的融合度约为 60%~70% 时转染。用 PacI 酶切线性化 pAd-β-catenin，LipofectamineTM 2000 10μl 转染 HEK293 细胞，24h 后倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达。继续培养 7~10 天，于 1/3~1/2 细胞变圆漂浮并有明显的细胞病变时离心收集细胞，1mlPBS 重悬细胞，-80℃/37℃反复冻融 4 次，离心取上清，反复感染 293 细胞获得大量病毒，纯化并检测病毒滴度。计算病毒滴度公式：病毒滴度（pfu/ml）=GFP 阳性细胞数×病毒上清稀释倍数（pfu）/ 稀释后体积（ml）。

2 结 果

2.1 目的基因的获取

以 pcmv-βNS-FC 质粒为模板做 PCR 扩增，1% 琼脂糖凝胶电泳可见一条约 2400bp 左右的特异性电泳条带（图 1），紫外分光光度计检测 DNA 浓度为 1.873μg/μl。



M1.DNA MarkerⅢ；1.PCR 产物 1；2.PCR 产物 2

图 1 以 pcmv-βNS-FC 质粒为模板的 PCR 电泳图

2.2 β-catenin 腺病毒穿梭质粒的鉴定

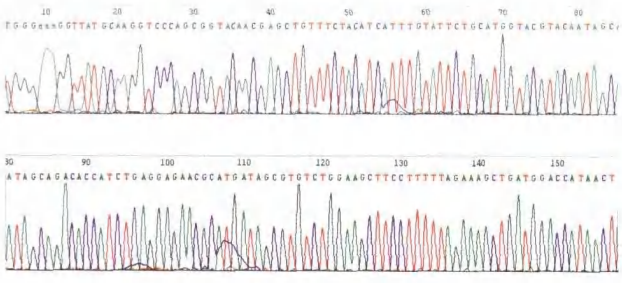
目的基因与 pAd track-cmv 穿梭质粒的连接产物转化感受态大肠杆菌 Top10，可在卡那霉素抗性平板上长出阳性菌落，挑菌提质粒，0.8% 琼脂糖凝胶电泳可见约 11ku 大小的电泳条带，以此为模板 PCR 扩增可见 2400bp 左右片断，质粒经 KpnI，XbaI 双酶切可见一条约 9000bp 和一条与 PCR 产物大小一致的条带（图 2），说明 β-catenin 腺病毒穿梭质粒构建成功，从中选择酶切结果较好的 pAd track-β-catenin1 质粒送上海英俊生物技术公司测序（图 3），结果与 GENEBANK 报道的序列一致（pubmed ID: 1174098539-1201-125014620078.BLASTQ4）。

维普资讯 http://www.cqvip.com



M_2 λ-*Hind* Ⅲ Marker;1.PCR 产物阳性对照;2.pAd track-β-catenin1 PCR 产物;3.pAd track-β-catenin2 PCR 产物;4.pAd track-cmv:KpnI+XbaI;5.pAd track-β-catenin1:KpnI+XbaI;6.pAd track-β-catenin2:KpnI+XbaI;7.pAd track-cmv:XbaI;8.pAd track-β-catenin1:XbaI;9.pAd track-β-catenin2:XbaI;

