维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0498-04

人 MxA 基因重组腺病毒载体的构建及鉴定

毛国强[1],彭明利[2],黄 琴[1],赵瑞秋[1],朱朝敏[1],任 红[2],许红梅[1]

(1.重庆医科大学附属儿童医院感染消化科,重庆 400014;
2.重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室、重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:克隆中国人 MxA 基因并构建含有 MxA 基因的重组腺病毒载体,为下一步应用其进行抗乙型肝炎基因治疗研究奠定基础。方法:从健康中国人外周血中分离单个核细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA。应用逆转录 PCR(RT-PCR)方法,以自行设计的引物扩增全序列 MxA 基因,应用基因克隆技术将 MxA 基因克隆到腺病毒穿梭质粒 pAdTrack(携带有绿色荧光蛋白基因)中,将线性化的 pAdTrack-MxA 和腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共同电转化入新鲜感受态大肠杆菌 BJ5183 中,两者在其中完成同源重组,MxA 重组腺病毒质粒经卡那霉素抗性鉴别和 PacI 酶切确证,验证正确的 MxA 重组腺病毒线性化转染入 293 细胞中包装成完整病毒颗粒,观察绿色荧光蛋白(GFP)表达并检测重组腺病毒的病毒滴度。结果:重组腺病毒穿梭质粒 pAd-Track-MxA 连接成功,测序结果表明克隆的 MxA 基因序列与 GenBank 中人 MxA 基因序列仅有 5 个核苷酸不同但所编码氨基酸仅 1 个发生改变,且此氨基酸位于非功能区。MxA 重组腺病毒经 PacI 酶切后产生 30kb 和 4.5kb 大小 2 个片段表明同源重组成功。重组腺病毒经 293 细胞包装后可观察到绿色荧光,收获病毒并测感染滴度为 1.59×10^{8}(pfu/ml),具有较高感染效率。结论:我们已成功克隆了中国人的 MxA 基因,并成功构建重组腺病毒质粒,为进一步应用此基因进行抗乙型肝炎基因治疗研究奠定了基础。

【关键词】MxA基因;逆转录;基因克隆;腺病毒
【中国图书分类法分类号】R512.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-11

Construction and identification of the recombinant adenovirus AdMxA

MAO Guoqiang,et al

(*Department of Infectous Disease and Gastroenterology,the Children's Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To clone the Chinese MxA gene and to construct the recombinant adenovirus plasmid carring human MxA gene for further study. *Methods:* The peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were isolated by gradient fractionation,then total RNA was extracted from the PBMCs.The MxA gene was amplified by RT-PCR using the primers based on the published sequence of MxA.The PCR product, double-digested with restrictive endonucleases NotI and XbaI, was cloned into pAdTrack-CMV by molecular cloning technique. The plasimid pAdTrack-MxA was linearized with Pme I ,and subsequently co-transformed into electrocompetent BJ5183 cells with an adenoviral backbone plasmid (pAdEasy-1). Recombinants were selected for kanamycin resistence and confirmed by PacI.Finally,the linearized recombinant plasmid was transfected into HEK 293 cells.Recombinant adenoviruses were generated within 7 to 12 days,then viral tite was checked by GFP. *Results:*Sequencing analysis revealed that the amino acid sequence of MxA gene had only one amino acid residue displace from isoleucine to valine(compared with that of published sequence) although there were five variations in nucleotide sequence.The restrictive endonuclease analysis confirmed that correct recombinant adenovirus plasmid was constructed.24 hours after transfection,the fluorescence was observed in 293 cells, and viral title checked by GFP was 1.59×10^{8}(pfu/mL). *Conclusion:* The MxA gene is cloned from a Chinese donor and a recombinant adenovirus vector containing human MxA gene is constructed successfully.It lays the foundation for further study of gene therapy for HBV.

