

腺病毒载体介导的大鼠 DNA 多聚酶 β 重组体的构建 及其在 PC12 细胞中的表达

钟建辉^{1,2}, 银 巍¹, 藏林泉¹, 江伟健¹, 邱鹏新¹, 颜光美¹

(中山大学 1. 基础医学院药理教研室; 2. 附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】为探讨 DNA 多聚酶 β 在神经细胞损伤中的作用与机制, 构建其重组腺病毒载体, 并在 PC12 细胞中表达。【方法】RT-PCR 获取大鼠 DNA 多聚酶 β (POL β) 的编码序列, TA 克隆测序, 酶切 POL β 基因并连入穿梭质粒 pAdTrack-CMV, 电转至含腺病毒 pAdeasy 骨架质粒的大肠杆菌 BJ5183。重组腺病毒质粒 (pAd-pol β) 和 Lipofectamine2000 转染 293 细胞, 用重组腺病毒感染 PC12 细胞。【结果】10 个 TA 克隆中有 3 个克隆的序列与 GENE BANK 中大鼠 POL β cDNA 序列完全一致, 同源重组检测时 30 个克隆中有 8 个含目标条带。DNA 序列正确的 POL β 重组腺病毒质粒转染 293 细胞后, 感染 Ad-pol β 的 293 及 PC12 细胞荧光显微镜下可见绿色荧光, 重组腺病毒 Ad-pol β PCR 鉴定含目标条带, Ad-pol β 感染 PC12 细胞 Western Blot 检测到 POL β 蛋白表达。【结论】成功构建了大鼠 DNA 多聚酶 β 的腺病毒重组体并在 PC12 细胞中表达

关键词: DNA 多聚酶 β ; 腺病毒载体; PC12 细胞

中图分类号: Q81

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)06-0622-04

Construction of Recombinant Adenovirus Containing Rat DNA Polymerase β and Its Expression in PC12 Cells

ZHONG Jian-hui^{1,2}, YIN Wei¹, ZANG Lin-quan¹, JIANG Wei-jian¹, QIU Peng-xin¹, YAN Guang-mei¹

(1. Department of Pharmacology, Preclinical Medical School, 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 The expression of rat DNA polymerase β was up-regulated after transient middle cerebral artery occlusion, using the technique of fluorescence differential display reverse transcription polymerase chain reaction (FDD RT-PCR). To determine the role of DNA polymerase β (pol β) in brain injury. An adenoviral vector was constructed containing the coding sequence for rat DNA polymerase β . 【Methods】 The rat pol β coding sequence was cloned to pGEM-T Easy™ vector by RT-PCR, and confirmed by DNA sequencing and subcloned into shuttle plasmid pAdTrack-CMV, then linearized and transferred to *E. coli* (BJ5183) contained adenoviral backbone vector pAdEasy-1. The recombinant plasmid was packaged and amplified in HEK 293 cells. PC12 cells were infected with the recombinant adenoviruses. 【Results】 Screening 10 pGEM-T Easy™ clones, 3 clones have no base changes. Eight out of 30 homologous recombination plasmids have the target band. The Adpol β recombinant plasmid was verified by DNA sequence analysis. After infected with Adpol β adenovirus, strong green fluorescence were observed in HEK 293 and PC12 cells under fluorescence microscopy. Adpol β DNA in 293 cells was identified by PCR. The expression of rat DNA polymerase β in Adpol β infected PC12 cells are confirmed by immunoblot analysis. 【Conclusion】 Recombinant adenoviral vectors containing rat DNA polymerase β were constructed and efficiently expressed in PC12 cells.

