

Ets-1 重组腺病毒的构建与活性鉴定

徐 辰, 韩 晓*

(南京医科大学江苏省人类功能基因组重点实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建小鼠成红细胞白血病病毒 E26 癌基因同系物 1 (V-Ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, Ets-1) 重组腺病毒, 并验证其对小鼠原代胰岛及胰岛 β 细胞系 INS-1 的感染活性和 Ets-1 蛋白表达活性。方法: 以小鼠胰岛 β 细胞系 MIN6 的 cDNA 为模板, PCR 扩增 Ets-1 基因的编码区序列(coding sequence, CDS)区, 纯化后经限制性内切酶切割和连接反应插入到 pAdTrack-CMV 穿梭质粒上, 构建成 pAdTrack-CMV-Ets-1 质粒。将该质粒与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组, 鉴定出阳性克隆。扩增并抽提阳性克隆质粒, 用 *Pac* I 酶切线性化后转染 293A 细胞, 经包装得到 AdV-Ets-1 重组腺病毒。相应对照病毒 AdV-GFP 由相同方法构建。腺病毒经纯化后, 感染小鼠原代胰岛及 INS-1 细胞, 并用 Western blot 检测 Ets-1 蛋白表达水平。结果: 腺病毒构建成功, 并具有高感染率及高蛋白表达能力。结论: 成功构建了小鼠 Ets-1 腺病毒, 为进一步研究 Ets-1 基因在原代胰岛中的功能提供基础。

[关键词] Ets-1; 腺病毒; 胰岛 β 细胞

[中图分类号] R394.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1436-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141038

Mouse Ets-1 recombinant adenovirus construction and identification

Xu Chen, Han Xiao*

(Jiangsu Province Key Lab of Human Functional Genomics, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a recombinant adenovirus that express mouse Ets-1 in primary cultured mouse islets. **Methods:** To generate pAdTrack-CMV-Ets-1 shuttle vector, the CDS region of Ets-1 was amplified by PCR, and then purified and cloned into the pAdTrack-CMV. pAdTrack-CMV-Ets-1 was recombined with back-bone pAdEasy-1 in BJ5183 bacteria. The resulting vector was transfected into QBI-293A cells to generate recombinant adenovirus. After been amplified and purified, the recombinant adenovirus were used to infect primary cultured mouse islets and INS-1 cells. The protein levels of Ets-1 were determined by Western blotting assay. **Results:** The Adv-Ets-1 was established successfully and proved to be high infective and possess a high expression potential. **Conclusion:** The Ets-1 recombinant adenovirus was successfully constructed, which provided a foundation for further study of the function of Ets-1 in primary islets.

[Key words]

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10): 1436-1440]

转录因子 Ets-1 是 Ets 家族的成员。Ets-1 通过其保守的 DNA 结合区域 ETS domain, 特异性地识别并结合下游靶基因启动子区域的核心靶向序列 GGAA/T^[1-2], 从而参与转录调控。Ets-1 广泛表达于全身各系统或组织, 如造血系统、脉管系统、神经系统、卵巢组织和胰腺组织。Ets-1 具有多样的生物学功能, 包括促进血管发生和发育、心脏发育以及维

持 T/B 淋巴细胞的生存及成熟等^[3-5]。Ets-1 在胰岛 β 细胞中的作用鲜有报道^[6]。本课题组前期研究发现, 在胰岛 β 细胞系 RINm5F 细胞中过表达 Ets-1 能促进环加氧酶 2(COX-2)基因的转录。由于 COX-2 是细胞合成前列腺素 E2(PGE2)的限速酶, 它的表达升高能显著降低胰岛 β 细胞高糖刺激的胰岛素分泌功能(GSIS function)^[7-8], 提示 Ets-1 在胰岛 β 细胞功能障碍中起重要作用。腺病毒载体具有高滴度、低毒性的特点, 被广泛用作将外源基因导入原代细胞或活体动物组织的载体。为了进一步研究 Ets-1 在原代

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130013)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hanxiao@njmu.edu.cn

