

## 大鼠 BDNF 基因复制缺陷型重组腺病毒的构建与鉴定

王 鹏<sup>1</sup>, 吴燕峰<sup>2</sup>, 黄文林<sup>3</sup>, 唐 勇<sup>1</sup>, 黄 霖<sup>1</sup>, 杨 睿<sup>1</sup>, 沈慧勇<sup>1</sup>( 中山大学 1. 附属第二医院矫形外科学, 广东 广州 510120 ; 2. 附属第二医院脐血库, 广东 广州 510120 ;  
3. 肿瘤防治中心实验研究部, 广东 广州 510060 )

**摘 要** 【目的】构建携带大鼠脑源性神经营养因子( brain derived neurotrophic factor, BDNF )目的基因的复制缺陷型重组腺病毒, 并初步检测其体外表达目的基因的能力。【方法】提取大鼠脑组织总 RNA, 使用 RT-PCR 方法扩增 BDNF 目的基因并将其克隆入 pMD18- T Simple 载体测序, 将测序完全正确的 BDNF 目的基因克隆入 pShuttle2 中, 然后利用体外连接法将 BDNF 目的基因克隆入 Adeno- X™ 腺病毒骨架中, Lipofectamine™ 2000 法转染 HEK 293 细胞包装携带 BDNF 目的基因的重组腺病毒, 少量提取重组腺病毒 DNA 检测证实为复制缺陷型 BDNF 基因重组腺病毒后大量扩增, 蛋白电泳及 Western blot 法初步检测 BDNF 目的基因在 HEK 293 细胞中的表达。【结果】成功构建了携带大鼠 BDNF 目的基因的复制缺陷型重组腺病毒, 并证实其在 HEK 293 细胞中可高水平表达 BDNF 目的基因。【结论】利用体外连接法可方便、快捷地构建携带 BDNF 目的基因的复制缺陷型重组腺病毒, 并可在体外高水平表达其所携带的目的基因。

关键词: 脑源性神经营养因子; 基因重组; 腺病毒载体

中图分类号: R342.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0135-05

## Construction and Identification of Replication- deficient Recombinant Adenovirus Cloned with a SD Rat BDNF Gene

WANG Peng<sup>1</sup>, WU Yan-feng<sup>2</sup>, HUANG Wen-lin<sup>3</sup>, TANG Yong<sup>1</sup>, HUANG Lin<sup>1</sup>, YANG Rui<sup>1</sup>, SHEN Hui-yong<sup>1</sup>  
(1. Department of Orthopedics; 2. Cord Blood Bank, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Department of Experimental Research, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】To construct a strain of replication- deficient recombinant adenovirus which were cloned with a SD rat brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene and examine its ability to express the BDNF gene in vitro. 【Methods】The total RNA of a SD rat brain were extracted, BDNF gene was synthesized and amplified by using the method of RT- PCR, then BDNF gene was cloned into the pMD18- T simple vector by using a method of A- T cloning, and then the BDNF gene, which sequences were correct, was cloned into pShuttle2 vector. Subsequently it was cloned into Adeno- X™ backbone by ligation in vitro, HEK 293 cells were transfected by using Lipofectamine™ 2000 and packaged for the recombinant adenovirus particles. Replication- deficient recombinant adenovirus which carried the BDNF gene were identified and amplified. Finally, the levels of secreted recombinant adenovirus- derived BDNF were determined by protein electrophoresis and Western blot analysis. 【Results】The replication- deficient recombinant adenovirus which carried the BDNF gene were constructed successfully and could express the BDNF gene in a high level when transfected HEK 293 cells in vitro. 【Conclusion】The method of ligation in vitro is a short cut for construction of replication- deficient recombinant adenovirus cloned with a SD rat BDNF gene and the gene of interest can be expressed in high level in cultured HEK 293 cells.

