

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.23.003

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190815.1626.006.html(2019-08-16)

重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho 构建的实验研究*

贾政¹, 刘茜², 邢正江¹, 邹弘麟¹, 李亚雄^{1△}, 魏玲³, 韦杰¹, 李春城¹, 孟凡棣¹

(1. 昆明医科大学附属延安医院心脏大血管外科/云南省心血管外科研究所,

昆明 650051; 2. 昆明医科大学附属延安医院老年医学科, 昆明 650051;

3. 中国人民解放军联勤保障部队第 920 医院干部病房, 昆明 650032)

[摘要] **目的** 本研究旨在构建并制备增强型荧光蛋白(EGFP)基因和 Klotho 基因重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho, 并将其感染 HEK293 细胞, 为基因治疗提供研究基础。**方法** 设计含有 Nhe I 与 Not I 双酶切位点的引物, 应用 PCR 方法扩增 Klotho 基因, 将其连接到 EGFP 标记的 pDC316-mCMV 穿梭质粒上, 构建重组穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-Klotho, 利用 Polyfectin 脂质体将骨架质粒和重组穿梭质粒共转染 HEK293 细胞进行同源重组, 得到重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho, 并包装扩增, 测定病毒颗粒数及滴度。采用 PCR 方法对重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho 进行鉴定, 并进行 Klotho 基因测序。**结果** 经 PCR 和 Nhe I、Not I 双酶切鉴定, 重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho 中证实含有 Klotho 基因, 测序结果和设计序列比对一致, 重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho 构建成功。滴度为 2.0×10^{10} Tu/mL, 成功感染 HEK293 细胞, 感染复数(MOI)=100, 感染效率达 91.75%, 从 Ad-EGFP-Klotho 重组腺病毒载体中可以检测到 3 045 bp 的条带, 表明目的基因已成功整合在重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho 基因组中。**结论** 应用细胞内同源重组方法成功构建了含有 EGFP 和 Klotho 基因的重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho, 制备获得高滴度的病毒, 可高效感染 HEK293 细胞并表达目的蛋白。

[关键词] Klotho 基因; 绿色荧光蛋白质类; 腺病毒, 人; 杂合子

[中图分类号] Q782

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)23-3970-04

Experimental study on construction of recombinant adenovirus vector Ad-EGFP-Klotho*

JIA Zheng^{1,2}, LIU Qian³, XING Zhengjiang^{1,2}, ZOU Honglin^{1,2},

LI Yaxiong^{1,2△}, WEI Ling⁴, WEI Jie^{1,2}, LI Chuncheng^{1,2}, MENG Fandai^{1,2}

(1. Department of Cardiac Vascular Surgery/Cardiovascular Surgery Research Institute of Yunnan Province, Yan'an Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650051, China; 2. Department of Geriatrics, Kunming Medical University Affiliated Yan'an Hospital, Kunming, Yunnan 650051, China; 3. Staff Ward, the 920th Hospital of the Joint Service Support Force of Chinese People's Liberation Army, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** The aim of this study was to construct and prepare an enhanced fluorescent protein (EGFP) gene and Klotho gene recombinant adenovirus vector Ad-EGFP-Klotho, and infect it into HEK293 cells to provide research basis for gene therapy. **Methods** The primer containing Nhe I and Not I double restriction site was designed. The Klotho gene was amplified by PCR and ligated into the EGFP-labeled pDC316-mCMV shuttle plasmid to construct the recombinant shuttle plasmid pDC316-mCMV-EGFP-Klotho. The backbone plasmid and the recombinant shuttle plasmid were co-transfected into HEK293 cells by Polyfectin liposome for homologous recombination to obtain recombinant adenovirus Ad-EGFP-Klotho, which was packaged and amplified, and the number of virus particles and titer were determined. The recombinant adenovirus Ad-EGFP-Klotho was identified by PCR and the Klotho gene was sequenced. **Results** The recombinant adenovirus Ad-EGFP-Klotho was identified by PCR and Nhe I + Not I double enzyme digestion, then the Klotho gene was confirmed. The sequencing result was consistent with the sequence of the designed fragment, and the recombinant adenovirus Ad-EGFP-Klotho was constructed successfully. The virus titer was 2.0×10^{10} Tu/mL. When the HEK293 cells were successfully infected, the MOI=100, the infection efficiency was

* 基金项目: 云南省基础研究计划(昆医联合专项)(2018FE001-276); 云南省昆明市卫生科技人才培养千工程科研项目[2018SW(后备)06]; 昆明医科大学附属延安医院内项目(yyky016-020)。 作者简介: 贾政(1988-), 主治医师, 硕士, 主要从事心血管病学研究。 △ 通信作者, E-mail: formyself.666@163.com。

91.75%, and the 3 045 bp band was detected from the recombinant adenovirus Ad-EGFP-Klotho, indicating that the target gene was successfully integrated into the viral genome of Ad-EGFP-Klotho. **Conclusion** The recombinant adenovirus Ad-EGFP-Klotho containing EGFP and Klotho gene was successfully constructed by intracellular homologous recombination method to prepare high titer virus, which can efficiently infect HEK293 cells and express the target protein.

