

· 基础研究 ·

人 S100A9 重组腺病毒载体的构建和鉴定*

徐兰兰, 游莉, 郭元元, 邹正渝, 黎玉叶, 孙双双, 罗进勇, 周兰[△]

(重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学教育部重点实验室 400016)

摘要:目的 制备人 S100A9(hS100A9)重组腺病毒载体,为进一步研究人 S100A9 蛋白的分子生物学作用奠定基础。方法 从 pHAHA-hS100A9 中 PCR 扩增 hS100A9 片段,亚克隆至穿梭质粒 pAdTrack-TOX,获得重组穿梭质粒 pAdTrack-TOX-hS100A9。酶切、聚合酶链反应(PCR)及测序鉴定正确后经 Pme I 酶切电转入 AdEasier 感受态细胞,获得重组腺病毒质粒 pAdhS100A9,该质粒经 Pac I 酶切后由脂质体转染至 HEK293 细胞中包装扩增重组腺病毒并进行滴度测定,最后通过 PCR 及蛋白印迹法(Western blot)鉴定重组腺病毒。结果 正确扩增出 hS100A9 基因;重组穿梭质粒 pAdTrack-TOX-hS100A9 均及重组腺病毒质粒 pAdhS100A9 构建成功,并在 HEK293 细胞中成功包装且扩增后滴度为 1 010 IU/mL;重组腺病毒 AdhS100A9 在 HEK293 细胞中成功转录和表达。结论 用 pAdEasy 系统成功构建 hS100A9 重组腺病毒载体,为探讨其生物学作用奠定了基础。

关键词:钙粒蛋白 B;腺病毒科;载体构建;鉴定

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)22-2231-03

Construction and identification of recombinant adenovirus vector expressing human S100A9*

Xu Lanlan, You Li, Guo Yuanyuan, Zou Zhengyu, Li Yuyue, Sun Shuangshuang, Luo Jinyong, Zhou Lan[△]

(Key Laboratory for Clinical Laboratory Diagnostics, of Ministry of Education, Department of Medical Laboratory Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenovirus vector expressing human S100A9 for further studying its molecular biology effects. Methods Human S100A9 gene was amplified using PCR method and inserted into pAdTrack-TOX vector. The recombinant plasmid pAdTrack-TOX-hS100A9 was confirmed by restriction endonuclease digestion, PCR and gene sequencing. Then the resultant vector was electro-transduced into competent AdEasier cells after linearized by Pme I to acquire recombinant adenovirus plasmid pAdhS100A9. Subsequently, the recombinant vector was transfected into HEK293 cells by liposome transfection to acquire recombinant adenovirus(AdhS100A9). Then AdhS100A9 was amplified and evaluated the titer and identified by PCR and Western blot. Results Human S100A9 gene was amplified accurately. The shuttle plasmid pAdTrack-TOX-hS100A9 and adenovirus plasmid pAdhS100A9 were constructed successfully. AdhS100A9 was successfully packaged in HEK293 cells and the virus titer was 1 010 IU/mL after amplification. The recombinant adenovirus could transcribe human S100A9 gene and express protein. Conclusion A recombinant adenovirus AdhS100A9 was successfully constructed with pAdEasy system. The adenovirus will be used to investigate the biological role of human S100A9.

Key words: calgranulin B; adenoviridae; vector construction; identification

S100A9 是钙调蛋白 S100 家族成员之一,与 S100A8 一样均是由嗜中性粒细胞分泌和表达的一种具有免疫原性的蛋白质^[1],在细胞内主要以 S100A8/S100A9 同源二聚体的形式发挥作用^[2]。细胞内的 S100A8 和 S100A9 也能独立发挥作用,但 S100A8 的同源二聚体不能形成稳定的分子结构,所以一般认为 S100A9 比 S100A8 的作用大^[3]。作为免疫原性物质, S100A9 具有抑制细胞生长、抗菌及促炎性细胞趋化的作用^[4-5],现发现其可作为炎症和自身免疫性排斥的早期标志物^[6-8]。随着对肿瘤微环境的深入研究,越来越多的实验表明 S100A9 在多种肿瘤微环境中高表达如肺癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌等,并可介导肿瘤的转移^[9-10]。本实验构建了携带该基因的腺病毒载体,为探讨 S100A9 在肿瘤及其他疾病发生、发展中的具体作用机制提供条件。

1 材料与方

1.1 材料 pHAHA-hS100A9、pAdTrack-TOX、pAdEasy-1 质粒由美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室馈赠;聚合酶

