DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.023
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
530 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0530-03

人AQP1基因的重组腺病毒构建及鉴定

杨彦春,杨 军,周继祥,李慧增,肖 林 (第三军医大学西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要:目的 构建人AQP1(hAQP1)基因的重组腺病毒载体。方法 采用DNA重组与细菌内同源重组技术,构建含hAQP1的复制缺陷型重组腺病毒载体(pAdEasy-1/hAQP1),并观察pAdEasy-1/hAQP1在ECV-304中的感染情况。PCR方法鉴定重组腺病毒载体,利用绿色荧光蛋白GFP检测病毒滴度和感染效率。结果 PCR及限制性内切酶酶切鉴定证明pAdEasy-1/hAQP1构建成功。结论 应用细菌内同源重组法成功构建了含hAQP1基因的重组腺病毒载体。

关键词:腺病毒;AQP1;同源重组
中图法分类号:R78;R373 文献标识码:A

Construction and identification of human aquaporin 1 gene recombinant adenovirus

YANG Yan-chun, YANG Jun, ZHOU Ji-xiang, LI Hui-zeng, XIAO Lin (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenovirus of human aquaporin 1 (AQP1) gene. Methods The replication-deficient recombinant adenovirus encoding hAQP 1(pAdEasy-1/hAQP1) was constructed by the method of DNA recombination and homogenous recombination in bacteria. The ECV-304 cells were transfected by the recombinant adenovirus. The target gene was identified by polymerase chain reaction (PCR). The titer and the infection rate were determined using the green fluorescent protein (GFP) expression in the shuttle plasmid. Results Restriction endonuclease and PCR analyses confirmed that the recombinant adenovirus was successfully constructed. The infection rate was high. Conclusion The recombinant adenovirus pAdEasy-1/hAQP1 has been successfully constructed by the method of homogenous recombination in bacteria.

Key words: adenovirus; AQP1; homogenous recombination

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是近10年来发现的一族细胞跨膜蛋白。它们的发现从分子水平上揭示了水跨膜转运调节的基本机制。在哺乳动物,目前至少发现10种具有组织特异性分布的AQP亚型。其中AQP1等亚型在涎腺中的表达与唾液的分泌过程密切相关,并在某些涎腺疾病及其病理过程中发挥了重要作用[1~3]。腺病毒载体具有宿主细胞范围广、高转移效率、高滴度、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[4]。本实验中应用基因工程技术,构建AQP1基因的重组腺病毒载体,为临床基因治疗涎腺干燥综合征等疾病提供新的依据和思路。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

含人AQP1 cDNA(1.1K)质粒pCHIPVev由美国亚立桑那大学Andrea J. Yool博士赠送,BJ5183菌株及其衍生物Adeasier-1细胞、含绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的穿梭质粒pAdTrack-CMV、腺病毒基因组质粒pAdEasy-1由美国Howard Hughes医学研究所Bert Hogelstein教授赠送。大肠杆菌DH5α菌株本室保存,腺病毒包装细胞293T细胞和人脐静脉血管内皮细胞株ECV-304由本校西南医院烧伤研究所馈赠。

1.2 酶类和主要生化试剂

限制性内切酶、T4连接酶、*Taq* DNA聚合酶、DNA回收试剂盒等购自Takara公司、质粒DNA提取试剂盒购于Omiga公司,DMEM培养基购自Hyclone公司,脂质体DOTAP购自Roche公司,PCR试剂盒购自Promega公司,PCR引物由上海生工公司合成。

1.3 细菌感受态的制备、质粒提取、纯化、酶切、连接及细菌转化

参见文献[5]方法。

1.4 转移质粒的构建

自pCHIPev载体中用*Kpn*Ⅰ和*Not*Ⅰ双酶切,凝胶电泳回收目的基因AQP1片段,同样酶切穿梭质粒pAdTrack-CMV,回收pAdTrack-CMV载体骨架,用T4NDA连接酶连接将两者连接,构建成转移质粒pAdTrack-CMV/AQP1,经酶切鉴定正确后,抽提质粒DNA备用。

