

重组人磷脂酶 D1/腺病毒表达载体的构建与表达

韩 黎¹ 吴桂芝² 朱世俊¹ 陈运奇¹ 陈世平¹

(¹中国解放军总医院 医院感染管理研究科 北京 100853)

(²德国埃森医科大学肿瘤医学研究所 埃森 45122)

摘 要 将磷脂酶 D1 基因及其功能缺陷点突变基因从真核表达载体 pCGN-PLD1 亚克隆至带有绿色荧光标记蛋白的穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中,再与腺病毒骨架载体一起在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组,阳性重组子经 *Pac* I 线性化后,转染入病毒组装细胞系 293 细胞,成功构建磷脂酰胆碱专一性磷脂酶 D1 重组腺病毒;并用该病毒颗粒感染嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞,高效表达磷脂酶 D1 蛋白。证明大蛋白基因,如磷脂酶 D1 基因的同源重组腺病毒表达构建切实可行,为研究其在细胞内的生理功能提供了有力工具。

关键词 磷脂酶 D1, 腺病毒, 同源重组

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)03-0315-04

磷脂酶 D (Phospholipase D, PLD) 催化细胞膜重要组成成份——磷脂酰胆碱,生成磷脂酸和胆碱基。磷脂酶 D 的激活是细胞蛋白信号转导系统中重要的效应体系^[1]。目前,对其激活及功能的研究多通过转染方式向培养细胞系导入外源基因,基因转染率的高低成为研究瓶颈,更为重要的是,外源性质粒对未分化细胞,如 PC12 (Pheochromocytoma 嗜铬细胞瘤) 细胞及大部分的原代培养细胞,尤其是免疫细胞 (T 细胞、B 细胞、抗原提呈细胞等) 的转染效果较差,大大阻碍了这些重要生理细胞内磷脂酶 D 的激活机制及功能研究。本文利用重组腺病毒技术^[2]将磷脂酶 D 亚型之一,磷脂酶 D1 及其功能缺陷点突变基因^[3]构建入腺病毒表达系统,为探索 PLD 在感染发生及细胞信号调节方面的重要作用提供了强有力的技术工具。

1 材料和方法

1.1 细胞培养、试剂、酶

293 细胞购自 Microbix Biosystems 或 ATCC, PC12 细胞由埃森医科大学 Schmidt 博士赠送。所有细胞传代培养条件为:含 10% 小牛血清 (Invitrogen), 10^5 units/L 青霉素, 100 μ g/mL 的 DMEM/F12 培养基 (Gibco), 37°C 5% CO₂ 孵箱 (Hereaus)。限制性内切酶均购于 New England BioLabs。Lipofectamine 试剂盒购于 Promega。

1.2 质粒

人磷脂酶 D1 真核表达质粒 pCGN-hPLD1 及其功能缺陷点突变株 hPLD1 (K898R) 由 Morris 博士和 Frohman 博士赠送;腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 和腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 由德国海德堡大学医学院药理研究所 Wieland 博士赠送。pAdEasy-1 包含除早期 E1、E3 基因外的所有腺病毒血清型 5 (Ad5) 基因序列; pAdTrack-CMV 带有绿色荧光蛋白 (GFP) CMV 启动子及多聚腺嘌呤 (poly A) 位点。

1.3 电感受态细胞准备和电转化

大肠杆菌 DH10B 及 BJ5183 在 1000 mL LB 培养基 (Sigma) 中振荡生长至 OD₆₀₀ 值 0.8;菌体经离心收获后,冰浴 1h、用 100 mL 冰冷的 10% (体积比) 甘油洗涤两次,悬浮于 5 mL 冰冷的 10% (体积比) 甘油中,分装贮存于液氮中 (每管 20 μ L)。电转化过程 40 μ L 电转化感受态细胞与 50 ~ 300 ng 待转化 DNA 冰浴条件下混合,移至电转化小杯中。电转化器 (Bio-Rad Gene Pulser Electroporator) 工作条件为 200 Ω /25 μ F/2.5 KV。电转化后,向小杯中加入 1 mL SOC 培养基 (Invitrogen), 37°C 振荡培养 1h 后涂布抗生素琼脂平板,筛选阳性克隆。

1.4 克隆 pAdTrack-hPLD1

7.5 ~ 10 μ g pCGN-hPLD1 质粒用 *Sma* I, *Xba* I 逐一酶解消化后,经电泳分离、苯酚/氯仿抽提回收并测定浓度。同时,将 pAdTrack-CMV 穿梭质粒用

基金项目 国家自然科学基金 (30340055)