【Key words】 MxA gene ; RT-PCR; Gene cloning; Adenovirus

对乙型肝炎的基因治疗研究已成为临床和基础研究的热点,为了从分子水平研究 MxA 基因的作用及其作用机制,并为构建重组腺病毒载体进而深入研究其抗乙型肝炎病毒的作用,本实验从健康中国人外周血单个核细胞中克隆成功 MxA 基因,并应

作者介绍:毛国强(1973-),男,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:乙型肝炎基因治疗。

基金项目:重庆市卫生局科技基金资助项目(03125)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

用腺病毒 AdEasy 系统成功构建了携带人 MxA 基因的重组腺病毒载体。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

pAdTrack-CMV 及 pAdEasy-1 由芝加哥大学 TC.He 博士惠赠，大肠杆菌 BJ5183、DH5a、HEK293 细胞由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存，PCR 试剂盒、Pyrobest DNA 多聚酶（高保真酶）、T4 DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司，限制性内切酶 Not I、Xba I，Pac I、Pme I 分别购于 Roche 和 NEB 公司。Trizol 试剂、脂质体 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司。小量质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 Promega 和 Omega 公司。新鲜胎牛血清由 Hyclon 公司生产，人淋巴细胞分离液购于中国医科院，PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 外周血单个核细胞的分离

取健康人静脉抗凝血 10ml，按文献[1]中操作步骤应用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞。

1.3 总 RNA 的提取

应用 Invitrogen 公司的 Trizol 提取总 RNA。

上步分离的单个核细胞，尽量弃上清，加入 1mlTrizol，室温置 5min，低温离心机 4℃、10000r/min 离心 5min，弃沉淀。加入 200μl 氯仿，轻柔震荡混匀后室温置 15min。4℃、10000r/min 离心 15min，小心吸取上层水相至另一 Ep 管中，加入 0.5ml 异丙醇混匀，室温置 10min。4℃、10000r/min 离心 10min 后弃上清，RNA 沉于管底。加入 1ml 75% 乙醇，混合振荡 Ep 管，悬浮沉淀。4℃、10000r/min 离心 5min，弃上清，室温凉干后用 50μl 0.1% DEPC 水溶解 RNA，所得产物于 -70℃ 冰箱保存。

1.4 逆转录 PCR

应用 TaKaRa 公司的 RNA -PCR 试剂盒进行 MxA 基因片断的扩增。参照 GenBank 中 MxA 基因序列，应用 Primer5.0 软件设计一对引物，根据克隆所需，在每条引物的 5′ 端引入相应的限制酶切位点及保护性碱基，引物序列如下（下划线为限制性内切酶位点）：

F:5′ -CCG*GCGGCCG*CATGGTTGTTTCCGAAGTGGAC-3′

（Not I 酶切位点）

R:5′ -GCG*TCTAGA*TTAGTTAACCGGGGAACTGGGCAAG-3′

（Xba I 酶切位点）

RT 反应体系：总 RNA 1ul，$Mgcl_2$ 2μl，dNTP 1μl，10× RT Buffer 1 μl，RNase Inhibitor 0.25 μl，AMV Reverse Transciptse 0.5μl，下游引物 1μl，RNase Free H_2O 2.25μl，体系为 10μl，反应条件：42℃ 60min，99℃ 5min，5℃ 5min。PCR 反应体系：RT 反应液 cDNA 10μl，10×Pyrobest Buffer 5μl，上游引物 1μl，下游引物 0.5 μl，Pyrobest DNA Polymerase 0.25μl，dH_2O 33.25μl，反应体系 50μl，热循环条件为：94℃变性 5min；94℃30s，55℃30s，72℃ 2min。共 35 个循环，72℃再延伸 7min。

1.5 目的基因的纯化

PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示扩增片断约为 2000bp，与目的片断大小符合，无非特异性扩增，故应用 Omega 公司的 PCR 产物纯化试剂盒进行目的基因纯化。获得目的基因 DNA 于 -20℃保存。取 3μl 样品于 1% 琼脂糖凝胶中电泳证实所得 DNA 片断为目的片断（2012bp）。

