

小鼠 T-bet 基因重组腺病毒载体的构建

檀卫平¹, 黄嘉凌², 刘然义², 梁志慧², 黄必军², 麦贤弟¹, 黄绍良¹, 黄文林²
(中山大学 1. 附属第二医院儿科, 广东 广州 510120; 2. 肿瘤研究所, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】构建小鼠 T-bet 基因重组腺病毒载体,为 T-bet 基因在支气管哮喘治疗中的作用研究提供有效的 T-bet 生物表达系统。【方法】采用内切酶从质粒 T-bet/GFP-RV 中切获约 1.7 kb 的小鼠 T-bet cDNA 片段,与穿梭质粒 pShuttle 连接,再通过稀有酶切位点将含 T-bet cDNA 的表达盒与 Adeno-X 腺病毒载体骨架连接,构建重组载体 pAdeno-T-bet,测序鉴定无错配及插入移位等 DNA 顺序改变,并转染 HEK293 细胞,出现 CPE 后取含病毒上清的细胞培养液抽提病毒 DNA 行 PCR 鉴定。【结果】PCR 及酶切证实:T-bet cDNA 正确克隆到穿梭质粒 pShuttle 中,带 T-bet cDNA 的表达盒成功重组到腺病毒载体基因组 E1A 缺失区,并在 HEK293 细胞中成功包装出具有感染活性的重组腺病毒 pAdeno-T-bet。【结论】本实验成功构建了小鼠 T-bet 基因重组腺病毒载体,并在 HEK293 细胞中成功包装出重组腺病毒。

关键词:小鼠 T-bet 基因;重组腺病毒载体

中图分类号:R511.8

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)06-0546-03

Construction of Murine T-bet cDNA Recombinant Adenovirus Vector and Its Identification

TAN Wei-ping¹, HUANG Jia-ling², LIU Ran-yi², LIANG Zhi-hui², HUANG Bi-jun², MAI Xian-di¹,
HUANG Shao-liang¹, HUANG Wen-lin²

(1. Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Cancer Institute, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To construct a murine T-box expressed in T cells(T-bet) cDNA recombinant adenovirus vector for facilitating the study of gene therapy for bronchial asthma. 【Methods】An approximate 1.7 kb murine T-bet cDNA segment was excised from plasmid T-bet/GFP-RV. T-bet cDNA was ligated with pShuttle in unique enzyme site which was connected with adenovirus backbone sequence Adeno-X, named as pAdeno-T-bet. Identifying the desired recombinant adenovirus, it was packaged in HEK293 cells. Supernatant of adenovirus from HEK293 cells which was appeared a visible cytopathic effect (CPE) was collected for extracting DNA and PCR amplification was performed with specific primers. 【Result】The recombinant plasmids were identified by PCR amplification and restriction enzyme map. The recombinant adenovirus carrying T-bet gene was identified by PCR amplification. 【Conclusion】The murine T-bet cDNA recombinant adenovirus vector was successfully constructed in this experiment, by which murine T-bet cDNA recombinant adenovirus was then packaged in HEK293 cells.

Key words: murine T-bet gene; recombinant adenovirus vector

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25 (6): 546-548, 553]

收稿日期:2004-07-25

基金项目:广东省科委自然科学基金资助(031668A)

作者简介:檀卫平(1966-),女,安徽东至人,博士生,讲师;黄绍良,教授,导师;黄文林,博士,教授,副导师,通讯作者。E-mail: weptan@yahoo.com.cn

