

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00069

携带人野生型 PKG I α 基因的重组腺病毒载体的构建及鉴定

易斌¹, 陆俊羽², 白莉², 王关嵩², 钱桂生^{2*}

1. 第三军医大学西南医院麻醉科, 重庆 400038

2. 第三军医大学新桥医院呼吸科, 重庆 400037

[摘要] **目的:**克隆人 PKG I α 基因, 构建其重组腺病毒载体。 **方法:**用 RT-PCR 方法从人肺动脉平滑肌组织中扩增 PKG I α 基因全长, 经 T/A 克隆后, 亚克隆至腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上, 构建穿梭质粒 pAdTrack-PKG I α 。 *Pme* I 酶切 pAdTrack-PKG I α , 然后分别将腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 和穿梭质粒 pAdTrack-PKG I α 转化至 BJ5183 感受态细菌中进行同源重组, *Pac* I 酶切线性化重组质粒 AdCMV-PKG I α 后转染 Ad293 细胞进行病毒包装和扩增。检测 PKG I α 基因的表达, 并用绿色荧光蛋白 (GFP) 法测定其滴度。 **结果:**用 RT-PCR 方法, 从人肺动脉中层扩增出 PKG I α , 测序证实为人 PKG I α 基因。构建了 PKG I α 基因的重组腺病毒载体并制备出高滴度重组病毒保存液。 **结论:**成功地克隆了人 PKG I α 基因, 并构建其重组腺病毒载体, 为进一步研究 PKG I α 基因在低氧肺血管重建中的作用提供了有效的基因转移载体。

[关键词] PKG I α 基因; 腺病毒载体; 基因克隆; DNA 重组

[中图分类号] R 349.65

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2009)01-0069-04

Construction and identification of recombinant adenovirus containing wild-type human PKG I α gene

YI Bin¹, LU Jun-yu², BAI Li², WANG Guan-song², QIAN Gui-sheng^{2*}

1. Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

2. Department of Respiratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037

[ABSTRACT] **Objective:** To clone human PKG I α gene and construct a recombinant adenovirus vector containing wild-type PKG I α . **Methods:** RT-PCR was used to amplify the full-length PKG I α gene from human pulmonary arterial smooth muscle. After T/A cloning, PKG I α cDNA was cloned into shuttle plasmid pAdTrack-CMV to construct pAdTrack-PKG I α . The plasmid was linearized by *Pme* I and transformed into BJ5183 *E. coli*, where the plasmid was recombined with pAdEasy-1 by homologous recombination. The recombinants were then transfected into Ad293 cells by Lipofectamine2000 for packaging the adenovirus; the recombinant adenovirus was traced by monitoring GFP expression under fluorescence microscope to determine the titer. **Results:** PKG I α was successfully amplified from human pulmonary arterial smooth muscle by RT-PCR. After 3 cycles of amplification, the titer of adenovirus containing wild-type PKG I α reached the indicated level. **Conclusion:** We have successfully constructed PKG I α gene and constructed the PKG I α recombinant adenovirus, which provides a foundation for the study of PKG I α function and its role in hypoxia pulmonary vessel remodeling.

[KEY WORDS] PKG I α gene; adenovirus vector; gene cloning; DNA recombination

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1):69-72]

近年来的研究^[1-3]显示 PKG I α 对肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cell, PASM) 表型有调控作用, 提示激活后的 PKG I α 可以促使 PASM 由收缩型向合成型转换, 从而在低氧肺血管重建中起到重要的调控作用。为了验证这一可能性, 本研究构建携带野生型人 PKG I α 基

因的重组腺病毒载体, 并进行体外表达和鉴定, 为进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肺动脉来自于第三军医大学西南医院的肺叶切除术患者, 排除生殖、内分泌系统相关疾

[收稿日期] 2008-07-31 **[接受日期]** 2008-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30700347), 重庆市自然科学基金(2007BB5045). Supported by National Natural Science Foundation of China (30700347) and Natural Science Foundation of Chongqing Municipal Government(2007BB5045).