1.5 重组体腺病毒质粒载体的构建及鉴定

取1 μg pAdTrack-CMV/AQP1DNA,PmeI酶切线性化后与

基金项目:重庆市科技项目计划资助项目(20030608)
Supported by the Sci & Tech Research Foundation of Chongqing (20030608)
作者简介:杨彦春(1974—),男,河北省保定市人,硕士研究生,医师,主要从事涎腺基因治疗及口腔颌面部缺损修复方面的研究。电话:(023)68754489
通信作者:杨 军,电话:(023)68754439
收稿日期:2003-10-15;修回日期:2004-01-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.1 μg 的 pAdEasy-1 质粒混匀, 加至感受态菌 BJ5183 中, 行电穿孔法质粒细菌转化。

小量抽提转化菌落, 根据琼脂糖电泳质粒大小, 选择可疑重组体腺病毒质粒 DNA, 经 *Pac*Ⅰ 酶切鉴定正确后, 抽提重组体腺病毒质粒 pAdEasy-1/AQP1 NDA 备用。

1.6　重组腺病毒的包装、扩增和纯化

重组体腺病毒质粒 DNA 经 *Pac*Ⅰ 酶切后采用脂质体介导转染 293 细胞。于转染后不同时间在荧光显微镜下观察 GFP 表达状况, 了解腺病毒包装过程。待有较明显的病毒克隆斑或蚀斑形成后, 将 293 细胞自培养瓶内刮下, −70 ℃/+37 ℃反复冻融 3 次裂解细胞, 离心取含病毒的上清, 重新感染 293 细胞大量扩增病毒[5]。采用 CsCl 密度梯度离心法纯化。−80 ℃保存备用。

1.7　病毒滴度及感染效率测定

将浓缩后的病毒贮存液作不同比例的稀释, 取 400 μl 稀释液加至 293 细胞培养瓶中, 放置 37 ℃吸附 30 min, 换新鲜培养基继续培养 18~24 h, 于荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数, 按下列公式计算病毒滴度:

病毒滴度(pfu/ml)= GFP 阳性细胞数× 病毒稀释度/0.4 ml[6,7]。

病毒感染效率测定: ECV-304 细胞按 2× 10⁶ 细胞/孔接种于 6 孔板中, 待长至融合度约 75% 时用 0.1、1、10、100 感染复数(multiplicity of infection, MOI)的腺病毒感染, 48 h 后在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞百分率。

1.8　重组腺病毒的鉴定

抽提重组腺病毒基因组 DNA, 进行 PCR 反应, 对腺病毒进行鉴定。引物顺序分别为 p1 5′-CTGGTGCTATGCGTGCTG-3′, p2 5′-CAC-CCTGGAGTTGATGTCG-3′。PCR 扩增条件是 94 ℃变性 60 s, 56 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 30 次循环后, 72 ℃继续延伸 10 min。

2　结果

2.1　含 AQP1 腺病毒重组载体构建及鉴定

将 pCHIPev 载体用 *Kpn*Ⅰ 和 *Not*Ⅰ 双酶切回收 1.1 kb 的 AQP1 基因片段, 克隆到 pAdTrack-CMV 的多克隆位点, 命名为 pAdTrack-CMV/AQP1。pAdTrack-CMV/AQP1 经酶切线形化后与骨架载体 pAdEasy-1 在细菌内重组 pAdEasy-1/AQP1, 经 293T 细胞包装为增殖缺陷性腺病毒。经酶切鉴定(图 1)均与预期结果相符。



1: Marker; 2: pCHIPev; 3: pCHIPev(*Kpn*Ⅰ + *Not*Ⅰ); 4: pAdTrack-CMV; 5: pAdTrack-CMV/AQP1; 6: pAdTrack-CMV/AQP1(*Xho*Ⅰ); 7: pAdTrack-CMV/AQP1 (*Eco*RⅠ + *Bam*HⅠ)