图 2 β-catenin 腺病毒穿梭质粒鉴定

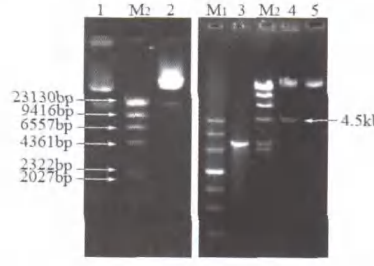


ATGATGGGaaaGGTTATGCAAGGTCCCAGCGGTACAACGAGCTGTTT
CTACATCATTTGTATTCTGCATGGTACGTACAATAGCAGACACCATC
TGAGGAGAACGCATGATAGCGTGTCTGGAAGCTTCCTTTTTAGAAA
GCTGATGGACCATAACTGCAGCCTTATTAACCACCACCTGGTCCTC
GTCATTTAGCAGTTTTGTCAGTTCAGGGATTGCACGTGTGGCAAGT
TCTGCATCATCTTGATAGTTAATCAAGTTTACAACTGCATGTTTCA
GCATCTGTGATGGTTCAGCCAAACGCTGGACATTAGTGGGATGAG
CAGCATCAAACTGTGTAGATGGGATCTGCATGCCCTCATCTAATG
TCTCAGGGAACATAGCAGCTCGTACCCTCTGAGCTCGAGTCATTG
CATACTGTCCATCAATATCAGCTACTTGTTCTTGAGTGAAGGAC
TGAGAAAATCCCTGTTCCC ACTCATACAG GACTTGGGAGGTATCC
ACATCCTCTTC CTCAGGATTGCCTTTACCACT CAGAGAAGGAGC
TGTGGTAGTGGCACCAGAATGGATTCCAGAGTCCAGGTAAGAC
TGTTGCTGCCAGTGACTAACAGCCGCTTTTCTGTCTGGTTCCATGGC
CATGTCCAACTCCATCAAATCAGCTTGAGTAGCCATGGTACCAGA
TCTCTAGCGGATCTGACGGTTCACTAAACCAGCTCTGCTTATAT AG
ACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCG
GAGTTGTTACGACATTTTGGAAAGTCC CGTTGATTTTGGTGCCAAA
ACAAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAAATCC
CCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTGATGTACTGCCAAAA
CCGCATCACCATGGTAATAGCGATGACTAATACGTAGATGTACTG
CCAGTAGGAAAGTCCCATAATGTCATGTACTGGCATAATGCCAGGC
GGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATA

图 3 pAd track-β-catenin1 测序结果(启动子循环)编号:F11.CS060930065_0219

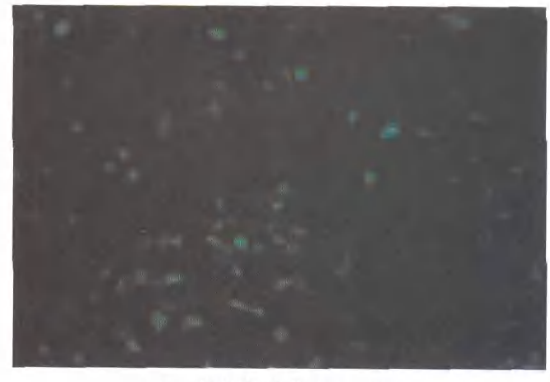
2.2 重组腺病毒质粒的鉴定

正确重组的 pAd track-β-catenin1 用 PmeI 线性化后与 pAd Easy-1 在 BJ5183 中同源重组后的质粒能在卡那霉素和链霉素平板上长出阳性菌落,摇菌提质粒,0.8%琼脂糖凝胶电泳可见约 40kb 左右的条带,较 pAd Easy-1 大,以此为模板的 PCR 产物为一大小约 2400bp 的片断;以 pAd Easy-1 为对照,PacI 酶切重组腺病毒质粒比较:pAd Easy-1 酶切后出现一条>20kb 的条带, 重组腺病毒质粒酶切可见一条 30kb 左右的大片段和一条约 4.5kb 的特征性小片段(图 4),表明重组腺病毒质粒构建成功。

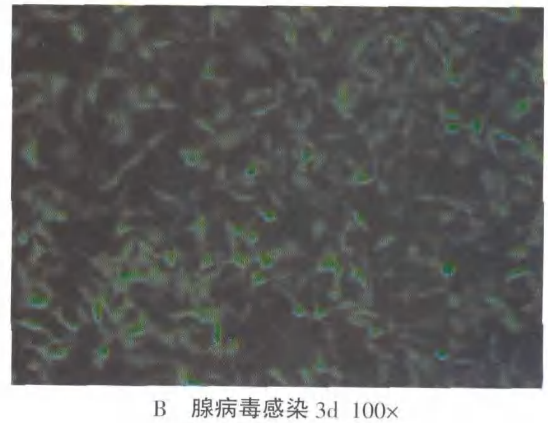


M_1.DNA Marker Ⅲ ;M_2. λ-*Hind* Ⅲ Marker;1.pAd Easy-1;2.pAd-β-catenin;3.pAd-β-catenin PCR 产物;4.pAd-β-catenin:PacI;5.pAd Easy-1:PacI

图 4 β-catenin 腺病毒质粒鉴定



A 腺病毒感染 24h 100×



B 腺病毒感染 3d 100×

图 5 重组腺病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 重组腺病毒质粒在 293 细胞中包装及滴度测定

PacI 酶切 pAd-β-catenin，脂质体转染 HEK293 细胞，24h 后可观察到约 10%细胞有 GFP 的表达，继续培养至第 7 天，GFP 大量表达，并可见细胞变圆呈串珠样聚集，收集病毒液，反复感染 293 细胞获得大量病毒，最终得到滴度约为 1.0×10^8pfu/ml 的重组腺病毒(图 5)。

