

· 论 著 ·

应用 AdEasy-1 腺病毒载体系统构建人 GDF-5 基因重组腺病毒*

罗栩伟, 刘 康, 陈 竹, 赵 明, 韩小伟, 白亦光, 冯 刚[△]

(南充市中心医院/川北医学院第二临床医学院组织工程与干细胞研究所, 四川南充 637000)

摘要:目的 应用 AdEasy-1 腺病毒载体系统构建人生长分化因子-5(GDF-5)基因重组腺病毒载体,并在 HEK293 细胞中扩增制备重组腺病毒。方法 将 PCR 获取的 GDF-5 基因插入到质粒 pMD19-T 中,基因测序鉴定后将目的基因克隆至腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV, Hind III 酶切鉴定。重组质粒经 Pme I 酶切使之线性化并去磷酸化处理,电转化含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的感受态大肠埃希菌 BJ5183,使其在细菌内发生同源重组,卡那霉素筛选, Hind III 酶切鉴定阳性克隆,扩增重组腺病毒质粒,并转染 HEK293 细胞,包装成重组腺病毒 Ad-GDF-5,分别采用 Western blot、TCID50 法对 Ad-GDF-5 进行蛋白鉴定和滴度测定。结果 经 PCR 扩增得到的 GDF-5 大小约为 1.7 kb,基因测序结果证实该基因与 GENBANK 中人 GDF-5 基因序列相同。pShuttle-CMV-GDF-5、pShuttle-CMV-GDF-5-AdEasy-1 经 Hind III 酶切后均得到大小约为 1.7 kb 的片段,与 GDF-5 大小相符。Western blot 证实 Ad-GDF-5 感染 HEK293 细胞后大量表达成熟 GDF-5 蛋白。研究结果表明成功地构建了携带人 GDF-5 基因的重组腺病毒载体,并制备出 5.6×10^9 PFU/mL 的重组腺病毒。结论 利用 AdEasy-1 腺病毒载体系统成功构建了携带人 GDF-5 基因的重组腺病毒载体,并制备出高滴度值的重组腺病毒 Ad-GDF-5,为进一步研究 GDF-5 的生物学功能及其相关疾病的基因治疗奠定了基础。

关键词:腺病毒科;生长分化因子-5;基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)12-1412-04

Construction of genetic recombinant adenovirus carrying human growth and differentiation factor-5 gene by using AdEasy-1 adenovirus vector system*

Luo Xuwei, Liu Kang, Chen Zhu, Zhao Ming, Han Xiaowei, Bai Yiguang, Feng Gang[△]

(Research Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, Nanchong Central Hospital/Second Clinical Hospital Affiliated to North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To construct the genetic recombinant adenovirus vector carrying the human growth and differentiation factor-5(GDF-5) gene by using AdEasy-1 adenovirus vector system and to amplify and prepare the recombinant adenovirus in HEK293 cells. Methods Human GDF-5 gene obtained by PCR was inserted into plasmid pMD19-T and the 1.7 kb GDF-5 cDNA sequence was cloned into the adenoviral shuttle plasmid pShuttle-cytomegalovirus(CMV) of the AdEasy-1 system. It was identified by DNA sequencing and a digestion with Hind III restriction enzyme. The resultant pShuttle-CMV-GDF-5 was used to generate the adenoviral GDF-5 vector through homologous recombination with the adenoviral backbone plasmid, pAdEasy-1 in BJ5183 bacterial cells. It was selected by kanamycin and identified by a digestion with Hind III restriction enzyme and amplified in XL10-Gold competent bacteria. The DNA of recombinant adenovirus vector was finally linearized by Pac I and the adenoviral recombinants were used to produce adenoviruses in HEK293 packaging cells, resulting in an Ad-GDF-5 identified by Western blot. The virus titer was assayed by TCID50. Results GDF-5 cDNA sequence obtained by PCR was 1.7 kb. Gene sequencing results indicated that the sequence was identical with the one in GENBANK. Cloned sequence 1.7 kb(GDF-5) was obtained by a digestion with Hind III restriction enzyme after GDF-5 cDNA segment was cloned into pShuttle-CMV and AdEasy-1. Western blot showed that two bands migrating at approximately 15 and 55 kDa were clearly observed in PVDF membrane. These data confirmed that HEK293 cells expressed a large number of mature GDF-5 protein after infected with Ad-GDF-5. Our research results demonstrated that recombinant adenovirus vector GDF-5 was successfully constructed. The virus titer was 5.6×10^9 PFU/mL. Conclusion Recombinant adenovirus vector carrying the human GDF-5 gene is successfully constructed by using the AdEasy-1 adenovirus vector system. Moreover, the Ad-GDF-5 with high titer is prepared. These provide the basis for further study of the biological function of GDF-5 and the gene therapy of its related diseases.