胰岛和体内所发挥的生物学作用,我们构建了 Ets-1 重组腺病毒作为 Ets-1 基因的表达载体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

C57BL/6 小鼠(8 周龄)购自南京大学模式动物研究所;Ets-1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。穿梭载体 pAdTrack-CMV、腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1、BJ5183 菌种与 QBI-293A 细胞株由南京大学宁文教授馈赠;小鼠 Ets-1 基因 CDS 区特异性扩增引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;Primer Star DNA 聚合酶、*Bgl* II 和 *Sal* I 限制性内切酶以及 T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Pac* I 和 *Pme* I、小牛肠碱性磷酸酶(CIP)购自美国 NEB 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;DNA 凝胶回收试剂盒与 PCR 清洁试剂盒购自美国 Axygen 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;病毒纯化试剂盒购自美国 Cell Biolabs 公司。

1.2 方 法

1.2.1 穿梭质粒的构建^[9]

以小鼠 Ets-1 基因的 CDS 区为模板,设计并合成 PCR 扩增引物,并在上下游引物 5' 端分别加入 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切序列。上下游引物序列分别为 5'-GAAGATCTATGAAGCGGCCGTCGATC-3' 和 5'-ACGCGTCGACCTAGTCAGCATCCGGC-3'。利用高保真 DNA 聚合酶 Primer Star 进行体外 PCR 扩增,得到的目的片段经琼脂糖凝胶电泳分离,并用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化。纯化后的目的片段与 pAdTrack-CMV 同时用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切(37℃, 8 h),酶切产物经 PCR 清洁试剂盒纯化,并由 T4 DNA 连接酶连接(16℃,12 h)。将连接产物转化入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞后,将感受态细胞涂布于卡那霉素抗性(50 μ g/ml)LB 琼脂培养基上,倒置培养 16 h。挑取中等大小的单克隆菌落至卡那霉素抗性(50 μ g/ml)的液体 LB 培养基中,37℃振荡培养 12 h 以扩增细菌。收集菌体,用碱裂解法提取质粒,对质粒进行酶切鉴定。阳性克隆经测序验证,即构建成穿梭质粒 pAdTrack-CMV-Ets-1。

1.2.2 质粒重组

首先制备含 pAdEasy-1 病毒骨架质粒的 BJ5183 感受态细胞。具体操作为:将 pAdEasy-1 转化入 BJ5183 感受态细胞。将转化后的感受态细胞涂布于氨苄青霉素抗性(100 μ g/ml)的 LB 琼脂培养基上,于 37℃倒置培养 12 h。挑取单克隆菌落至

氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中,于 37℃振荡培养 12 h,收集菌体用于制备含 pAdEasy-1 病毒骨架质粒的 BJ5183 感受态细胞。

用 *Pme* I 内切酶对 pAdTrack-CMV-Ets-1 或 pAdTrack-CMV 穿梭质粒进行酶切线性化,然后用 CIP 酶对线性化的片段进行 1 h 的去磷酸化处理。将这两种线性化的片段清洁纯化,并分别转化入上述含有 pAdEasy-1 病毒骨架质粒的 BJ5183 感受态细胞中。将转化后的细胞涂布于卡那霉素抗性的 LB 琼脂培养基上,37℃倒置培养 16 h。在此期间,穿梭质粒 pAdTrack-CMV-Ets-1 与病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在 BJ5183 中重组。

挑取单克隆菌落,扩增后用质粒小量制备试剂盒抽提质粒。重组阳性的质粒经 *Pac* I 酶切和琼脂糖凝胶电泳后,应得到 1 条 30 kb 左右的大片段和 1 条 3.0 kb 或者 4.5 kb 的小片段。