3 讨 论

Wnt/Wingless 途径是一个经典的信号传导通路，在胚胎发育中参与相关基因的转录调控，而一些原癌基因，凋亡因子和细胞周期调控因子的基因也是该途径激活的靶基因。β-catenin 作为该信号途径的核心分子，主要参与细胞间的粘附和 Wnt/Wingless 信号传递过程[4]：β-catenin 可与 E-cadherin 形成环连蛋白复合体，发挥细胞黏附分子的作用，还直接或间接参与细胞核及细胞骨架的信号传导；游离的 β-catenin 分子能够与转录因子 TCF4(T cell factor-4)/LEF 结合形成具有转录激活的复合物，并转移至细胞核激活下游 Wnt 靶基因的转录。在动物研究中发现，该基因的同源缺失对胚胎具有致死性；目前的研究也认为 β-catenin 参与调节细胞的增殖分化，在肿瘤的发生发展中起着重要作用[5]。各种信号传导途径在不同肿瘤发生中的作用是相互交织的，许多信号分子作用于 Wnt 信号途径都是通过抑制 β-catenin 胞质内降解，促进核内累积或引起基因突变，错误激活下游一系列靶基因如：C-myc，Cyclin D1，Cox-2 等的转录而导致肿瘤的发生；另外，β-catenin 在核内的异常积聚可能下调 E-cadherin 的表达，使其失去维持上皮细胞正常极性和细胞粘附的功能，这与肿瘤细胞的侵袭、移动及远处转移的能力密切相关[6]。因此了解这条通路在肿瘤发生发展中的具体分子机制有助于为肿瘤早期诊断提供理论依据，并为肿瘤的基因治疗提供重要靶点。

研究信号传导通路具体分子机制的一个重要方法就是基因的过表达，在目前许多可供选择的基因转移载体中，使用最广泛的是重组腺病毒载体。传统的构建重组腺病毒的方法是在 293 细胞内进行质粒间同源重组，时间长，重组效率低；而 He TC 等[7]构建的 Ad Easy 腺病毒载体系统利用 BJ5183大肠杆菌进行同源重组，生长周期短、操作方便，重组效率高；所构建的腺病毒为复制缺陷型病毒，只在提供其缺失的 E1，E3 功能区的 293 或 911 细胞中复制，不整合入细胞基因组，更安全；重组腺病毒滴度高，感染效率高，感染范围广。我们在此基础上：①选用 pAd track-cmv 作为穿梭载体，可直接观察 GFP 的表达来判断转染效率，不需病毒空斑筛选，更直观；②用传统氯化钙化学感受态转化代替电转，转化效率高且方便：等量质粒按两种方法转化入同批次等量感受态细菌后涂板，化转的菌落明显多于电转，且化转不需使用电穿孔仪及摸索电转条件，操作步骤简单；③两步法同源重组：骨架质粒 pAd Easy-1 先转化感受态大肠杆菌 BJ5183，得到 pAd Easy-1 BJ5183，再将线性化的重组穿梭质粒转化入感受态 pAd Easy-1 BJ5183 内同源重组，经两次抗性筛选，重组效率高，特异性好；④将脂质体用量较一般转染细胞用量减半，细胞贴壁时间更长，能坚持到 7 天以后收集。本试验采用细菌内同源重组法，经 PCR、酶切鉴定及基因测序证实 β-catenin 重组腺病毒质粒构建成功，并在 HEK293 细胞中包装出 β-catenin 重组腺病毒；为进一步研究当 β-catenin 过表达时，异常激活的 Wnt/Wingless 信号通路在肿瘤发生发展中的作用机制奠定重要基础。

(通讯作者：冯 涛(1963-)，男，教授，博士生导师，主要研究方向：肿瘤发生机制及基因治疗。)

参 考 文 献

[1] Akiyama T.Wnt/beta-catenin signaling[J].Cytokine Growth Factor Rev,2000;11(4):273-282.

[2] Willert K,Jones KA.Wnt signaling:is the party in the nucleus [J].Genes Dev,2006;20(11):1394-1404.

[3] Polakis P.Wnt signaling and cancer[J].Genes Dev,2000;14(15):1837-1851.

[4] Brembeck FH,Rosario M,Birchmeier W.Balancing cell adhesion and Wnt signaling,the key role of beta-catenin[J].Curr Opin Genet Dev,2006;16(1):51-59.

[5] Kimura T,Nakamura T,Murayama K,et al.The stabilization of beta-catenin leads to impaired primordial germ cell development via aberrant cell cycle progression[J].Dev Biol,2006;300(2):545-553.

[6] Nelson WJ,Nusse R.Convergence of Wnt,beta-catenin,and cadherin pathways[J].Science,2004;303(5663):1483-1487.

[7] He TC,Zhou S,da Costa LT,et al.A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J].Proc Natl Acad Sci USA,1998;95(5):2509-2514.