

山羊 $\Delta fosb$ 基因重组腺病毒载体的构建

郑惠玲,袁 超,包黎娟,闫林慧,祝珍珍

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】利用腺病毒 pAdEasy-1 表达系统构建含山羊 $\Delta fosb$ 基因的重组腺病毒,为在原代细胞中研究该基因的功能奠定基础。【方法】扩增山羊的 $\Delta fosb$ 基因,与 pAdTrack 连接构建 pAdTrack-HA- $\Delta fosb$ 。用 pAdTrack-HA- $\Delta fosb$ 转化含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 细胞,同源重组后获得重组腺病毒质粒 pAd-HA- $\Delta fosb$,用其转染 HEK293 细胞,包装得到重组腺病毒。对重组腺病毒进行 PCR 和 Western blot 鉴定。【结果】酶切鉴定、绿色荧光蛋白观察及 PCR 均证明,重组腺病毒质粒构建正确;Western blot 检测到了 $\Delta fosb$ 蛋白的表达。【结论】成功构建获得了可表达 $\Delta fosb$ 蛋白的重组腺病毒 rAd-HA- $\Delta fosb$ 。

【关键词】 山羊; $\Delta fosb$;重组腺病毒

【中图分类号】 Q782;S852.65⁺9.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)06-0037-05

Construction of recombinant adenoviral vector of $\Delta fosb$ gene in goat

ZHENG Hui-ling, YUAN Chao, BAO Li-juan, YAN Lin-hui, ZHU Zhen-zhen

(College of Animal Science and Technology, Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture in Shaanxi Province,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to construct recombinant adenovirus vector bearing the goat $\Delta fosb$ gene and to amplify the adenovirus in HEK293 cells, which would provide a basis for further study on the role of $\Delta fosb$ gene in primary culture cells. 【Method】 Inserting the gene fragments containing both the complete CDS region of goat $\Delta fosb$ gene and HA tag into adenovirus shuttle vector pAdTrack, a recombinant shuttle vector pAdTrack-HA- $\Delta fosb$ was constructed. After identifying by digestion and sequencing, pAdTrack-HA- $\Delta fosb$ was linearized with *Pme* I, and then it was homologously recombined with plasmid pAdEasy-1 containing the adenovirus backbone DNA in BJ5183 *E. coli* cells to reform a new recombinant pAdEasy-HA- $\Delta fosb$. The DNA extracted from digested pAdEasy-HA- $\Delta fosb$ by *Pac* I was transfected into HEK293 cells by liposomes method. Then the integrity adenovirus pAd-HA- $\Delta fosb$ was packaged in HEK293 cells. 【Result】 It was confirmed by PCR detection and Western blot that the recombinant adenovirus rAd-HA- $\Delta fosb$ contained $\Delta fosb$ gene and could express both goat $\Delta fosb$ gene and HA tag in HEK293 cells. 【Conclusion】 The recombinant adenovirus rAd-HA- $\Delta fosb$ was constructed successfully.

Key words: goat; $\Delta fosb$; recombinant adenovirus

小鼠骨肉瘤基因 B (Finkel-Biskis-Jenkins murine osteosarcoma B, FosB) 是转录因子 AP-1 (activator protein-1) 家族的成员之一,其在转录拼接过程中发生自然截短形成 $\Delta fosb$ ^[1]。 $\Delta fosb$ 具有广泛

的生物学功能,在动物体脂肪形成、骨钙沉积、应激、药物成瘾等方面均有重要作用。有研究表明, $\Delta fosb$ 转基因小鼠与对照小鼠相比,全身骨量增加、脂肪形成减少^[2-3]。转基因小鼠脂肪减少的原因主要是由

* [收稿日期] 2009-12-24

[基金项目] 西北农林科技大学基本科研业务费(Z109021002);农业部公益性行业科研专项经费项目(3-45)

[作者简介] 郑惠玲(1969—),女,陕西西乡人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事生物技术与动物遗传育种研究。

E-mail: zheng. huiling@yahoo. com

于能量消耗增加导致脂肪细胞变小^[4]。在离体培养的原代前成骨细胞中,过表达 $\Delta fosb$ 可促进细胞钙化^[5]。 $\Delta fosb$ 基因在正常人乳腺上皮细胞中高表达,而在乳腺癌细胞中表达量下调^[6]。由此推测, $\Delta fosb$ 蛋白可能参与动物体的骨钙代谢,并且在维持乳腺的正常功能中具有重要作用。