作者简介 韩 黎 (1973 -) 男, 山东淄博人, 德国埃森大学医学院博士, 现解放军总医院助理研究员。主要从事医院感染机理及信号转导研究。Tel: 86-10-66937144; E-mail: lihan@301hospital.com.cn

收稿日期 2003-08-15, 修回日期 2003-12-11

EcoRV、*Xba* I 逐一酶解消化,分离回收(条件同上)。线性化的 pAdTrack-CMV 穿梭质粒经碱性磷酸酶(Roche Molecular Biochemicals, 1U/pmol 5'末端)去磷酸化处理,与 hPLD1 基因片段以摩尔比 1:3 混合,加水补至一定体积于 45℃温育 5min。然后加入 5U T4 DNA 连接酶及缓冲液于 4℃连接过夜。次日涂布于 10^5 units/L 青霉素琼脂平板,以筛选可能阳性克隆。以碱性裂解法小提可能阳性克隆的质粒 DNA,经 *Bgl* II 限制性内切酶消化后,电泳分析。阳性克隆直接接种培养,用 Qiagen Maxi-prep 试剂盒大量纯化 pAdTrack-hPLD1。

1.5 同源重组^[2]

1μg pAdTrack-hPLD1 质粒经限制性内切酶 *Pme* I 消化,苯酚氯仿抽提回收线性化的质粒,并将其与 500ng 超螺旋腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 40μL BJ5183 大肠杆菌混合,进行电转化。向转化后的 BJ5183 大肠杆菌立即加入 1mL SOC 培养基,37℃ 孵育 45min,涂布于含卡那霉素 50mg/L 的琼脂平板上,37℃ 培养过夜。次日,挑取小克隆,接种于含卡那霉素 50mg/L 的 LB 培养基中,37℃ 振荡过夜,以碱性裂解法小提质粒 DNA。质粒 DNA 经 *Nde* I 限制性内切酶酶切,凝胶电泳分析。阳性克隆直接接种培养,用 Qiagen Maxi-prep 试剂盒大量纯化 pAdEasy-hPLD1。

1.6 人磷脂酶 D1 腺病毒颗粒的产生

30μg pAdEasy-hPLD1 质粒经 *Pac*I 消化后,暴露其倒置终端重复序列。线性化的质粒经苯酚氯仿抽提、乙醇沉淀纯化后与 20μL Lipofectamine 试剂混合溶于 1mL 不含小牛血清的 DMEM/F12 培养基中,置于室温 15min。将混合物转移至 145mm 培养皿中的 293 细胞单层(2×10^6 细胞)上,另补加 4mL 不含小牛血清的 DMEM/F12 培养基,37℃ CO₂ 孵箱温育 4h,然后,给细胞更换含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基,继续培养。每天用荧光显微镜(Zeiss Axiovert S100)观察绿色荧光蛋白的产生情况。7d 后刮取收集并离心沉淀细胞,悬浮于 3mL 含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基中。将细胞悬浮液置于液氮中速冻,然后置于 37℃ 水浴融化,此循环连续 3 次。4℃ 2200r/min 离心 10min,取病毒上清分装贮存或继续感染更多 293 细胞以获得高滴度病毒。

1.7 人磷脂酶 D1 腺病毒感染 PC12 细胞及 hPLD1 蛋白的表达

取上一步中的病毒上清 2mL,分别感染两个 PC12 细胞单层(60mm 培养皿,每个平皿约 2×10^7 细

胞),每天观察绿色荧光蛋白的产生情况并拍照。5d 后,加入 1mL 10% SDS 裂解液,刮取细胞并移至 1.5mL Eppendorf 管中,置 95℃ 温度槽内 10min,其间用 1mL 注射器将细胞悬浮液打匀,进行 Pierce 蛋白浓度测定(见 Pierce 试剂盒说明)。进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳及 Western blot 分析。一抗为兔抗 hPLD1 血清;二抗为羊抗兔 IgG/过氧化物酶嵌合蛋白。抗体标记蛋白通过化学荧光反应(Western Lightning™, PerkinElmer Life Sciences)由 Kodak 胶片捕获。

2 结果

2.1 pAdTrack-hPLD1 的克隆

hPLD1 基因约 3.5kb,含一个 *Nde* I 限制性内切酶位点和一个 *Bgl* II 内切酶位点,不含 *Pme* I、*Pac* I 酶切位点(图版 I-A)。实验中,尽管经 *Xba* I 和 *EcoRV* 线性化的腺病毒穿梭载体已经去磷酸化处理,但 *EcoRV* 产生的载体平端切口及 *Sma* I 产生的 hPLD1 基因平端切口,加上 hPLD1 基因较大,导致连接效率很低。阳性克隆的 *Bgl* II 酶切图谱含一条约 700bp 的标志性条带,位于 hPLD1 基因的 685 *Bgl* II 位点与 pAdTrack-CMV 2398 *Bgl* II 位点之间。

