

FKBP12.6 重组腺病毒载体的构建及其心肌细胞感染效率测定

李 德, 伍 卫, 周淑娴

(中山大学附属第二医院心内科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】构建携带 FKBP12.6 基因的重组腺病毒载体以研究 FKBP12.6 在心力衰竭时心室肌电重构中的作用。【方法】将平端化的 FKBP12.6 片段连接到穿梭质粒 pAdTrack-CMV 构建重组穿梭质粒 pAdTrack/FKBP12.6, 用 Xho I 单酶切进行鉴定。采用电穿孔法将线性化 pAdTrack/FKBP12.6 转化 AdEasier-1 细菌, 产生重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/FKBP12.6。采用脂质体介导法用线性化 pAdEasy-1/FKBP12.6 转染 293 细胞, 从病变的 293 细胞分离、纯化重组腺病毒 Ad.FKBP12.6; 采用 PCR 方法对其进行鉴定。用重组腺病毒感染乳鼠心肌细胞, 在荧光显微镜下计算 GFP 阳性细胞百分率。【结果】在病变 293 细胞的冻融上清中含有重组腺病毒 Ad.FKBP12.6, 其滴度为 1.5×10^{12} pfu/mL。当感染复数(MOI)为 75 时, 感染效率可达 100%。【结论】成功构建了携带 FKBP12.6 基因的重组腺病毒载体; Ad.FKBP12.6 可高效感染乳鼠心肌细胞。本研究为进一步探讨 FKBP12.6 在心力衰竭时心室肌电重构中的作用奠定了基础。

关键词: FKBP12.6; 腺病毒载体; 心肌细胞

中图分类号: R749.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0271-05

Construction of Recombinant Adenovirus Vector of Ad.FKBP12.6 and Its Efficiency of Infecting Myocardial Cells

LI De, WU Wei, ZHOU Shu-xian

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To construct recombinant adenovirus vector of FKBP12.6 and determine its efficiency of infecting myocardial cells. 【Methods】 FKBP12.6 cDNA was subcloned into shuttle plasmid pAdTrack-CMV to construct recombinant shuttle plasmid pAdTrack/FKBP12.6. The recombinant shuttle plasmid was transformed into Adeasier-1 cells by electroporation to construct recombinant adenovirus plasmid pAdEasy-1/FKBP12.6. Then pAdEasy-1/FKBP12.6 was transfected into 293 cells by liposome to package recombinant adenovirus Ad.FKBP12.6 after linearization with Pac I. PCR was used to detect target gene fragment. The efficiency of recombinant adenovirus infecting myocardial cells (MCs) was measured with the aid of green fluorescent protein (GFP) expression. 【Results】 The recombinant adenovirus Ad.FKBP12.6 with GFP report gene was successfully constructed in 293 cell. PCR test proved Ad.FKBP12.6 contained the insertion of FKBP12.6. The titre of purified recombinant adenovirus was 1.5×10^{12} pfu/mL. The efficiency of recombinant adenovirus infecting MCs was 100% when multiplicity of infection (MOI) was 75. 【Conclusion】 The construction of recombinant adenovirus vector containing FKBP12.6 gene has been achieved, and the recombinant adenovirus can infect MCs with high efficiency. This study has proved a basis for further research.

Key words: FKBP12.6; adenovirus vector; myocardial cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):271-275]

肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR) Ca^{2+} 释放通道(RyR2)在心脏兴奋-收缩偶联过程中起关键

收稿日期: 2005-11-24

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2005037611)

作者简介: 李 德(1966-), 男, 四川乐至人, 博士后, 主要从事心力衰竭时心脏电生理方面的研究。

作用, SR 中的 Ca^{2+} 通过 RyR2 释放到胞浆启动心肌收缩。RyR2 功能障碍不仅引起心肌收缩功能降低, 同时导致室性心律失常发生, 而 FK506 结合蛋白 12.6 (FK506 binding protein 12.6, FKBP12.6) 是 RyR2 功能的关键调节因子^[1,2]。因此, FKBP12.6 在心力衰竭及室性心律失常发生中的作用正受到广泛关注。以 FKBP12.6 为目标的干预实验可能为心力衰竭及室性心律失常的防治提供新的线索。腺病毒载体作为一种高效的基因转移工具被广泛应用于基因治疗的研究。本实验拟构建携带人 FKBP12.6 基因的重组腺病毒, 为以 FKBP12.6 为目标的干预研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