Key words: adenoviridae; growth and differentiation factor-5; gene therapy

生长分化因子-5(GDF-5)亦称软骨源性形态发生蛋白-1(β(TGF-β)超家族-骨形态发生蛋白(BMPs)家族中的特殊成员,是骨骼正常发生和发育必需的生长因子。GDF-5除了可

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201407、81171472、81071270、30872614);四川省杰出青年学科带头人资助计划(09ZQ026-005);四川省科技支撑计划项目(2010SZ0048);南充市应用技术与开发资金项目(11A0115);川北医学院科研发展计划项目重点培育项目(CBY11-A-ZP01)。作者简介:罗栩伟(1985-),住院医师,硕士研究生,主要从事椎间盘退行性变疾病基因治疗的研究工作。△ 通讯作者, Tel:15881729989;E-mail:lssmd18@gmail.com。

促进软骨发生、软骨成骨、长骨发育、关节形成和修复骨、软骨、关节损伤外,在修复受损的肌腱、韧带、神经、血管、牙组织等方面也显示了良好的应用前景^[1-5]。因此,对 GDF-5 基因表达及其相关疾病基因治疗的研究具有重要价值,但如何构建高效的病毒载体将该基因转移至体内并进行正常表达是基因治疗需要攻克的难点。作为转基因研究主要手段的 AdEasy-1 重组腺病毒载体具有高转染率、高病毒滴度和广泛感染性,能感染分裂和非分裂期细胞,且可插入外源基因片段达 7.5 kb 等优点。本研究拟利用该腺病毒载体系统的基因同源重组技术,构建携带人 GDF-5 基因的复制缺陷型重组腺病毒,为进一步研究 GDF-5 的生物学功能及其相关疾病的基因治疗奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV、腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1、大肠埃希菌 DH5a、BJ5183、XL10-Gold 及 HEK293 购自 Stratagene 公司,质粒 pMD19-T 试剂盒、碱性磷酸酶 (CIAP) 购自 Takara 公司,质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司, Pme I 酶、Pac I 酶、Hind III 酶、脂质体购自 New England Biolabs 公司,T4DNA 连接酶购自上海生物工程公司,GDF-5 单克隆抗体购自 Biopharm 公司,FBS、DMEM 购自 Hyclon 公司,PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司,PCR 引物合成与基因测序由南京金思特科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 GDF-5 基因克隆到穿梭质粒 pShuttle-CMV

根据 GENE BANK 上人 GDF-5 的基因序列 (NM000557.2),利用 Primer 5.0 软件设计上游引物:5'-ATG GGA CTG GAT ACA AAC ACA CAC C-3',下游引物:5'-GGT GTG TGT TTG TAT CCA GTC CCA T-3'。以人关节软骨 RNA 为模板逆转录成 cDNA,做 PCR 扩增反应。反应条件为:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,59 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 2 min,35 个循环后,72 °C 延伸 10 min。电泳回收 GDF-5 DNA 并插入到质粒 pMD19-T,抽提质粒 DNA 行基因测序鉴定。质粒 DNA 和穿梭质粒 pShuttle-CMV 经 Hind III 酶切后 T4DNA 连接酶 16 °C 水浴连接过夜,产物转化大肠埃希菌 DH5a,挑取阳性单个菌落扩增,抽提重组质粒 DNA,Hind III 酶切鉴定,得到的重组质粒命名为 pShuttle-CMV-GDF-5。