Key words: DNA polymerase β ; adenovirus vector; PC12 cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(6):622-625]

收稿日期: 2005-06-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472010); 广东省自然科学基金研究团队项目(039191)

作者简介: 钟建辉 (1963-), 男, 湖南双峰人, 博士生; 颜光美 男, 教授, 导师. E-mail: ygm@zsu.edu.cn

碱基切除修复中受损碱基切除为碱基切除修复的限速步骤^[1],DNA多聚酶 β 在碱基切除和DNA链缺口填补等过程中发挥作用^[2]。DNA多聚酶 β (DNA polymerase beta, POL β)为一单链多肽,相对分子质量 $M_r=39\times 10^3$,是最小的真核细胞DNA多聚酶^[3]。Lang等^[4]检测90例肿瘤的DNA多聚酶 β (POL β)基因,有近35%存在突变。POL β 基因敲除小鼠胚胎的外周和中枢神经系统发育缺陷,以细胞凋亡为特征,出生即死亡^[5]。DNA多聚酶 β 稳定过表达可使细胞基因突变增加^[6-8]。我们在用荧光差异显示RT-PCR法克隆和鉴定大鼠脑缺血相关基因时,检测到大鼠脑缺血后POL β 显著增加。为进一步研究POL β 在大鼠脑缺血等过程中的作用,我们以RT-PCR法克隆大鼠POL β 的cDNA序列,将其构建至腺病毒载体中,用人胚胎肾293细胞(HEK293)包装和扩增病毒。PC12细胞系来自大鼠嗜铬细胞瘤(pheochromocytoma),为一种研究神经细胞营养,分化,单胺生物合成及蛋白质运输等功能的细胞模型^[9],也是一种重要的探索细胞抗缺氧分子机制等的体外模型^[10]。我们用DNA多聚酶 β 重组腺病毒感染PC12细胞,使其在PC12细胞中过表达。

1 材料与方 法

1.1 材 料

逆转录酶为Gibco公司产品,TA克隆试剂盒购自美国Promega公司,引物合成及DNA测序在上海博雅公司,腺病毒穿梭载体pAdTrack-CMV、腺病毒骨架载体pAdeasy转化的BJ5183菌株即AdEasier Cells由美国休斯霍华德医学院及约翰霍普金斯肿瘤中心Tong-Chuan He教授惠赠;CsCl(美国Sigma);脂质体转染试剂Lipofectamine2000(美国Invitrogen);人胚肾293细胞,PC12细胞购自上海市中科院细胞库。

1.2 栓塞模型制作及脑组织RNA提取

大鼠大脑中动脉栓塞模型制作参照文献^[11]。大鼠大脑中动脉栓塞模型成功2h后,取缺血区脑组织用液氮冷冻,冷冻组织用研钵研磨使成粉末,边研磨边加液氮。粉末及时转移到Trizol试剂中,激烈震荡使粉末完全溶于试剂。于1mL Trizol液中加入三氯甲烷0.2mL,混匀,12000 $\times g$ 4℃离心15min,沉淀用无RNase的水溶解后纯化。

1.3 获取大鼠pol β 编码区和pol β 定向亚克隆入

穿梭质粒pAdTrack-CMV

根据大鼠pol β 的cDNA序列(NM_017141 CDS 8..1015)设计一对特异性寡核苷酸引物:正向引物P1:TATTGGTACCATGAGCAAACGCAAGG,反向引物P2:TTAAGTCGACTCACTCCTGTCCTTGGGCTC,分别有Kpn I和Sal I酶切位点。以P₁、P₂为引物,以缺血侧mRNA为模板,采用一步法RT-PCR法获取目的基因大鼠pol β 的编码区。PCR扩增反应体系:DEPC水22 μ L,2 \times RT-PCR反应缓冲液25 μ L,mRNA模板1 μ L(约1 μ g),正义链引物(10 μ mol/L)P₁1 μ L,反义链引物P₂(10 μ mol/L)1 μ L,Rt/Taq酶1 μ L共2管100 μ L。RT-PCR参数是先50℃预变性30min,94℃2min;94℃45s,52℃40s,72℃1min,4个循环;94℃变性45s,58℃复性45s,72℃延伸1min,25个循环。产物用10g/L琼脂糖电泳,琼脂糖凝胶试剂盒回收pol β 后作TA克隆。TA克隆按pGEM-T EasyTM(美国Promega)说明书进行,简述如下:凝胶回收PCR产物和pGEM-T EasyTM,经T₄DNA连接酶室温1h后,4℃连接过夜,转化到感受态细菌DH5 α ,涂板培养后,挑取白色克隆(α 互补筛选)培养;用分子克隆所述碱裂解法抽提质粒后,再用EcoRI酶切鉴定。阳性克隆使用Sp6通用引物测序。Kpn I和Sal I双酶切腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV和大鼠pol β TA克隆质粒,分别用琼脂糖凝胶试剂盒回收载体与目的片段,用T₄DNA连接酶于16℃过夜连接。CaCl₂法转化到大肠杆菌DH5 α 。转化菌落用引物P1:TATTGGTACCAGAGCAAACGCAAGGC,Pn:TTAAGTCGACTCAGCCCAATTCGCTGATGGT做PCR鉴定。阳性克隆质粒pAdTrack-CMV-pol(用PmeI酶切线性化,10g/L琼脂糖电泳凝胶回收。