链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物由 Takara 公司合成;高保真 PCR、普通 PCR、DNA 连接试剂盒购自 Takara 公司;限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 购自 Takara 公司, Pme I 和 Pac I 购自 New England Biolab 公司;胶回收及 DNA 纯化试剂盒购自 Omega 公司;脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司;DH5 α 及 BJ5183 菌种、HEK293 细胞由重庆医科大学分子医学实验室提供;DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司;S100A9 一抗购自 Santa Cruz 公司(sc-58706)。

1.2 方法

1.2.1 重组穿梭质粒 pAdTrack-TOX-S100A9 的构建及鉴定

(1)PCR 扩增 hS100A9 片段。以 pHAHA-hS100A9 为模板,设计含 BamH I/Hind III 酶切位点的 hS100A9 片段的引物(正义/BamH I:5'-CGC GGA TCC GCA TGA CTT GCA AAA TGT CGC AG-3',反义/Hind III:5'-CCC AAG CTT TTA GGG GGT GCC CTC CCC GAG-3'),用高保真酶 PCR

扩增 hS100A9 片段, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, DNA 回收试剂盒回收 hS100A9 片段。(2) pAdTrack-TOX-hS100A9 的构建。BamH I 和 Hind III 双酶切所回收的 hS100A9 片段及 pAdTrack-TOX, 酶切产物经纯化试剂盒纯化后用 DNA 连接试剂盒连接, 连接产物即为重组穿梭质粒 pAdTrack-TOX-hS100A9。(3) pAdTrack-TOX-hS100A9 的鉴定。以上连接产物经乙醇沉淀后电转入 DH5 α 菌, 接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后挑取数个单个菌落分别接种于 2 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 6 h 后取 1.5 μ L 进行菌液 PCR。将菌液继续扩大培养后提取质粒, 取 5 μ L 进行测序, 5 μ L 用 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定。

1.2.2 重组腺病毒质粒 pAdhS100A9 的制备 将重组穿梭质粒 pAdTrack-TOX-hS100A9 经 Pme I 酶切线性化, 乙醇沉淀后电转入经 10% 甘油制备的 AdEasy 感受态细胞(将骨架质粒 pAdEasy-1 电转入 BJ5183 感受态细胞即为 AdEasy 细胞)。所得菌液涂布含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养, 次日挑取 5~10 个最小克隆菌落, 于 5 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 16 h 后提取质粒, Pac I 酶切鉴定重组结果, 正确的重组质粒会得到一个约 30 kb 的大片段和一个 3.0 kb 或者 4.5 kb 的小片段, 此质粒命名为 pAdhS100A9, 用 1 μ L pAdhS100A9 转化 DH5 α 菌, 接种于 10 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 16 h 后提取质粒以备后用。

1.2.3 重组腺病毒(AdhS100A9)在 HEK293 细胞中包装、扩增及滴度测定 Pac I 酶切 3 μ g pAdhS100A9, 乙醇沉淀后用 Lipofectamine 2000 转染入 HEK293 细胞, 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 的饱和湿度细胞培养箱培养, 适时观察荧光表达量, 至 80% 以上细胞变圆, 少数细胞脱落漂浮后收集病毒, 按腺病毒扩增操作规程逐轮扩增腺病毒。

对数生长期的 HEK293 细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔细胞培养板, 取 10 μ L 病毒液用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 依次按 10 倍稀释, 分别加样于 96 孔板中, 每个浓度加样 3 个平行孔, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 细胞培养箱培养 24 h, 荧光显微镜观察, 能出现荧光的最高病毒液的稀释倍数即为病毒的滴度, 该滴度单位为 IU/mL, 指每毫升病毒溶液中所含有感染能力的病毒颗粒。

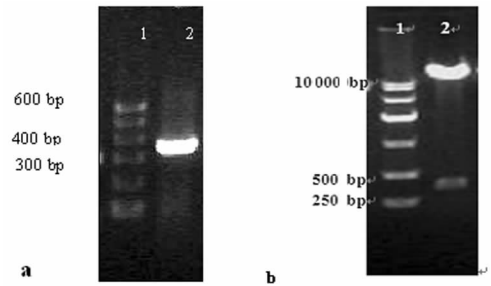
1.2.4 重组腺病毒(AdhS100A9)的鉴定 (1) AdhS100A9 携带的 hS100A9 基因转录的鉴定。分别提取未经处理的 HEK293 和经 AdhS100A9 感染的 HEK293 细胞的 RNA, 经逆转录 PCR 获得 cDNA, 以 pAdTrack-TOX-hS100A9 为模板设计引物(BamH I 正义: 5'-CGC GGA TCC GCA TGA CTT GCA AAA TGT CGC AG-3', 反义: 5'-CTA GCA GAT CCT GGT TCT TTC CG-3'), 长度约 700 bp。(2) AdhS100A9 携带的 hS100A9 基因表达的鉴定。分别提取未经处理的 HEK293 和经 AdhS100A9 感染的 HEK293 细胞的总蛋白, 取 20 μ L 样品经 Western blot 鉴定。

