

[文章编号] 1000-2200(2010)01-0010-04

· 基础医学 ·

携带神经营养因子-3 基因的重组腺病毒的构建和鉴定

范 迟^{1,2}, 高 下², 徐 琳², 朱光洁¹, 陈 杰², 麻晓峰², 丁小琼², 陆 玲², 周 函²

[摘要]目的:构建含人神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)的重组腺病毒载体,为初步研究 NT-3 的在体功能做准备。方法:酶切法从已构建好的真核表达载体 NT-3-pIRES2-DsRed2 质粒中切下含有 NT-3 和 DsRed2(包括连接区域 pIRES2)的目的片段,将其插入到腺病毒骨架质粒 pAdShuttle-CMV 的多克隆位点中,电穿孔法将腺病毒骨架载体 pAdShuttle-CMV-NT-3-DsRed2 和预转入人肠杆菌 BJ5183 的穿梭载体 pAdEasy-1 进行细菌内同源重组。Pac I 酶切线性化鉴定正确的同源重组载体,脂质体法转染 293T 细胞,包装形成表达 NT-3 目的蛋白和红色荧光的腺病毒。通过 293T 细胞 3 轮扩增病毒,氯化铯密度梯度离心,获得高滴度的纯化腺病毒。Western blot 方法检测蛋白表达情况。结果:同源重组质粒载体的 DNA 测序证实腺病毒载体中含有 NT-3 的目的片段,Western blot 证实感染重组腺病毒的 293T 细胞中有相应的 NT-3 蛋白表达;病毒滴度为 10^9 PFU/ml。结论:利用细菌内同源重组的方法可以成功构建同时表达 NT-3 蛋白和红色荧光的重组腺病毒。

[关键词] 腺病毒,人;人神经营养素-3;红色荧光蛋白;耳蜗圆窗

[中国图书资料分类法分类号] R 373.1 **[文献标识码]** A

Construction and identification of recombinant adenovirus with NT-3 gene

FAN Chi^{1,2}, GAO Xia¹, XU Lin², ZHU Guang-jie¹, CHEN Jie², MA Xiao-feng², DING Xiao-qiong², LU Ling², ZHOU Han²

(1. Medical College, Southeast University, Nanjing Jiangsu 210009; 2. Department of Otorhinolaryngology, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing Jiangsu 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the recombinant adenovirus vector carrying neurotrophin-3 (NT-3) gene. **Methods:** NT-3 and DsRed2 (including the ligation region pIRES2) fragment which had been digested by proper enzyme from NT-3-pIRES2-DsRed2 plasmid were cloned into adenovirus pAdShuttle-CMV plasmid. Adenovirus vector pAdShuttle-CMV-NT-3-DsRed2 were electroporated into BJ5183 which had been transformed into pAdEasy-1 previously to have the recombination with pAdEasy-1. Recombinant AdEasy plasmid DNA was analyzed and linearized by Pac I, then transfected into 293A cells with liposome method. The adenovirus that expressed NT-3 protein and red fluorescence was successfully constructed. The adenovirus was amplified in 293A cells three times, and high quality adenovirus was obtained by cesium chloride density gradient centrifugation. Western blot confirmed the expression of the NT-3 protein in 293T cells. **Results:** With the system of Adshuttle, a recombinant adenovirus expressing NT-3 protein and red fluorescence was successfully constructed. **Conclusions:** The recombinant adenovirus carrying NT-3 gene can be constructed with the system of Adeasy.