1.2.2 重组腺病毒质粒的构建和鉴定

腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1(33.5 kb)电转化 CaCl₂ 制备的 BJ5183 感受态细菌备用(电压 25 kV,电容 25 μF,电阻 200 Ω)。Pme I 酶切 pShuttle-CMV-GDF-5 使其线性化,电泳回收酶切产物,加入 CIAP 使之去磷酸化后电转化含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌。挑取阳性单个菌落,抽提质粒 DNA,Hind III 酶切鉴定,得到的重组子命名为 pShuttle-CMV-GDF-5-AdEasy-1。将重组腺病毒质粒转入 XL10-Gold 超感受态细胞扩增,大量提取质粒备用。

1.2.3 重组腺病毒的包装、鉴定、扩增、纯化和滴度测定

HEK293 细胞按 5×10⁵ 个/孔接种于无菌 6 孔板,第 2 天 Pac I 酶切重组质粒,脂质体包裹并转染 HEK293 细胞,5~7 d 出现细胞病变反应(CPE)后,收集病毒上清液行 Western blot 鉴定病毒蛋白,收集 CPE 阳性孔病毒上清液,命名为 Ad-GDF-5。大量扩增重组腺病毒,采用 CsCl 梯度离心法纯化(4 °C,32 000 r/min 离心 20 h)。最后,在 96 孔板中应用半数组织培养感染量(TCID₅₀)法测定并计算病毒滴度。

2 结果

2.1 质粒 pMD19-T-GDF-5 基因测序

GDF-5 全长 cDNA 经

过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳后,可得到大小约为 1.7 kb 的片段,与 GDF-5 大小一致,见图 1。基因测序结果证实所整合的目的基因与 GENBANK 中的人 GDF-5 基因序列一致,为包含有编码 501 个氨基酸的碱基序列,证实质粒 pMD19-T-GDF-5 构建成功。

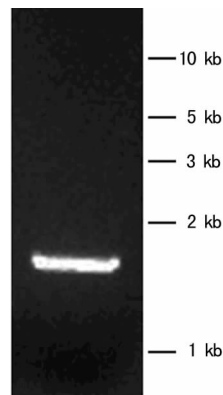
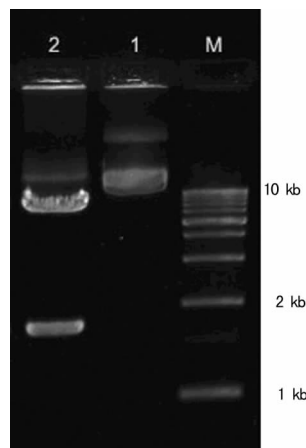


图 1 GDF-5 全长 cDNA 扩增

2.2 重组质粒 pShuttle-CMV-GDF-5 的鉴定

重组质粒 pShuttle-CMV-GDF-5 经过 Hind III 酶切,1%琼脂糖凝胶电泳后,可得到与预期结果一致的 1.7 kb(GDF-5)和 7.5 kb(pShuttle-CMV)两个片段,未经 Hind III 酶切的重组质粒电泳得到与预计大小相符的单个片段,约为 9.2 kb,证明质粒 pShuttle-CMV-GDF-5 内整合有 GDF-5 DNA,表明 pShuttle-CMV-GDF-5 构建成功,见图 2。