1.4 大鼠DNA多聚酶 β (pol β)腺病毒pAdeasy重组体的构建

用线性化pAdTrack-CMV-pol β 质粒转化含腺病毒pAdeasy骨架质粒的大肠杆菌BJ5183感受态细菌(电转法)。含重组质粒的BJ5183细菌可在含Kan^r的LB平板上生长形成克隆,挑选10~15个最小的菌落,碱裂解法小量抽提转化克隆菌的质粒DNA,经8g/L琼脂糖电泳,根据与pAdEasy-1比较分子大小进行初筛,选择分子较大的候选阳性重组体腺病毒质粒DNA用PacI酶切鉴定后,抽提重组腺病毒质粒转化感受态细菌DH5 α ,用引物P1,P2测定重组腺病毒质粒(pAd-pol β)的序列。

1.5 重组腺病毒包装、扩增及滴度测定

取 4 μg PacI 线性化的重组腺病毒 (pAd-pol β) 质粒, 用 Lipofectamine2000 转染 60% 融合的人胚胎肾 293 细胞 (HEK 293), 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO_2 条件下温育 5 h, 弃去原培养液, 加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。培养 2 d 后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达, 继续培养 10 d, 将 293 细胞自培养瓶内刮下, 离心 1 000 $\times g$, 5 min, 弃上清, PBS 悬浮细胞, 反复冻融裂解细胞 4 次后, 离心 2 200 $\times g$, 5 min 取上清, 重新感染 HEK293 细胞。将病毒储存液按 10 倍比例稀释, 取 400 μL 加至培养在 24 孔板的 HEK293 细胞中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h, 然后换新的培养基继续培养 18~24 h, 于荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数, 计算病毒滴度。

1.6 重组腺病毒 pAd-pol β PCR 鉴定及其在 PC12 细胞中的过表达

取 5 μL 含病毒的上清, 加入 10 μL 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 煮沸 5 min, 1 000 $\times g$ 离心 1 min, 取 2 μL 上清以引物 P1, Pn 进行 PCR 鉴定。培养 PC12 细胞的培养皿预先用多聚赖氨酸包被, 培养基为含体积分数 5% 胎牛血清和体积分数 10% 马血清的 RPMI1640。PC12 细胞传代培养第 2 天, 用重组腺病毒 pAd-pol β 感染 (MOI=20), 感染 48 h 后, 于荧光显微镜下观察。pAd-pol β 感染 PC12 细胞 48 h 后弃去培养基, 用冷 PBS 洗 1 遍, 加 120 μL 细胞裂解液, 静置 5 min, 收集细胞裂解物转移至 1.5 mL EP 管中, 沸水浴 5 min, 10 000 $\times g$ 离心 30 s 后用 12 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶电泳。100 V 恒压转印 60 min 至硝酸纤维素膜, 硝酸纤维素膜用 1 \times TBS 洗 5 min, 用封闭液室温封闭 1~2 h 后, 以含 pol β 多克隆抗体的新封闭液 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16~18 h, 1 \times TBST 洗 5 min, 3 次, 二抗 (含 HRP 标记的鼠抗羊 IgG 和 HRP 标记的抗生物素抗体) 室温孵育 1~2 h, 1 \times TBST 洗 5 min, 3 次, 用 10 mL 1 \times LumiGLO 室温孵育 1~2 min, 于暗室用 X 线胶片感光。