[Key words] Klotho gene; green fluorescent proteins; adenoviral; human; heterozygote

Klotho 基因于 1997 年首先由 KURO-O 等^[1]在自发型高血压相关研究时发现, Klotho 基因仅在部分器官表达, 比如脑、心、肾、唾液腺等。研究表明, Klotho 基因可以抑制经典瞬时电位受体 (transient receptor potential canonical-6, TRPC-6)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 信号转导通路, 改善内皮功能, 增加一氧化氮 (NO) 活性并调节离子通道活性, 增强机体抗氧化应激能力^[2]。给予外源性 Klotho 或诱导内源性 Klotho 过表达对于钙磷异常代谢、内皮功能障碍、心肌纤维化等疾病发挥保护作用, 可能成为其治疗的有效方法。据此, 本研究以大鼠 Klotho 基因为目的基因, 利用 AdMaxTM 腺病毒包装系统构建了绿色荧光蛋白 (EGFP) 标记的重组腺病毒表达载体, 为相关疾病的基因治疗提供依据, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞 本科室构建含有 Klotho 基因和 EGFP 基因的重组质粒, 并向深圳百思维生物科技有限公司购买 AdMaxTM 腺病毒包装系统、穿梭质粒 pDC316-mCMV 和骨架质粒, JM109 感受态细胞及 HEK293 细胞由本科室保存。

1.1.2 实验试剂 ExTaq 酶、限制性内切酶 Nhe I、限制性内切酶 Not I 及 T4 DNA 连接酶均购自美国 New England BioLab 公司; Qiagen 大规模质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司; Polyfectin 脂质体、DMEM 培养基、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化液 (0.25%)、胎牛血清 (FBS)、凝胶 EDTA 回收试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; DNA 引物合成、DNA 测序均为美国 Invitrogen 公司; ViraBind 腺病毒纯化试剂盒购自美国 Cell Biolabs 公司; Trans2K Plus II DNA Marker 和去内毒素小量质粒抽提试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司; RNAiso Plus、GoScriptTM Reverse Transcription System 试剂盒、Go Tap[®] qPCR Master Mix 购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 NCBI GenBank 中大鼠 Klotho mRNA 编码序列 (NM_031336.1) 报告, 应用 Prime primer5.0 软件设计特异性引物: 上游 5'-CTA CAG CAT CCG ACG AGG AC-3', 下游 5'-AGC AAA GTC ACA GGG AAA CG-3', 在每条引物的前端加入相应的限制性内切酶位点和保护性碱基, 选取 Nhe I (CAT ATG) 和 Not I (GCG GCC GC) 两个酶

切位点。

1.2.2 重组穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-Klotho 的构建及鉴定 同时用内切酶 Nhe I、Not I 对合成的 Klotho 基因及载体质粒 pDC316-mCMV-EGFP 进行双酶切鉴定。双酶切反应质粒体系包含 Nhe I 1 μ L、Not I 1 μ L、pDC316-mCMV-EGFP 质粒 1 μ g、缓冲液 2 μ L、牛血清蛋白 (BSA) 2 μ L、ddH₂O 补足至 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。目的基因体系包括: Klotho PCR 产物 14 μ L、缓冲液 2 μ L、BSA 2 μ L、Nhe I 1 μ L、Not I 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。使用 DNA 凝胶提取试剂盒根据说明书操作进行回收, 分别获得目的基因酶切产物和酶切质粒大片段。经纯化后, 在 22 $^{\circ}$ C 环境下, 经 T4 DNA 连接酶作用将载体片段与目的基因片段连接, 连接反应体系包含目的基因 6 μ L、T4 DNA 连接酶 1 μ L、质粒大片段 2 μ L、10 \times DNA 连接酶 Buffer 1 μ L, 反应体系总共为 10 μ L, 在 22 $^{\circ}$ C 连接 2 h。采用热休克法将 10 μ L 上述连接产物与 100 μ L JM109 感受态细胞进行转化培养, 次日挑取 LB 平板上氨苄西林抗性的 5 个单克隆菌落并接种至 10 mL 培养基扩增, 随后 37 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 20 h, 根据去内毒素小量质粒抽提试剂盒说明书取 3 mL 菌液抽提质粒, 经 Nhe I 和 Not I 双酶切鉴定和基因测序验证。需同时构建空白质粒 pDC316-mCMV-EGFP 作为对照。