T-bet(T-box expressed in T cells) 是 2000 年哈佛大学 Szabo 等^[1]首先从 T 淋巴细胞中发现的一个重要的 Th1 特异性转录因子。T-bet 通过上调 IFN- γ 基因转录,正调控 Th1 的发育,抑制 Th2 的发育,最终决定 Th1/Th2 分化方向。最近研究发现 T-bet 基因的表达低下与支气管哮喘发病密切相关,同时参与肿瘤等免疫性疾病的发病^[2]。增加 T-bet 表达有望纠正疾病状态的 Th2 异常漂移和 Th1 不足。为探讨 T-bet 基因在哮喘治疗中的作用,利用腺病毒载体感染效率高、宿主范围广及安全性较好等特点,我们在国外已成功构建小鼠 T-bet 基因真核表达载体和逆转录病毒载体的基础上^[1],首次构建了含小鼠 T-bet 基因的重组腺病毒载体,为 T-bet 基因的研究提供有效的生物表达体系。

1 材料和方法

1.1 材料

Adeno-X 腺病毒载体表达系统为美国 Clontech 公司产品,含小鼠 T-bet 基因 cDNA 的质粒 T-bet/GFP-RV 由美国哈佛大学 Glimcher 教授惠赠,测序结果证实与 Gene Bank 中提供的小鼠 T-bet 基因 cDNA 完全一致。DNA 切胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒购自德国 Qiagen 公司, *Taq* 酶、dNTP 购自上海博采生物工程有限公司,限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司,细胞培养基 DMEM、胎牛血清及脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 均为美国 Gibco 公司产品。DL2000marker 及 1 kb DNA ladder marker 购自中日合资 Takara 公司。DH5 α 大肠杆菌菌种、HEK293 细胞为本研究组保存。抗生素及其他化学试剂均为进口分装或国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 构建小鼠 T-bet 基因穿梭质粒 pShuttle-Tbet ①选用内切酶 *Xho* I 和 *Sal* I 从重组质粒 T-bet/GFP-RV 中切下约 1.7 kb 的 T-bet cDNA 片段,以 *Xho* I 不完全酶切处理穿梭质粒 pShuttle,电泳回收 4.1 kb 的 pShuttle 线性片段,分别切胶回收后,以 T_4 DNA 连接酶,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。② T-bet cDNA 分别非定向克隆入位于 CMV 启动子下游多克隆酶切位点区 *Xho* I (947) 以及卡那霉素抗性区 *Xho* I (650) 位点。连接产物转化至 DH5 α 感受态菌中,用卡那霉素筛选,并进行 PCR 及酶切鉴定,选择正向重组入多克隆酶切位点区 *Xho* I 的阳性重组质粒为 pShuttle-Tbet (图 1)。

1.2.2 小鼠 T-bet 基因重组腺病毒载体 pAdeno-Tbet 的构建 ① *PI-Sce* I 和 *I-Ceu* I 酶切重组 pShuttle-Tbet,回收带有 CMV 启动子、T-bet 基因及 BGH PolyA 的约 3.0 kb 的表达盒 30 μ L 酶切总体系中 *PI-Sce* I 和 *I-Ceu* I 分别为 2 U 和 0.5 U,重组 pShuttle-Tbet 质粒 DNA (5×10^8 ng/L) 2 μ L,10 \times 双消化缓冲液 3 μ L,10 \times BSA 3 μ L。37 $^{\circ}$ C 温育 3 h。消化后样品中,加入 70 μ L TE Buffer (pH 8.0) 和 100 μ L 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,乙醇沉降后,加 10 μ L TE 溶解。②将表达盒亚克隆入腺病毒基因组 E1 缺失区 10 μ L 体系中 *PI-Sce* I 和 *I-Ceu* I 酶切后重组 pShuttle-Tbet 质粒 DNA 2 μ L,含同样酶切位点的 Adeno-X 病毒 DNA (2×10^8 ng/L) 3 μ L,以 T_4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 孵育过夜。③ *Swa* I 酶切非重组的腺病毒 DNA,连接反应完成后,产物用 *Swa* I 对非重组的(如自身连接) Adeno-X DNA 进行酶切线性化,减少了非重组 DNA 克隆的可能。④转化 DH5 α 并用 PCR 及酶切鉴定 PCR 初步鉴定阳性克隆,抽提质粒,以 *Xho* I 及 *Hind* III 酶切,7 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析酶切图谱(图 2),证实 T-bet 基因正确重组入腺病毒载体,将阳性克隆(命名为 pAdeno-Tbet)在 DH5 α 中大量扩增,用试剂盒抽提 pAdeno-TbetDNA。

