

网络出版时间: 2018-11-5 15:39 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.030.html>

◇技术与方法◇

FGF13VY 腺病毒过表达载体的构建及其鉴定

董梅¹ 陈宇峰^{2*} 孙如梦² 华乐² 杨甫² 孟丹琳² 杨晶³ 王川⁴

摘要 利用 PCR 技术扩增目的基因 FGF13VY 亚型,经酶切、连接等反应将目的基因插入穿梭载体 pShuttle-CMV 中,进而转化至含有 AdEasy 质粒的大肠杆菌中,进行重组。将所产生的腺病毒载体转染在 HEK-293 细胞中,进行腺病毒的包装、分泌和扩增,将所获得的腺病毒在背根神经节中进行过表达,可检测到腺病毒携带的绿色荧光蛋白表达在背根神经节神经元,PCR 检测到 FGF13VY mRNA 的表达明显升高。FGF13VY 腺病毒过表达载体的成功构建,为研究其在 DRG 神经元中作用奠定了基础。

关键词 FGF13VY; 腺病毒载体; 绿色荧光蛋白; 背根神经节中图分类号 R 331.3+8; R 337.5; R 34; R 541.7; R 542.

2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)12-1956-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.030

成纤维细胞生长因子同源性因子(fibroblast growth factor homologous factors, FGFs)作为成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)家族中的一类特殊成员,包括 4 种亚型: FGF1 ~ FGF4, 又称 FGF11 ~ FGF14^[1]。每种 FGFs 亚型又包含不同的空间剪接体,如 FGF13 含有 5 种空间剪接体包括 FGF13VY。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元表达有钠通道,钠通道基因突变,可导致初级传入神经元兴奋异常,产生了神经病理性疼痛以及无痛症^[2]。目前发现有多种蛋白,包括 FGFs 可调

节钠通道^[3]。FGF13 在 DRG 神经元内表达水平较高,尤其是 FGF13VY 亚型。FGF13 可调节钠通道的功能,推测 FGF13 可能在外周神经痛中具有一定作用。该课题组前期已成功构建 FGF13 在 DRG 条件性基因敲除小鼠,为进一步研究 FGF13VY 亚型在其中的作用,该研究将在基因敲除小鼠的基础上,拟过表达其中的 FGF13VY 亚型,以证明 FGF13VY 亚型在 DRG 神经元内的功能特异性。因此,构建腺病毒介导的 FGF13VY 过表达载体是此研究的重要前提和基础,具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α (日本 TaKaRa 公司); AdEasy 腺病毒表达系统和穿梭载体 pShuttle-CMV (美国 Clontech 公司); FGF13VY 质粒(河北医科大学); HEK293 细胞(中科院细胞库)。

1.1.2 试剂 质粒 DNA 提取试剂盒(北京天根生化公司); PCR 反应体系的 Taq 酶及各种限制性内切酶(日本 TaKaRa 公司);腺病毒纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒(美国 Promega 公司); PCR 引物制备(上海生工公司)。

1.2 方法

1.2.1 FGF13VY 基因的制备 利用 PCR 方法扩增 FGF13VY 目的基因。依据质粒及载体多克隆位点的特征,设计引物时分别在其在 3' 端引入酶切位点 EcoR V、5' 端引入酶切位点 Xho I。FGF13VY 上游引物: 5'-CCCTCGAGATGAGTGGAAAGGTGACC-3', FGF13VY 下游引物: 5'-GGTCACCTTTCCACT-CATCTCGAGGG-3'。测序鉴定 PCR 产物,利用胶回收纯化得到 FGF13(vy 亚型)片段。

1.2.2 FGF13VY 基因的穿梭质粒的构建 将 FGF13VY 片段和 pShuttle-CMV 载体分别用 Xho I 和 EcoR V 进行双酶切,用 T4 DNA ligase 连接酶切产物,16℃ 过夜。将连接产物转化至 DH5 α 大肠杆菌,涂布于 LB 琼脂糖平板(卡那抗性),37℃ 过夜,挑选