1.2.3 病毒包装与扩增

转染前 1 d 将 293A 细胞接种于 6 cm 细胞培养皿,第 2 天细胞密度达到 80%~90% 时进行转染。将重组性质粒用 *Pac* I 酶切线性化,并用酚氯仿抽提纯化。取 12 μ g 酶切片段转染 293A 细胞,并在转染 4 h 后更换含 5% FBS 的 DMEM 培养液继续培养以进行原代病毒包装。此后,每隔 2~3 d 补加 1 ml 培养液。病毒包装需要 10 d 左右,当细胞约有 80% 发生病变时,表示原代病毒包装完成。收集含有病毒颗粒的 293A 细胞,重悬于 PBS,在 -80℃ 与 37℃ 之间反复冻融 3 次,使细胞中的病毒颗粒释放。细胞裂解物于 4℃ 以 12 000 *g* 离心 30 min 以除去细胞碎片。收集含病毒颗粒的上清,于 -80℃ 保存。

用原代病毒感染 293A 细胞以扩增得到第 2 代病毒,以此类推,直到扩增得到第 4 代病毒以用于感染原代胰岛或细胞。

1.2.4 病毒纯化

使用病毒纯化试剂盒 ViraBind™ Adenovirus Purification Kit 进行病毒纯化,并将纯化的浓缩病毒小量分装,于 -80℃ 保存。

1.2.5 感染复数(multiplicity of infection,MOI)的测定

MOI 是感染时病毒与细胞的比值。测定 MOI 的步骤如下:将 293A 细胞接种于 24 孔板,使其第 2 天密度达到 80%~90%。感染病毒前取 3 孔细胞进行细胞计数,取平均值作为每孔的细胞数;将纯化的病毒以 1:100~1:5 000 用含 5% FBS 的 DMEM 培养液稀释,感染 293A 细胞;细胞在 72 h 完全病变所对应的病毒感染复数即为 10~20 MOI,根据每孔的细胞

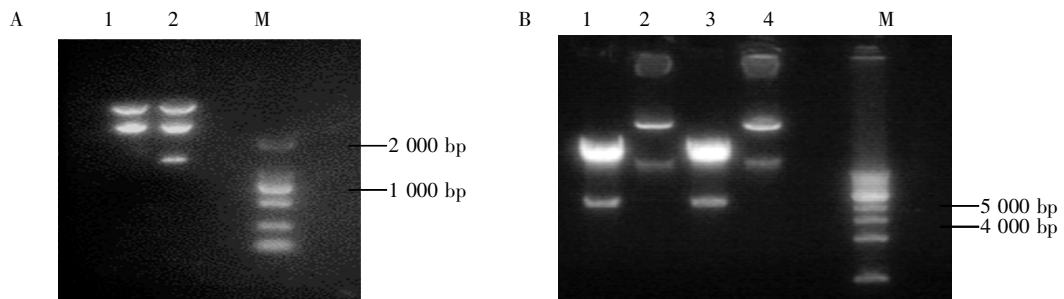
数以及病毒稀释倍数即可算出病毒母液的 MOI。

2 结果

2.1 重组 Ad-Ets-1 质粒的构建与鉴定

空载 pAdTrack-CMV 经 *EcoR* I 与 *Bgl* II 双酶切后得到 2 800 bp 的片段, 而重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-Ets-1 经酶切后得到 1 100 bp 与 2 800 bp 2 条片段(图 1A), 证明 pAdTrack-CMV-Ets-1 质粒构建成功。接下来将 pAdTrack-CMV-Ets-1/pAd-

Track-CMV 质粒转化入含有 pAdEasy-1 病毒骨架质粒的 BJ5183 感受态细胞, 使 pAdTrack-CMV-Ets-1/pAdTrack-CMV 与 pAdEasy-1 在 BJ5183 细菌中进行同源重组。重组阳性质粒用 *Pac* I 酶切后, 应得到 1 条 30 kb 左右的大片段和 1 条 3.0 kb (或者 4.5 kb, 与同源重组方式有关) 的小片段, 如图 1B 第 1、3 泳道所示。2、4 泳道分别为 Ad-Ets-1/ Ad-GFP 质粒未使用 *Pac* I 酶切对照。通过以上实验, 得到了重组 Ad-Ets-1 质粒。



