

• 基础实验研究论著 •

hIFN- γ 腺病毒表达载体的快速构建及鉴定

陈昌国, 刘 敏, 郭建巍, 张建肖, 赵强元, 李 娜, 王珍光

(中国人民解放军海军总医院检验科, 北京 100048)

摘 要:目的 快速构建 hIFN- γ 腺病毒载体。方法 Trizol 法提取 IFN- γ (10 ng/mL)刺激的 Raji 细胞总 RNA,以 Oligo 引物进行反转录获得 cDNA 序列,PCR 法钩取入 hIFN- γ 的 cDNA 序列并插入 pAdTrack-CMV 载体中获得 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 表达载体;然后将 pAdEasy-1 电转入 BJ5183 感受态菌并通过硫酸链霉素和氨苄青霉素双抗筛选获得 pAdEasy-1-BJ5183 感受态菌;之后将 PmeI 线性化的 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 电转入 pAdEasy-1-BJ5183 感受态菌中并通过卡那霉素抗性筛选获得 pAdEasy-1-BJ5183-pAdTrack-CMV-hIFN- γ 重组体;Pac I 酶切鉴定。结果 成功获得 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-hIFN- γ 腺病毒表达载体。结论 改良的两步法腺病毒表达载体的构建效率远高于同时将线性化 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 与 pAdEasy-1 电转入 BJ5183 感受态菌以获得重组体传统方法,节省了实验时间和实验材料。

关键词:干扰素 γ , 重组; 腺病毒科; 遗传载体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1635-03

Rapid construction and identification of hIFN- γ adenovirus expression vector

Chen Changguo, Liu Min, Guo Jianwei, Zhang Jianxiao, Zhao Qiangyuan, Li Na, Wang Zhengguang

(Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China)

Abstract:Objective To construct the IFN- γ adenovirus vector rapidly. **Methods** RNA of raji cell stimulated by IFN- γ (10 ng/mL) was extracted using Trizol, and oligo primer was used for reverse transcription. The hIFN- γ cDNA sequence was acquired by PCR, inserted into vector pAdTrack-CMV, and the pAdTrack-CMV-hIFN- γ expression vector was obtained. Then the pAdEasy-1 was transferred into BJ5183 competent bacteria and screened by streptomycin sulfate and ampicillin resistance. pAdTrack-CMV-hIFN- γ was transferred into pAdEasy-1-BJ5183 competent bacteria and screened by kanamycin to obtain the pAdEasy-1-BJ5183-pAdTrack-CMV-hIFN- γ recombinant, and it was confirmed by Pac I enzyme digestion. **Results** Successfully obtained the pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-hIFN- γ adenovirus expression vector. **Conclusion** adenovirus expression vector construction efficiency by two-step modified methods, is much more efficient than traditional methods which transferred the linear pAdTrack-CMV-hIFN- γ and pAdEasy-1 into BJ5183 competent bacteria at one time, saving experimental time and materials.

Key words: interferon-gamma, recombinant; adenoviridae; genetic vectors

构建蛋白表达载体并将其以不同的方法转染真核细胞表达是研究蛋白生物学功能的重要手段,而腺病毒表达载体由于感染效率高、可插入外源基因片段大、病毒载体容易制备等优点被广泛用于基因疫苗、基因治疗等研究中。IFN- γ 属 II 干扰素,主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞所分泌,亦可由 B 细胞、NKT 细胞和抗原递呈细胞分泌,具有重要的免疫调节、抗病毒及抗肿瘤^[4-7]。构建 hIFN- γ 腺病毒表达载体能够为进一步开展 hIFN- γ 相关研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Raji 细胞、293T 细胞购自协和细胞库, RPMI1640 培养基为 Hyclone 公司产品, γ 干扰素 (IFN- γ) 为 Pe-proTech 公司产品, RNA 提取试剂 TRIzol 为 Invitrogen 公司产品, RT-PCR 试剂盒为 Fermentas 公司产品, pfu PCR Mix、DL2000 Marker 购自天根生物科技有限公司 Lipofectman 2000、T4 DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司; Xba I、Xho I、Pme I、Pac I 限制性内切酶为 New England Biolabs 公司产品; λ DNA • Hind III Marker 为 Promega 公司产品, 质粒提取试剂盒和 DNA 片段回收试剂盒为威格拉斯生物技术(北京)有限公司产品, pAdEasy-1、pAdTrack-CMV 质粒、BJ5183、DH5 α 大肠杆菌为陈津助理研究员惠赠, 硫酸链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素及其他化学试剂购置海军总医院试剂采购中