1.6 pAdTrack-MxA 穿梭质粒的构建

将 PCR 产物回收纯化的目的片段和 pAdTrack-CMV 均以 Not I 和 Xba I 双酶切后在 4℃下经 T_4DNA 连接酶连接 17h，连接产物转化新鲜感受态大肠杆菌 DH5a，接种于含卡那霉素的 LB 平板培养 16h，挑取阳性克隆扩增培养，碱裂解法提取获得重组穿梭质粒 pAdTrack-MxA。重组穿梭质粒以双酶切和 PCR 鉴定。验证正确的克隆送交上海生工公司测序。

1.7 同源重组及鉴定

将正确重组的 pAdTrack-MxA 穿梭质粒用 Pme I 酶切线性化，将酶切产物用 Omega 的 PCR 纯化试剂盒纯化，以 20μl 纯水溶解。将 6μl（200ng）酶切产物和 1μl（100ng）pAdEasy-1 质粒加入到制备好的 20μl 电转化用感受态 BJ5183 细菌中混匀，并将其转入 0.2cm 电转杯中。将电转杯放入 Bio-Rad 电转仪中，以 2.5kV，200 Ohms，25 μF 进行电转，电转液加入到 500μl LB 培养液中，37℃孵育 10min，分别以 200μl 和 300μl 菌液涂于含 50μg/ml 卡那霉素的 LB 平板，置 37℃ 孵箱内培养过夜。选择阳性克隆并提取纯化，得到含 MxA 基因的重组腺病毒质粒 pAd-MxA。重组腺病毒以 PacI 酶切和 PCR 鉴定。另设置阴性对照组，为空载体 pAdTrack-CMV 用 Pme I 酶切线性化后与 pAdEasy-1 同源重组。

1.8 重组腺病毒 pAd-MxA 的包装

1.8.1 HEK293 细胞的培养 HEK293（人胚肾）细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，37℃、5%CO_2 孵箱中培养。转染时细胞应融合至 70% ~ 80%。

1.8.2 重组腺病毒转染 293 细胞 重组质粒 pAd-MxA 4ug 用 Pac I 酶切线性化后以乙醇沉淀纯化，经 Lipofectamine™2000 介导转染 25cm^2 培养瓶中的 HEK293 细胞，于 37℃、5%CO_2 培养箱中孵育，7 ~ 10 天后可观察到细胞病变效应（cytopathic effect，CPE），并可在荧光显微镜下观察到绿色荧光的表达。

1.8.3 重组腺病毒的提取鉴定 收集出现病变的 293 细胞及培养液，800r/min 离心 5min 弃上清，以 2mlPBS 重悬细胞，-70℃/37℃反复冻融 3 次，离心后吸取上清加入 lmg 蛋白酶 K、2ml 1% SDS、10mmol/L EDTA 和 20mol/L Tris HCL 消化 2h。离心取上清，酚/氯仿抽提无水乙醇沉淀，获得的病毒 DNA 以 MxA 基因上下游引物进行 PCR 鉴定。

1.8.4 重组腺病毒的滴度测定 取病毒上清 1 ml 再感染

维普资讯 http://www.cqvip.com

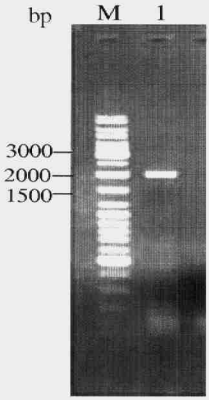


图 1 PCR 扩增产物 1.0%琼脂糖凝胶电泳

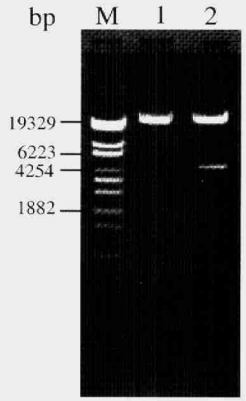


图 2 pAd-MxA 单酶切 0.8%琼脂糖凝胶电泳图

25cm² 培养瓶中至 70%～80%汇合的 293 细胞，感染后 3～5 天，约 50% 的 293 细胞脱落时，收集细胞，按上述方法收集病毒，再重复感染扩增 1 次，收集第 3 代病毒进行滴度(pfu/ml)测定。

