

• 基础实验研究论著 •

大鼠组织激肽释放酶 8 重组腺病毒载体的构建及鉴定

曹步清, 刘铁牛

(中国人民解放军第三〇三医院检验科, 广西南宁 530021)

摘要:目的 构建大鼠组织激肽释放酶 8(KLK8)的腺病毒表达载体,为进一步研究 KLK8 对心肌细胞的作用提供实验基础。方法 采用 AdEasy 系统构建携带外源性 KLK8 编码基因的重组腺病毒载体 pAd-KLK8,转染 AD-293 细胞包装产生重组腺病毒 Ad-KLK8,TCID₅₀ 法对收获病毒进行滴度鉴定,RT-PCR 及 Western-blot 方法检测目的基因在 HeLa 细胞的表达。结果 PCR、序列测定以及限制性酶切证实 KLK8 基因正确插入腺病毒表达载体,并在 AD-293 细胞中包装出重组腺病毒;收获病毒的滴度为 3.16×10^{12} IU/mL。结论 成功构建 pAd-KLK8 重组腺病毒表达载体,且重组腺病毒在 HeLa 细胞能有效表达。

关键词:组织激肽释放酶 8; 腺病毒载体; 逆转录聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)18-2355-03

Construction and identification of a recombinant adenovirus vector KLK8

Cao Bqing, Liu Tieniu

(Department of Clinical Laboratory, the 303 Hospital of PLA, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: **Objective** To construct recombinant adenovirus expression vector containing rat KLK8 and provide a base for investigating the function of KLK8 on myocardial cells. **Methods** The recombinant adenovirus vector pAd-KLK8 carrying KLK8 was constructed with AdEasy system and then transfected AD-293 cells to produce recombinant adenovirus Ad-KLK8. TCID₅₀ was used to measure the virus titers. The expression of target gene in HeLa was tested by RT-PCR and Western-blot. **Results** It was confirmed by PCR, sequencing identification and restrictive analysis that the target gene was cloned correctly to the shuttle plasmid. The titer of the recombinant adenovirus was 3.16×10^{12} IU/mL. **Conclusion** Recombinant adenovirus vector is constructed successfully and recombinant adenovirus Ad-KLK8 can efficiently expressed in HeLa.

Key words: Kallikrein 8; recombinant adenoviral vector; reverse transcriptase polymerase chain reaction

组织激肽释放酶(KLK)是存在于心血管系统中重要的血管活性物质,并且是由多个成员(KLK1~KLK15)组成。目前组织激肽释放酶对心血管作用的研究主要集中在 KLK1(即经典组织激肽释放酶),表明 KLK1 对心脏具有抗缺血-再灌注损伤、抗心肌细胞凋亡^[1]和抗心肌细胞肥大^[2-3]等保护作用。KLK8 是组织激肽释放酶家族成员之一,其基因结构与 KLK1 具有很大的相似性^[4]并且在心脏组织中也有表达^[5],然而 KLK8 是否具有与 KLK1 类似的心血管活性作用至今仍未阐明。本研究旨在将外源性 KLK8 编码基因插入腺病毒载体中构建重组腺病毒载体,经 AD-293 细胞包装获得可高效转录表达 KLK8 的重组腺病毒,为探讨外源性 KLK8 表达对心肌细胞的作用奠定良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 DNA 分子量 Marker、限制性内切酶 Xho I 和 EcoR V、DNA 聚合酶、T4 DNA ligase 为大连宝生物(Takara)工程公司产品;限制性核酸内切酶 Pac I 和 Pme I 为美国 NEB 公司产品。大肠杆菌 E. coli DH-5α 为北京博大泰克生物技术公司产品。腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV, E1 区和 E3 区缺失的复制缺陷 5 型腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1、BJ5183、人宫颈癌细胞系 HeLa 和 AD-293 细胞均由上海长海医院心内科实验室提供。预染蛋白 Maker 为 Fermentas 公司产品, KLK8 多克隆抗体为 Santa-cruz 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的 PCR 扩增 大鼠 KLK8-mRNA 序列全长根据 GeneBank 由南京 Genescript 公司合成,结合 pShuttle-CMV 载体的多克隆位点,采用 Primer 5.0 软件设计扩增