[作者简介] 易斌, 博士, 副教授, 副主任医师, E-mail: yibin1974@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 023-68755603, E-mail: qiangs@mail.tmmu.com.cn

病,标本经过病理切片光镜下检查证实为正常肺动脉组织。腺病毒载体系统质粒 pAdEasy-1 及大肠杆菌 BJ5183 购自 Stratagene 公司。大肠杆菌 DH5 α 及 Ad293 细胞由本实验室保存。载体 pGEM-T 购自 Promega 公司。RT-PCR 试剂盒、各种限制性内切酶、T₄DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。Pme I 及 Pac I 购自 NEB 公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒及 PCR 产物回收试剂盒均购自 Qiagen 公司。LipofectamineTM2000 脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。DMEM 及 TRIzol 购自 Gibco 公司。兔抗人蛋白激酶 G(PKG) I α 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 人 PKG I α 的克隆及序列测定 以常规方法从人肺动脉组织中提取总 RNA,并进行 RT-PCR。以寡脱氧胸苷酸(oligo dT)为引物进行逆转录,反应条件为:70 $^{\circ}$ C 5 min,55 $^{\circ}$ C 60 min;产物进行定量后,取 2 μ g 进行 PCR 扩增。PKG I α 的引物序列为:上游 5'-CCT ACA GAG TCG GCT ACT ATG GCG C-3';下游 5'-ATC AGG CCG CGA AAG TCC TGT TAT C-3'。上游引物含 Sal I 酶切位点,下游引物含 Sph I 酶切位点。PCR 反应条件为:98 $^{\circ}$ C 2 min,97 $^{\circ}$ C 60 s,56 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 90 s 共 35 个循环,再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳证实后,用 Sal I 和 Sph I 酶切,胶回收目的基因片段。回收的片段经多聚腺苷加尾(A-Tailing)反应后,与载体 pGEM-T 连接,对重组质粒 pGEM-T-PKG I α 进行 PCR 及酶切鉴定,并测序分析。

1.3 腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-PKG I α 的构建 重组质粒 pGEM-T-PKG I α 及穿梭质粒 pAdTrack-CMV 经 Sal I 和 Xho I 双酶切后,纯化酶切产物,用 T₄DNA 连接酶连接 PKG I α 及线性化的 pAdTrack-CMV(37 $^{\circ}$ C 18 h),转化 DH5 α 感受态细菌,在含有卡那霉素抗性的平板上培养过夜,筛选转化的菌落,进行酶切鉴定。

1.4 重组腺病毒质粒 pAdCMV-PKG I α 的构建 腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 经氯化钙法转化 BJ5183 细菌,通过氨苄西林抗性的 LB 平板筛选,鉴定正确的克隆即为 pAdEasy-1 转化细菌。小量抽提质粒 pAdTrack-CMV-PKG I α ,经 Pme I 酶切线性化后,取 5 μ l 转化 AdEasy-1 的感受态细菌,转化菌用含有卡那霉素抗性的平板筛选,16 h 后挑取平板上较小的菌落,抽取质粒,根据电泳的结果初步筛选

出阳性重组子 pAdCMV-PKG I α ,并经 Pac I 酶切鉴定。重组病毒质粒转化 DH5 α 感受态细菌,获得高拷贝数的质粒备用。

1.5 重组腺病毒 AdCMV-PKG I α 的包装和扩增

Pac I 酶切重组腺病毒质粒 pAdCMV-PKG I α ,暴露其反转末端重复序列(ITR)。用 LipofectamineTM2000 将线性化的 pAdCMV-PKG I α 转染至 70%~80% 融合的 Ad293 细胞中,培养 8 h 后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM,24 h 后观察细胞形态变化及绿色荧光蛋白(GFP)表达情况。3~4 d 后当 90% 以上细胞出现病理征时(细胞呈现葡萄样串珠状改变,部分细胞漂浮);收集细胞,-20 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 反复快速冻融 4 次。每次冻融后在微量震荡器中震荡 15 s,使细胞破裂释放出病毒。然后 12 000 \times g 离心 10 min,将上清液转移至新 Eppendorf 管中。上清液中含有大量扩增的重组腺病毒载体,此时获得的病毒液尚未纯化,称为粗制病毒液(crude virus liquid,CVL)。