腺病毒载体系统 pAdEasy-1、pAdTrack-CMV、AdEasier-1 细菌(已转化腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌株) 由美国 John Hopkins 肿瘤中心 Bert Vogelstein 教授惠赠; pHybLex/Zeo-FKBP12.6 由意大利 Padova 大学 Natascia Tiso 教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 及 293 细胞由第三军医大学西南医院烧伤科贺伟峰博士提供; 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、PCR 试剂盒购及病毒 DNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 公司; FKBP12.6 扩增引物(F: 5 CTGGAATTCATGGGCGTGGAGATCGAG 3 和 R: 5 GACTCGAGTCACTCTAAGTTGAGCAGCTC 3)由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方 法

质粒的转化、提纯、酶切、连接等均采用常规方法。基因测序由成都天泰生命科技公司完成。

1.2.1 重组穿梭质粒 pAdTrack/FKBP12.6 的构建及鉴定 pHybLex/Zeo-FKBP12.6 用 EcoR + Sal 双酶切, 得到 4.8 kb 和 0.35 kb 两个片段, 回收 0.35 kb 片段 FKBP12.6; 用 T4 DNA 多聚酶使 FKBP12.6 片段末端平端化; 穿梭质粒 pAdTrack-CMV 经 EcoR 单酶切后回收 9.2 kb 载体片段; 用 T4 DNA 连接酶连接 pAdTrack-CMV 片段和平端化的 0.35 kb FKBP12.6 片段; 连接产物转化大肠杆菌, 从卡那霉素抗性平板上挑取菌落抽提质粒 DNA; 用 Xho I 单酶切鉴定重组质粒; 正向质粒保种, 送成都天泰生命科技公司进行基因测序。

1.2.2 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/FKBP12.6 的构建 用 Pme 酶切质粒 pAdTrack/FKBP12.6, 回收线性化片段; 电穿孔法将线性化 pAdTrack/FKBP12.6 转化 AdEasier-1 细菌, 在细菌内发生基因重组, 产生重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/FKBP12.6; 转化重组子的筛选、扩增、提取: 取涂布于含有卡那霉素的 SOB 培养板上的单一菌落 10 个, 进行质粒扩增, 用小量质粒提取试剂盒提取转化重组子 DNA; 转化重组子 pAdEasy-1/FKBP12.6 的酶切鉴定: 转化重组子经 Pac 酶切, 用 6 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察酶切结果。

1.2.3 重组腺病毒载体 Ad.FKBP12.6 的构建 用大肠杆菌 DH5 进行重组腺病毒质粒的转化、扩增, 用碱裂解法提取质粒, 再经 Pac 酶切线性化, 用胶回收试剂盒回收线性化的质粒 pAdEasy-1/FKBP12.6; 以含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基在 60 mm 培养皿中培养 293 细胞株, 待细胞 60% 汇片后进行转染; 按 DOTAP 说明书配制 pAdEasy-1/FKBP12.6 和脂质体转染混合液 150 μ L, 室温孵育 10~15 min 后加入 4~5 mL 无血清 DMEM 并混匀, 吸除培养皿中的旧培养基, 将上述混合液移至 60 mm 培养皿中, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中培养 24 h, 移走含转染液的培养基, 加入 4 mL 含 50 mL/L 胎牛血清的培养基, 常规培养 10~12 d, 直至 293 细胞完全出现病变效应, 在荧光显微镜下观察所有细胞均呈现绿色荧光。