1.2.3 重组腺病毒 pAdeno-Tbet 的获得 ①以 1×10^5 /孔密度接种 HEK293 细胞于 6 孔板中,在含体积分数 10% 胎牛血清(FCS) 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO $_2$ 条件下培养细胞至 80% 融合状态备用。② pAdeno-TbetDNA 用 *Pac* I 酶切使其线性化,4 U *Pac* I 酶切后的腺病毒载体 DNA(2 μ g),按操作说明书用 Lipofectamine2000 转染 HEK293 细胞。细胞病理表现(cytopathic effect CPE)约在转染 7 d 左右后观察到。当大部分细胞脱落后,将细胞悬液转至消毒的 15 mL 锥形离心管内。仍然贴壁的细胞,轻轻搅动使其分离。室温下离心,将透明上清,转至一清洁、消毒的锥形管内,此为低滴度的病毒原种。

1.2.4 高滴度重组腺病毒的制备 将上一步骤沉降的细胞加 PBS 反复冻融后,离心取上清的 1/2 重新感染 HEK293 细胞。如此反复进行 5~8 次后可得到高滴度腺病毒。

1.2.5 重组腺病毒的鉴定 用以上收集出现 CPE 的病毒上清,感染在 6 孔培养板中培养的 HEK 293 细胞(设复孔)。将其中 1 个复孔中的细胞,进行目的基因的 PCR 鉴定。收集 PCR 鉴定为阳性的

病毒上清,扩大感染 HEK 293 细胞。

1.2.6 重组腺病毒滴度的测定 用 HEK293 细胞(每孔 10^4 个)种 96 孔板,约 24 h,细胞贴壁并形成均匀单层。准备 10^{-5} - 10^{-13} 9 个稀释度的待测病毒,每孔加 50 μ L 病毒,每列一个稀释度,共 9 列病毒。余下 3 列加入培养液,作为空白对照。然后在 37 $^{\circ}$ C,体积分数 5% CO_2 培养 14 d。每天显微镜下观察细胞病变情况。记录病变情况,并按 Karber's 公式计算病毒的滴度。

2 结果

2.1 重组腺病毒载体的构建和鉴定

2.1.1 重组质粒 pShuttle-T-bet 酶切鉴定 经 *Xho* I、*Not* I 双酶切,得到约 1.7 kb(与插入的目的片段大小相一致)和 2.7 kb、1.4 kb(pShuttle 酶切两部分)的 3 个片段(图 1)。

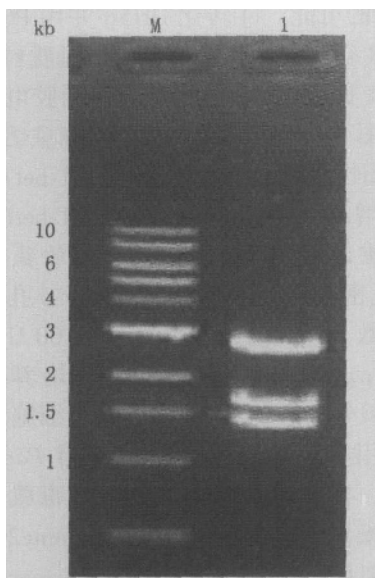


图 1 pShuttle-T-bet *Xho* I、*Not* I 酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pShuttle-T-bet *Xho* I and *Not* I