[Key words] recombinant adenovirus, human; neurotrophin-3; red fluorescence protein; cochlea round window

现代耳神经生物学研究发现,外周听觉神经系统的生长发育与神经营养因子间有着密切的关系^[1]。神经营养因子(NGF)是指一组能支持神经元发育与存活的小分子多肽,与外周听觉系统关系密切的神经营养因子主要包括脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经营养因子 4/5、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)等。NT-3、BDNF 可由耳蜗感觉上皮的已分化或前体细胞合成,并以自分泌或旁分泌的形式作

用于听觉神经系统,是发育中和(或)哺乳动物内耳感觉上皮中最重要的存活因子^[1-2]。BDNF 和 NT-3 在听觉神经元的正常发育及其功能维持中发挥重要作用。NT-3 基因突变可以导致 I 型听神经元缺失, BDNF 基因突变可以导致 II 型听神经元缺失^[3]。基于以上观点,我们通过构建含 NT-3 基因的重组腺病毒来为研究 NT-3 基因的载体功能做准备。

1 材料与方法

1.1 实验材料 载体 pIRES2-DsRed2 (Clontech 公司),腺病毒载体系统(美国 Q. biogene 公司),大肠埃希菌 DH5 α ,人肠杆菌 BJ5183,人胚肾 293T 细胞系为本实验室保存,DMEM (Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶,限制性内切酶 EcoR I、BamH I、Bgl II、Not I, λ -ECoT14 DNA Marker (Takara 公司),Pac I, Pme I (NEB 公司),琼脂糖 (Sunshine 公司),LB 培养基 (Oxoid 公

[收稿日期] 2009-03-23

[基金项目] 江苏省重点人才项目基金资助(RC2007010);南京市医学科技重点项目基金资助(ZKX06019)

[作者单位] 1. 东南大学医学院,江苏南京 210009; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院耳鼻咽喉科,江苏南京 210008

[作者简介] 范 迟(1983-),男,硕士研究生。

[通讯作者] 高 下,主任医师,xiagao213@yahoo.com.cn

司),羊抗人 NT-3 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司), Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit(Invitrogen 公司),凝胶回收试剂盒(U-gene 公司),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 质粒 NT-3-pIRES2-DsRed2 和腺病毒穿梭载体 pAdShuttle-CMV 扩增及鉴定 将带有 pIRES2-DsRed2-NT-3 质粒的菌液和带有 pAdShuttle-CMV 的菌液各 1 μ l 分别加入 50 ml LB 培养液中(卡那霉素 50 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床培养过夜, Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit 提取质粒, pIRES2-DsRed2-NT-3 质粒用 *Bgl* II 单酶切鉴定^[4]。

1.2.2 目的基因的获取及穿梭载体的构建 根据质粒 pIRES2-DsRed2-NT-3 和穿梭载体 pAdShuttle-CMV 的酶切位点图谱,用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Not* I 对质粒进行双酶切, *Bgl* II/*Not* I 各 0.25 μ l, 加灭菌双蒸水至 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 酶切 2 h。质粒 pIRES2-DsRed2-NT-3 经 *Bgl* II/*Not* I 双酶切出约 2 096 bp 的目的基因片段 NT-3-DsRed2, 穿梭载体 pAdShuttle-CMV 则切出约 7 445 bp 的长片断, 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 凝胶回收试剂盒回收目的片段。T₄DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接上述目的片段。将 DNA 连接产物转化至 KCM 感受态细胞, 具体方法为, 将转化产物涂于卡那抗性的琼脂糖平板, 37 $^{\circ}$ C 培养, 次日挑选 14 个克隆, 各于 3 ml LB 培养基(卡那霉素 50 μ g/ml) 中扩增, 碱裂解法鉴定阳性克隆。阳性克隆经 *Bgl* II/*Not* I 双酶切鉴定, 酶切出 2 096 bp 和 7 445 bp 的目的片段^[5-6]。

1.2.3 细菌内同源重组、腺病毒质粒的鉴定及扩增 取 1 μ g 重组穿梭质粒 pAdShuttle-CMV-NT-3-DsRed2 经 *Pme* I 酶切线性化, 酶切体系为 pAdShuttle-CMV-NT-3-DsRed2 1 μ l, *Pme* I 0.5 μ l, 补水至 20 μ l, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收线性化重组穿梭载体片段, 与超螺旋骨架载体 pAdEasy-1 共转 BJ 5183 高效感受态细胞, 进行二者的同源重组。将电转后的感受态细胞涂于抗性的琼脂糖平板, 37 $^{\circ}$ C 培养, 次日挑选阳性克隆, 提抽质粒, 初步鉴定后将质粒用电转法转入 DH5 α 菌中, 扩增质粒。用 *Pac* I 对同源重组病毒质粒 pAdShuttle-CMV-NT-3-DsRed2 进行酶切。