2018-07-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81770407); 河北省自然科学基金(编号: H2017206262、C2018206277); 河北省高等学校科学技术研究项目(编号: ZD2015007、ZD2016002、Z2015005); 河北省高层次人才资助项目(编号: A2017005070); 河北医科大学大学生创新性实验计划项目(编号: USIP201509A)

作者单位: ¹ 河北科技大学医院, 石家庄 050018

河北医科大学² 基础医学院、³ 生理学教研室、⁴ 药理学教研室, 石家庄 050017

作者简介: 董梅,女,主治医师,本科;

王川,男,教授,博士,责任作者, E-mail: wangchuan@hebm. edu. cn

* 对本文具有同等贡献

单克隆菌落摇菌、提质粒。分别用 PCR 和双酶切法初步鉴定全部质粒,并将鉴定后的阳性克隆进行测序,以得到正确的 pShuttle-CMV-FGF13VY 克隆。

1.2.3 制备含 FGF13VY 基因重组腺病毒的质粒

用 Pme I 酶将 pShuttle-CMV-FGF13VY 进行单酶切线性化处理,利用化学转化法将其转入 pAdEasy-BJ5183 感受态细胞中,再涂布于 LB 琼脂糖平板,37 °C 过夜,挑取单克隆菌落,摇菌扩增提质粒。用 Pac I 单酶切鉴定 pShuttle-FGF13VY-AdEasy 质粒。

1.2.4 包装和扩增重组 FGF13(vy 亚型) 基因腺病毒

用 Pac I 酶将 pShuttle-FGF13VY-AdEasy 质粒进行单酶切线性化处理后转染至 HEK293 细胞中。24 ~ 48 h 后观察绿色荧光情况,继续培养 10 ~ 15 d 后,收集细胞,用 PBS 重悬,在 -70 °C 和 37 °C 两种温度条件下反复冻融细胞 3 次,以释放病毒,然后离心收集上清液,再次感染 HEK-293 细胞,以大量扩增腺病毒。

1.2.5 DRG 神经元分离与培养

取 SD 大鼠,麻醉后断头处死,摘出椎间孔内 DRG,置于冰浴的 D-Hanks 液中。移入 1 ml 胶原酶(1 mg/ml) + Dispease(7.5 mg/ml) 消化液中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中消化约 40 min。1 500 r/min 离心 5 min。弃去上清液,加入 2 ml 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,以 5×10^5 密度接种于 24 孔培养板,并置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较使用单因素方差分析或 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 克隆 FGF13VY 基因

利用 PCR 技术,从含 FGF13VY 基因的质粒中克隆出含有 EcoR V 和 Xho I 特定酶切位点的 FGF13VY 基因片段,并进行电泳鉴定(图 1A)。PCR 产物经电泳后可见一条大小约为 800 bp 的条带,与目的基因 FGF13VY 大小一致,证明 FGF13VY 基因片段扩增正确。

2.2 构建 pShuttle-CMV-FGF13VY 载体

将得到的 FGF13VY 片段与载体 pShuttle-CMV 连接,得到 pShuttle-CMV-FGF13VY 质粒。为了进一步验证连接产物的正确性,又通过双酶切(Xho I 和 EcoR V)反应来鉴定以上连接产物,结果如图 2 所示: pShuttle-CMV-FGF13VY 质粒经 Xho I 和 EcoR V 双酶切后得到 800 bp 和约 7 500 bp 大小的两条条带,与预

期产物大小相符(图 1B)。

2.3 构建过表达腺病毒载体(pShuttle-FGF13VY-AdEasy)

将经 Pme I 酶线性化的 pShuttle-CMV-FGF13VY 转入 pAdEasy-BJ5183 感受态细胞中发生同源重组,在含卡那抗性的 LB 琼脂糖平板上长出多个阳性单克隆菌落。选取单克隆阳性菌落挑菌摇菌提质粒后经 Pac I 单酶切鉴定,出现 3.0 kb 或 4.5 kb 片段的质粒即为正确重组质粒 pShuttle-FGF13VY-AdEasy(图 1C、1D)。