2.2 同源重组 hPLD1 腺病毒(pAdEasy-hPLD1)

用限制性内切酶 *Nde* I 来筛选阳性 pAdEasy-hPLD1 同源重组子,因为它在巨大腺病毒骨架载体中的酶切位点较少(仅有 3 个);在含 hPLD1 基因的穿梭质粒 pAdTrack-hPLD1 中有 4 个切点,1 个在 hPLD1 基因内,3 个位于 pAdTrack-CMV 穿梭质粒自身内,如果 *Pme* I 线性化的 pAdTrack-hPLD1 与腺病毒超螺旋骨架载体 pAdEasy-1 在左右臂同源区(图版 I-A)发生了正确的同源重组, pAdTrack-hPLD1 的 4 个酶切位点会取代位于 pAd Easy-1 Ori 附近的 *Nde* I 1673 酶切位点,因此阳性同源重组子含 6 个 *Nde* I 位点。其中, hPLD1 基因被 *Nde* I 切分为两条带:一条(也是 6 条带中最小的)大约 1.3kb,位于 hPLD1 基因 1026 位点和 pAdTrack-CMV 穿梭质粒的 2670 位点之间;另一条大约 3.1kb,位于穿梭质粒的 1705 位点与 hPLD1 基因的 1026 位点。

2.3 hPLD1 腺病毒颗粒形成及 hPLD1 蛋白在细胞中的表达

编码 hPLD1 蛋白的重组腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切线性化后,转染 293 细胞,在细胞内包装形成重组腺病毒颗粒,并引起细胞生理病变。细胞裂解后,重组腺病毒颗粒释放于上清液中,该病毒上清可有效

感染 PC12 细胞。2d 时在荧光显微镜下可见少量绿色荧光(图版 I-B-b) 4d 后大量绿色荧光产生(图版 I-B-c)。PC12 细胞的病毒感染病理现象显著,形成星状的病毒感染斑。另外,抗体免疫杂交显示,hPLD1 蛋白确实在 PC12 细胞中有大量表达(图版 I-B-d)。

3 讨论

重组腺病毒技术被广泛应用于基因转移、疫苗研制和基因治疗等方面。其具有感染效率高、可转移细胞谱系宽、基因转移效率高(不取决于细胞分裂状态)等优点^[4]。因此,将 PLD 基因重组入腺病毒表达载体,利用腺病毒这一有利工具研究 PLD 在原代细胞,尤其是在免疫细胞内的信号激活及功能机制,为探索 PLD 在感染发生及细胞调节方面的重要作用打下了可靠技术基础。

传统上有两种重组腺病毒技术方案。一是直接将目的基因片段连接克隆入腺病毒基因组。由于某腺病毒基因组相对于一般目的基因太大,且可供选择的稀有位点的限制性内切酶极少,因此连接效率极低且阳性克隆难以筛选^[5];二是在病毒包装哺乳动物细胞系内的同源重组。该细胞系可提供病毒载体所缺陷基因蛋白,阳性重组子由靠逐一筛选细胞病毒斑获得,工作量极大且阳性率低。1998 年,一种新的重组腺病毒技术简化方法由 He 等^[2]建立起来。其基本策略是利用细菌的高效重组机制,直接使用超螺旋化的腺病毒骨架载体与目的基因在细菌内进行同源重组,并借助绿色荧光蛋白对病毒产生及数量示踪。

本实验中,目的基因 hPLD1 及其功能缺陷占突变株基因约 3.5kb,不含 *Pme* I、*Pac* I 两个重要的酶切位点,使其重组腺病毒的构建成为可能;否则,必须实行限制性内切酶部分消化及重组蛋白 *RecA* 辅助酶切^[6]。超螺旋化的腺病毒骨架载体(直接纯化后)的应用有效提高了同源重组率。我们发现,Qiagen 大提试剂盒的质粒纯化效果即可满足同源重组要求;CsCl 梯度离心纯化后的超螺旋化腺病毒骨架载体同源重组的发生率更高(结果未示)。在筛选 pAdEasy-hPLD1 同源重组子时,假阳性克隆主要来自于 *Pme* I 消化后的 pAdTrack-hPLD1 质粒的自我连接。减低假阳性率的方法是调整同源重组体系中 *Pme* I 线性化的 pAdTrack-hPLD1 与超螺旋化腺病毒骨架载体的摩尔比,这与目的基因的大小有关。另一情况,则错位同源重组,即在 pAdTrack-hPLD1 的

ori 区及 pAdEasy-1 的 ori 区之间发生同源重组。这种同源重组可能会减少一个 *Nde* I 酶切位点,造成 5 条带的酶切图谱型。这种克隆也可在包装细胞系中有效地产生重组腺病毒颗粒(结果未示)^[2]。