A: pAdTrack-CMV-Ets-1 质粒经 *EcoR* I 与 *Bgl* II 双酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性 pAdTrack-CMV-Ets-1 质粒; 1: 经双酶切的 pAdTrack-CMV; 2: 经双酶切的 pAdTrack-CMV-Ets-1; M: DL2000 Marker; B: pAdTrack-CMV-Ets-1 与 pAdEasy-1 的同源重组产物经 *Pac* I 酶切后, 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性 Ad-Ets-1 质粒; 1: 经 *Pac* I 酶切的 Ad-Ets-1 质粒; 2: Ad-Ets-1 质粒; 3: *Pac* I 酶切 Ad-GFP; 4: Ad-GFP; M: 1 kb Marker。

图 1 重组 Ad-Ets-1 质粒的鉴定

Figure 1 Identification of recombinant plasmid Ad-Ets-1

2.2 重组腺病毒的包装

为了进行重组腺病毒的包装, 需将 *Pac* I 线性化的重组 Ad-Ets-1 质粒转入 293A 细胞, 其对照 Ad-GFP 也采用相同处理。病毒在 293A 细胞中包装 10 d 后, 可以明显观察到细胞病变, 即细胞圆缩、脱落; 并且细胞在荧光显微镜下可以观察到大量的绿色荧光, 说明腺病毒正进行大量复制及包装。

2.3 重组腺病毒感染效率的观察及 Ets-1 蛋白表达效率的验证

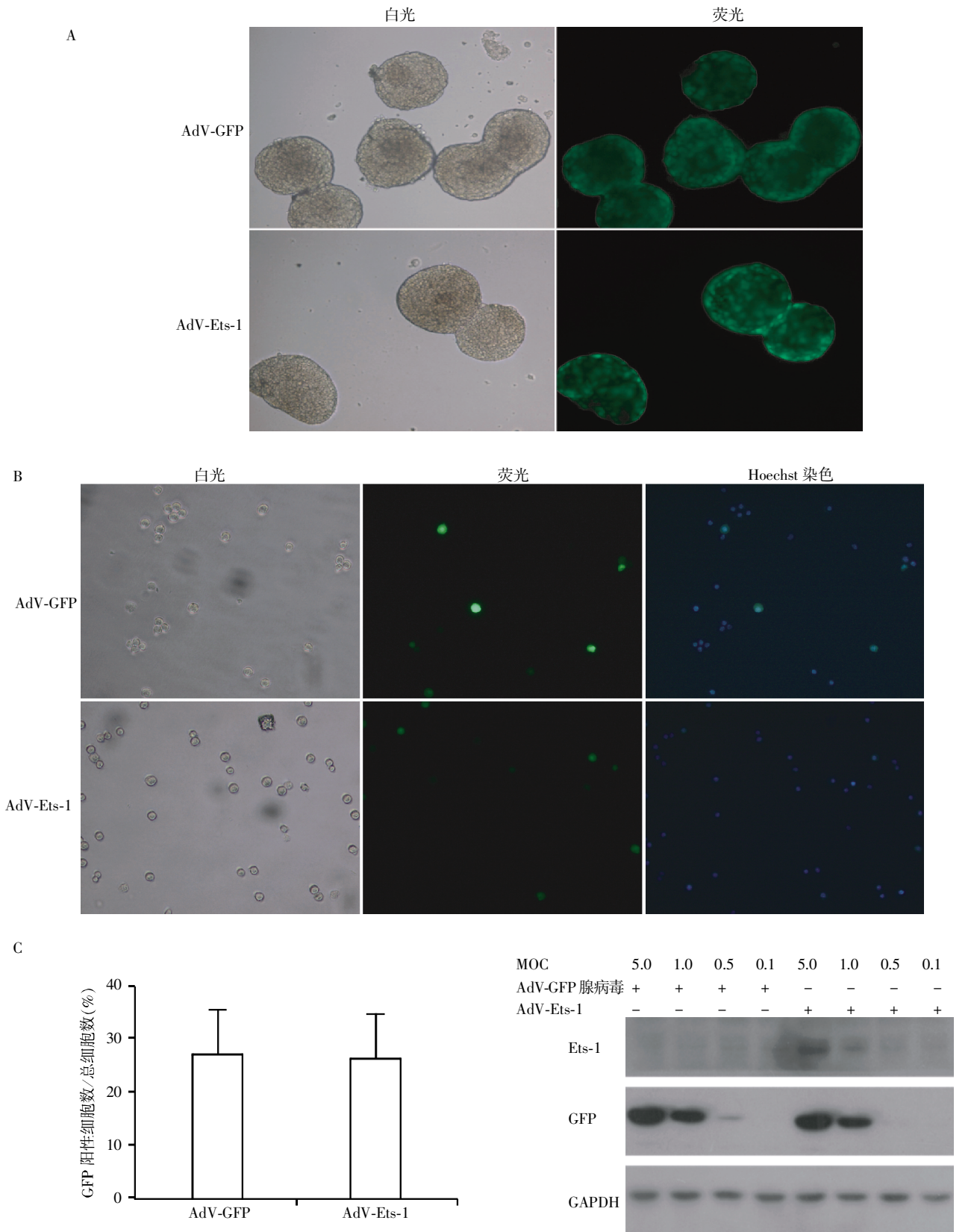
分离纯化的小鼠胰岛是颜色微黄、大小不一、圆形或椭圆形的细胞团, 且具有完整的包膜。用 30 MOI 的重组腺病毒 AdV-Ets-1 和对照病毒 AdV-GFP 感染小鼠原代胰岛, 24 h 后在荧光显微镜下观察其感染情况(图 2A), 从图中可以看出, 感染病毒后, 小鼠原代胰岛包膜完整, 说明所构建的重组腺病毒 AdV-Ets-1 毒性低。接着, 消化感染后的小鼠原代胰岛并制备单细胞悬液。在荧光显微镜下对细胞悬液中的 GFP 阳性细胞进行计数, 并以 Hoechst 染色来计算总细胞个数。结果发现(图 2B)分别用这 2 种病毒感染胰岛, 其 GFP 阳性细胞数与总细胞数的比值均为 30% 左右, 说明所构建的重组腺病毒 AdV-Ets-1 与对照病毒有着相近的感