M: 1kb DNA Ladder; 1: pShuttle-T-bet/*Xho* I + *Not* I

2.1.2 pAdeno-T-betDNA 酶切鉴定 用 *Xho* I 及 *Hind* III 分别酶切,结果与预计酶切图谱相同(图 2)。

2.2 重组腺病毒 pAdeno-T-bet 的获得与鉴定

用线性 pAdeno-T-bet 转染 HEK 293 细胞,培养 1 周后出现 CPE。将出现 CPE 的病毒上清再次感染 HEK293 细胞,收集细胞裂解上清,抽提病毒 DNA,分别以 T-bet 基因与 Adeno-X 病毒基因组 DNA 交叉引物两对(PF1 5'-gcgtaaccgag taagattg-3' PR1 5'

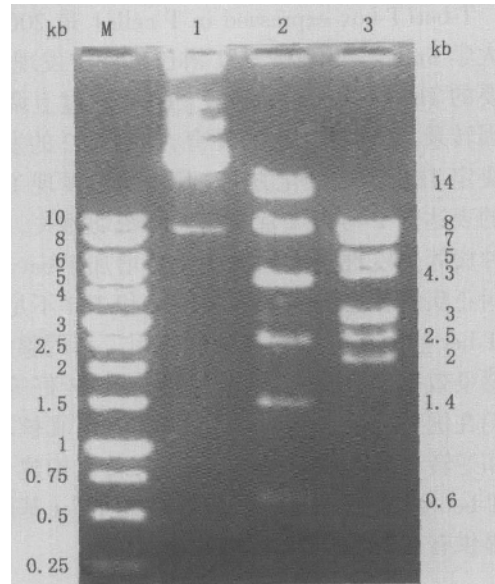


图 2 pAdeno-T-bet DNA(35 452 bp) *Xho* I 及 *Hind* III 酶切鉴定图谱

Fig. 2 Restriction enzyme map of pAdeno-T-bet DNA (35 452bp) *Xho* I and *Hind* III

M: 1kb DNA Extended Ladder; 1: pAdeno-T-bet plasmid DNA; 2: pAdeno-T-bet/*Xho* I; 3: pAdeno-T-bet/*Hind* III

-tctgggtcacattg ttggaa-3'), (PF2: 5'-caacaaccctt gccaaag-3' PR2: 5'-ggtctcg taggtcaagtag-3') 以及 T-bet 基因上引物 1 对 (PF3: 5'-aatctagaggatgggcatc gtggagcc-3' PR3: 5'-tcccccagcagttgac agt-3'), 分别经 PCR 扩增,出现预计的(1.8 kb、1.3 kb、1.0 kb)特异性带,确定为阳性克隆。将重组腺病毒 Adeno-T-bet 在 HEK293 细胞中大量扩增后,收集含病毒的细胞裂解上清,反复冻融后分装,贮存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

2.3 重组腺病毒的滴度

经以上细胞病变法测定,所制备的病毒滴度最高可达 10^{11} pfu/L。

3 讨论

我们以往研究表明哮喘患儿体内 Th1/Th2 平衡失调,表现为 Th1 不足和 Th2 异常极化^[3]。最近研究证实转录因子 T-bet 基因的表达低下是导致其 Th1/Th2 失衡的关键。不仅哮喘患者气道内 T-bet 基因的表达显著减少, Th2 特异性转录因子 GATA-3 的表达增加^[4];完全敲除和部分缺陷 T-bet 基因小鼠可自发表现出类似与过敏原激发所引起

(下转第 553 页 to page 553)

- sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2001, 12(3): 270-8.
- [4] Quinones C R, Hurzeler M B, Schubach P, *et al.* Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and osseointegrated dental implants in monkeys. Part II. Evaluation of porous hydroxylapatite as a grafting material[J]. *Clin Oral Implants Res*, 1997, 8(6): 487-96.
- [5] Hurzeler M B, Quinones C R, Kirsch A, *et al.* augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part III. Evaluation of autogenous bone combined with porous hydroxylapatite[J]. *Clin Oral Implants Res*, 1997, 8(5): 401-11.
- [6] 陈松龄,连克乾,冉炜,等. Endopore 种植体即刻种植的临床研究[J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(6): 462-4.
- [7] 陈松龄,冉炜,连克乾,等. 上颌前部牙槽骨内圆柱洞形扩宽同期牙种植[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(6): 359-61.
- [8] Sisson S. 家禽解剖学[M]. 张鹤宇,林大诚,孔繁瑶,等译. 北京: 科技出版社, 1962. 452-523.
- [9] Dominici J T. Treatment of a microvascular reconstructed mandible using a implant-supported overdenture: case report[J]. *J Oral Implant*, 1995, 21(4): 309-18.
- [10] Zlotolow I M, Huryn J M, Pire J D, *et al.* Osseointegrated implants and functional prosthetic rehabilitation in microvascular fibula free flap reconstructed mandibles[J]. *Am J Surg*, 1992, 164(6): 677-86.
- [11] 张志勇,黄伟,孙坚. 血管化与非血管化移植骨同期种植的比较研究[J]. *中国口腔种植学杂志*, 1997, 2(3): 123-5.

(编辑 刘清海)

(上接第 548 页 from page 548)

的哮喘特征性的病理炎症改变(如气道 EOS 和淋巴细胞浸润,典型的气道重塑)^{5]}。因此, T-bet 基因的表达低下与哮喘发病具有直接的相关性。Schwartz^[6]在《新英格兰医学杂志》上回顾以上工作的基础上,肯定了 T-bet 基因的发现是哮喘发病机制研究中的一新进展,并进一步提出 T-bet 可作为哮喘治疗的新基因靶点之一。

本实验是在明确 T-bet 基因表达低下与支气管哮喘发病密切相关的基础上,将 T-bet cDNA 克隆到腺病毒 5 型 E1 区缺失复制缺陷型腺病毒中,进一步研究 T-bet 基因在哮喘模型中的作用机制。腺病毒是目前用于基因转移最广泛的载体之一,重组腺病毒除感染谱广、安全性高、容量大、体外可操作性好等优点外,腺病毒载体能利用真核细胞系统表达加工的蛋白质进行翻译后处理,与天然蛋白质的磷酸化、折叠、复折叠、二酯键一致,具有很高的生物活性。且腺病毒感染宿主细胞后,不依赖于宿主细胞增殖而表达外源基因,绕开了气道上皮细胞复制慢的问题,为呼吸道疾病的靶向基因治疗中一种高效载体。本文所用的腺病毒载体勿须同源重组,只在体外连接,并在穿梭质粒和腺病毒载体上设计稀有的酶切位点,避免反向连接及自身环化,便可保证重组腺病毒载体正确构建^[7]。本实验成功构建了小鼠 T-bet 基因重组腺病毒载体,并在 HEK293 细胞中成功包装出重组腺病毒,为支气管哮喘等呼

吸性疾病的防治研究提供了一种理想的生物载体表达体系,为以后的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Szabo S J, Kim S T, Costa G L *et al.* A novel transcription factor, T-bet, direct Th1 lineage commitment[J]. *Cell*, 2000, 100(6): 655-69.
- [2] 魏海明,田志刚,许晓群,等. 肺癌患者转录因子 T-bet 和 GATA3 的基因表达状况及药物干预研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(1): 34-6.
- [3] 麦贤弟,赵莉,檀卫平,等. 哮喘患儿 IL-12、IL-13 与总 IgE 水平变化 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(5): 400-2.
- [4] Larche M, Robinson D S, Kay A B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(3): 450-63.
- [5] Finotto S, Neurath M F, Glickman J N, *et al.* Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet[J]. *Science*, 2002, 295(5553): 336-8.
- [6] Schwartz R S. A new element in the mechanism of asthma [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(11): 857-8.
- [7] 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(17): 2577-83.

(编辑 张恩健)