Key words: replication- deficient recombinant adenovirus; genetic recombination; adenovirus vector

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):135- 139]

Barde 等<sup>[1]</sup>于 1982 年第一次报告 BDNF, 相关 研究已证实 BDNF 对在体运动神经元的发育, 成

收稿日期 2005-10-12

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30271311); 广东省自然科学基金资助项目(36642); 广东省科技厅重大项目(2004A30201002)

作者简介: 王 鹏(1979-), 男, 博士研究生, 沈慧勇, 研究员, 硕士生导师, 通讯作者, E-mail: shen.h.y.@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

熟后运动神经元以及病变运动神经元的存活和轴突再生有十分重要的作用<sup>[2-4]</sup>。正常情况下在脊髓中很难检测到表达,而在中枢神经系统损伤时表达上调<sup>[5]</sup>,提示可能在中枢神经系统损伤后修复过程中有重要的作用。Mitsui 等<sup>[6]</sup>将经过大鼠 BDNF 基因修饰过的成纤维细胞植入大鼠脊髓挫伤模型中,发现实验组大鼠的肢体运动及膀胱功能都有所改善。本实验利用第三代腺病毒作为载体构建携带大鼠 BDNF 基因复制缺陷型重组腺病毒,具有较高的安全性,可长时间表达目的基因,为中枢神经系统损伤后利用转基因技术研究神经再生奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和仪器

Trizol Reagent, Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司。ReverAid™ FirstStrand cDNA Synthesis Kit 为美国 Fermentas 公司产品。T4 DNA 连接酶购自美国 MBI 公司。TaKaRa Ex Taq™, DNA Marker DL 2000, pMD18-T simple vector, -Hin digest 及常用限制性内切酶均为日本 TaKaRa 公司产品。质粒抽提试剂盒,PCR 产物纯化试剂盒购自美国 Omega 公司。DNA 凝胶回收试剂盒,质粒中量提取试剂盒为德国 QIAgen 公司产品。Pac I, I-SceI, I-Ceu I 等稀有内切酶购自英国 NEB 公司。本实验所用引物为上海博亚生物科技有限公司合成。Adeno-X™ Expression System 购自美国 BD 公司。Sheep anti-rat BDNF pAb 购自美国 CHEMICON 公司。DH5 菌株,HEK 293 细胞由中山大学肿瘤医院 619 室提供。

### 1.2 大鼠 BDNF 目的基因的获取与测序

TRIZOL 法从即可处死 SD 大鼠脑组织中提取总 RNA,利用 M-MLV 逆转录酶及 Oligo-dT 引物合成第一条 cDNA 链,然后在 PCR 管中加入 Ex Taq™、BDNF 特异性上、下游引物利用 PCR 方法扩增 BDNF 目的基因,BDNF 上游引物为:5'-GC TCTAGAGCCACCATGACCATCCTTTTCTTACTAT G-3',其中 TCTAGA 为 XbaI 识别位点,下游引物为:5'-GCGGTACCCTATCTTCCCCTTTTAATGG TCAAT-3',其中 GGTACC 为 KpnI 的识别位点。A-T 克隆法将所得到的 BDNF 目的基因插入 pMD18-T simple 载体中,酶切初步鉴定克隆成功

后进行双脱氧链终止法测序。

### 1.3 将大鼠 BDNF 目的基因克隆入 Adeno-X™ 腺病毒载体系统

将测序完全正确的 pMD18-T-BDNF 重组质粒用 XbaI 和 KpnI 双酶切,用 QIAquick 胶回收试剂盒回收 BDNF 目的基因片段,利用 T4 DNA 连接酶将其连接到同样用 XbaI 和 KpnI 双酶切的 pShuttle2 中,转化 DH5,提取质粒,酶切初步鉴定后测序,将测序正确的 pShuttle2-BDNF 重组质粒用 I-CeuI 和 PI-SceI,苯酚:氯仿:异戊醇法抽提含有 BDNF 目的基因的片段后将其接入 Adeno-X™ 腺病毒骨架中,转化 DH5,大量摇菌后抽提质粒,酶切初步鉴定后测序。

### 1.4 携带大鼠 BDNF 目的基因的复制缺陷型重组病毒的制备

将测序完全正确的重组 pAdeno-X-BDNF 用限制性内切酶 Pac I 酶切消化,以暴露重组腺病毒基因组两端的反向末端重复序列(ITR),按说明书用 Lipofectamine™ 2000 将 Pac I 酶切线性化产物转入细胞生长融合度为 50%~70%的 HEK 293 细胞,转染后每天观察细胞形态,当出现细胞病变时反复冻融裂解细胞收集病毒作为原代重组腺病毒用于大量扩增。