2 结 果

2.1 重组腺病毒质粒 (pAd-pol β) 的克隆序列

与 NCBI GENE BANK 中列出的大鼠 pol β 的 cDNA 序列 (NM_017141 CDS 8..1015) 一致。

2.2 重组腺病毒质粒 (pAd-pol β) 转染、重组腺病毒扩增及表达

荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白 (GFP) 表达, (图 1A, B); 感染重组腺病毒 pAd-pol β 的 PC12 细胞在 488 nm 激发光下观察到绿色荧光。(图 1C)

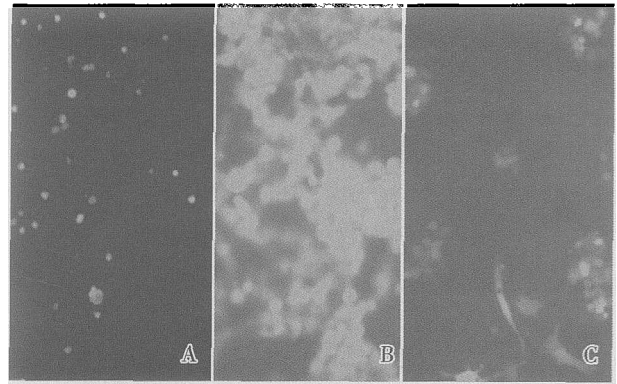


图 1 pAd-pol β 转染, 扩增 (HEK293 细胞) 与表达 (PC12 细胞)

Fig.1 Transfection and amplification of Ad-pol β in 293 cells, expression of Ad-pol β in PC12 cells

PacI-digested pAd-pol β was transfected into 293 cells and GFP expression was visualized by fluorescence microscopy (A, $\times 100$). Ad-pol β infected 293 cells. Fluorescence microscopy of the infected cells was performed 24 h later, strong green fluorescence were observed (B, $\times 200$). PC12 cells infected by Ad-pol β . After infected for three days. PC12 cells were visualized under fluorescent microscopy. The rate of adenovirus to PC12 cells is 20:1 (C, $\times 200$)

2.3 重组腺病毒 rAd-pol β PCR 鉴定

可见 400 bp 特异带 (图 2)。

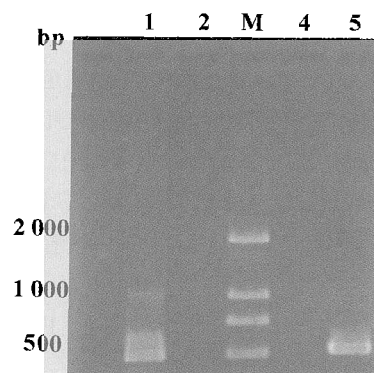


图 2 重组腺病毒 pAd-pol β PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of Adpol β by PCR

1: pol β plasmid; 2: negative control; M: DNA Marker; 4: Ad-pol β ; 5: Ad-pol β

2.4 重组腺病毒 rAd-pol β 感染的 PC12 细胞的 Western blot

在 $M_r = 40 \times 10^3$ 处有条带, 而对照空病毒 rAdeasy-GFP 感染的 PC12 细胞样品没有该条带, 表明重组腺病毒 rAd-pol β 在 PC12 细胞中过表达

(图3)。

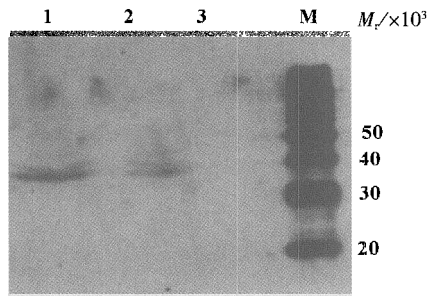


图3 重组腺病毒 Ad-pol β 感染 PC12 细胞 pol β 表达
Fig.3 Expression of pol β in Ad-pol β infected PC12 cells