KLK-8 mRNA 的特异性引物;并分别在两条引物中的 5' 端引入 Xho I 和 EcoR V 酶切位点以及保护性碱基。上游引物序列为:5'-TAG-CTC GAG-ATG GGA CGC CCC CCA CC-3', 下游引物序列为:5'-TAA-GAT ATC-TCA GTC CCT CTT GCC C-3', 下划线部分为引入的酶切位点,扩增片段长度为 780 bp。反应体系为:5×buffer 10 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 4 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 聚合酶(2.5 U/μL) 0.5 μL, KLK-8 mRNA(10 pg/μL) 1 μL, 无菌去离子水补至 50 μL。PCR 扩增条件为:95℃ 5 min 热启动; 95℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环。取全部扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶自动成像系统紫外灯下可见约 780 bp 的条带,将该条带切下并按照 Axygen DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行操作进行回收纯化。

1.2.2 重组穿梭质粒的构建及鉴定 分别用限制性内切酶 XhoI 和 EcoR V 双酶切回收纯化的基因片段和穿梭载体 pShuttle-CMV,并在 T4 DNA ligase 作用下以摩尔比 10:1 进行连接。应用 1×TSS 法,将上述连接产物转化新鲜制备的 E. coli DH-5α 感受态细菌,取转化菌涂布于含卡那霉素的 LB 琼脂平板,37℃ 培养 16 h。然后,从转化菌平板上挑取 6~10 个生长良好的单个菌落接种至 5 mL 含卡那霉素的 LB 培养液中,37℃ 摇床中振荡培养 18 h,取 1.5 mL 培养液按质粒抽提试剂盒操作步骤提取质粒。将所提质粒使用限制性内切酶 XhoI 和 EcoR V 进行双酶切电泳鉴定;同时,鉴定为阳性的质粒菌液送往上海杰李生物技术公司进行测序鉴定,核酸测序结果表明,插入的 KLK8 序列与 GeneBank 中序列完全一致,构建成功的质粒命名为 pShuttle-CMV-KLK8。

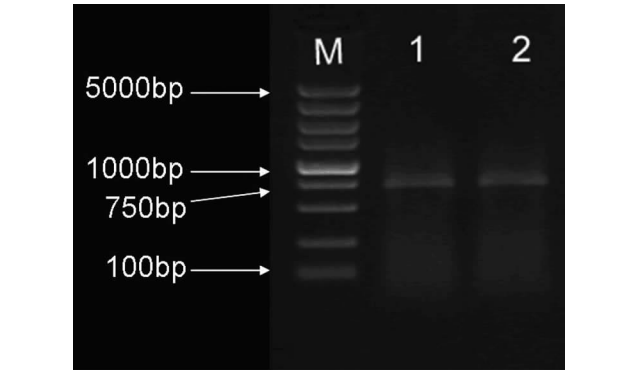
1.2.3 重组腺病毒载体的构建 用限制性内切酶 Pme I 将 pShuttle-CMV-KLK8 酶切线性化,随后与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组。从平板上挑取单个克隆转入含卡那霉素的 LB 培养液中振荡培养 18 h,提取质粒,进行 Pac I 酶切鉴定,经鉴定为阳性的重组子命名为 pAd-KLK8。

1.2.4 腺病毒包装和滴度测定 将提取的重组腺病毒质粒 pAd-KLK8 用限制性内切酶 Pac I 酶切线性化,酶切产物纯化后,脂质体法将 pAd-KLK8 转染入 AD-293 细胞包装重组腺病毒。采用腺病毒感染滴度 (TCID₅₀) 法测定所获腺病毒滴度,并计算病毒滴度。

1.2.5 KLK-8 基因及蛋白表达检测 取 2.5 μL 重组腺病毒液感染 Hela 细胞,3 d 后约 90% 的细胞观察到细胞毒性反应 (变圆、脱落) 时收集细胞,按 Invitrogen 公司 TRIzol Reagent 说明书提取 Hela 细胞总 RNA,RT-PCR 检测 KLK-8 mRNA 的表达。同时提取重组腺病毒液感染后的 Hela 细胞总蛋白进行 Western blot 以检测目的基因蛋白的表达。