染效率。用低滴度的病毒感染 INS-1 细胞系, 24 h 后裂解细胞, 离心并收集细胞裂解物上清, 将此上清用 Western blot 验证 Ets-1 表达效率(图 2C), 相比于 AdV-GFP 感染对照, 在 1 MOI 的 AdV-Ets-1 病毒感染条件下就可看出明显的 Ets-1 蛋白条带, 说明低滴度的腺病毒就可过表达 Ets-1 蛋白。

3 讨论

Ets-1 作为 ETS 转录因子家族成员, 具有多种生物学功能^[10-13]。本实验室前期试验发现过表达 Ets-1 能促进 COX-2 的转录活化, 从而影响胰岛素的分泌^[14]。鉴于 Ets-1 有着众多的生物学功能, 在细胞系或者原代细胞过表达 Ets-1 是研究 Ets-1 功能常用的方法之一, 但常规转染方法(如磷酸钙法、人工脂质体法等)在原代细胞中转导外源基因效率并不是十分理想, 阻碍了关于 Ets-1 在原代细胞中的作用的进一步研究。因此, 为了提高外源基因转导的效率, 本实验构建了 Ets-1 重组腺病毒。

腺病毒是一种大分子(36 kb)双链无包膜 DNA 病毒^[15]。腺病毒载体系统可广泛用于表达人源或者非人源蛋白。相对于逆转录病毒, 腺病毒不仅能够感染增殖细胞, 也可感染非增殖细胞和大多数动物



A: AdV-GFP 和 AdV-Ets-1 腺病毒感染小鼠胰岛, 24 h 后荧光显微镜下观察小鼠胰岛形态($\times 100$); B: 将感染病毒 24 h 后的小鼠原代胰岛消化成单细胞悬液, 并用 Hoechst 进行染色, 在荧光显微镜下观察并计算 GFP 阳性细胞比例; C: 不同 MOI 的 AdV-GFP 和 AdV-Ets-1 分别感染 INS-1 细胞, Western blot 检测 Ets-1 的蛋白表达水平。