1.2.4 重组腺病毒的包装及大量扩增 提取鉴定正确的重组病毒质粒, 用 *Pac* I 酶切使之线性化后醋酸钠、乙醇沉淀、回收。取培养达对数生长期的 293T 细胞, 经胰蛋白酶消化, 计数后铺细胞于 100 mm 培养皿, 用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液

培养(5% CO₂, 饱和湿度, 37 $^{\circ}$ C) 至 20% ~ 30% 丰度, 用脂质体法将 *Pac* I 线性化的重组腺病毒载体 20 μ g 转染 293T 细胞, 48 h 后用荧光显微镜进行观察, 将细胞 1:3 进行分盘, 以增加原代病毒产量, 病毒包装过程中, 观察培养基颜色, 如变黄, 则补 1 ml 5% DMEM, 14 天后 80% ~ 90% 细胞漂起, 收取细胞及上清, 在液氮/37 $^{\circ}$ C 条件下反复冻融及振荡器振荡 4 次, 离心收取原代病毒上清。取部分原代病毒上清感染 293T 细胞得到二代病毒, 同上法收取病毒上清, 以扩增三代病毒。为达到足够的病毒量, 用 150 mm 培养皿按 1:5 分盘培养 50 盘细胞以扩增病毒。3 天后用 50 ml 离心管收取细胞及病毒悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸去上清, 用移液管将细胞收集到 50 ml 离心管中, 加入 10 ml 无血清 DMEM, 液氮/37 $^{\circ}$ C 条件下反复冻融及振荡器振荡 4 次, 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 20 min, 吸取上清于离心管中冻存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.2.5 重组腺病毒的纯化及滴度测定 4 $^{\circ}$ C 超速离心机 23 000 g, 2 h CsCl 梯度离心纯化病毒上清, 加样顺序为 6 ml 密度 1.2 CsCl, 将加样枪轻轻伸入管底将 8 ml 密度 1.4 CsCl 加入管内, 将病毒上清缓缓加入 CsCl 之上, 离心后, 射器针头刺入管壁收取病毒悬液约 1 ml 装入透析袋中, 于透析液中 4 $^{\circ}$ C 透析 3 次, 前两次 1 h, 最后一次透析过夜。透析完毕后 20 μ l 一管分装病毒, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。取 5 μ l 病毒用病毒裂解液 1:20 稀释至 100 ml, 56 $^{\circ}$ C 剧烈振荡 10 min, 测 OD₂₆₀ 为 0.547A, 根据 0.1OD = 1.1 \times 10¹², 初步推算病毒的 VP 值为 6.0 \times 10¹² ml。进一步测病毒的 PFU: 用 0.25% 胰蛋白酶消化处于对数生长期的 293T 细胞, 计数后接种于 6 孔板, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养(5% CO₂, 饱和湿度, 37 $^{\circ}$ C) 至细胞全部长满, 此时认定每孔细胞数量为 1 \times 10⁶; 弃培养液, 用纯化的包装病毒颗粒按感染复数 1:1、1:10、1:20、1:50、1:100 分别感染 293T 细胞, 观察培养 3 h 时哪个孔的细胞全部漂起, 则认定此孔病毒的 MOI 值为 1:10, 观察结果为 1:100 孔的细胞 3 天全部漂起, 而其余各孔细胞则部分或大部分漂起。根据上述结果计算得出, 病毒的实际 VP 值为 6.0 \times 10¹¹/ml, PFU 为 6.0 \times 10⁹/ml。

1.2.6 Western blot 鉴定 将 10 μ g NT-3 质粒转入 50% 融合的 293T 细胞中, 将 1 μ l 纯化腺病毒转入 90% 融合的 293T 细胞中, 1 盘 50% 融合的 293T 细胞作为空白对照, 36 h 后提取细胞蛋白, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C。BCA 法测蛋白浓度。将 100 μ g 蛋白加入泳道中, 电转移, SDS-PAGE 结束, 取下凝胶, 将分离胶浸泡于转移缓冲液(25 mmol/L Tris-cl, 192 mmol/L