2 结 果

2.1 KLK-8 编码基因的鉴定 采用 PCR 方法扩增合成好的 KLK-8 mRNA 全长并在上下游加上 Xho I 和 EcoR V 酶切位点,可在约 780 bp 处观察到特异性扩增条带,与理论预计值相符且测序后与 GenBank 报道的 KLK8 编码序列完全一致。见图 1。内切酶 Xho I 和 EcoR V 双酶切重组质粒 pShuttle-CMV-KLK8,电泳后可观察到长约 7.5 kb 的载体片段和长 780bp 的目的基因片段,表明目的基因片段成功插入表达载体。见图 2。鉴定为阳性的质粒菌液还进行测序鉴定,核酸测序结果表明,插入的 KLK-8 序列与 GeneBank 中序列完全一致,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。



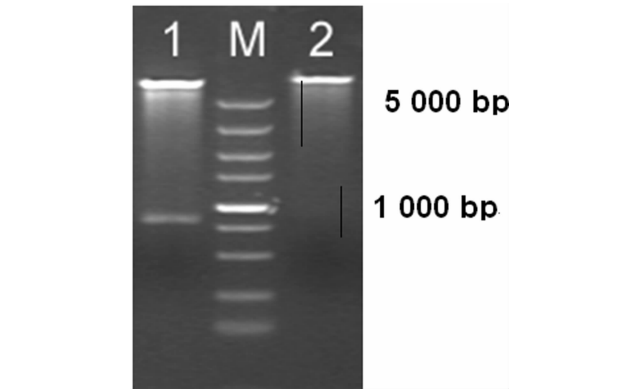
M: DL5000 DNA 标记物;1,2: 大鼠 KLK8 mRNA PCR 扩增产物。

图 1 大鼠 KLK-8 mRNA 全长 PCR 扩增产物

2.2 重组腺病毒载体 pAd-KLK8 鉴定 重组腺病毒载体 pAd-KLK8 经限制性内切酶 Pac I 酶切,琼脂糖凝胶电泳可观察到长 4.5kb 和 30kb 左右的两条带,结果提示穿梭质粒 pShuttle-CMV-KLK8 和骨架质粒 pAdEasy-1 的重组发生在 ori 与右臂之间。见图 4。

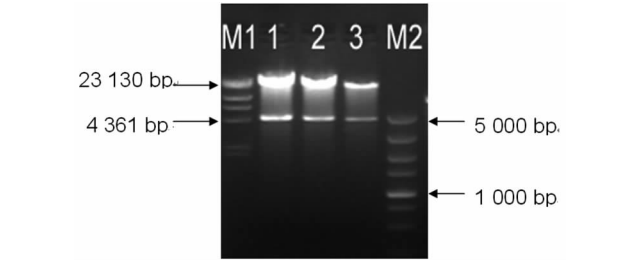
2.3 重组腺病毒的包装 质粒 pAd-KLK8 经 Pac I 酶切线性化后,用脂质体法转染 AD-293 细胞,转染 5 d 后细胞开始变圆、脱落,第 10~14 天约 80% 的细胞出现毒性反应时收获细胞,反复冻融 3 次后离心除去细胞碎片,取上清继续感染 AD-293 细胞以扩增病毒,2 d 后细胞内开始出现变圆、脱落并逐渐增多,说明包装出的重组腺病毒具有感染性且在细胞内不断增殖。重复上述过程 3~4 次即可获得大量具有稳定感染性的重