1.2.3 重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho 的包装 根据 Polyfectin 脂质体使用说明书, 将鉴定正确的穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-Klotho、骨架质粒采用脂质体介导的方法共同转染入 HEK293 细胞, 进行细胞内同源重组, 大量扩增, 在高速离心机上以最大速率离心去除细胞碎片, 收集上清液, 得到重组腺病毒 Ad-EGFP 和 Ad-EGFP-Klotho。随后行 PCR 鉴定: 取 2 μ L 腺病毒, 加 2 μ L 胰蛋白酶 K, 56 $^{\circ}$ C 温育, 沸水 10 min 后立即冰浴, 在高速离心机上以最大速率短暂离心后取 1 μ L 作为模板, 加入特异性引物、dNTP 混合物及无核酸水进行 PCR 扩增。扩增反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 15 min, 所获 PCR 产物行电泳。

1.2.4 重组腺病毒质粒 Ad-EGFP-Klotho 的扩增及纯化 将感染复数 (MOI) = 1 的重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho 病毒液感染 5×10^8 个 HEK293 细胞, 并置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中扩增, 随后每天观察细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE)^[5], 当出现完全 CPE 时即可收获细胞, -80 $^{\circ}$ C/37 $^{\circ}$ C 反复冻融 4

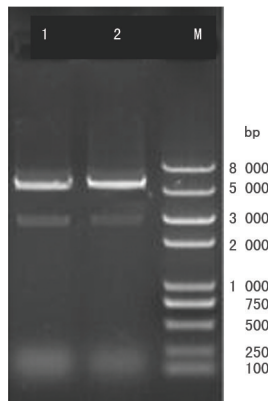
次,随后 4 ℃下高速离心 5 min 裂解细胞,离心并收集病毒上清液,根据腺病毒纯化试剂盒使用说明书纯化病毒。

1.2.5 重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho 转染 HEK293 细胞情况 将 HEK293 细胞按 2×10^5 接种于 6 孔板中,设置 MOI=100,在转染前 2~4 h 加入不含血清的 DMEM 培养基 500 μ L,轻微混匀后置 37 ℃,5% CO₂ 培养箱孵育,期间每 15 分钟震荡培养基 1 次,2 h 后去除培养基,加入 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 新鲜培养基,48 h 后置于荧光显微镜下,观察细胞表达 EGFP 的情况。

1.2.6 重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho 的病毒滴度测定 为减少病毒损耗,应尽量避免反复冻融,采用 10 倍梯度倍比稀释法在 96 孔板中计算病毒滴度。经 48 h 感染,置于荧光显微镜下,计数荧光细胞情况。高稀释度 m 的孔若数出 $N(N < 10)$ 个带荧光的细胞,则病毒滴度为 $N \times 10^m / \text{mL}$ (m 为稀释梯度),若 $N > 10$,则需继续稀释,如果观察不清楚可先换 PBS 再进行观察,计数方法同前。采用计算公式^[5]:半数组织细胞感染量 (TCID₅₀) = $10^{1+d(s-0.5)}$,再根据公式 $T = a \times 10^b \text{TC}$, ID_{50} (单位 mL) = $10^{b-0.7} \text{PFU/mL}$ 进行换算。其中, T 为 1 为最高稀释度的对数, d 为稀释系数, s 为阳性比率总和, a 为阳性比率, b 为滴度对数值, TC 为组织细胞培养物, ID_{50} 为半数感染量。

2 结 果

2.1 重组穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-Klotho 的鉴定 重组穿梭质粒经 Nhe I 和 Not I 双酶切鉴定后发现,在 3 045 bp 处可见到目的基因 Klotho 片段,在 6.7 kb 处可见到穿梭质粒 pDC316-mCMV 片段(图 1),与预期一致。从 Ad-EGFP-Klotho 重组腺病毒样品中可以检测到 3 045 bp 的条带,表明目的基因已成功整合在病毒基因组中(图 2)。经基因测序显示,Klotho 基因片段与原始序列比对相符。