图 1　质粒的酶切鉴定

Fig 1　Electrophoretic map of the plasmid digested by two restriction endonucleases

pAdTrack-CMV/AQP1 的酶切鉴定: *Xho*Ⅰ 在 pAdTrackCMV 2 368 bp 有位点, 在 AQP1 末端有 *Xho*Ⅰ 位点, 因此用 *Xho*Ⅰ 单酶切 pAdTrackCMVAQP1 后出现约 1.2 和 9.2 kb 片段。*BamH*Ⅰ 在 pAdTrackCMV 6 307 bp 有位点, AQP1 末端有 *Bam*HⅠ 位点, 在 pAdTrackCMV5285 有 *Eco*RⅠ 位点, 因此用 *EcoR*Ⅰ + *Bam*HⅠ 双酶切 pAdTrackCMVAQP1 后出现约 4.0、1.1、5.3 kb 片段。

2.2　腺病毒的包装和扩增

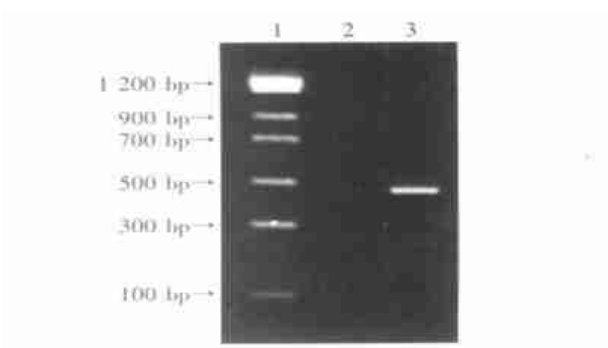
pAdEasy-1/AQP1 经 *Pac*Ⅰ 酶切后, 脂质体法转染 293T 细胞, 48 h 出现绿荧光(图 2), 在荧光显微镜下可见约 10% 左右的 293T 细胞有 GFP 的表达, 逐渐增强。约 6~8 d 左右出现 CPE 反应, 并向周围蔓延。并形成蚀斑, 293 细胞出现固缩、脱落、裂解等明显的病理现象。提取感染后的 293 细胞基因组 DNA 进行 PCR 测可获得 348 bp 的特异性片段, 而未感染细胞未能扩增出此片段(图 3), 表明重组腺病毒构建已成功。



图 2　293T 细胞转染 48 h 后 GFP 的表达　(荧光显微镜× 200)

Fig 2　GFP expression at 48 h after transfection of 293T cells

(Fluorescence microscope × 200)



1: Marker; 2: Uninfected; 3: Infected

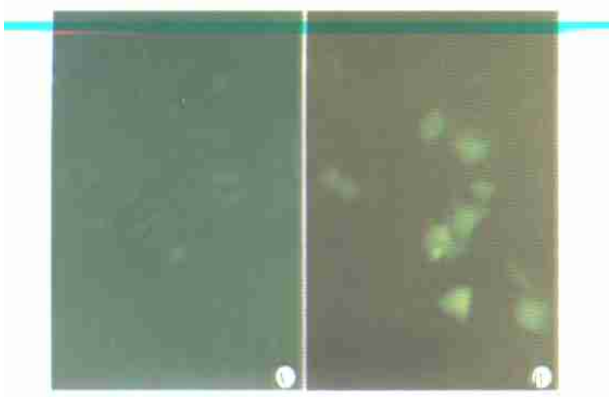
图 3　PCR 检测

Fig 3　PCR analysis

2.3　重组体腺病毒滴度及感染效率的测定

根据 GFP 计数法测得的腺病毒滴度为 6× 10¹² pfu/ml。用该重组腺病毒通过不同 MOI 感染 ECV-304, 发现当 MOI 为 10, 仅少数细胞有荧光, 当 MOI= 100, 约 75% 的 ECV-304 出现荧光, 表明该重组病毒的生物活性高, 适用于基因转运载体(图 4)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: Light microscope× 200; B: Fluorescence microscope × 200