2 结果

2.1 重组穿梭质粒 pAdTrack-TOX-hS100A9 的酶切鉴定 用高保真 PCR 从 pHAHA-hS100A9 中成功扩增出 hS100A9 片段, 见图 1(a), 目的片段为 360 bp。用 BamH I 和 Hind III 双酶切 pAdTrack-TOX-hS100A9, 正确重组的质粒可得到约 9、360 bp 的两个片段, 见图 1(b)。将 pAdTrack-TOX-hS100A9 进行测序, 结果示该质粒构建成功(结果未显示)。

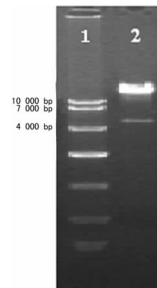
2.2 重组腺病毒质粒 pAdS100A9 的酶切鉴定 Pac I 酶切 pAdhS100A9 鉴定重组结果见图 2, 所选质粒酶切后得到一个约 30 kb 的大片段和一个约 4.5 kb 的小片段, 证明重组腺病毒质粒构建正确。

2.3 重组腺病毒的包装和扩增 将酶切纯化后的 pAdhS100A9 转染 HEK293 细胞后, 分别于 12、24、48 h 观察绿色荧光表达量。随时间增加, 病毒感染率和强度逐渐增加, 见图 3。证明病毒在 HEK293 细胞中成功包装且随时间逐渐扩增。荧光显微镜下观察 96 孔板中进行滴度测定的细胞, 在病毒样品稀释 10 倍的孔板中还能看见绿色荧光, 而稀释 11 倍的孔中无荧光, 将 AdhS100A9 滴度记为 1 010 IU/mL。



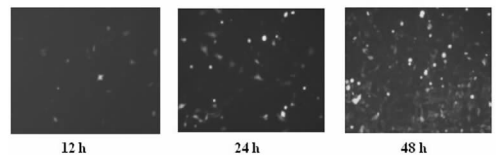
a: PCR 扩增 hS100A9 片段; 1: 标准品(DL600); 2: hS100A9。b: pAdTrack-TOX-hS100A9 酶切电泳图; 1: 标准品(DL10000); 2: pAdTrack-TOX-hS100A9-BamH I-Hind III。

图 1 pAdTrack-TOX-hS100A9 的酶切鉴定



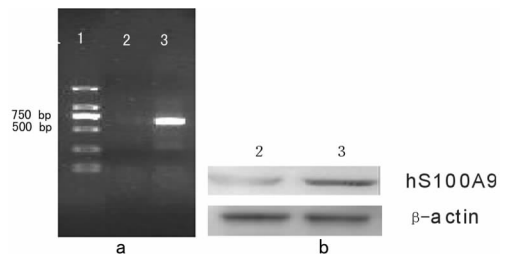
1: 标准品(DL10000); 2: pAdhS100A9-Pac I。

图 2 pAdhS100A9 酶切电泳图



1: 标准品(DL10000); 2: pAdhS100A9-Pac I。

图 3 HEK293 细胞中 AdhS100A9 的包装



a: 基因转录的检测; b: 基因表达的检测。1: 标准品(DL2000); 2: 阴性对照; 3: AdhS100A9。

图 4 AdhS100A9 感染 HEK293 细胞后 hS100A9 基因的检测

2.4 AdhS100A9 携带的 hS100A9 基因的检测 (1) 分别提取未经处理的 HEK293 细胞及 AdhS100A9 感染后 HEK293 细胞中的 mRNA, 逆转录为 cDNA, 用 1.5 中的引物扩增 cDNA, 扩增产物为 pAdTrack-TOX-hS100A9 中的一个片段, 见图 4a, HEK293 细胞中因没有腺病毒而没有扩增产物, 但经 AdS100A9 感染后 HEK293 细胞可以扩增出约 700 bp 的目的片段, 提示经 AdhS100A9 感染后的 HEK293 细胞可以外源性引入 hS100A9 基因。(2) 分别提取未经处理的 HEK293 和经 AdhS100A9 感染的 HEK293 细胞的总蛋白, 取 10 μ L 样品经 Western blot 鉴定, 见图 4b, 经腺病毒 AdhS100A9 感染后 HEK293 细胞中的 hS100A9 蛋白水平明显增加, 蛋白相对分子质量为 14×10^3 , 提示该重组病毒能够成功表达 hS100A9。