甘氨酸,20%甲醇,pH 8.3)中 30 min。30%小牛血清封闭 30 min。一抗二抗孵育后 DAB 显色。

2 结果

2.1 重组质粒 pIRES2-DsRed2-NT-3 的鉴定 用 Bgl II 单酶切鉴定的 pIRES2-DsRed2-NT-3 线性化质粒长度与实际长度符合,约为 6.0 kbp(见图 1)。

2.2 穿梭质粒 pShuttle-CMV-DsRed2-NT-3 的酶切

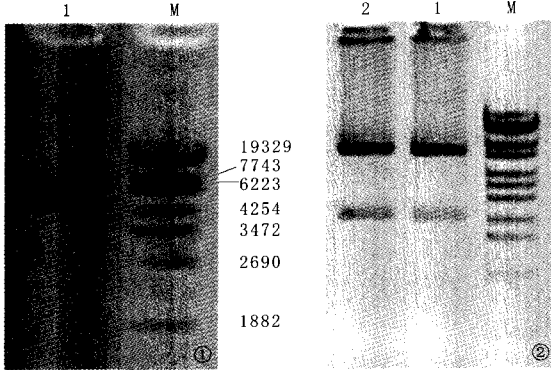


图 1 质粒 pIRES2-DsRed2-NT-3 酶切电泳图 图 2 Bgl III 和 Not I 双酶切 pShuttle-CMV-DsRed2-NT-3 电泳图 图 3 Pac I 酶切 Ad-DsRed2-NT-3、Ad-DsRed2 电泳图

鉴定 用 Bgl II 和 Not I 双酶切鉴定的 pShuttle-CMV-DsRed2-NT-3 产生两个条带,分别为 7.5 kbp (pShuttle-CMV) 和 2.1 kbp (DsRed2-NT-3)。酶切产物条带大小与实际长度符合(见图 2)。

2.3 重组腺病毒质粒 PShuttle-NT-3-RFP 的酶切鉴定 用 Pac I 酶切鉴定的 Ad-DsRed2-NT-3, Ad-DsRed2 产生两个特征性条带,分别为 35 kbp 和 3.5 kbp 或者 4.5 kbp(见图 3)。

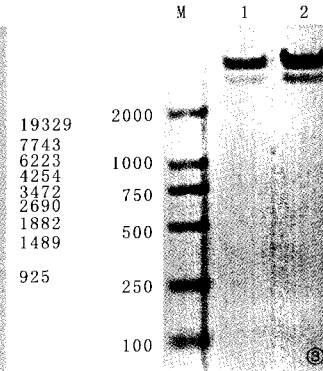


图 1: M: λ-ECOT14 DNA Marker; 图 2: M: λ-ECOT14 DNA Marker; 1: Bgl III 和 Not I 双酶切 pShuttle-CMV-DsRed2-NT-3(质粒 2 μl); 2: 同上; 图 3: M: DL-2000 Marker; 1: Pac I 酶切 Ad-DsRed2-NT-3 (质粒 0.2 μl); 2: Pac I 酶切 Ad-DsRed2-NT-3 (质粒 0.1 μl)

2.4 重组腺病毒的包装和扩增 转染 48 h 后,倒置荧光显微镜下显示 HEK 293A 细胞中有红色荧光蛋白 DsRed2 表达,后逐渐增多,呈“彗星状灶性”分