乳汁是新生幼畜骨骼快速发育所需钙的惟一来源,为了保证提供足够的钙用于乳汁生产,并且保护自身不出现严重的低血钙症,哺乳期的母畜除通过增加摄入钙量以缓解对钙的大量需求外,还将骨钙流失转向乳汁,以补充生产乳汁所需要的大量钙。这种骨钙向乳汁转移的现象在幼畜断奶后会完全、迅速逆转。由此可见,泌乳期的乳腺组织也是钙代谢的重要器官。

为了探讨 $\Delta fosb$ 在乳腺钙和脂肪代谢过程中的作用,在从山羊乳腺组织中克隆得到 $\Delta fosb$ 基因 CDS 区全序列的基础上^[7],本研究构建了含 HA 标签的 $\Delta fosb$ 基因的重组腺病毒,并对其表达情况进行了 Western blot 检测,以期为进一步研究山羊 $\Delta fosb$ 基因在乳腺上皮细胞钙和乳脂肪代谢过程中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pAdTrack、pAdEasy-1、pMD- $\Delta fosb$ 、BJ5183 和 HEK293 细胞,由西北农林科技大学动物科技学院奶山羊实验室保存;兔抗羊 $\Delta fosb$ 抗血清由西北农林科技大学动物科技学院奶山羊实验室制备;HA 抗体购自 Cruz Biotechnology 公司;LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司;其他常用试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。引物合成及测序由上海生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 $\Delta fosb$ 的克隆 根据奶山羊 $\Delta fosb$ 序列(GenBank 登录号:FJ455501)设计 1 对引物,上游引物:5'-GGA AGA TCT ATG TTT CAA GCT TTC CCC GGA G-3',下游引物:5'-TGC TCT AGA TCA AGC GTA ATC CGG AAC ATC GTA TGG GTA CTC CGC CAG CGG GCC CGG CC-3'(下划线部分为 HA-tag,上、下游引物中的斜体部分分别为 *Bgl* II 和 *Xba* I 酶切位点,酶切位点的 5'端加入 3 个保护性碱基)。以 pMD- $\Delta fosb$ 质粒为模板,PCR 扩增 $\Delta fosb$ 的目的片段。PCR 反应体系为:模板 1 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,

premix Taq 12.5 μ L,dd H₂O 10.5 μ L,反应总体积 25 μ L。采用降落 PCR 方法,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,69 $^{\circ}$ C(每 s 下降 0.5 $^{\circ}$ C)40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 15 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。将符合目的基因 HA- $\Delta fosb$ 大小的 PCR 产物用 DNA 片段回收试剂盒纯化,将纯化后的 DNA 片段与 pMD-18T 载体连接,构建得到 pMD-HA- $\Delta fosb$,并对其进行 *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定。将鉴定正确的质粒转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆做菌液 PCR,将出现 HA- $\Delta fosb$ 条带的菌液送上海生物工程有限公司测序。

1.2.2 重组腺病毒质粒的构建 用 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶切腺病毒穿梭质粒 pAdTrack 和 pMD-HA- $\Delta fosb$,回收纯化后用 T₄ 连接酶连接,获得 pAdTrack-HA- $\Delta fosb$ 质粒 DNA,酶切鉴定后进行测序分析。用 *Pme* I 酶切 pAdTrack-HA- $\Delta fosb$ 使其线性化,然后用其转化含腺病毒骨架载体 pAdeasy-1 的大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞,在感受态细胞中 2 种质粒发生同源重组,用卡那霉素抗性筛选发生了同源重组的阳性克隆,并用 *Pac* I 酶切及 PCR 鉴定这些阳性克隆。

1.2.3 重组腺病毒的包装和病毒滴度的测定 *Pac* I 酶切线性化 pAdEasy-HA- $\Delta fosb$,然后用 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 转染 HEK293 细胞,转染第 3 天开始出现细胞病变效应(Cytopathic effect,CPE),第 12 天出现完全 CPE。出现完全 CPE 后,收集细胞及培养液,依次在液氮和 37 $^{\circ}$ C 水浴中冻融,反复冻融 3 次后,300 g 离心,收集第 1 代病毒上清,并用其感染 HEK293 细胞,以扩增得到更多病毒。提取病毒基因组 DNA,用设计的引物 PCR 扩增 $\Delta fosb$ 基因。采用半数荧光细胞法测定病毒滴度^[8]。