2 结 果

2.1 pAdTrack-MxA 穿梭质粒的鉴定

酶切鉴定：分别对重组 pAdTrack-MxA 穿梭质粒和空 pAdTrack-CMV 进行 Not I 和 Xba I 双酶切，前者得到约 2000bp 和 9200bp 的两个片段，与插入的目的片段大小相一致。PCR 鉴定：以重组穿梭质粒为模板，用合成的上下游引物进行 PCR 扩增，产物用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，得到大约 2000bp 的目的片段(图 3)。测序鉴定：测序结果与 GenBank 中 GenBank 中人 MxA 基因序列仅有 5 个核苷酸不同但所编码氨基酸仅 1 个发生改变，且此氨基酸位于非功能区。

2.2 pAd-MxA 的鉴定

酶切鉴定用 Pac I 酶切重组腺病毒质粒 pAd-MxA，得到 30kb 和 4.5kb 两个片段（图 2）。PCR 鉴定：分别以 pAdTrack-MxA 和 pAd-MxA 为模板，用前面合成的上游引物进行 PCR 扩增，产物用 1%琼脂糖凝胶电泳，得到大约 2000bp 的片段（图 3）。

2.3 重组人 MxA 腺病毒的包装

用 Pac I 酶切线性化的 pAd-MxA 后转染

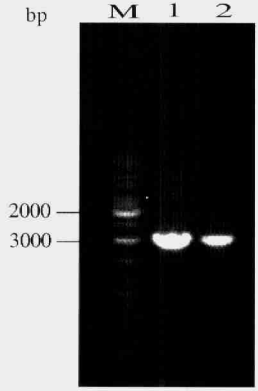


图 3 分别以重组腺病毒质粒 pAd-MxA (1)和 pAdTrack-MxA(2)为模板的 PCR 产物电泳图

HEK293 细胞，转染 24h 后，即可在倒置荧光显微镜下观察到散在少量明亮的绿色荧光，随后荧光量逐渐增加，至 4～5 天绿色荧光斑点最多（图 4,5）。培养 1 周左右待细胞呈空泡样病变并逐渐呈悬浮生长时收获病毒上清并再次感染 HEK293 细胞，将重组腺病毒在 HEK293 细胞大量扩增后，收集含病毒的培养上清。反复冻融后分装，贮存于 -80℃备用。

2.4 重组腺病毒的滴度测定

计算公式：病毒滴度（pfu/ml）= 绿色荧光蛋白阳性细胞数 (感染后 24h) × 稀释倍数 / 感染用体积

维普资讯 http://www.cqvip.com

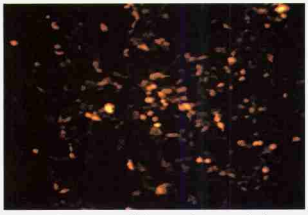


图 4 线性化 pAd-MxA 转染 293 细胞 24hGFP 表达(×200)



图 5 线性化 pAd-MxA 转染 293 细胞 4 天 GFP 表达(×200)

数(ml)。本次实验单孔细胞计数为 7.95×10^4，根据检测结果，计算病毒滴度为 $7.95 \times 10^4 \times 1000 \div 0.5 = 1.59 \times 10^8$（pfu/ml）。

3 讨 论

Mx 基因是 Lindenmann 研究 A2G 小鼠对流感病毒具有天然抵抗力这一现象时，发现这种特性是从小鼠 16 号染色体上单一显性等位基因遗传获得的，因能抵抗粘液病毒而命名为 Mx（myxovirus-resistant）基因，即抗粘液病毒基因。进一步研究发现人的 Mx 基因位于第 21 号染色体长臂上，经 I 型干扰素 -IFN（α/β）诱导可产生 78×10^3 大小的 MxA 和 MxB 蛋白，二者均分布于细胞质中。MxB 蛋白目前研究未发现有抗病毒活性[2]，而 MxA 蛋白具有广谱的抗病毒效应，是继 2′ 5′ - 寡腺苷酸合成酶和 P68 蛋白激酶之后发现的又一种抗病毒蛋白，并与前二者共同完成 IFN 的抗病毒生物学效应[3]。