心。

1.2 细胞的培养及刺激刺激 Raji 细胞在含有 5% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 中培养, 置含有 5% CO₂ 孵育箱。在药物刺激前, 将细胞的密度调整为 3×10^5 /mL。然后加入 10 ng/mL 的 IFN- γ 刺激细胞 24 h。

1.3 RNA 的提取及反转录 按照 Invitrogen 说明书要求用 1 mL Trizol 提取 IFN- γ 刺激细胞总 RNA, 用紫外分光光度计定量后取 2 ng 用 Fermentas 反转录试剂盒进行反转录获取 cDNA 模板。

1.4 重组 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 质粒的构建 hIFN- γ cDNA 序列从 <http://www.hprd.org> 网站获得, 采用 Primer primer 5.0 进行 hIFN- γ 基因 PCR 引物的设计:

hIFN- γ 上游: 5'-CCG ctc gag ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GC-3'; hIFN- γ 下游: 5'-TGC TCT AGA TTA CTG GGA TGC TCT TCG AC-3'; 在上下游引物中分别加入 Xba I 和 Xho I 限制性酶切位点, 由北京奥科生物公司合成。采用上述引物以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 hIFN- γ 基因片段。PCR 参数设置为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。用 Xho I 和 hIFN- γ 酶切 PCR 产物和 pAdTrack-CMV 质粒, 琼脂糖凝胶电泳回收, T4 DNA 连接酶连接; 转化 DH5 α 感受态菌, 卡那霉素

抗性平板筛选。挑取单克隆菌落增菌后提取质粒,用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定,能酶切出目的基因片段大小质粒为阳性质粒 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 。

1.5 重组腺病毒表达载体的重组及鉴定 将腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 电转新鲜制备的 BJ5183 感受态细菌,接种在硫酸链霉素和氨苄青霉素抗性平板上筛选,挑取单克隆菌落培养并提取质粒,以 pAdEasy-1 为对照,得到阳性 pAdEasy-1-BJ5183 感受态菌。*Pme* I 线性化 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 凝胶电泳进行片段回收,并用 200 ng 线性化的 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 电转 pAdEasy-1-BJ5183 感受态菌,卡那霉素抗性平板筛选,挑取单克隆菌落增菌后抽提质粒,以 pAdEasy-1 为对照,分别用 *Pac* I 酶切鉴定,能够切出约 30 kb 的大片段及 3.0 kb 或 4.5 kb 左右片段的为阳性重组体 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-hIFN- γ 。

2 实验结果

2.1 IFN- γ 刺激 Raji 细胞的总 RNA 提取及质量鉴定 用 Trizol 法成功提取到 IFN- γ 刺激 Raji 细胞的总 RNA,经紫外分光光度测定 OD₂₆₀,其浓度为 780 ng/ μ L,OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.9,1%凝胶电泳的结果为(图 1),提取的细胞总 RNA 符合进行反转录的要求。

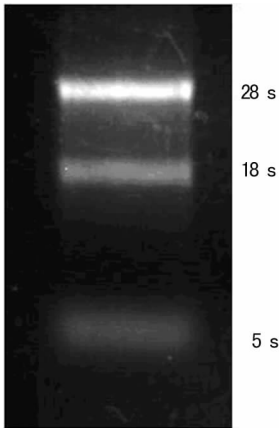


图 1 Raji 细胞总 RNA

2.2 hIFN- γ 基因的调取及 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 表达载体的构建及鉴定 通过 PCR 扩增出基因片段,1%凝胶电泳的结果显示 PCR 扩增片段大小为 500 bp 左右(图 2),与 hIFN- γ 的 cDNA 序列大小一致,并且扩增效率能够满足回收要求。