1.2.4 Western blot 检测 用重组腺病毒 pAdEasy-HA- $\Delta fosb$ 感染 80% 汇合的 HEK293 细胞,48 h 后收集细胞,超声裂解,Western blot 检测 $\Delta fosb$ 蛋白的表达^[5],一抗分别用兔抗羊 $\Delta fosb$ 抗血清(按 1:1 000 体积比稀释)和 HA 单克隆抗体,以未感染病毒的 HEK293 细胞作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆和重组穿梭质粒 pAdTrack-HA- $\Delta fosb$ 的构建

以 pMD- $\Delta fosb$ 质粒为模板,PCR 扩增得到 768 bp 的 DNA 片段(图 1)。测序结果表明,该片段包

括 723 bp $\Delta fosb$ CDS 区、*Bgl* II 和 *Xba* I 酶切位点、*HA*-tag 及保护碱基。用 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶切 pMD-*HA-Δfosb* 质粒,结果得到了 768 bp 的 *HA-Δfosb* 条带和约 2 000 bp 的 pMD 载体条带(图 2),表明 $\Delta fosb$ 基因克隆正确。用 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶

切 pAdTrack-*HA-Δfosb*,电泳检测出现 9 220 bp 和 768 bp 的条带(图 3-A)。以 pAdTrack-*HA-Δfosb* 为模板,用设计的引物进行 PCR 扩增,得到 768 bp 的目的条带(图 3-B)。以上结果均表明,pAdTrack-*HA-Δfosb* 构建正确。

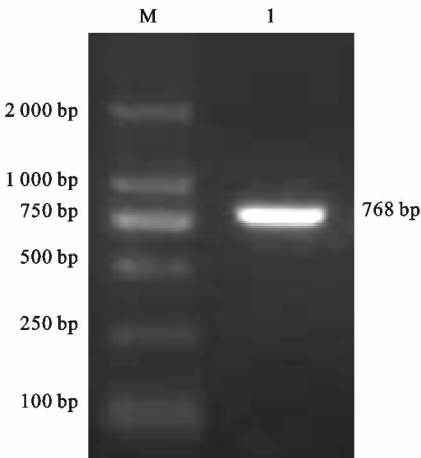


图 1 山羊 $\Delta fosb$ 基因的 PCR 扩增
M. DNA 标样 DL2000;1. 带酶切位点的 $\Delta fosb$ 片段
Fig. 1 $\Delta fosb$ in goat amplified by PCR
M. DL2000 DNA Marker;1. $\Delta fosb$ with the digestion site amplified by PCR

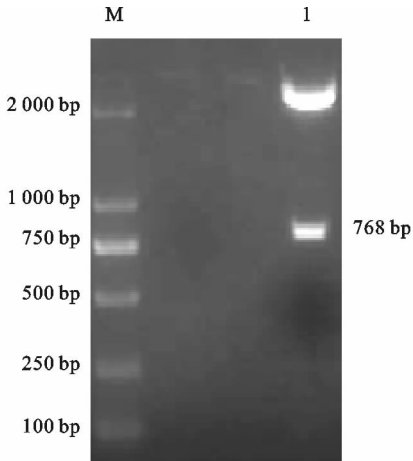


图 2 pMD-*HA-Δfosb* 质粒的 *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定
M. DNA 标样 DL2000;1. 用 *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切 pMD-*HA-Δfosb* 质粒
Fig. 2 Identification of pMD-*HA-Δfosb* by enzyme digestion
M. DL2000 DNA Marker;1. pMD-*HA-Δfosb* digested by *Xba* I / *Bgl* II