图 2 重组腺病毒感染效率的观察及 Ets-1 蛋白表达活性验证

Figure 2 Transfection efficiency of recombinant adenovirus and protein expression activity of Ets-1

细胞和组织。而且腺病毒滴度高,不整合到染色体,不会干扰其他宿主基因的表达。更值得一提的是,70%~80%成人体内都有腺病毒抗体存在,对人类致病性低,所以也广泛用于基因治疗。本文采用了第三代腺病毒,该腺病毒由于缺失全部的腺病毒蛋白编码序列,因此病毒的细胞毒性和免疫原性大幅减弱,而且该病毒没有改变病毒的外壳包装蛋白,保留了腺病毒天然的高感染性。

本文所构建的重组腺病毒自带绿色荧光蛋白(GFP),易于观察病毒感染效率。我们使用重组腺病毒感染小鼠胰岛 24 h 后便可使部分细胞感染,并且没有改变小鼠胰岛的形态,说明所构建的重组腺病毒毒性低,避免了对后续实验结果的影响;而且构建的腺病毒感染效率高,解决了常规转染方法在原代胰岛中转染效率低下的问题。并且,在使用低滴度病毒感染细胞系的情况下,Ets-1 重组腺病毒也具有相当高的表达效率。因此,本文所构建的 Ets-1 重组腺病毒对进一步研究 Ets-1 的功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future[J]. *Oncogene*, 2000, 19(55): 6533-6548
- [2] Lim JH, Cho JY, Park YB, et al. ESE-3 transcription factor is involved in the expression of death receptor (DR)-5 through putative Ets sites[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350(3): 736-741
- [3] Mattot V, Vercamer C, Soncin F, et al. Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organization into capillary-like structures[J]. *Oncogene*, 2000, 19(6): 762-772
- [4] Bories JC, Willerford DM, Drevin D, et al. Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene[J]. *Nature*, 1995, 377(6550): 635-638
- [5] Ye M, Coldren C, Liang X, et al. Deletion of ETS-1, a gene in the Jacobsen syndrome critical region, causes ventricular septal defects and abnormal ventricular morphology in mice[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(4): 648-656
- [6] Du ZJ, Kamei M, Suzuki M, et al. Coordinated expression of Ets-1, pERK1/2, and VEGF in retina of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Ophthalmic Res*, 2007, 39(4): 224-231
- [7] Zhang X, Zhang J, Yang X, et al. Several transcription factors regulate COX-2 gene expression in pancreatic beta-cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2007, 34(3): 199-206
- [8] Fujimoto J, Aoki I, Toyoki H, et al. Expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine endometrium during the menstrual cycle[J]. *J Biomed Sci*, 2003, 10(3): 320-327
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1993: 34
- [10] Mathew SO, Vaidya SV, Kim JR, et al. Human natural killer cell receptor 2B4 (CD244) down-regulates its own expression by reduced promoter activity at an Ets element[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(2): 483-487
- [11] Behrens P, Rothe M, Wellmann A, et al. The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer[J]. *J Pathol*, 2001, 194(1): 43-50
- [12] Naito S, Shimizu K, Nakashima M, et al. Overexpression of Ets-1 transcription factor in angiosarcoma of the skin[J]. *Pathol Res Pract*, 2000, 196(2): 103-109
- [13] Vairaktaris E, Goutzaris L, Kalokerinos G, et al. Diabetes increases both N-ras and Ets-1 expression during rat oral oncogenesis resulting in enhanced cell proliferation and metastatic potential[J]. *In Vivo*, 2007, 21(4): 615-621
- [14] Meng ZX, Sun JX, Ling JJ, et al. Prostaglandin E2 regulates Foxo activity via the Akt pathway; implications for pancreatic islet beta cell dysfunction[J]. *Diabetologia*, 2006, 49(12): 2959-2968
- [15] Breyer B, Jiang W, Cheng H, et al. Adenovira vector-mediated gene transfer for human gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2001, 1(2): 149-162

[收稿日期] 2014-06-11