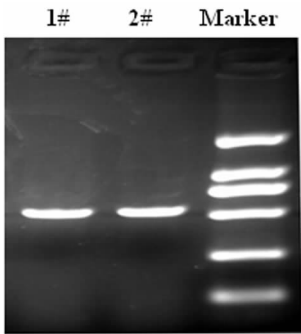


图 2 PCR 扩增结果

将 hIFN- γ 片段与 pAdTrack-CMV 质粒用 *Xho* I 和 *Xba* I 37℃水浴双酶切 12 h,1%凝胶电泳回收酶切后的片段,然后用 T4 DNA 连接酶在 12~16℃水浴中连接 4 h,将连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,挑取阳性克隆至 LB 培养液中在 37℃摇床中振荡 12 h,提取质粒并将质粒用 *Xho* I 和 *Xba* I

双酶切,能够酶切出 500 bp 左右片段的 Clone 1 为阳性克隆(图 3)。

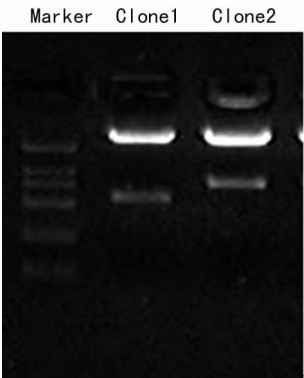


图 3 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定结果

取 1# 克隆的质粒为模板进行 PCR 鉴定结果(图 4),此克隆能过扩增出目的条带。

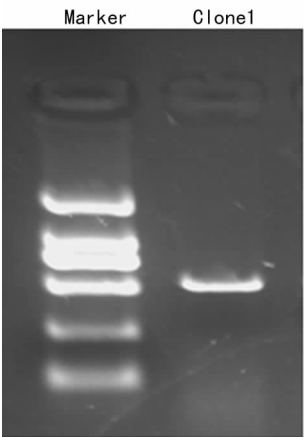


图 4 Clone 1 PCR 鉴定结果

并且将阳性克隆送北京奥科生物公司进行测序,测序结果与 hIFN- γ 基因的序列比对未发现突变。

2.3 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 与 pAdEasy-1 在 BJ5183 感受态中的重组及鉴定 通过电转方式将线性的 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 导入含有 pAdEasy-1 在 BJ5183 感受态中,在含有卡那霉素抗性的平板上筛选,挑取阳性克隆增菌后提取质粒,用 *Pac* I 进行酶切,能够切成能够切出约 30 kb 的大片段及 3.0 kb 或 4.5 kb 左右片段的为阳性克隆,我们酶切鉴定的结果是 Clone3 和 Clone4 获得 30 kb 的大片段及 4.5 kb 左右右片段(图 5)。

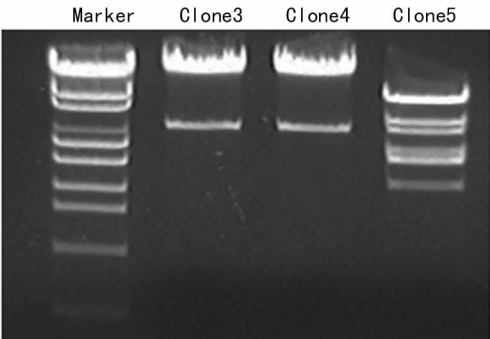


图 5 重组体 *Pac* I 酶切鉴定结果

3 讨论

2002 年 Robert. D. Schriber 提出著名的“肿瘤免疫编辑”

学说,认为对于肿瘤而言免疫系统是一把双刃剑,在早期免疫系统发挥“免疫监视”作用清除肿瘤,而在平衡期免疫系统重塑了肿瘤的免疫原性促进了肿瘤的发生^[8,9]。众多研究都指出 IFN- γ 在“肿瘤免疫编辑”过程中发挥了重要的作用,不但参与免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤同时也参与了免疫系统对肿瘤细胞免疫原性的重塑^[10-12]。因此构建 hIFN- γ 腺病毒重组载体对于开展肿瘤细胞 IFN- γ 的敏感性改变的相关研究十分必要。