Western blot 1, 2: Ad-pol β ; 3: Ad-gfp; M: protein marker

3 讨论

局灶性脑缺血损伤后其基因表达发生明显改变。本课题组用荧光 mRNA 差异显示 RT-PCR 研究脑缺血基因差异表达,检测到大鼠脑缺血时金属蛋白酶组织抑制 3 亚型(TIMP-3), DNA 多聚酶 β , 热休克蛋白 HSP70 等表达上调。为进一步研究 POL β 的作用,特构建其表达载体。已有的 POL β 表达体系大都为稳定转染,腺病毒载体介导的大鼠 DNA 多聚酶 β 及其在 PC12 细胞中的表达尚未见文献报道。与逆转录病毒载体相比,腺病毒载体能感染分裂期和非分裂期细胞,腺病毒 5 型(Ad5)是实验性基因治疗中常用的复制不能的腺病毒载体,新的腺病毒载体系统 AdEasy 具有操作较简便等优点。为便于筛选和作序列分析,我们在构建腺病毒载体前,先作 TA 克隆。共挑选 10 个克隆测序,3 个克隆的序列与 GENE BANK 中大鼠 POL β cDNA 序列完全一致。3 个克隆有单个碱基改变,分配为 188g-a,318g-a,968c-g。1 个克隆存在两处变化,即 493a-t 和 839c-t。另 3 个克隆有较多突变,较高的突变率可能与没有用高保真 *Taq* 酶有关。序列正确的穿梭(shuttle)质粒电转入含骨架(backbone)质粒的大肠杆菌 BJ5183,*PacI* 酶切 30 个最小克隆电泳,8 个克隆有 4.5 kb 或 3 kb DNA 带,取其一测序,其(pAd-pol β)DNA 序列正确。*PacI* 线性化的重组腺病毒质粒(pAd-pol β)用 Lipofactamine2000 包裹后转染 293 细胞,经扩增,收集 Ad-pol β 感染 PC12。荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白(GFP)表达 PC12 细胞随病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)增加而增多,MOI 为 100 时,PC12 GFP 阳性率达 90%。Ad-pol β 感染 PC12 作 Western blot 在近

$M_r=40\times 10^3$ 处有条带,而对照空病毒 rAdeasy-GFP 感染的 PC12 细胞样品没有该条带。表明重组腺病毒 rAd-pol β 在 PC12 细胞中表达。正对其功能作进一步研究。

参考文献:

- [1] Frosina G. Counteracting spontaneous transformation via overexpression of rate-limiting DNA base excision repair enzymes [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(9):1335-41.
- [2] Sobol RW, Prasad R, Evenski A, *et al*. The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity [J]. *Nature*, 2000,405(6788):807-10.
- [3] Beard WA, Wilson SH. Structural design of an eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase beta [J]. *Mutat Res*, 2000, 460(3-4):231-44.
- [4] Lang T, Maitra M, Starcevic D, *et al*. A DNA polymerase β mutant from colon cancer cells induces mutations [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(16): 6074 - 9.
- [5] Sugo N, Aratani Y, Nagashima Y, *et al*. Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase β [J]. *EMBO J*, 2000, 19(6): 1397-404.
- [6] Canitrot Y, Capp JP, Puget N, *et al*. DNA polymerase beta overexpression stimulates the Rad51 -dependent homologous recombination in mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(17):5104-12.
- [7] Canitrot Y, Cazaux C, Frechet M, *et al*. Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(21): 12586-90.
- [8] Bergoglio V, Frechet M, Philippe M, *et al*. Evidence of finely tuned expression of DNA polymerase beta in vivo using transgenic mice [J]. *FEBS Lett*, 2004, 566(1-3): 147-50.
- [9] Martin TF, Grishanin RN. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells [J]. *Methods Cell Biol*, 2003, 71:267-86.
- [10] Spicer Z, Millhorn DE. Oxygen sensing in neuroendocrine cells and other cell types: pheochromocytoma (PC12) cells as an experimental model[J]. *Endocr Pathol*, 2003, 14(4):277-91.
- [11] 藏林泉,银巍,皮荣标,等. 荧光差异显示 PCR 克隆大鼠脑缺血相关基因 KIAA0280 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*2004, 25(2)97-101.

(编辑 黄小延)