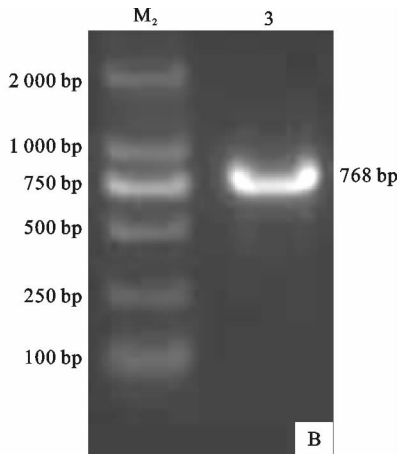
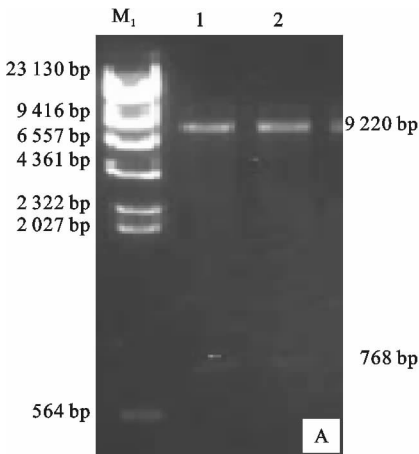


图 3 重组穿梭质粒 pAdTrack-*HA-Δfosb* 的 *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定及 PCR 鉴定
A. *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定重组穿梭质粒 pAdTrack-*HA-Δfosb*;B. PCR 鉴定重组穿梭质粒 pAdTrack-*HA-Δfosb*
M₁. DNA 标样 λ DNA/*Hind* III;1,2. 用 *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切 pAdTrack-*HA-Δfosb* 质粒;
M₂. DNA 标样 DL2000;3. 以 pAdTrack-*HA-Δfosb* 质粒为模板扩增 $\Delta fosb$ 基因
Fig. 3 Identification of pAdTrack-*HA-Δfosb* by enzyme digestion and PCR
A. pAdTrack-*HA-Δfosb* identified by *Xba* I and *Bgl* II digestion;B. pAdTrack-*HA-Δfosb* identified by PCR;
M₁. λ DNA/*Hind* III DNA Marker;1,2. pAdTrack-*HA-Δfosb* digested by *Xba* I and *Bgl* II;M₂. DL2000 DNA Marker;
3. $\Delta fosb$ amplified by pAdTrack-*HA-Δfosb*

2.2 腺病毒载体 pAdEasy-*HA-Δfosb* 的构建
用线性化的质粒 pAdTrack-*HA-Δfosb* 转化含

有腺病毒骨架质粒的 BJ5183 感受态细胞,同源重组后获得 pAdEasy-*HA-Δfosb*,经 *Pac* I 酶切后进行

电泳检测,可知获得约 4.5 kb 和约 30 kb 的 2 条条带(图 4)。PCR 鉴定结果表明,所构建的重组腺病毒骨架载体已经成功插入 $\Delta fosb$ 片段。

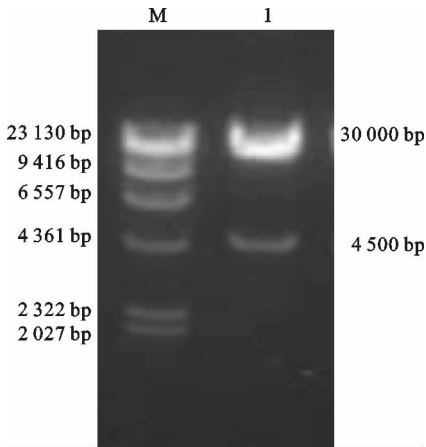


图 4 pAdEasy-HA- $\Delta fosb$ 重组腺病毒骨架质粒的 *Pac* I 酶切鉴定

M. DNA 标样 λ DNA/*Hind* III;

1. *Pac* I 酶切 pAdEasy-HA- $\Delta fosb$ 质粒

Fig. 4 Identification of pAdEasy-HA- $\Delta fosb$ plasmid by *Pac* I digestion

M. λ DNA/*Hind* III DNA Marker;

1. pAdEasy-HA- $\Delta fosb$ digested by *Pac* I

2.3 重组腺病毒的包装

用线性化的 pAdEasy-HA- $\Delta fosb$ 质粒转染 HEK293 细胞,48 h 后在荧光显微镜下可观察到有绿色荧光蛋白表达(图 5)。

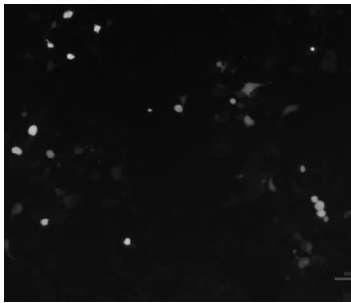


图 5 pAdEasy-HA- $\Delta fosb$ 转染的 HEK293 细胞中绿色荧光蛋白的表达

Fig. 5 Expression of GFP in HEK293 cells transfected with pAdEasy-HA- $\Delta fosb$