MxA 蛋白具有广谱的抗病毒活性，MxA 蛋白对布尼亚病毒（bunyaviruses）、粘液病毒、副粘液病毒、棒状病毒、囊膜（外衣）病毒（togaviruses）、小 RNA 病毒、柯萨奇 B4 病毒以及乙型肝炎病毒均有敏感的抗病毒活性[4]。MxA 蛋白有两种构型，一种是非活性的 GDP 结合形式，另一种是活性的 GTP 酶结合形式。MxA 蛋白与病毒的核糖蛋白体中的核衣壳结合使 MxA 构型改变而活化，活化的 MxA 水解核衣壳后，释放出的病毒核酸很快被胞质中的核酸内切酶降解[5]。体外试验证实，MxA 蛋白对乙肝病毒（HBV）有抗病毒活性。在表达 MxA 蛋白的 Huh7 细胞株转染入 HBV 后，细胞质中的乙肝病毒表面抗原和 e 抗原均明显减少，而 HBVDNA 复制的中间产物（负链 DNA）几乎全部消失，细胞质中的 HBV 前基因组 RNA 减少了 2 至 4 倍，提示 MxA 蛋白抑制 HBV 复制是在逆转录后水平作用的，而对 HBV 核壳以及核壳的形成则无作用[6]。此外 MxA 蛋白在体内外均能独立发挥抗病毒活性，并且无需 IFN 的诱导和协同[7]。本实验在国内是第 1 次将人的全序列 MxA 基因克隆成功，1989 个基因序列中只有 5 个碱基差异，其中只有 1 个氨基酸变异（异亮氨酸→缬氨酸），而且此氨基酸位于 MxA 蛋白的非功能区，故本实验扩增的 MxA 基因可以表达正常功能的 MxA 蛋白，为实验奠定了基础。

基因治疗研究中，基因转移方法是基因治疗的基础和关键。病毒能与细胞表面受体结合并将其基因组有效导入宿主细胞，因此，可以利用病毒载体进行目的基因转运。腺病毒载体具有宿主细胞范围广、高转移效率、高滴度和高表达等优点，是目前基因治疗研究中应用最为广泛的载体[8]，本实验中将构建成的 pAdTrack-MxA 质粒与 pAdEasy-1 共转染入 BJ5183 中完成同源重组证实了这种方法简便，同源重组能力强[9]，是一种高效简易的构建重组腺病毒的方法。本实验成功构建了携带有人 MxA 基因的重组腺病毒载体，为下一步研究 MxA 基因抗乙肝病毒的基因治疗研究奠定了坚实基础。

（通讯作者：许红梅；重庆医科大学附属儿童医院感染消化科 400014；第一作者：毛国强；现在河南省漯阳市中原油田总医院。）

参 考 文 献

[1] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京：北京医科大学出版社. 1998.157.

（下转第 508 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

作用有关,细胞凋亡不仅存在于缺血性神经元损伤过程之中,而且在迟发性神经元死亡和继发性损害发生过程中占重要地位[6]。研究表明凋亡的神经元主要存在于梗死的内边缘,即缺血半影区,凋亡程度决定了缺血梗死范围的大小,这迫使人们从防治凋亡的角度去探索缺血性脑血管病的治疗,减少神经元凋亡相关事件的发生是保护神经元缺血性损伤的一种机制[7]。本实验采用异硫氰酸荧光素(FITC)标记 Annexin V,同时结合 PI 拒染法进行凋亡细胞双染后用流式细胞仪检测,结果显示,体外培养大鼠海马神经元缺氧再灌后,神经元的凋亡率与坏死率均增加,而且以凋亡率增加为著,从而进一步验证了前人关于缺氧损伤所致延迟性神经元损伤以凋亡为主的观点,但经过 PTEN 治疗后神经元坏死率和凋亡率均下降;AO/EB 染色方法可观察凋亡细胞总量的变化,其结果与流式测得的结果吻合,说明 PTEN 下调可以抑制神经元的凋亡,从而延长了它的生存时间。