图 4 重组腺病毒对 ECV-304 的感染(48 h)

Fig 4 ECV-304 infected by the recombinant adenovirus (48 h)

3 讨论

pAdEasy 系统所采用的细菌内同源重组法[8] 相对于传统的细胞内同源重组法[9] 更为快速、高效、简便。细胞内同源重组通常对 293 细胞的状态要求很高, 传代次数不宜太高, 而重复引进传代次数较低的 293 细胞既费时, 代价也较为高。本法与细胞内同源重组法的根本不同之处在于, 两种质粒共转染和同源重组均在细菌内完成, 继而用经筛选鉴定的重组体克隆质粒 DNA 转染 293 细胞, 包装和扩增病毒, 方法简便, 成功率较高。

AQP 是细胞膜固有蛋白, 是特异的水通道, 水分子可以通过 AQP 向高渗方向跨膜快速转运。它们的发现标示着水跨膜转运分子机制的研究取得了重大进展, 为从分子水平研究涎腺分泌障碍提供了可能。目前已知表达于涎腺组织细胞的 AQP 种类及分布特点, 使学者们相信其在唾液的分泌过程起着重要作用[10]。

本实验中构建了含 hAQP1 基因的重组腺病毒载体, 所具备的感染效率为今后研究腺病毒介导的水通道蛋白的基因转染对干燥综合征涎腺组织的治疗作用打下了基础。

参考文献:

[1] Lee M D, King L S, Agre P. The aquaporin family of water channel proteins in clinical medicine[J]. Medicine (Baltimore), 1997, 76(3): 141—156.

[2] Gresz V, Burghardt B, Ferguson C J. Expression of aquaporin 1 water channels in human labial salivary glands[J]. Arch Oral Biol, 1999, 44 (Suppl 1): s53—s57.

[3] 杨 军, 肖林, 孙 远, 等. AQP-5 在干燥综合征小鼠颌下腺中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(2): 122—124.

[4] Richard G M. The basic science of gene therapy[J]. Science, 1993, 260 (5110): 926—932.

[5] J. 萨姆布鲁克, D. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 27—102.

[6] 魏道严, 糜 军, 陈诗书. 细菌内同源重组法高效制备含 CD、TK 融合自杀基因重组体腺病毒[J]. 癌症, 2000, 19(5): 399—403.

[7] Miyake S, Makimuru M, Kanegae Y, *et al*. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(6): 1320—1324.

[8] He T C, Zhou S, Costa L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenovirus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509—2514.

[9] Bett A J, Haddara W, Prevec L, *et al*. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(19): 8802—8806.

[10] Ishikawa Y, Ishida H. Aquaporin water channel in salivary glans[J]. JPn J Pharmacol, 2000, 83(2): 95—101.

(编辑 栾 嘉)

全国临床医学和检验医学学术交流会征文通知

本刊与重庆市生化学会拟于 2004 年 8 月在广西北海举办全国临床医学与检验医学学术交流会。现征集在医药、临床科研中所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法等方面的论文。撰稿要求详见本刊稿约(每年第 1 期)。来稿请寄审稿费 40 元(勿将现金夹入信封内)。来稿经审定后及时通知处理意见。录用论文刊登在《第三军医大学学报 2004 年专刊》上, 同时寄去开会通知。投稿截稿日期: **2004.6.30**。凡参会者可获继续教育学分。

地 址: 重庆市高滩岩第三军医大学学报编辑部 收 邮 编: 400038

联系人: 曾 颖 电 话: (023)68752187 传 真: (023)68753851

E-mail: leng@mail.tmmu.com.cn

重庆市生物化学与分子生物学学会

第三军医大学学报编辑部

2004 年 3 月 1 日

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net