布,10 天时细胞呈现 CPE 现象,细胞变圆,脱壁,呈葡萄串状(见图 4)。

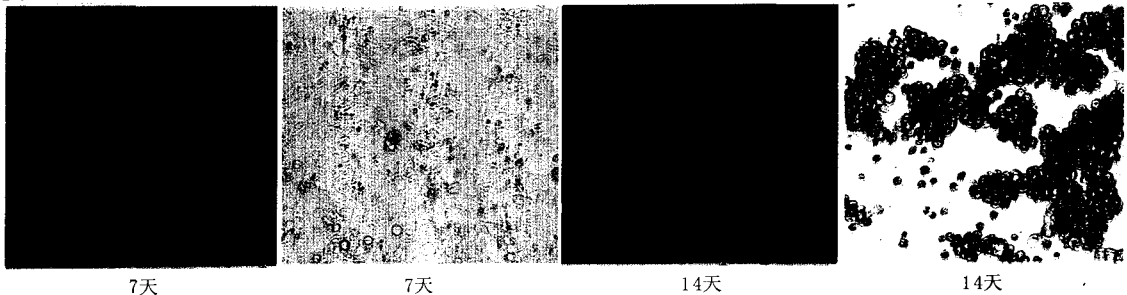
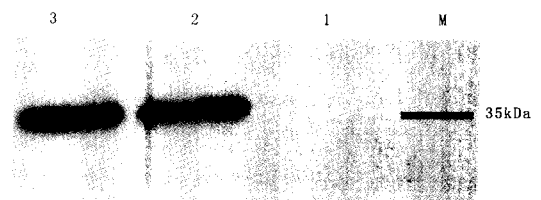


图 4 Ad-DsRed2-Hath1 腺病毒感染 HEK293T 细胞图片

2.5 重组腺病毒的鉴定和滴度测定 条带 1、2 均出现相同大小的蛋白条带,说明我们自行构建的 Ad-DsRed2-NT-3 腺病毒完全正确;条带 3 未出现条带,说明 293T 细胞不表达 NT-3 蛋白,排除了假阳性的结果。NT-3 蛋白的基因编码区为 774 bp,编码蛋白为 257 aa,蛋白分子量为 28.27 kDa,由于蛋白糖基化等原因,蛋白分子量可达 35 kDa,与图中条带大小基本一致(见图 5)。

3 讨论

听觉的建立与维持依赖于听觉通路解剖形态的完整及生理机能的正常^[8]。在临床实践中,各种原因(耳毒性药物、缺氧、感染、噪声、爆震及自身免疫性疾病)导致的后天性感音神经性耳聋十分常见。鉴于感音神经性耳聋的发病机制目前尚不明显,其



1: 自行构建的 Ad-DsRed2-NT-3 病毒(10 μl 病毒转染 6 cm 培养皿, 培养 36 h), 293T 细胞中提取蛋白; 2: 10 μg pShuttle-CMV-DsRed2-NT-3 线性化质粒(10 μg 质粒转染 6 cm 培养皿, 培养 36 h, 293T 细胞中提取蛋白); 3: 阴性对照组(6 cm 培养皿, 培养 36 h), 293T 细胞中提取蛋白(排除细胞表达 NT-3)

图 5 Western blot 检测 Ad-DsRed2-NT-3 蛋白表达

治病因素和临床表现形式的多样性使得治疗上始终难以获得确实有效的方法。因此,感音神经性耳聋的预防和治疗始终是耳科学临床与基础研究的重点课题。近年来,随着发育神经生物学研究的深入和

基因工程技术的发展,已开始出现某种具有重要意义的进展。随着对多肽类营养因子与听觉神经系统间相互关系的研究深入,为最终解决这类问题带来了希望^[9]。

神经营养因子是一组与神经结构和功能密切相关的家族蛋白,它包括 NGF、BDNF、GDNF、NT-3、NT-4、NT-5、NT-6 等^[9-12]。NGF 是中枢和周围神经系统中最重要的内源性蛋白,调控着神经元的发育、生长、分化和生存,对维持神经系统的正常功能起着正常的作用。NGF 也是听觉神经系统的重要营养因子,其中 BDNF 和 NT-3 是内耳发育最重要的营养因子。NT-3 基因敲除小鼠模型显示传入耳蜗支配神经轴突减少和明显的螺旋神经节细胞丢失。NT-3 的 mRNA 主要在柯替氏器,其受体 TrkC 的 mRNA 在大鼠的螺旋神经节和前庭神经节被检测到,说明 NT-3 对耳蜗螺旋神经节的结构和功能维持起到了重要的作用^[13-17]。