1.6 重组腺病毒 AdCMV-PKG I α 的鉴定 病毒上清感染 PSMCs 后进行以下检测:取约 5 \times 10⁶ 个 PSMCs 细胞,用 RT-PCR 检测 Ad-PKG I α 转染后的转录水平,引物及反应条件同 1.2;用蛋白裂解液裂解后进行蛋白质印迹检测。未转染 Ad-PKG I α 组为对照组,GAPDH 作为内参照。

1.7 重组腺病毒滴度测定 采用 GFP 法进行测定。在 96 孔板上接种 Ad293 细胞,设定 4 个复孔,细胞数 4 \times 10⁴。培养 24~48 h 后,待细胞达到 90% 以上融合后加入拟测病毒液。病毒液使用 DMEM 高糖培养液进行稀释,达到 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ 不同的稀释倍数。吸取上清后,分别加入每个稀释度的病毒载体,每孔 100 μ l。每孔设 3 个复孔,剩下 1 孔加入 DMEM 高糖培养液作为对照(不含腺病毒)。24 h 后在倒置荧光显微镜下观察并计数,根据如下公式计算病毒滴度:

$$\text{滴度 (pfu/ml)} = \frac{\text{GFP 阳性细胞数} \times \text{病毒稀释度}}{\text{病毒稀释液体积}}$$

2 结果

2.1 PKG I α 基因的克隆 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后,回收片段克隆入载体 pGEM-T 获得重组质粒 pGEM-T-PKG I α ,重组质粒经 Sal I、Sph I 双酶切后可见 2.2 kb 条带。测序证实为全长的人 PKG I α 基因。用 Sal I 和 Xho I 双酶切重组

质粒 pAdTrack-CMV-PKG I α , 得到约 9.2 kb 和 2.2 kb 的 2 个片段, 分别代表穿梭载体 pAdTrack-CMV 和 PKG I α 基因片段, 证明穿梭质粒构建成功。

2.2 重组腺病毒质粒 pAdCMV-PKG I α 的鉴定

Pme I 酶切线性化 pAdTrack-CMV-PKG I α 后, 转入含有腺病毒基因组质粒 AdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌中, 进行同源重组获得重组腺病毒质粒 pAd-CMV-PKG I α 。 *Pac* I 酶切重组质粒后见 30 kb 和 4.5 kb 的特征性的电泳条带, 证明同源重组成功。

2.3 重组病毒感染 Ad293 细胞后的鉴定

2.3.1 重组病毒感染 Ad293 细胞后 GFP 的表达

含有 Ad-PKG I α 病毒的上清液感染 Ad293 细胞, 培养 48 h 后细胞出现较为明显的完全 CPE 征(图 1)。离心后细胞沉淀呈现强绿色, 表明胞内含有大量的病毒, 提示 Ad-PKG I α 能够在 Ad293 细胞中大量扩增。反复冻融/震荡后裂解离心, 上清液呈现较明显的绿色, 为 CVL 液; 而离心下来的细胞碎片沉淀绿色消失, 表现为白色。说明细胞裂解后, 病毒释放出来存在于上清液中, 该上清液为 CVL 液。多次进行扩增后, -70°C 保存约 2 ml 的 Ad-PKG I α CVL 液。