腺病毒载体与痘苗病毒载体、腺相关病毒载体、单纯疱疹病毒载体及逆转录病毒载体等都是目前常用的病毒表达载体。重组腺病毒载体因具有多种特点而被广泛应用于重要感染性疾病及恶性肿瘤的相关研究。无论是对肿瘤原代细胞转染还是进行动物实验普通的转染方式转染效率均不能满足要求,构建 hIFN- γ 重组腺病毒表达载体能过为下一步在动物实验中探索肿瘤逐渐丧失 IFN- γ 敏感性的研究提供良好的物质基础。重组腺病毒载体构建通常是将穿梭载体和骨架载体同时电转入 BJ5183 感受态细菌中,重组效率不高^[1]。改良的方法是首先将骨架质粒 pAdEasy-1 转染入 BJ5183 感受态细菌中筛选获取含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态,将 *Pme* I 线性化的穿梭载体电转入含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态中,避免了将转移质粒转化到有缺陷或复制能力弱的细菌中,因而重组效率大幅提高^[2]。邹昌勇等^[3]利用改良的重组腺病毒构建方法以氯化钙化学转化法取代电穿孔法高效构建 p53 重组腺病毒表达载体。本实验将 pAdEasy-1 载体采用氯化钙化学转化入 BJ5183 感受态,而线性的 pAdTrack-CMV-hIFN- γ 转化入 BJ5183-pAdEasy-1 采用的是电转化法,并且鉴定采用的是测序和双酶切使得构建过程更加合理阳性克隆获得率也较高。

参考文献

[1] Luo JZ, Deng L, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.

(上接第 1634 页)

本研究成功构建了 NGAL 重组真核表达载体 pcDNA3.1/His A-NGAL,对其通过测序证实无误后转染 HEK293T 细胞,通过 Western blot 和 ELISA 方法对表达产物进行鉴定说明 pcDNA3.1/His A-NGAL 能够在 HEK293T 细胞中表达且可以分泌到细胞外,但细胞表达量远远大于分泌出胞蛋白量。本实验为进一步研究 NGAL 蛋白并建立其相关免疫学检测方法奠定了基础。

参考文献

[1] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengel H, et al. Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase [J]. Biol Chem, 1993, 268 (14): 10425-10432.

[2] Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalinsiderophore iron complex rescues the kidney from ischemia reperfusion injury[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 610-621.

[3] Xu SY, Pauksen K, Venge P, et al. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1995, 55 (2): 125-131.

[4] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2534-

[2] 柳云帆, 吴小兵, 阮力. 腺病毒载体在疫苗研究中的应用[J]. 生物技术通讯, 2011, 4: 552-558.

[3] 邹昌勇, 全家妩, 田生和, 等. 简化的两步法细菌内同源重组腺病毒表达载体重组高效制备 p53 基因[J]. 中华医药杂志, 2006, 6 (2): 126-129.

[4] Kubota K. Innate IFN-gamma production by subsets of natural killer cells, natural killer T cells and gammadelta T cells in response to dying bacterial-infected macrophages[J]. Scand J Immunol, 2011, 71(3): 199-209.

[5] Pillai S, Mattoo H, Cariappa A. B cells and autoimmunity[J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(6): 721-731.

[6] Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells[J]. Nat Immunol, 2000, 1(6): 475-482.

[7] Schroder KP, Hertzog J, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2): 163-189.

[8] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. Science, 2011, 331(6024): 1565-1570.

[9] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape[J]. Nat Immunol, 2002, 3 (11): 991-998.

[10] Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, et al. Interferon-gamma and cancer immunoediting[J]. Immunol Res, 2005, 32(1/3): 231-245.

[11] Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6 (11): 836-848.

[12] Ikeda HL, Old J, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(2): 95-109.

(收稿日期: 2012-12-01)

2543.

[5] Prabhu A, Sujatha DI, Ninan B, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass [J]. Ann Vasc Surg, 2010, 24(4): 525-531.

[6] Gomes E, Antunes R, Dias C, et al. Acute kidney injury in severe trauma assessed by RIFLE criteria: a common feature without implications on mortality? [J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2010, 18(1): 1-6.

[7] Andrikos E, Tseke P, Balafa O, et al. Epidemiology of acute renal failure in ICUs: a multi-center prospective study[J]. Blood Purif, 2009, 28(3): 239-244.

[8] Paragas N, Qiu A, Zhang Q, et al. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time[J]. Nat Med, 2011, 17(2): 216-223.

[9] Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery[J]. Lancet, 2005, 365(9466): 1231-1238.

[10] Fricker LD, Gelman JS, Castro LM, et al. Peptidomic analysis of HEK293T cells: effect of the proteasome inhibitor epoxomicin on intracellular peptides[J]. J Proteome Res, 2012, 11 (3): 1981-1990.

(收稿日期: 2012-12-08)