组腺病毒,所获病毒命名为 Ad-KLK8,经检测病毒滴度为 3.16×10^{12} IU/mL。



M: DL5000 DNA 标记物;1: 双酶切处理的重组质粒 pShuttle-CMV-KLK8;2: pShuttle-CMV-KLK8。

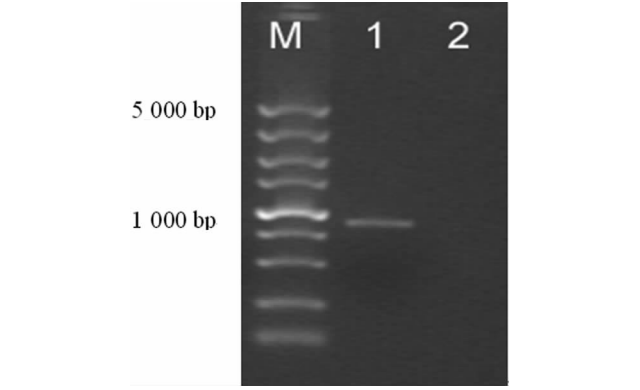
图 2 重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-KLK8 的鉴定



M1: λ/HindIII DNA 标记物;1,2,3: Pac I 酶切 pAd-KLK8;M2: DL5000 DNA 标记物。

图 4 重组腺病毒质粒 pAd-KLK8 的鉴定

2.4 RT-PCR 检测 提取经重组腺病毒感染的 Hela 细胞总 RNA,RT-PCR 可扩增出大小约 780 bp 的片段,与目的片段大小一致;而未感染腺病毒的 Hela 细胞此条带相对较弱。见图 5。Western-blot 结果显示,感染腺病毒的 Hela 细胞 KLK8 蛋白表达量明显增加,可见相对分子质量约 34×10^3 的特异性条带,符合理论值,表明重组腺病毒 Ad-KLK8 感染 Hela 细胞后可以表达出具有抗原活性的 KLK8 蛋白。见图 6。



M: DL5000 DNA 标记物;1: Ad-KLK8 感染 Hela 细胞后;2: 未感染腺病毒的 Hela 细胞。

图 5 RT-PCR 检测 Hela 细胞中 KLK-8 的表达

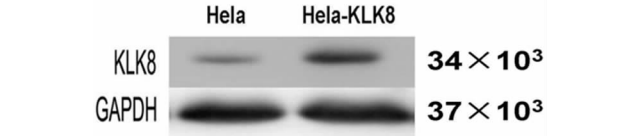


图 6 Ad-KLK8 在 Hela 细胞的蛋白表达鉴定

3 讨 论

组织激肽释放酶-激肽系统(KKS)是动物体多种组织中广泛存在的生物活性物质,包括激肽释放酶原、激肽释放酶、激肽原、激肽和激肽受体。激肽释放酶以激肽原酶原的形式在组织中合成,再经胰蛋白酶激活形成组织激肽释放酶。组织激肽释放酶是一组联系紧密的丝氨酸蛋白酶类,相对分子质量在 $(24\sim 45)\times 10^3$ 之间,等电点为 $3.5\sim 4.4$,大量存在于肾、胰腺、胃肠道黏膜及中枢神经系统等多种组织中,并可释放至血液循环,它可通过多种方式产生不同的生物学作用,参与多器官功能调节和多种病理生理过程,如心血管、肾脏和神经系统的调节,细胞增殖、炎症、凋亡等过程^[1],其活性能被抑肽酶或它的内源性抑制剂 kallistatin 所抑制^[6-7]。较早的研究一直认为 KLK 基因家族只有 3 个基因:KLK1、KLK2 和 KLK3。KLK1 对心血管、肾脏和中枢神经系统具有重要的保护作用,而 KLK2 和 KLK3(也称为前列腺特异性抗原,PSA)则被认为是前列腺癌的标志物。最新研究表明,组织激肽释放酶基因家族至少有 15 个基因组成(KLK1~KLK15),并且这 15 个激肽释放酶相关基因都处于 19q13.4 这条染色体上^[8]。

KLK8 是 KLK 家族成员之一,以往的研究表明,KLK8 可作为卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌等疾病的肿瘤标志物,对这些疾病的发展和预后起到一定的指导作用^[9-10];在癫痫及阿兹海默氏症等中枢神经系统损伤的疾病中,KLK8 表达增高^[11-12],提示 KLK8 在此过程中有一定作用,但具体机制尚未明确;同时,KLK8 基因结构与 KLK1 具有很大的相似性,那么它是否具有与 KLK1 相同心脏保护作用,这是一个非常有意义、值得深入研究的课题。

本实验成功构建了携带外源性 KLK8 基因的重组腺病毒表达载体,并在 AD-293 细胞中包装获得重组腺病毒 Ad-KLK8,应用 RT-PCR 及 Western-blot 鉴定结果表明 Ad-KLK8 重组腺病毒可在靶细胞中高效转录及表达蛋白,进一步为研究 KLK8 对心肌细胞作用奠定了实验基础。

参考文献

[1] Yin H,Chao L,Chao J. Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad. 14-3-3 signaling pathways[J]. J Biol Chem,2005,280(9):8022-8030.