### 1.5 携带大鼠 BDNF 目的基因的复制缺陷型重组病毒的鉴定

用原代重组腺病毒感染 HEK 293 细胞,待出现细胞病变裂解细胞收集病毒再接种于 HEK 293 细胞,反复上述操作以扩增重组腺病毒。在扩增过程中,苯酚-氯仿-异戊醇法抽提重组腺病毒 DNA 做如下鉴定:用特异性上、下游引物 5'-TCGTTTCTCAGCAG CTGTTG-3' 和 5'-CATCTGAA CTCAAAGCGTGG-3' PCR 法鉴定是否为腺病毒载体,这两条引物所扩增的部位位于腺病毒 E2 区,是腺病毒载体所必备的一段序列,如为腺病毒载体则可扩增出 861 bp 的特异性条带。用特异性上、下游引物 5'-GAAGCCTGGACCGATGTAAG-3' 和 5'-GT CACATCCAGCA TCACAGG-3' 检测是否有野生型腺病毒污染:这两条引物所扩增的部位位于腺病毒 E1 区,是腺病毒复制所必需的序列,只存在于野生型腺病毒,腺病毒载体中已将其去除,如扩增出 576 bp 的条带则提示有野生型腺病毒污染。初步鉴定后将所抽提的 pAdeno-X-BDNF 进行双脱氧链终止法测序确保 BDNF 目的

基因每个碱基都正确。

### 1.6 大鼠 BDNF 基因复制缺陷型重组腺病毒的纯化及其体外表达 BDNF 目的基因的检测

用病毒接种于大约 10 瓶 175 cm<sup>2</sup> 培养瓶的 HEK 293 细胞,待出现细胞病变时如上收集病毒,用 CsCl 密度梯度离心法纯化重组腺病毒:依次将 1.5 mg/mL、1.35 mg/mL 及 1.25 mg/mL 的 CsCl 加入 14 mL 的离心管中,再将已制备好的样品加入其中,27 000 r/min 10 离心 60 min,从 1.35 mg/mL CsCl 界面收集蓝白色的病毒条带,再用 1.35 mg/mL CsCl 27 000 r/min 10 离心 18 h,收集蓝白色的病毒条带,用已配制好的透析液 4 透析 36 h,每 9 h 更换透析液一次,最后用 0.22 μm 的滤过膜除菌,70 保存备用。将纯化的重组腺病毒的转染 HEK 293 细胞,取其培养基配制电泳样品,用未接种的同时传代的 HEK 293 细胞培养基配制样品做为阴性对照,分别取第 1 天,第 2 天,第 3 天的培养基用于样品制备,蛋白电泳及 Western blot 法检测 BDNF 基因在 HEK 293 细胞中的表达,其中在 Western blot 过程中使用羊抗大鼠 BDNF 多克隆抗体(1:1000)与 PVDF(聚偏氟乙稀)膜上的 BDNF 蛋白质进行结合。

大鼠脑组织总 RNA 提取后电泳可见三条清晰的 RNA 条带,从小到大分别为 5S RNA、18S RNA、28S RNA,说明成功地提取了总 RNA。PCR 方法扩增 BDNF 目的基因片段(图 1),图中可见一条清晰的 DNA 条带,大小为 800 bp 左右,该条带即是用特异性引物所扩增出的 BDNF 目的基因。BDNF 目的基因片段成功克隆入 pMD18-T Simple 载体后紫外分光光度仪测定所提取的 pMD18-T Simple-BDNF 质粒浓度为 420 ng/L, XbaI 和 KpnI 双酶切鉴定后进行双脱氧链终止法测序(图 2),测序结果与基因库中的 SD 大鼠 BDNF 基因仅在从启动子 ATG 开始的第 727 个碱基 C 定点突变为 T,对照密码子表可见其所代表的氨基酸相同,故所表达的蛋白质不受影响。