在目前基因治疗的常用载体中(脂质体、逆转录病毒载体和细菌载体),腺病毒以其显著的优点而成为基因治疗相关研究中重要的工具之一。其优点有^[9]:(1)宿主范围广。腺病毒可感染一系列宿主细胞和组织,而在相应的细胞和组织中表达重组蛋白。(2)可以感染增殖和非增殖细胞,除了一些抗腺病毒的淋巴瘤细胞。(3)能有效进行增殖,病毒滴度高,因而对组织和细胞的感染率相当高。(4)E1 和 E3 区的缺失使得腺病毒载体能够容纳多达 7.5 kbp 的目的基因,为基因插入提供了相当大的克隆空间。(5)与人类基因同源,可高效表达人类蛋白。(6)不整合到宿主染色体中,不会干扰宿主基因。(7)能同时表达两个或两个以上基因。

本实验利用基因工程技术构建了重组腺病毒 PShuttle-NT-3-RFP,经抗性菌落筛选、酶切片段分析、DNA 序列测定等方法证明重组腺病毒完全符合设计要求。将重组腺病毒载体转染 293T 细胞,经荧光监测、Western blot 方法检测蛋白 pShuttle-NT-3-RFP 可在增殖细胞中正常表达,证实重组腺病毒可用于转染真核细胞,并在较长时间内表达目的基因。以上结果为进一步研究 NT-3 基因治疗毛细胞受损奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Ruan RS, Leong SK, Mark I, *et al.* Effects of BDNF and NT-3 on hair cells survival in guinea pig cochlea damaged by kanamycin treatment[J]. *Neuroreport*, 1999, 10(10): 2067-2071.
- [2] Erfors P, Van de Water TR, Loring J, *et al.* Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development[J]. *Nature*, 1995, 14(6): 1153-1164.
- [3] Fritsch B, Silos-Santiago I, Bianchi LM, *et al.* The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation[J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(6): 159-164.
- [4] Amalfitano A, Hauser MA, Hu H, *et al.* Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted[J]. *Virology*, 1998, 72(4): 926-933.
- [5] Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(5): 440-447.
- [6] Armentano D, Zabner J, Sacks C, *et al.* Effect of the E4 region on the persistence of Transgene expression from adenovirus vectors[J]. *Virology*, 1997, 71(2): 2408-2416.
- [7] Martin-Martinez MD, Stoenoiu M, Verkaeren C, *et al.* Recombinant adenovirus administration in rat peritoneum: endothelial expression and safet concerns[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(5): 1293-1297.
- [8] Gao WQ. Role of neurotrophins and lectins in prevention of ototoxicity[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 884(6): 312-327.
- [9] 卢大儒, 邱信芳, 薛京伦, 等. 医学分子遗传学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1998: 600-601.
- [10] 孔维佳, 周梁, 许庚, 等. 耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 516-518.
- [11] Duan M, Agerman K, Erfors P, *et al.* Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(6): 7597-7602.
- [12] Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, *et al.* Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo[J]. *Neurosci*, 2003, 23(11): 4395-4400.
- [13] Agerman K, Canlon B, Duan M, *et al.* Neurotrophins, NMDA receptors, and nitric oxide in development and protection of the auditory system[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 884(6): 131-142.
- [14] Duan M, Agerman K, Erfors P, *et al.* Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 7597-7602.
- [15] Shepherd RK, Coco A, Epp SB, *et al.* Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss[J]. *J Comp Neurol*, 2005, 486(2): 145-158.
- [16] Noushi F, Richardson RT, Hardman J, *et al.* Delivery of Neurotrophin-3 to the Cochlea using Alginate Beads[J]. *Otol Neurotol*, 2005, 26(3): 528-533.
- [17] Maiorana CR, Staecker H. Advances in inner ear gene therapy: exploring cochlear protection and regeneration[J]. *Current Opinion Otolaryngol Head Neck Surgery*, 2005, 13(5): 308-312.