2.4 重组腺病毒的 PCR 鉴定和病毒滴度测定

以提取的重组腺病毒 rAd-HA- $\Delta fosb$ 基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增 $\Delta fosb$ 片段,得到 768 bp 的片段(图 6),与目的片段长度一致,表明已经获得含有 $\Delta fosb$ 的重组腺病毒。采用半数荧光细胞法对病毒进行滴度测定,24 h 后在荧光显微镜下观察到

第 1~7 孔均有大量的荧光,第 8 孔有 3 个荧光细胞,第 9 孔及以后各孔都没有出现荧光,故以第 8 孔为计量孔,稀释的病毒滴度为 10^9 U/mL。

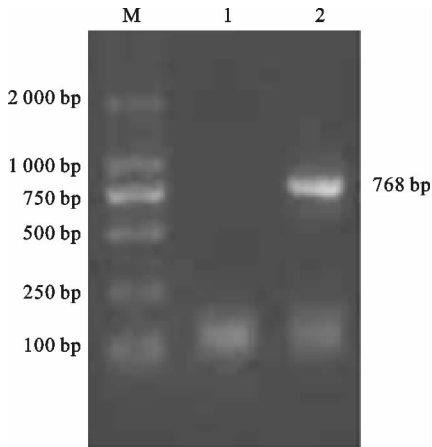


图 6 重组腺病毒 pAd-HA- $\Delta fosb$ 基因组中 $\Delta fosb$ 基因的 PCR 鉴定

M. DNA 标样 DL2000;1. 空白对照;2. 以 rAd-HA- $\Delta fosb$

基因组 DNA 为模板扩增的 $\Delta fosb$ 基因片段

Fig. 6 Identification of $\Delta fosb$ by PCR with rAd-HA- $\Delta fosb$

M. DL2000 DNA Marker;1. The control;

2. $\Delta fosb$ amplified by rAd-HA- $\Delta fosb$

2.5 $\Delta fosb$ 蛋白的 Western blot 检测

Western blot 结果显示,在 HEK293 细胞中检测到了山羊 $\Delta fosb$ 蛋白的表达,未感染病毒的细胞(对照)中无 $\Delta fosb$ 蛋白表达(图 7),说明山羊 $\Delta fosb$ 重组腺病毒 rAd-HA- $\Delta fosb$ 制备成功,能够过表达 $\Delta fosb$ 蛋白,可用于该蛋白的功能研究。

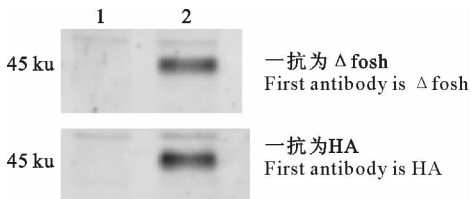


图 7 山羊 $\Delta fosb$ 蛋白表达的 Western blot 检测

1. 对照;2. rAd-HA- $\Delta fosb$ 感染的 HEK293 细胞

Fig. 7 Detection of $\Delta fosb$ expression in HEK293 cells by Western blot

1. The control;2. HEK293 cells infected with rAd-HA- $\Delta fosb$

3 讨 论

目前,有多种方法可以将外源基因导入细胞系,导入效率较高,但是对于离体培养的原代细胞,脂质体法或化学法的转染效率均很低,只有 5%左右,不能满足基因功能研究的需要,利用病毒载体将外源基因导入原代细胞是当前解决这一难题的有效途

径。目前,比较成熟的病毒载体主要有疱疹病毒、逆转录病毒、牛乳头瘤病毒、腺病毒及痘苗病毒等,其中腺病毒作为载体可感染几乎所有类型的增殖和非增殖细胞,它不插入宿主细胞基因组,无插入致突变性,能在辅助细胞内有效地进行增殖,得到高滴度病毒,并且导入外源基因效率高,对人的致病性低,操作安全,因此,已被广泛用于基因功能研究和基因治疗等诸多领域。