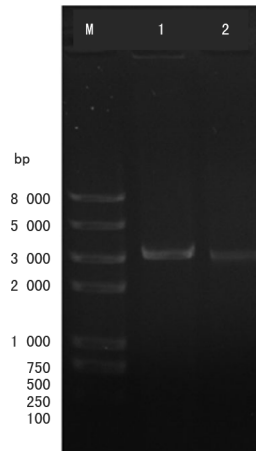


1,2:pDC316-mCMV-EGFP-Klotho Nhe I + Not I 双酶切鉴定结果;M:DNA 分子标记物

图 1 重组穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-Klotho 酶切鉴定结果

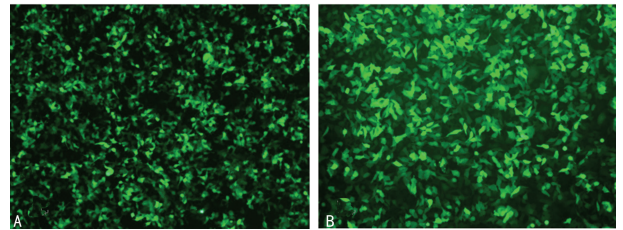
2.2 重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho 的鉴定 重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho 转染 HEK293 细胞,转染 8 d

后细胞表现出 CPE 现象,置于荧光显微镜下观察,可见大量表达 EGFP,见图 3。



M:DNA 分子标记物;1:Ad-EGFP-Klotho 病毒原液;2:Ad-EGFP-Klotho 病毒 10 倍稀释液

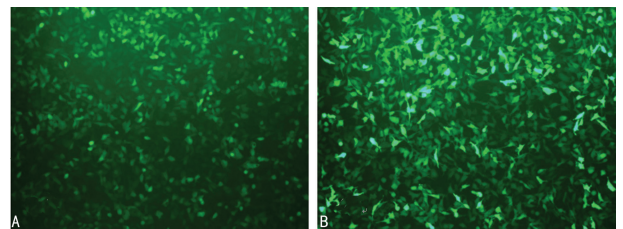
图 2 重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho PCR 鉴定结果



A:HEK293 细胞转染后 24 h,细胞仍贴壁生长,未见变大、变圆等现象,并可见 EGFP 表达;B:HEK293 细胞转染 8 d 后,可见 HEK293 细胞出现 CPE 现象并大量扩增,EGFP 广泛表达

图 3 Klotho 和 EGFP 转染后到获得重组腺病毒的 EGFP 表达图

2.3 重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho 感染 HEK293 细胞的效率 当 MOI=100 时,重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho 转染 HEK293 细胞 24 h 后,细胞生长情况良好,无污染,荧光显微镜下可见满视野 HEK293 细胞表达 EGFP,感染效率达 91.75%,见图 4。



A:转染 24 h;B:转染 60 h

图 4 重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho 感染 HEK293 细胞扩增病毒效率图

2.4 重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho 的滴度测定 经反复感染、扩增、包装、纯化及浓缩,可获得高滴度重组腺病毒 Ad-EGFP-Klotho。测定病毒滴度为 2.0×10^{10} Tu/mL,高于对照组(Ad-EGFP)的滴度,满足后续实验要求。

3 讨 论

Klotho 基因位于染色体 13q12 区域^[6-7],由 5 个外显子和 4 个内含子组成,全长大约 50 kb。人、小鼠

和大鼠的外显子长度分别为 3 022、3 036、3 042 bp, 且以上三者 Klotho 基因之间存在同源性(人和小鼠 80%, 人和大鼠 83%), 第三外显子区域存在一个固有的供体剪切位点, 可进行选择性剪切。根据选择性剪切后, 转录两种产物: 跨膜型和分泌型 Klotho 蛋白。研究显示, 跨膜型 Klotho 蛋白相对分子质量为 130×10^3 , 全长编码 1 014 个氨基酸, 该蛋白包含 1 个 N-末端信号序列, 1 个单跨膜螺旋区域, 1 个胞内区域和 1 个胞外区域^[8]。单跨膜螺旋区域贴近 C-末端, 胞外区域又分为 2 个固有的重复序列 KL1 和 KL2, 中间又存在 1 个短的延伸基础氨基酸序列(赖氨酸-赖氨酸-精氨酸-赖氨酸)。研究还表明, 血液中分泌的 Klotho 蛋白可作为调节各种靶器官的激素, 对心血管系统有保护作用^[9-12]。Klotho 蛋白对血管内皮细胞具有抗氧化应激, 抗炎和抗细胞凋亡作用。