1.2.4 重组腺病毒的扩增及纯化^[3] 将病变的 293 细胞-70 $^{\circ}$ C 冻融 3 次, 4 离心, 取上清感染 293 细胞。约 3~4 d 后, 当绝大多数细胞出现变圆、脱壁时收集病变细胞, 离心取上清再感染 293 细胞, 剩余上清及细胞保存于-70 $^{\circ}$ C。经过反复感染, 可获得足够多的病变细胞用于制备重组腺病毒。将收集的病变 293 细胞集中冻融、离心, 收集上清, 采用 CsCl 梯度离心进行病毒纯化。

1.2.5 重组腺病毒的 PCR 鉴定 取病毒上清 250 μ L, 按病毒 DNA 提取试剂盒说明书提取重组腺病毒 DNA。用 PCR 法对重组腺病毒进行鉴定, 外源基因 PCR 扩增的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 共 32 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.6 重组腺病毒滴度测定^[4] 24 孔培养板每孔接种 1×10^5 293 细胞, 培养 24 h, 取病毒转染液 0.1 mL 加 PBS 至总量 2 mL, 混匀后作 10 倍比稀释

至第 6 管, 每个稀释度设 3 孔, 加入不同稀释度病毒液 0.6 mL, 置 37 ℃、体积分数 5%CO₂ 培养 1 h, 其间每 10~15 min 摇动 1 次培养板, 1 h 后补加培养液 1.5 mL, 继续培养 36 h, 在荧光显微镜下计数绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 阳性细胞数, 按下列公式计算病毒滴度: 病毒滴度 = GFP 阳性细胞数 × 病毒稀释度 / 0.6 mL (pfu/mL)。

1.2.7 重组腺病毒对心肌细胞感染效率的检测
将小鼠心肌细胞按每孔 10⁵ 个细胞接种于 24 孔培养板, 每孔加含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 1 mL, 24 h 后换成无血清培养液培养 12 h; 按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 25、50、75、100 加入 Ad.FKBP12.6, 37 ℃、体积分数 5%CO₂ 培养 30 min, 而后加入含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 继续培养, 分别于 12、24、48 h 在荧光显微镜下计算 GFP 阳性细胞百分率。

2 结 果

2.1 重组穿梭质粒 pAdTrack/FKBP12.6 的构建与鉴定

平端化的 FKBP12.6 片段与 EcoR Ⅰ 单酶切后的 pAdTrack-CMV 连接可得到正、反 2 种质粒。正向质粒中的 2 个 Xho Ⅰ 酶切位点位于 FKBP12.6 片段的 2 端, 而反向质粒中的两个 Xho Ⅰ 位点在 FKBP12.6 片段的一端, 且相距仅十几个碱基。用

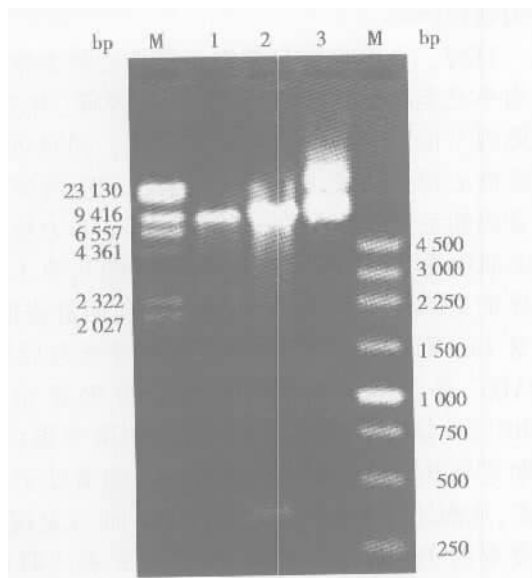


图 1 重组穿梭质粒 pAdTrack/FKBP12.6 酶切产物
Fig.1 Restriction products of pAdTrack/FKBP12.6

M: DNA marker; 1: reverse recombinant plasmid (Xho I);
2: forward recombinant plasmid (Xho I); 3: pAdTrack/FKBP12.6