M:DNA 标记物;1:pShuttle-CMV-GDF-5;2:GDF-5/Hind III。

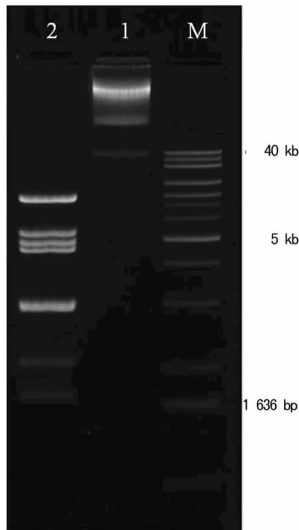
图 2 重组质粒 pShuttle-CMV-GDF-5 的酶切鉴定

2.3 重组腺病毒质粒 pShuttle-CMV-GDF-5-AdEasy-1 的鉴定

挑选卡那霉素抗性克隆,提取重组腺病毒质粒 DNA,经 Hind III 酶切、琼脂糖凝胶电泳得到大小约为 1.7 kb 的片段,与 GDF-5 大小相符;未经 Hind III 酶切的重组腺病毒质粒与预计大小相符,约为 35.5 kb,经酶切鉴定结果表明,重组腺病毒质粒 pShuttle-CMV-GDF-5-AdEasy-1 构建成功,结果见图 3。

2.4 目的基因产物的 Western blot 鉴定

吸取重组腺病毒转染 HEK293 细胞 3 d 后的病毒上清液进行 Western blot 分析,凝胶成像出现大小约为 55×10³、15×10³ 的两条蛋白条带,分别为 GDF-5 前体蛋白及其裂解后的成熟单体,与 Feng 等^[6]的报道一致,表明病毒上清液中存在 GDF-5 蛋白,且 Ad-GDF-5 感染 HEK293 细胞后大量表达成熟 GDF-5 蛋白,见图 4。



M: DNA 标记物; 1: pShuttle-CMV-GDF-5-AdEasy-1; 2: GDF-5/Hind III。

图 3 重组腺病毒质粒 pShuttle-CMV-GDF-5-AdEasy-1 的酶切鉴定

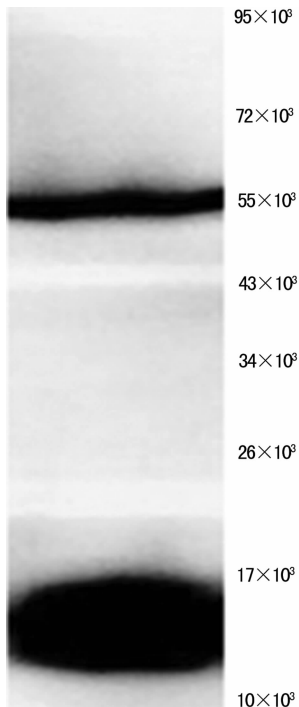


图 4 Western blot 检测 GDF-5 蛋白表达

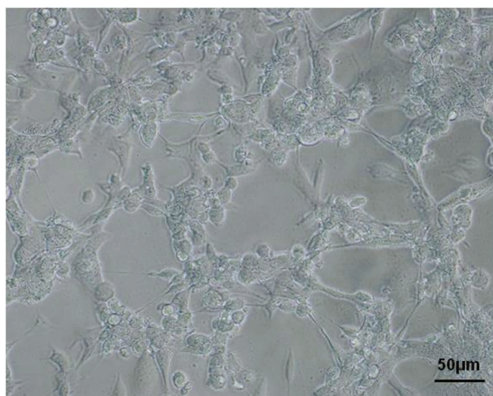


图 5 Ad-GDF-5 感染 HEK293 细胞 48 h (×200)

2.5 重组腺病毒的包装及滴度测定 取 5 μg 重组腺病毒质粒经 Pac I 酶切线性化、脂质体包裹后, 转染 HEK293 细胞, 第 5~7 天出现了明显的 CPE: 细胞变圆、间隙增宽、聚集成团, 呈串珠状样改变并部分从培养瓶壁上脱落、死亡等典型病毒细胞病变, 表明重组腺病毒 Ad-GDF-5 在 HEK293 细胞中已包装成功(图 5)。反复感染—收集—冻融数次后, 收集大量病毒上清液, CsCl 梯度离心纯化 Ad-GDF-5, 经 TCID₅₀ 法两次重复试验得到病毒滴度值为 5.6×10^9 PFU/mL。