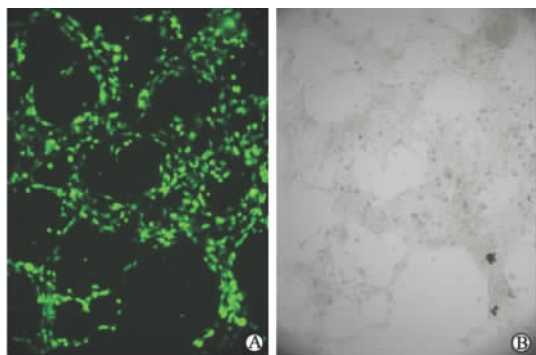


图 1 同一个视野的普通光镜图和荧光光镜图

Fig 1 The same visual field under light microscope and fluorescence microscope

A: Fluorescence light microscope: most Ad293 cells presented bright green color, indicating that Ad-PKG I α intruded into Ad293 and duplicated and expressed genes; B: Light microscope: complete CPE phenomenon indicated strong transfective ability of Ad-PKG I α . Original magnification: $\times 100$

2.3.2 病毒感染 Ad 293 细胞后目的基因转录及蛋白的表达

Ad-PKG I α 转染 Ad293 细胞后, RT-PCR 检测 PKG I α mRNA 表达水平明显高于转染前, 证实该病毒载体中携带有 PKG I α 基因并进行

了转录(图 2A)。Western 印迹检测结果显示, 转染 Ad-PKG I α 后 PASCs 中 PKG I α 的磷酸化蛋白含量明显增高(图 2B)。

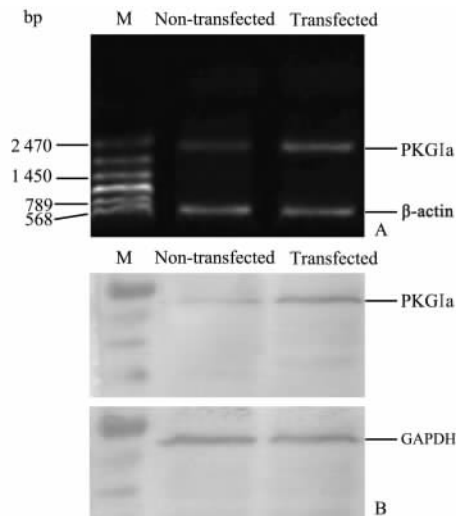


图 2 Ad-PKG I α 转染前后 PKG I α 的转录和表达

Fig 2 Change of PKG I α transcription and expression before/after Ad-PKG I α intruded into Ad293 cells

A: Electropherogram of RT-PCR. Transcriptional level of PKG I α obviously rised after Ad-PKG I α intruded into Ad293 cells. B: Electropherogram of Western blotting. Protein level of PKG I α obviously rised after Ad-PKG I α intruded into Ad293 cells

2.4 病毒滴度的测定

足量携带 GFP 的 Ad-PKG I α 进入 Ad293 细胞后, 光镜下观察到 Ad293 细胞呈现完全 CPE 状态, 由于 GFP 表达, 在蓝色荧光下呈现亮绿色。在 10^{-2} 稀释度下, 观察到细胞亮绿色强度很高, 随着稀释度的增大, 亮绿色的强度逐渐减弱, 表明亮绿色的强度与进入细胞的 Ad-PKG I α 量有较好的相关性。由于 10^{-6} 孔荧光亮点过于密集, 而 10^{-8} 过于稀少, 因此选择稀释度为 10^{-7} 孔计算。3 孔的阳性细胞数为 $(10+14+7)/3=10.3$, 算得滴度为 $10.3 \times 10^7 / 0.1 = 1.03 \times 10^9$ 。

3 讨论

PKG 分为胞质可溶性 I 型和膜结合性 II 型, 其中 I 型相对分子质量 76 000, 又分为 α 和 β 2 个亚型, 是由相同的基因两种不同的结合而形成。近年来的研究显示 PKG I α 途径对 PASC 表型起重要的调节作用^[1-2]。激活后的 PKG I α 作用于多种底物, 包括血管扩张刺激磷蛋白(VASP)、肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)、Rho 家族、HSP27、Maxi-k 通路、MAPK 等, 通过调节细胞