自 20 世纪 80 年代以来,人们对腺病毒载体的结构不断进行改造优化,目前多种腺病毒载体已实现商品化。AdEasy™ 系统是由 He 等于 1998 年构建的代替传统腺病毒重组系统的一种快捷系统^[9-11],只需 2 步即可产生重组腺病毒:第 1 步将表达盒装入穿梭载体,第 2 步通过同源重组插入腺病毒基因组^[12]。该系统使病毒 DNA 操作更容易,用抗性筛选重组载体更简单、方便。目前常用的腺病毒载体有 pAdEasy-1 和 pAdEasy-2。本研究采用非复制型腺病毒 pAdEasy-1 系统构建重组腺病毒载体,经酶切、PCR 鉴定正确后,在 HEK293 细胞中包装得到重组腺病毒颗粒。然后,用重组腺病毒感染 HEK293 细胞,分别用兔抗羊 $\Delta fosb$ 抗血清和 HA 单克隆抗体作为一抗进行 Western blot 检测,结果显示,HEK293 细胞中有 $\Delta fosb$ 蛋白表达,证明山羊 $\Delta fosb$ 基因的重组腺病毒载体构建成功,获得了具有感染能力并且能够表达 $\Delta fosb$ 蛋白的重组腺病毒,为进一步研究 $\Delta fosb$ 基因在原始山羊乳腺上皮细胞中的功能奠定了基础。

[参考文献]

[1] Nakabeppu Y,Nathans D. A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity [J]. Cell,1991,64(4):751-759.

[2] Sabatakos G,Sims N A,Chen J,et al. Overexpression of Delta FosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis [J]. Nat Med,2000,6(8):985-990.

[3] Kveiborg M,Sabatakos G,Chiusaroli R,et al. Delta FosB induces osteosclerosis and decreases adipogenesis by two independent cell autonomous mechanisms [J]. Mol Cell Bio,2004,

24(7):2820-2830.

[4] Glenn C R,Cheo S C,Lynn N,et al. Increased energy expenditure and insulin sensitivity in the high bone mass $\Delta fosB$ transgenic mice [J]. Endocrinology,2009,150:135-143.

[5] 郑惠玲,袁超,包黎娟,等. 过表达 $\Delta 2\Delta fosb$ 蛋白促进小鼠原代前成骨细胞的分化 [J]. 分子细胞生物学报,2008,41(3):222-226.

Zheng H L,Yuan C,Bao L J,et al. Overexpression of the shorter FosB isoform ($\Delta 2\Delta fosb$) increases nodus in CD1 primary osteoblasts [J]. Journal of Molecular Cell Biology,2008,41(3):222-226. (in Chinese)

[6] Karin M L,Holger K,Sabine R,et al. FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas [J]. Breast Cancer Research and Treatment,2003,77:265-275.

[7] 郑惠玲,袁超,包黎娟. 山羊 $\Delta fosb$ 基因的克隆和生物信息学分析 [J]. 西北农业学报,2009,18(5):12-16.

Zheng H L,Yuan C,Bao L J. Cloning and bioinformatics analysis of dairy goat $\Delta fosb$ cDNA [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2009,18(5):12-16. (in Chinese)

[8] 江千里,王健民,温丽敏. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度 [J]. 第二军医大学学报,2002,23(9):1034-1035.

Jiang Q L,Wang J M,Wen L M. Establishing a realtime large-scale recombinant virus titering method taking GFP as marker gene [J]. Journal of Second Military Medical University,2002,23(9):1034-1035. (in Chinese)

[9] He T C,Zhou S,Da-Costa L T,et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(5):2509-2514.

[10] Mizuguchi H,Kay M A. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method [J]. Hum Gene Ther,1998,9:2577-2583.

[11] Anderson R D,Haskell R E,Xia H,et al. A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors [J]. Gene Therapy,2000,7:1034-1038.

[12] 陈建发,黄宗海,黄元媛,等. 简化的两步法细菌内同源重组高效制备腺病毒质粒 [J]. 肿瘤防治杂志,2003,10(5):473-475.

Chen J F,Huang Z H,Huang Y Y,et al. Recombinant adenovirus plasmid constructed by simplified and high performance two-step homologous recombination in bacteria [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment,2003,10(5):473-475. (in Chinese)