(上接第 2354 页)

卫生出版社,2009:420-421.

[2] Onouchi S,Matsushita H. New method for colorectal cancer diagnosis Based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally Evacuated feces[J]. Anticancer Res,2008,28(1):145-150.

[3] Hewitson P,Glasziou P,Irwig L, et al. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult [J]. Cochrane Database Syst Rev,2007,24(1):CD001216.

[4] 林汉利,李俊达,王亚东,等. 不同年龄组大肠癌发病特点与病理分析[J]. 广东医学,2003,24(11):1191-1192.

[5] 翟志伟,顾晋. 肿瘤大小对结肠癌患者预后的影响[J]. 中华胃肠外科杂志,2012,15(5):495-497.

[6] Moffat P,Salois P,St-Amant N, et al. Identification of a conserved cluster of skin-specific genes encoding secreted proteins[J]. Gene, 2004,334(1):123-131.

[2] Silva JA,Jr. ,Araujo RC,Baltatu O, et al. Reduced cardiac hypertrophy and altered blood pressure control in transgenic rats with the human tissue kallikrein gene[J]. FASEB J, 2000, 14(13): 1858-1860.

[3] Li HJ, Yin H, Yao YY, et al. Tissue kallikrein protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy through kinin B2 receptor and glycogen synthase kinase-3beta activation[J]. Cardiovasc Res,2007,73(1):130-142.

[4] Kishi T,Cloutier SM,Kundig C, et al. Activation and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 8 [J]. Biol Chem,2006,387(6):723-731.

[5] Elliott MB,Irwin DM,Diamandis EP. In silico identification and Bayesian phylogenetic analysis of multiple new mammalian kallikrein gene families[J]. Genomics,2006,88(5):591-599.

[6] Chao J,Chai KX,Chen LM, et al. Tissue kallikrein-binding protein is a serpin. I. Purification, characterization, and distribution in normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. J Biol Chem, 1990,265(27):16394-16401.

[7] Zhou GX,Chao L,Chao J. Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence[J]. J Biol Chem,1992,267(36):25873-25880.

[8] Yousef GM,Chang A,Scorilas A, et al. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13. 3-q13. 4 [J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,276(1):125-133.

[9] Yousef GM,Polymeris ME,Yacoub GM, et al. Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer[J]. Cancer Res,2003,63(9):2223-2227.

[10] Kishi T,Grass L,Soosaipillai A, et al. Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma[J]. Cancer Res,2003,63(11): 2771-2774.

[11] Momota Y,Yoshida S,Ito J, et al. Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy[J]. Eur J Neurosci,1998, 10(2):760-764.

[12] Shimizu-Okabe C,Yousef GM,Diamandis EP, et al. Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain [J]. Neuroreport,2001,12(12):2747-2751.

(收稿日期:2013-04-28)

[7] Matsui T, Hayashi-Kimumi F, Kinoshita Y, et al. Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine- β/γ and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13. 12[J]. Genomics,2004,84(2):384-397.

[8] Toulza E, Galliano MF, Jonca N, et al. The human dermokine gene: description of novel isoforms with different tissue-specific expression and subcellular location[J]. J Invest Dermatol,2006, 126(2):503-506.

[9] Naso MF, Liang B, Huang CC, et al. Dermokine: an extensively differentially spliced gene expressed in epithelial cells[J]. J Invest Dermatol,2007,127(7):1622-1631.

[10] 徐艳松,唐卫中,高枫,等. 散发性结直肠癌 APC、K-ras、p53、MMR 基因突变检测[J]. 结直肠肛门外科,2009,15(4):229-232.

(收稿日期:2012-11-08)