3 讨论

基因转移载体的选择是影响基因治疗疗效的重要因素, 腺病毒是目前基因治疗中研究最多、应用最广的一种基因转移载体, 是长度约为 30~35 kb 的双链 DNA 病毒。由于腺病毒载体介导的目的基因具有感染细胞谱广、转染效率高、病毒滴度高且易于浓缩和储存等特点, 因而在基因治疗领域具有广阔的应用前景和研究价值^[7-8]。1998 年 He 等^[9]建立了 AdEasy 系统后, 该技术得到进一步完善和发展。本研究所选择的 AdEasy-1 腺病毒载体系统属于第 1 代 E1 区(1~3 533)和 E3 区(28 130~30 820)双缺失型人血清 5 型腺病毒(Ad5)载体系统, 是较为成熟、高效的腺病毒载体系统。E1 区缺失的腺病毒, 丧失其自我复制能力, HEK293 细胞可以弥补 E1 区缺失。该载体系统可感染广泛的哺乳动物细胞, 并已成功用于表达人类和非人类蛋白质; 具有高转染率、高病毒滴度, 重组腺病毒经纯化后可以达到 10^{12} PFU/mL; 其宿主细胞广泛, 能感染分裂和非分裂期细胞; 并且容量大, 可插入外源基因片段达 7.5 kb。另外, 安全性较好, 携带的外源基因不整合到宿主细胞基因组中, 插入突变风险极低, 且插入的目的基因表达相对持久稳定; 而且制备简单, 可以通过超速离心得到高滴度的重组腺病毒。

GDF-5 作为骨骼正常形态发生和发育必需的软骨内成骨诱导因子, 具有特异的软骨诱导能力, 能促进软骨发生、长骨发育和关节形成。然而, 该基因的缺失、突变或表达异常均会引起多种骨与关节疾病, 常染色体隐性遗传疾病已被体内实验所证实, 主要表现为短指畸形或缺如、四肢骨短小、骨端发育不良、软骨发育不全、关节缺失、关节错位、关节融合等^[10-11]。此外, 国内外研究还发现 GDF-5 基因的突变与骨关节炎(OA)、椎间盘退行性变(IDD)等疾病的发生发展密切相关, 且应用 GDF-5 修复退变的关节或椎间盘已有了初步的成果^[12-16]。为了进一步研究 GDF-5 的生物学功能及其在 OA、IDD 等相关疾病基因治疗中的应用, 本研究构建了携带人 GDF-5 的重组腺病毒载体并制备出高滴度值的重组腺病毒。

本研究利用 AdEasy-1 系统将线性化的重组质粒 pShuttle-CMV-GDF-5 电转化含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的大肠埃希菌 BJ5183 感受态细菌, 进行菌内高效同源重组, 卡那霉素筛选挑取阳性菌落, Hind III 酶切鉴定, 将得到的重组腺病毒质粒 pShuttle-CMV-GDF-5-AdEasy-1 转入 XL10-Gold 超感受态细胞进行扩增, 质粒 DNA 经 Pac I 酶切线性化、脂质体包裹后, 转染 HEK293 细胞, 对 Ad-GDF-5 进行包装、鉴定、扩增、纯化和滴度测定。这种菌内同源重组法重组腺病毒阳性率较高, 重组腺病毒生长快速, 且方法简便, 实验周期短, 更易得到高滴度值的重组腺病毒, 是基因转移的有效手段。

本研究利用 AdEasy-1 载体系统成功构建了携带人 GDF-5 基因的腺病毒载体, 并经包装、扩增和纯化后得到高滴度值 (5.6×10^9 PFU/mL) 的重组腺病毒, 从而为进一步深入研究