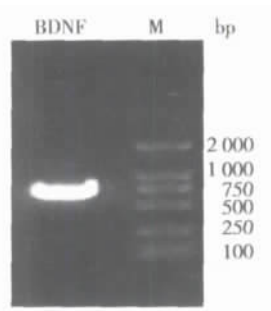


图 1 PCR 扩增 SD 大鼠 BDNF 基因电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the SD rat BDNF gene

Marker : DL 2000 DNA

## 2 结 果

### 2.1 大鼠 BDNF 基因的扩增和序列测定

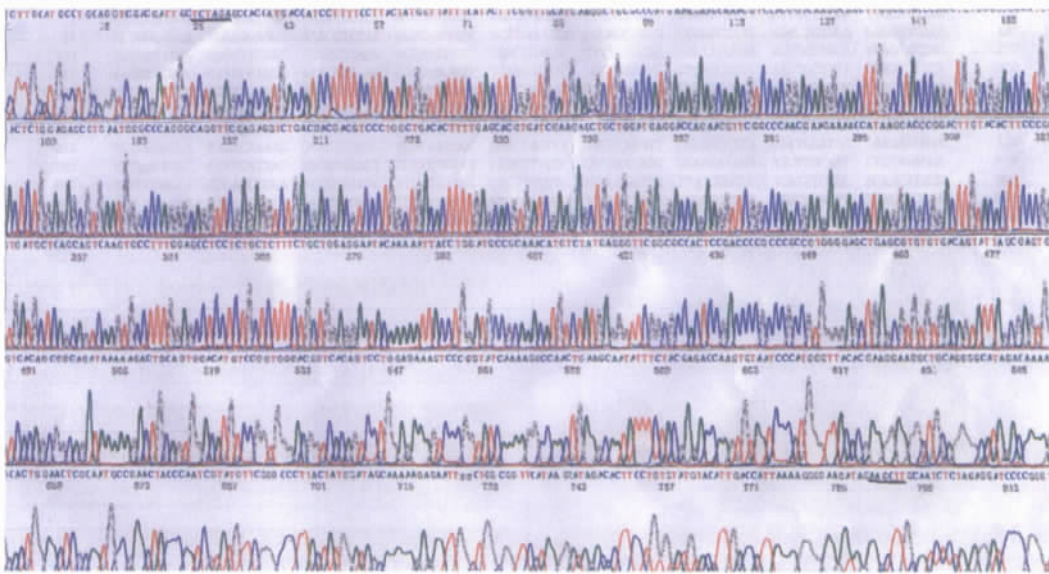


图 2 pMD18-T Simple-BDNF 重组体测序

Fig. 2 Sequence of the recombinant pMD18-T Simple-BDNF

The BDNF gene are flanked by XbaI and KpnI which were underlined in the figure. The green, red, blue and black peaks stand for A, T, C, G respectively

### 2.2 BDNF 基因重组腺病毒的构建及鉴定

将测序正确的 BDNF 目的基因克隆入 pShuttle2 及 Adeno- X™ 腺病毒骨架后,用 I- Ceul 和 P1- Scl 双酶切后电泳都可发现大小为 2 000 bp 左右的含有 BDNF 目的基因的表达框( pAdeno- X- BDNF 酶切鉴定电泳图如图 3 ),测序结果同前。pAdeno- X- BDNF 的 Pac 酶切产物转染 HEK 293 细胞后大约两周后可见到明显的细胞病变:细胞脱离培养瓶底壁,圆球形,呈葡萄串状聚集在一起,有的细胞已经破裂。上述提到两对特异性引物对重组腺病毒 DNA 的 PCR 鉴定结果依次为:可见大小为 861 bp 电泳条带,表明所检测质粒为腺病毒骨架;未见电泳条带,而野生型腺病毒对照组则有明显的 576 bp 大小的特异性电泳条带,表明没有野生型腺病毒污染(图 4)。抽提 pAdeno- X- BDNF 测序结果同前,说明构建成功携带 BDNF 目的基因的复制缺陷型重组腺病毒。

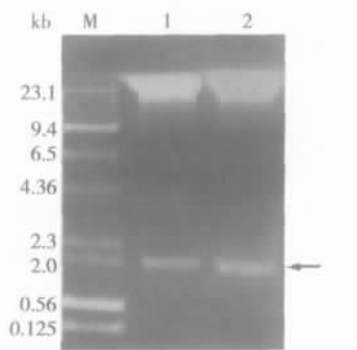


图 3 重组 Adeno- X- BDNF 质粒限制性酶切鉴定电泳图  
Fig.3 Restriction analysis of recombinant pAdeno-X- BDNF