本研究采用病毒载体系统将目的基因导入靶细胞。研究显示, 导入系统不依赖于宿主细胞基因组整合的基因递送载体^[13], 为基因转导提供了若干优点, 主要是避免插入诱变和位置效应异常。然而, 除非设计用于复制和分离, 否则非整合载体将在增殖细胞中逐渐稀释, 并且不能免除表观遗传效应。这些用于编辑细胞基因组的方法还允许将表达盒靶向整合到“安全港”, 例如 19 号染色体上的 AAVS1 位点或内源基因座。为了实现这点, 表达盒必须侧接核酸酶切位点周围的 DNA 以指导同源修复并且还可以有效递送, 例如用非整合的慢病毒载体^[14]。目前, 腺病毒载体作为广泛使用的病毒载体之一, 血清 5 型腺病毒运用最广, 它具有安全性高、免疫原性低、感染效率高、宿主广泛、能介导基因的长期稳定表达、所制备的病毒滴度高、高效转导目的基因、物理性质稳定、不整合入宿主细胞基因组、致病性低的优点, 且具有分别转染静息期及分裂期细胞, 对各种细胞和组织亲嗜性差异等特点^[15]。因此, 腺病毒载体可以广泛应用于各领域基因治疗, 故本研究根据其特点选用 5 型腺病毒作为载体进行目的基因重组。

本研究使用的 AdMaxTM 腺病毒载体系统在 HEK293 细胞中, 经 Cre 酶催化, 产生的催化效率较前大大提高。ST GEORGE 等^[16]对腺病毒载体的研究结果显示: 目的基因不超过 8 kb, 几乎全部重组腺病毒都能够有效携带, 并在细胞中稳定表达、产率高。除此之外, 与其他启动子相比, 本研究所使用的 mC-MV 启动子作用更强, 目的基因能够高水平表达, 并且所构建的穿梭质粒中携带 EGFP 基因, 能够在荧光显微镜下直观评估重组腺病毒转染 HEK293 情况和感染细胞扩增效率情况。

本研究证明, 已获得 2×10^{10} Tu/mL 的高滴度重组腺病毒载体 Ad-EGFP-Klotho, 该重组腺病毒载体含有目的基因 Klotho, 可高表达 EGFP, 能够满足后续研究, 甚至为临床研究提供了研究依据。

参考文献

- [1] KURO-O M, MATSUNURA Y, AIZAWA H, et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing[J]. *Nature*, 1997, 390(6655): 45-51.
- [2] KURO-O M. The klotho proteins in health and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(1): 27-44.
- [3] ZHOU X, FANG X, JIANG Y, et al. Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 37-46.
- [4] XIE J, CHA S K, AN S W, et al. Cardio-protection by Klotho through down-regulation of TRPC6 channels in the mouse heart[J]. *Nat Commun*, 2012, 4(3): 1238-1259.
- [5] 扈江伟, 王军, 徐曼, 等. 重组腺病毒载体 Ad5-hTRX-EGFP 的构建及其表达[J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(3): 744-748.
- [6] SHIRAKI-IIDA T, AIZAWA H, MATSUMURA Y, et al. Structure of the mouse Klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein [J]. *FEBS Lett*, 1998, 424(1/2): 6-10.
- [7] SAITO Y, KUROO M, NABESHIMA Y, et al. The protective role of Klotho gene on vascular endothelium [J]. *Nippon Rinsho*, 1999, 57(7): 1514-1518.
- [8] LIM K, LU T S. Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23 clinical perspective [J]. *Circulation*, 2012; 125(18): 2243-2255.
- [9] CUI W, LENG B, WANG G. Klotho protein inhibits H₂O₂-induced oxidative injury in endothelial cells via regulation of PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 21: 1-7.
- [10] KIM J H, XIE J, HWANG K H, et al. Klotho may ameliorate proteinuria by targeting TRPC6 channels in podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(1): 140-151.
- [11] HU M C, SHI M, ZHANG J, et al. Renal production, uptake, and handling of circulating Klotho [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(1): 79-90.
- [12] LU X, HU M C. Klotho/FGF23 Axis in chronic kidney disease and cardiovascular disease [J]. *Kidney Dis*, 2017, 3(1): 15-23.
- [13] ATHANASOPOULOS T, MUNYE M M, YÁÑEZ-MUÑOZ R J. Nointegrating gene therapy vectors [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2017, 31(5): 753-770.
- [14] GENOVESE P, SCHIROLI G, ESCOBAR G, et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2014, 510(7504): 235-240.
- [15] STELLBERGER T, KOEHLER N, DINKELMEIER A, et al. Strategies and methods for the detection and identification of viral vectors [J]. *Virus Genes*, 2017, 53(5): 749-757.
- [16] ST GEORGE J A. Gene therapy progress and prospect: adenoviral vectors [J]. *Gene Therapy*, 2003, 10(14): 1135-1141.