Xho Ⅰ 单酶切重组质粒, 正向质粒可产生 9.2 kb 和 0.35 kb 大小 2 个片段, 反向质粒只产生 1 个 9.5 kb 大片段 (图 1)。正向质粒就是本研究所需要的重组穿梭质粒 pAdTrack/FKBP12.6。将 pAdTrack/FKBP12.6 的外源性基因测序结果与 Internet GeneBank 中公布的 FKBP12.6 序列比较, 未发现有突变或碱基置换, 说明重组穿梭质粒获得成功。

2.2 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/FKBP12.6 的构建及鉴定

pAdTrack/FKBP12.6 转化 Adeasier-1 细菌, 在细菌内 pAdTrack/FKBP12.6 与腺病毒骨架质粒发生同源重组, 产生重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/FKBP12.6。获得的重组腺病毒质粒经 Pac Ⅰ 酶切, 产生一个大于 23 kb 的大片段和 4.5 kb (或 3.0 kb) 的特征性小片段 (图 2), 说明重组腺病毒质粒构建成功。

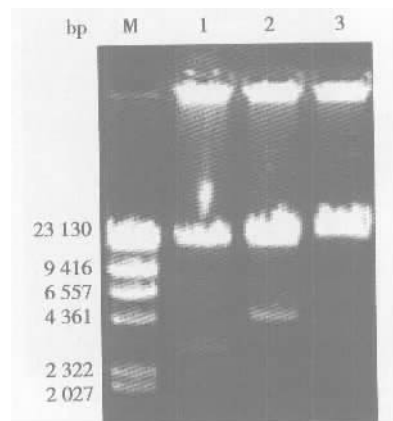


图 2 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/FKBP12.6 酶切产物
Fig.2 Restriction products of pAdEasy-1/FKBP12.6

M: DNA marker; 1: pAdEasy-1/FKBP12.6 (Pac Ⅰ);
2: pAdEasy-1/FKBP12.6 (Pac Ⅰ); 3: pAdEasy-1/FKBP12.6

2.3 重组腺病毒的构建与鉴定

经 Pac Ⅰ 酶切线性化的腺病毒质粒 pAdEasy-1/FKBP12.6 用脂质体介导转染 293 细胞后, 产生的重组腺病毒 Ad.FKBP12.6 对 293 细胞有致病作用。转染前 293 细胞呈梭形或多角形, 胞体较小 (图 3 A)。转染后 7~10 d, 293 细胞开始出现病变效应, 大部分细胞肿胀、增大、变圆、部分细胞空泡化 (图 3 B), 在荧光显微镜下观察有绿色荧光 (图 3 C), 10~12 d 细胞完全出现病变, 大量细胞脱壁浮起, 未脱壁细胞变圆呈葡萄珠状, 绿色荧光增强。