Marker: - Hin digest ; Lane 1, 2: Digested products of pAdeno- X- BDNF by I- Ceul and P1- Scl ; The arrow indicates the band of BDNF expression cassette which flanked by I- Ceul and P1- Scl

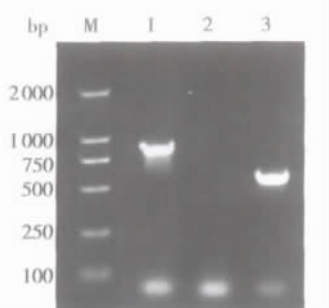


图 4 重组腺病毒 DNA 提取物 PCR 鉴定  
Fig.4 Identification of the recombinant adenovirus DNA by PCR

Marker: DL 2000 DNA ; Lane 1, 2: PCR products of the recombinant adenovirus DNA ; Lane 3: PCR products of the wild adenovirus. The band in Lane 1 and Lane 3 are 861 bp and 576 bp respectively

### 2.3 BDNF 基因重组腺病毒的纯化及体外表达 BDNF 基因的检测

大量扩增重组腺病毒( 175 cm<sup>2</sup> 的培养瓶 10 瓶左右)并检测后,用 CsCl 密度梯度离心进行病毒纯化,图中箭头所示的条带即为纯化的已包装好的重组腺病毒(图 5)。蛋白电泳及 Western blot 检测结果如下:检测对照组 1、2、3 d 培养基均未见明显特异性条带,而实验组,转染后 1、2、3 d 取其培养基进行检测,可见 BDNF 的表达逐渐增强,并较对照组有显著性增强,图中的黑色条带即为检测到的大鼠 BDNF 蛋白,相对分子质量 M<sub>r</sub>=12.3 ×10<sup>3</sup> (图 6)。

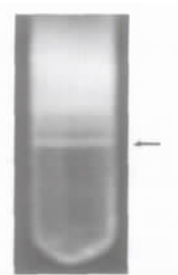


图 5 CsCl 密度梯度离心纯化重组腺病毒  
Fig.5 The purified recombinant adenovirus by CsCl gradient centrifugation

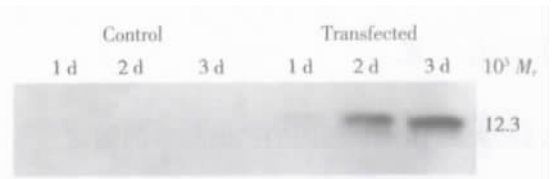


图 6 Western blot 方法检测大鼠 BDNF 蛋白体外表达  
Fig.6 The in vitro expression of the rat BDNF protein detected by Western blot

## 3 讨 论

### 3.1 BDNF 对脊髓损伤修复的作用

Novikov 等<sup>[7]</sup>证实了 BDNF 具有减少脊髓损伤后神经元死亡和损伤区大小的作用。Ruitenber 等<sup>[8]</sup>将携带大鼠 BDNF 基因的嗅鞘细胞移植入大鼠脊髓横断损伤模型中,4 个月后发现脊髓损伤体面积明显小于对照组,后肢功能也有部分恢复,推测其来自对于濒临死亡的神经元的保护。BDNF 这种防止脊髓损伤后轴突减少的作用有重要的意义,因为保存残留轴突并促进这些轴突修复和再生是脊髓损伤治疗和研究中最为重要的内容,仅仅多挽救百分之几的轴突就可能给患者带

来完全不同的生存质量。在脊髓损伤后，局部神经营养因子受体表达上调，而神经营养因子的表达相对缺乏，被认为是神经再生的障碍之一<sup>[9]</sup>。携带 BDNF 基因复制缺陷型重组腺病毒的构建及鉴定，是本课题组承担“转 BDNF 基因嗅鞘细胞移植对脊髓 Nogo 基因表达的影响”的研究的一部分，该研究希望通过 BDNF 及嗅鞘细胞的双重作用降低中枢神经系统中 Nogo 基因表达神经再生的抑制因子 Nogo-A，从而促进神经再生，为从机理上阐明影响中枢神经系统神经再生的因素奠定了基础。