GDF-5 的生物学功能及其相关疾病的基因治疗奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] Hogan M, Girish K, James R, et al. Growth differentiation factor-5 regulation of extracellular matrix gene expression in murine tendon fibroblasts [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5(3):191-200.
- [2] Saiga K, Furumatsu T, Yoshida A, et al. Combined use of bFGF and GDF-5 enhances the healing of medial collateral ligament injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(2):329-334.
- [3] O'Sullivan DB, Harrison PT, Sullivan AM. Effects of GDF5 over expression on embryonic rat dopaminergic neurones in vitro and in vivo [J]. *J Neural Transm*, 2010, 117(5):559-572.
- [4] Zaidi SH, Huang Q, Momen A, et al. Growth differentiation factor 5 regulates cardiac repair after myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(2):135-143.
- [5] Moore YR, Dickinson DP, Wikesjö UM. Growth/differentiation factor-5; a candidate therapeutic agent for periodontal regeneration? A review of pre-clinical data [J]. *J Clin Periodontol*, 2010, 37(3):288-298.
- [6] Feng G, Wan Y, Balian G, et al. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells [J]. *Growth Factors*, 2008, 26(3):132-142.
- [7] 胡英明, 梅晰凡, 宋长威, 等. 大鼠 ZnT1 基因重组腺病毒载体的构建及鉴定 [J]. *重庆医学*, 2012, 41(20):2055-2061.
- [8] 徐兰兰, 游莉, 郭元元, 等. 人 S100 A9 重组腺病毒载体的

构建和鉴定 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(22):2231-2233.

- [9] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5):2509-2514.
- [10] Daans M, Luyten FP, Lories RJ. GDF5 deficiency in mice is associated with instability-driven joint damage, gait and subchondral bone changes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(1):208-213.
- [11] Loughlin J. Knee osteoarthritis, lumbar-disc degeneration and developmental dysplasia of the hip-an emerging genetic overlap [J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(2):108.
- [12] Wu DD, Li GM, Jin W, et al. Positive selection on the osteoarthritis-risk and decreased-height associated variants at the GDF5 gene in East Asians [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42553.
- [13] Shin MH, Lee SJ, Kee SJ, et al. Genetic association analysis of GDF5 and ADAM12 for knee osteoarthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2012, 79(5):488-491.
- [14] Williams FM, Popham M, Hart DJ, et al. GDF5 single-nucleotide polymorphism rs143383 is associated with lumbar disc degeneration in Northern European women [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(3):708-712.
- [15] Eskola PJ, Lemmelä S, Kjaer P, et al. Genetic association studies in lumbar disc degeneration: a systematic review [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e49995.
- [16] Liang H, Ma SY, Feng G, et al. Therapeutic effects of adenovirus-mediated growth and differentiation factor-5 in a mice disc degeneration model induced by annulus needle puncture [J]. *Spine*, 2010, 10(1):32-41.

(收稿日期:2013-09-17 修回日期:2013-12-20)

(上接第 1411 页)

- [5] 熊青, 徐龙, 李强, 等. 肠易激综合征血循环 microRNA 的表达谱 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(5):386-391.
- [6] Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs [J]. *Nature*, 2008, 455(7209):58-63.
- [7] Capodanno A, Boldrini L, Proietti A, et al. Let-7g and miR-21 expression in non-small cell lung cancer: Correlation with clinicopathological and molecular features [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(3):765-774.
- [8] Takahashi Y, Forrest AR, Maeno E, et al. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8):e6677.
- [9] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family [J]. *Cell*, 2005, 120(5):635-647.
- [10] Sampson VB, Rong NH, Han J, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(20):

9762-9770.

- [11] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11):3753-3756.
- [12] Heinrich EM, Dimmeler S. MicroRNAs and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment [J]. *Circ Res*, 2012, 110(7):1014-1022.
- [13] Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J]. *Cell*, 2005, 120(1):21-24.
- [14] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units [J]. *Genome Res*, 2004, 14(10A):1902-1910.
- [15] Yu F, Yao H, Zhu P, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. *Cell*, 2007, 131(6):1109-1123.

(收稿日期:2013-10-09 修回日期:2013-12-07)