收集病变细胞分离病毒, 提取病毒 DNA。以收获的腺病毒 DNA 为模板, 用 FKBP12.6 引物进

行 PCR 反应。结果如图 4 所示, 重组腺病毒和重组穿梭质粒一样可扩增出 0.35 kb 片段, 证实重组

腺病毒获得成功。

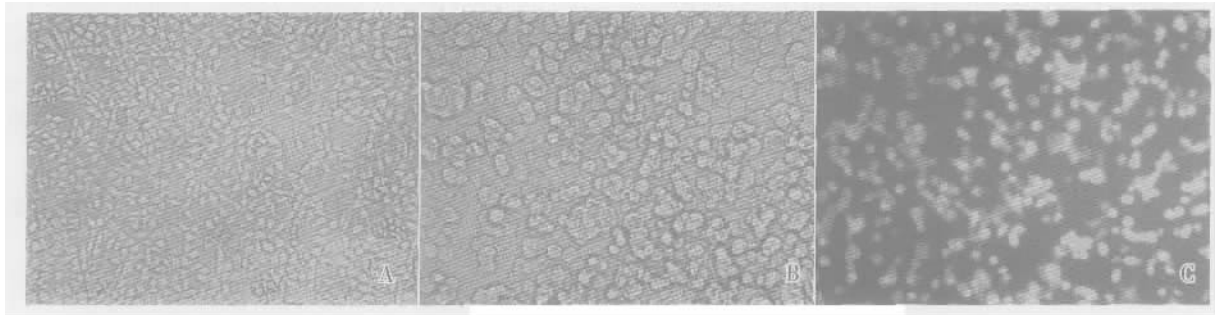


图 3 重组腺病毒的包装

Fig.3 Package of recombinant adenovirus

A: normal 293 cell (LM, $\times 100$); B: cytopathic effect 10 days after transfection (LM, $\times 200$); C: fluorescent protein expression 10 days after transfection (FM, $\times 100$)

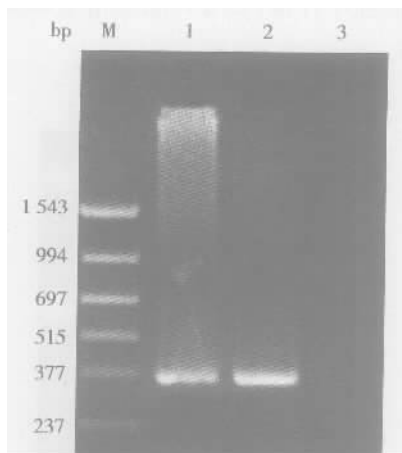


图 4 重组腺病毒 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant adenovirus by PCR

M:DNA marker; 1: Ad.FKBP12.6; 2:pAdTrack/FKBP12.6; 3: Ad.GFP

2.4 重组腺病毒的滴度

纯化提取的病毒经 10 倍比稀释后转染 293 细胞, 36~48 h 后, 在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数, 用公式计算病毒滴度为 1.5×10^{12} pfu/mL。

2.5 重组腺病毒对心肌细胞感染效率

如表 1 所示, 当 MOI 为 75 时, 24 h 的感染效

表 1 重组腺病毒感染心肌细胞效率

Table 1 Efficiency of recombinant adenoviruses infecting myocardial cells (%)

| | Multiplicity of infection | | | |
|------|---------------------------|-----|-----|-----|
| | 25 | 50 | 75 | 100 |
| 12 h | 45 | 76 | 90 | 100 |
| 24 h | 64 | 85 | 100 | 100 |
| 48 h | 82 | 100 | 100 | 100 |

率可达 100%, 因此重组腺病毒 Ad.FKBP12.6 对心肌细胞的最佳感染复数为 75。

3 讨论

室性心律失常的防治是改善心力衰竭患者预后的重要措施。现有的抗心律失常药物多数具有负性肌力及致心律失常等副作用, 而现有的强心剂也有致心律失常的风险, 使增强心肌收缩力和抗心律失常治疗常常处于相互矛盾之中。解决上述矛盾将为心力衰竭及室性心律失常的治疗开辟新的途径。

目前, 心力衰竭患者发生室性心律失常的机制尚不完全明确。近年来的研究^[5,6]发现, RyR2 功能障碍不仅引起心肌收缩功能降低, 同时可能导致室性心律失常发生。因此, RyR2 功能障碍是心力衰竭和室性心律失常的共同机制。心力衰竭时心室肌电重构是产生室性心律失常的基础, Ca^{2+} 循环异常是室性心律失常的启动因素, 而舒张期 SR 异常 Ca^{2+} 释放 (Ca^{2+} 渗漏) 导致的延迟后除极 (DAD) 是室性心律失常启动的重要机制。FKBP12.6 是维持 RyR2 功能稳定的调节蛋白, 舒张期它与 RyR2 结合使 SR Ca^{2+} 释放通道处于关闭状态, 从而防止 Ca^{2+} 渗漏。Jiang 等^[1,7]研究发现, 心力衰竭时 RyR2 复合体中 FKBP12.6 表达明显减少, 与 RyR2 的结合力显著降低, 导致 RyR2 异常开放, 引起 SR 舒张期 Ca^{2+} 异常释放, 进而导致心肌收缩功能障碍, 并诱发室性心律失常及猝死。上述研究提示, FKBP12.6 是解决心力衰竭和室性心