重组 hPLD1 腺病毒不仅可有效感染其包装细胞系 293 细胞,而且对不易于转染的 PC12 细胞系的感染效率也很高,约 90%,而且 hPLD1 蛋白在 PC12 细胞内高效表达^[7]。这为进一步研究 PLD 蛋白在 PC12 细胞中的功能打下了坚实基础。另外,由于 hPLD1 功能缺陷株与正常蛋白仅区别一个碱基,因此尚需对重组 hPLD1 腺病毒的 PLD1 基因区进行 PCR 测序,以确保重组 hPLD1 腺病毒的准确性和纯度。Hoer^[8]报道腺病毒感染细胞本身也有可能对胞内 PLD 基础活性有增强作用。利用本实验获得的 hPLD1 重组腺病毒感染细胞,对细胞生理功能的影响研究也在进行之中。

利用重组腺病毒进行研究工作安全性向来是人们关注的重要问题。目前,常用的做为重组载体的人类腺病毒亚型(血清五型)为 36kb 的双链 DNA,外源基因一般重组入 E1 或 E3 基因区,已减弱或消除病毒自身的感染力和侵袭性。本实验构建的重组 hPLD1 腺病毒在未来的实验研究中是相当安全的,因为这里应用的腺病毒骨架载体是 E1 及 E3 基因缺陷株。E1 基因对腺病毒复制至关重要;E3 基因则编码病毒对免疫系统的侵袭蛋白。

参 考 文 献

[1] Exton J H. 2002 Phospholipase D-structure, regulation and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2002, **144**: 1 - 94.

[2] He T C, Zhou S, Da Costa, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 2509 - 2514.

[3] Morris A J, Frohman M A, Engebrecht J. Measurement of phospholipase D activity. *Anal Biochem*, 1997, **252**: 1 - 9.

[4] Miller A D. Human gene therapy comes of age. *Nature*, 1992, **357**: 455 - 460.

[5] Rosenfeld M A, Siegfried W, Yoshimura K, *et al.* Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium *in vivo*. *Science*, 1991, **252**: 431 - 434.

[6] West S C. The processing of recombination intermediates: mechanistic insights from studies of bacterial proteins. *Cell*, 1994, **76**: 9 - 15.

[7] Han J M, Kim J H, Lee B D, *et al.* Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase D2 by protein kinase C delta in rat Pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 8290 - 8297.

[8] Hoer A, Schoneberg T, Harteneck C, *et al.* Enhancement of phospholipase D activity following baculovirus and adenovirus infection in Sf9 and COS-7 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1393**: 325 - 335.

Construction and Expression of Human Recombinant Phospholipase D1 *Adenovirus*

HAN Li¹* WU Gui-Zhi² ZHU Shi-Jun¹ CHEN Yun-Qi¹ CHEN Shi-Ping¹

(¹ Institute of Hospital Infection Control & Research, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

(² Institut fuer Tumor Forschung, Essen Uniklinikum, Essen 45122, Germany)

Abstract: To construct the human recombinant phospholipase D1 *adenovirus* and express PLD1 protein efficiently in mammalian cells, human phospholipase D1 gene was firstly subcloned from the eukaryotic expression vector pCGN into the shuttle vector pAdTrack-CMV encoding GFP (green fluorescent protein); then pAdTrack-hPLD1 was linearized by *Pme* I and cotransformed with supercoiled adenoviral backbone pAdEasy-1 vector into BJ5183 *E. coli* for homologous recombination. The right hPLD1 adenoviral recombinant was linearized by *Pac* I enzyme and transfected into the virus packaging cell line, 293 cells. The packaged recombinant hPLD1 adenoviral particles were used to infect the Pheochromocytoma 12 cells with high efficiency detected by GFP. Meantime, significant PLD1 protein expression in PC12 cells was examined by immunoblotting. The results demonstrated that the construction of homologous recombinant *adenoviruses* of huge proteins, like PLD1, was quite applicable and provided an indispensable tool for studying further their important physiological role of PLD1 in the cell.

Key words: Phospholipase D1, *Adenovirus*, Homologous recombination

* Corresponding author. Tel: 86-10-66937144; E-mail: lihan@301hospital.com.cn

Received date: 08-15-2003

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。本刊科学严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证:京东工商广字第0034号)编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

通讯地址:100080 北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内

《微生物学报》编辑部

电话: (010) 62630422 传真: (010) 62554303 电子信箱: actamicro@sun.im.ac.cn

联系人: 王晋芳 王敏