内磷酸化和去磷酸化的平衡、G蛋白功能、骨架蛋白系统等来调控 PASM C 的表型。转染 PKG I α 后,可使体外培养的合成型细胞转化为收缩表型,不但细胞形态学明显发生变化,而且一些表型标志基因的表达也产生相应的变化,如 SM-MHC、SM- α -actin 和 calponin 等基因表达上调,同时伴有骨桥蛋白和 PDGF 受体表达水平下降;抑制 PKG I α 的表达,则 PASM C 可转化为合成型^[3-5]。而转化为合成型的 PASM C 能够进行增殖、迁移,也是低氧肺血管重建的主要病理变化。这些研究结果显示 PKG I α 基因可能在低氧肺血管重建中起到重要的调控作用,可能为今后低氧肺血管重建的基因治疗提供一个作用靶点,值得进行深入的研究。

由于 PKG I α 是一种细胞内固有表达的非分泌型蛋白,因此对其研究手段主要是基因敲除、转基因动物和外源基因的转(感)染^[6]。对于肺动脉平滑肌细胞而言,用腺病毒作为载体进行外源性 PKG I α 基因的导入手段,更为经济、简便和有效。本研究构建了携带有 PKG I α 基因的腺病毒载体,并进行包装和扩增,以及滴度测定过程。构建方法基本上根据文献^[7-8]报道的方法进行,同时进行了如下的调整,即用菌液进行 PCR 初步筛选阳性菌落。通过此方法可以同时进行广泛的菌落筛选;在此粗筛的基础上再选择阳性菌落进行质粒提取和酶切,减少了烦琐的质粒提取过程以及大量的酶切鉴定;用化学方法转化 BJ5183 实现同源重组,操作较电转法更加简便;在缩短 DNA-脂质体复合物与接受转染 Ad293 细胞的孵育时间方面,部分文献推荐在 DNA-脂质体复合物加入待转染 Ad293 细胞后,37℃、体积分数 5%CO₂ 孵箱内孵育 24~48 h 再补加完全培养液,但是由于脂质体的细胞毒性作用,会造成大量细胞死亡;本研究在此过程中参照于林君等^[9]用 2~3 h 的

孵育时间,细胞死亡较少,转染效果也能够达到实验要求。

综上所述,所构建的携带野生型 PKG I α 重组腺病毒能够高效地在靶细胞中表达目的基因,可以用于下一步实验研究。

[参考文献]

- [1] Cook A L, Haynes J M. Phosphorylation of the PKG substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), in human cultured prostatic stromal cells[J]. Nitric Oxide, 2007, 16: 10-17.
- [2] Yun M R, Lee J Y, Park H S, Heo H J, Park J Y, Bae S S, et al. Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. Pharmacol Res, 2006, 54: 97-102.
- [3] Nagai-Kusuhara A, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Negi A, Seigel G M. cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuron-glia progenitor cells[J]. Exper Eys Res, 2007, 84: 152-162.
- [4] Hervé J C, Sarrouilhe D. Protein phosphatase modulation of the intercellular junctional communication: Importance in cardiac myocytes[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2006, 90(1-3): 225-248.
- [5] Hofmann F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinase[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 1-4.
- [6] Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Insights into cGMP signaling derived from cGMP kinase knockout mice[J]. Front Biosci, 2005, 10: 1279-1289.
- [7] Ward J P, Knock G A, Snetkov V A, Aaronson P I. Protein kinase in vascular smooth muscle tone-role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction[J]. Pharmacol Ther, 2004, 104: 207-231.
- [8] He T C, Zhou S, da Costa L T, Yu J, Kinzler K W, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2509-2514.
- [9] 于林君, 祝善俊, 周裔忠, 田颖, 王江, 祝之明. 携带野生型 PTEN 基因的腺病毒载体的构建[J]. 免疫学杂志, 2005, 21: 241-243.

[本文编辑] 孙岩