律失常治疗矛盾的理想切入点。以 FKBP12.6 为目标的干预实验可能为探索皆心力衰竭和室性心律失常的理想治疗提供新的思路。

腺病毒载体能将外源基因高效导入哺乳动物细胞,其转染不依赖细胞分裂,既可转染分裂期细胞又可转染非分裂期细胞,携带的外源基因不与宿主基因整合。上述优点使其成为一种高效而安全的基因转移工具被广泛应用于基因治疗的研究。腺病毒载体构建方法主要有细胞内同源重组法和细菌内同源重组法 2 种。本研究采用目前最先进的改良 AdEasy 系统^[4](即 AdEasier-1 细菌与 pAdTrackCMV),将人 FKBP12.6 基因克隆到穿梭质粒中,再将穿梭质粒 pAdTrack/ FKBP12.6 转化 AdEasier-1 细菌,在 AdEasier-1 细菌中完成重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/ FKBP12.6 的构建,在 293 细胞中进行重组腺病毒包装,通过 PCR 鉴定,成功构建了携带目的基因 FKBP12.6 的重组腺病毒。本研究用重组腺病毒 Ad.FKBP12.6 转染体外培养的心肌细胞,MOI 为 25 时,48 h 的感染效率可达 82%;MOI 为 75 时,24 h 的感染效率高达 100%。结果表明重组腺病毒 Ad.FKBP12.6 可高效转染体外培养的心肌细胞。本研究为进一步探讨 FKBP12.6 在心力衰竭时心室肌电重构中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] JIANG M T, LOKUTA A J, FARRELL E F, et al.

Abnormal Ca^{2+} release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure [J]. *Circulation Research*, 2002, 91(11): 1015- 1022.

[2] YANO M, KOBAYASHI S, KOHNO M, et al. FKBP12.6 - mediated stabilization of calcium - release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure[J]. *Circulation*, 2003, 107 (3):477- 484.

[3] 斯佩克特 D L, 戈德曼 R D, 莱因万德 L A, 等. 细胞实验指南[M]. 黄培堂等译.第 3 版,北京:科学出版社,2001: 256 - 267.

[4] ZENG M, SMITH S K, SIEGEL F, et al. AdEasy system made easier by lecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination[J]. *Biotechniques*, 2001,31(2): 260- 262.

[5] ARMOUNDAS A A, WU R, JUANG G, et al. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2001,92(2- 3): 213- 230.

[6] WEHRENS X H, LEHNART S E, MARKS A R. Intracellular calcium release and cardiac disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2005,67(1):69- 98.

[7] WEHRENS X H, LEHNART S E, HUANG F, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise- induced sudden cardiac death[J]. *Cell*, 2003, 113(7):829- 840.

(编辑 黄小延)

达安基因股份有限公司荣获第九届中国专利金奖

3月22日在贵阳召开的全国知识产权局局长会议传来捷报:我校达安基因股份有限公司的“一种荧光定量聚合酶链式反应方法及其试剂盒”项目荣获了国家知识产权局和世界知识产权组织联合颁发的第九届中国专利金奖,专利号是:ZL99100669.0,其主要发明人是程钢博士。

这项技术立足于国际诊断技术的前沿,曾在2004年荣获国家科技进步二等奖。仅这项技术,近3年的累计销售额就高达4.06亿元,占领了国内市场70%的份额,产品质量已达国外进口产品的水平,其性价比极其优越,致使国外该项技术产品无法进入中国市场,一改国内诊断产品长期以来依靠进口国外产品的局面,也使我国人民在第一时间充分享受到了自主创新生物科技带来的成果。值得欣喜的是,此项技术在2003年SARS诊断中,发挥过重要的作用。利用这项领先的基因诊断技术平台,我校达安基因的近百种试剂产品已进入研发阶段,它将在人民的医疗保健事业中继续发挥重要作用。

(中山大学医学科学处)