3 讨论

近年来对肿瘤日渐深入的研究发现肿瘤的发生和成功的转移很大程度上依赖于肿瘤微环境的变化。肿瘤微环境能够提供肿瘤内部或周围血管与淋巴管, 包括免疫细胞和它们分泌产物的炎性环境, 以及以细胞外基质形式存在的可提供进一步生长的支架等^[11]。在肿瘤微环境中存在大量的骨髓起源细胞, 包括骨髓起源的抑制细胞、肿瘤相关性巨噬细胞、间充质细胞等。大量研究发现 S100A9 是产生骨髓起源的抑制细胞及肿瘤相关性巨噬细胞的重要因子^[12], 髓样细胞分泌的 S100A9 还可通过一系列途径活化核因子- κ B (nuclear factor-kappaB, NF- κ B), 使这些细胞产生肿瘤相关性表型^[13], 同时 NF- κ B 也能促进一系列转录因子的转录从而促进肿瘤的发生、发展^[14-15]。但也有实验发现外源性的 S100A9 能抑制肿瘤细胞 (如鼠乳腺癌细胞 MM46、淋巴瘤细胞 EL-4、鼠肝癌细胞 MH-134、鼠纤维肉瘤细胞 L-929、人乳腺癌细胞 MCF-7、人白血病细胞 MOLT-4 等) 的生长^[13], 可见对 S100A9 的研究为探明不同肿瘤在不同微环境中的发展情况开拓了新的视野。

重组腺病毒是复制缺陷型的腺病毒载体, 已证实其为基因、免疫治疗及基础生物学研究的有力工具。与其他载体系统比较, 它具有以下优点: 宿主范围广, 包装容量大, 在增殖或非增殖细胞中感染和表达基因, 能有效进行增殖, 滴度高, 不整合到染色体中, 无插入致突变性, 能同时表达多个基因, 与人类基因同源等。1998 年, He 等^[16]创立 pAdEasy 系统, 实现细菌内高效同源重组, 与传统的构建重组腺病毒载体相比, 不再进行真核细胞内同源重组和噬斑筛选, 克服了周期长、效率低等不足, 使操作过程大大简化。另外, 它携带有荧光基因, 在与目的基因连接后能在细胞中产生荧光。本实验采用 pAdEasy 系统成功构建出 AdhS100A9, 经 PCR 和 Western blot 鉴定构建正确, 能在 HEK293 细胞中成功包装及扩增, 并能成功转录及表达 hS100A9 蛋白, 为进一步研究 S100A9 的生物学作用及作用机制奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] Roth J, Vogl T, Sunderkotter C, et al. Chemotactic activity of S100A8 and S100A9 [J]. *J Immunol*, 2003, 171 (11): 5651-5659.

[2] Nacken W, Kerkhoff C. The hetero-oligomeric complex of the S100A8/S100A9 protein is extremely protease resistant [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581 (26): 5127-5130.

[3] Hunter MJ, Chazin WJ. High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration

inhibitory factor-related proteins 8 and 14 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (20): 12427-12435.

[4] Rammes A, Roth J, Goebeler M, et al. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (14): 9496-9502.

[5] Frosch M, Strey A, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 (3): 628-637.

[6] Foell D, Frosch M, Sorg C, et al. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation [J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 344 (1-2): 37-51.

[7] Pechkovsky DV, Zalutskaya OM, Ivanov GI, et al. Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 29 (1): 27-33.

[8] Carroccio A, Iacono G, Cottone M, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children [J]. *Clin Chem*, 2003, 49 (6 Pt 1): 861-867.

[9] Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, et al. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8 (12): 1369-1375.

[10] Rafii S, Lyden D. S100 chemokines mediate bookmarking of premetastatic niches [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8 (12): 1321-1323.

[11] Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis [J]. *Nature*, 2009, 457 (7225): 36-37.

[12] Sinha P, Clements VK, Bunt SK, et al. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response [J]. *J Immunol*, 2007, 179 (2): 977-983.

[13] Sinha P, Okoro C, Foell D, et al. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181 (7): 4666-4675.

[14] 范艳燕. 核因子- κ B 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *重庆医学*, 2010, 39 (16): 2166-2167.

[15] 熊秀娟. 核因子- κ B 抑制物激酶-核因子- κ B 信号途径在肿瘤发生中的作用 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2009, 36 (3): 166-169.

[16] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (5): 2509-2514.