### 3.2 体外连接法构建 BDNF 基因复制缺陷型重组腺病毒

随着对腺病毒基因组序列及其表达调控认识的不断深入，对腺病毒载体的不断改造使它能容纳大约 8 kb 大小的外源性基因、表达时间可持续数月、免疫原性越来越低，并且其本身不整合入宿主细胞的基因组中使其成为最有希望应用于临床治疗疾病的载体之一<sup>[10]</sup>。郭家松等<sup>[11]</sup>已证实腺病毒载体可过量表达其所携带的目的基因。构建重组腺病毒的两种传统方法都是以同源重组为基础的：其一是用修饰的腺病毒 DNA 与穿梭载体在 HEK 293 细胞中进行同源重组；更为流行的方法采用了穿梭载体与腺病毒质粒转化一种特殊的菌株 (BJ 5183)。然后从细菌中收集重组腺病毒，用其感染 HEK 293 细胞。虽然这些方法是可行的，但由于在 HEK 293 细胞中同源重组率偏低；或在转化 BJ 5183 之前克隆步骤过于复杂，使这两种方法效率偏低。Adeno-X™ 表达系统以体外连接方法为基础，减少了非重组腺病毒的产生，且无需进行费时的噬斑纯化，从而提供了一种快速、高效构建重组腺病毒的方法。Adeno-X™ 系统可以高效转染靶细胞并可以高水平表达所携带的目的基因。在本试验中，BDNF 目的基因的表达明显较对照组高，这可以使得移植入病灶区的细胞为损伤的神经元或神经轴突源源不断地提供 BDNF，以保护濒临死亡的神经元和促进损伤轴突的再生。

(衷心感谢中山大学生命科学院邓庆丽副教授、中山大学肿瘤防治中心刘然义博士、第三军医大学薛刚博士对我们实验过程中的指导与帮助)

### 参考文献：

- [1] BARDE Y A, EDGAR D, THOENEN H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain [J]. *EMBO J*, 1982, 1(5):549- 553.
- [2] SCHABITZ W R, BERGER C, KOLLMAR R, et al. Effect of brain- derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia[J]. *Stroke*, 2004, 35(4):992- 997.
- [3] BOYD J G, GORDON T. Glial cell line- derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo[J]. *Exp Neurol*, 2003,183(2):610- 619.
- [4] 金国华,田美玲,秦建兵,等. BDNF、NGF 对体外长期培养的胚基底前脑胆碱能神经元的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2001, 17(4):337- 341.
- [5] ZHOU L, SHINE H D. Neurotrophic factors expressed in both cortex and spinal cord induce axonal plasticity after spinal cord injury [J]. *J Neurosci Res*, 2003,74(2):221- 226.
- [6] MITSUI T, FISCHER I, SHUMSKY J S, et al. Transplants of fibroblasts expressing BDNF and NT- 3 promote recovery of bladder and hindlimb function following spinal contusion injury in rats[J]. *Exp Neurol*, 2005,194(2):410- 31.
- [7] NOVIKOV L, NOVIKOVA L, KELLERTH JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo[J]. *Neuroscience*, 1997, 79(3):765- 774.
- [8] RUITENBERG M J, PLANT G W, et al. Ex vivo adenoviral vector-mediated neurotrophic gene transfer to olfactory ensheathing glia:effect on rubrospinal tract regeneration,lesion size, and functional recovery after implantation in the injured rat spinal cord [J]. *J Neuroscience*, 2003, 23(18):7045- 7058.
- [9] LIEBL D J, HUANG W, YOUNG W, et al. Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(1):15- 26.
- [10] KAMEN A, HENRY O. Development and optimization of an adenovirus production process [J]. *J Gene Med*, 2004, 6 Suppl 1: S184- S192.
- [11] 郭家松,曾园山,黄文林,等. 腺病毒介导神经营养素- 3 基因转染施万细胞 [J]. *中山大学学报：医学科学版*, 2004,25(4):304- 307.

(编辑 张敏瑞)