PTEN 是迄今发现的重要抑癌基因,参与了蛋白质和酯类底物酪氨酸、丝/苏氨酸磷酸化的调节过程,它可通过抑制 PI3K/Akt 信号途径,从而抑制细胞生长促进凋亡。PTEN 也可通过 Fas 活化 Caspase-8,增加细胞对辐射及 Fas-FasL 诱导的凋亡的敏感性,并引起细胞的线粒体通透性改变,这一作用可能与 PI3K 途径有关[8]。因此当下调 PTEN 就可能会激活 PI3K/Akt 信号通路,达到减少凋亡延长细胞生长时间的目的。本研究通过激光共聚焦显微镜观察到 shRNApten 成功转染到神经元内,经过免疫印迹检测发现转染后 PTEN 确有下降。至于下调 PTEN 阻断 Ca^{2+} 内流的机制,我们推测可能是通过其减少 NMDA 受体活性,阻断 Ca^{2+} 内流,导致与凋亡相关的酶活性降低,达到神经元保护的目的;另外一条途径是 PTEN 可能是通过 Cdk5 而影响细胞凋亡,达到保护的目的,但其具体机制都有待于深入研究。

参 考 文 献

[1] Choi JS, Park HJ, Kim HY, et al. Phosphorylation of PTEN and Akt in astrocytes of the rat hippocampus following transient forebrain ischemia [J]. Cell Tissue Res, 2005; 319(3): 359-366.

[2] 刘宝松,陈恒胜,许 忠,等. 缺氧所致神经元 AMPA 受体的结构组成及功能变化[J]. 第三军医大学学报,2004;26(23):2139-2142.

[3] Ke Ning,Lin Pei,Mingxia Liao,et al. Dual neuroprotective signaling mediated hy downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN[J]. J Neurosci, 2004;24(16):4052-4060.

[4] 侯筱宇,张光毅. NMDA 受体信号复合体中蛋白质的相互作用[J].生命科学,2003;15(5):274-278.

[5] Kawaguchi M, Drummond JC,Cole DJ, et al. Effect of isoflurane on neuronal apoptosis in rats subjected to focal cerebral ischemia [J]. Anesth Analg ,2004;98(3):798-805.

[6] Yin D, Zhou C,Kusaka I, et al. Inhibition of Apoptosis hy Hyperharic Oxygen in a Rat Focal Ce-rebral Ischemic Model [J]. J Cereh Blood Flow Metah, 2003;23(7):855-864.

[7] Hoehn B, Yenari MA, Sapolsky RM , et al. Glutathione peroxidase overexpression inhibits cytochrome C release and proapoptotic mediators to protect neurons from experimental stroke[J].Stroke, 2003;34(10): 2489-2494.

[8] Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis[J]. J Cell Sci, 2001;114(13): 2375-2382.

(上接第 501 页)

[2] King MC, Raposo G, Lemmon MA,et al. Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB[J].Proc Natl Acad Sci USA,2004;101(24):8957-8962.

[3] Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection:roles of MxA,OAS-1 and PKR[J].Genes Immun.2003;4(6):411-419.

[4] Haller O,Kochs G.Interferon-induced Mx proteins:dynamin-like GTPases with antiviral activity[J] .Traffic,2002;3(10):710-714.

[5] Engelhardt OG, Ullrich E,Kochs G,et al. Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear hodies [J].Exp Cell Res,2001;271 (2):286-295.

[6] Gordien E, Rosmorduc O, Peltekian C,et al. Inhibition of hepatitis B virus replication hy the interferon-inducihle MxA protein [J].J Virol,2001; 75(6):2684-2691.

[7] Lee SH, Vidal SM. Functional diversity of Mx proteins:variations on a theme of host resistance to infection[J].Genome Res.2002;12(4):527-530.

[8] Kirk CJ, Mule JJ. Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines[J]. Human Gene Therapy, 2000;11(6):797-806.

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