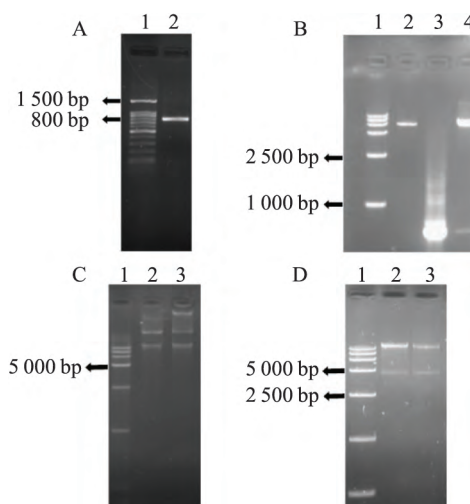


图1 制备 FGF13VY 过表达腺病毒载体 (pShuttle-FGF13VY-AdEasy)

A: FGF13VY 基因的克隆; 1: DL 100 DNA ladder; 2: 含有特定酶切位点的 FGF13VY 基因片段; B: 双酶切鉴定 pShuttle-CMV-FGF13VY 载体的电泳结果; 1: DL 15 000 DNA ladder; 2: pShuttle 单酶切; 3: FGF13VY PCR 扩增产物; 4: pShuttle-CMV-FGF13VY 双酶切产物; C: 筛选两个正确克隆质粒提取后的电泳图; 1: DL 15 000 DNA ladder; 2 和 3 为所挑选的两个质粒酶切前结果; D: 所选两个克隆单酶切后的电泳图; 1: DL 15 000 DNA ladder; 2、3: 所挑选的两个质粒 Pac I 酶切后结果

2.4 FGF13VY 过表达腺病毒在 HEK293 细胞中的包装、分泌、扩增

将 pShuttle-FGF13VY-AdEasy 质粒用 Pac I 单酶切线性化,并将其转染至 HEK-293 细胞中,持续培养 10 ~ 15 d,可观测到所有细胞呈悬浮状态,满视野细胞均可见绿色荧光蛋白的表达(图 2)。

鉴定 FGF13VY 过表达腺病毒在背根神经节神经元内的表达用所获得的 FGF13VY 过表达腺病毒感染培养的背根神经节神经元,可观测到腺病毒携带的绿色荧光蛋白在心肌细胞内有明显表达(图 3) 经 qPCR 检测显示,与对照腺病毒组 (0.0036 ± 0.0003) 比较, FGF13VY 过表达腺病毒组 mRNA 表

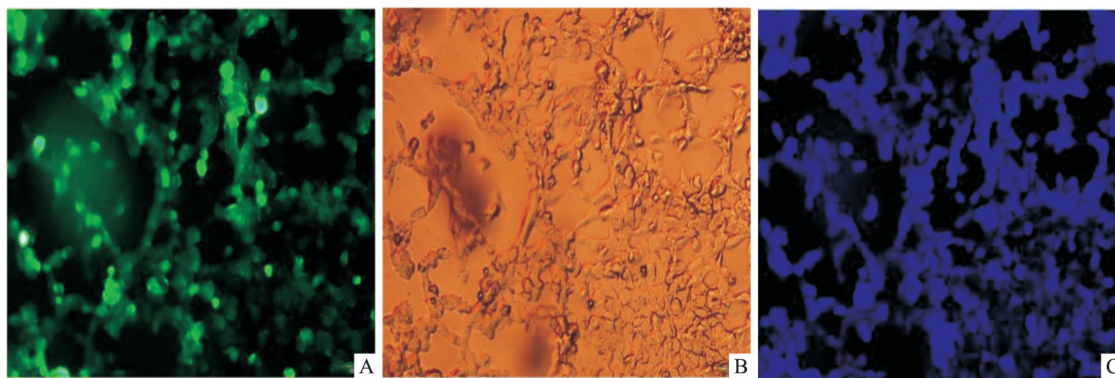


图2 FGF13VY 过表达腺病毒在 HEK293 细胞中的包装、分泌和扩增 ×100

A: 荧光检测结果; B: 亮视野结果; C: DAPI 染色

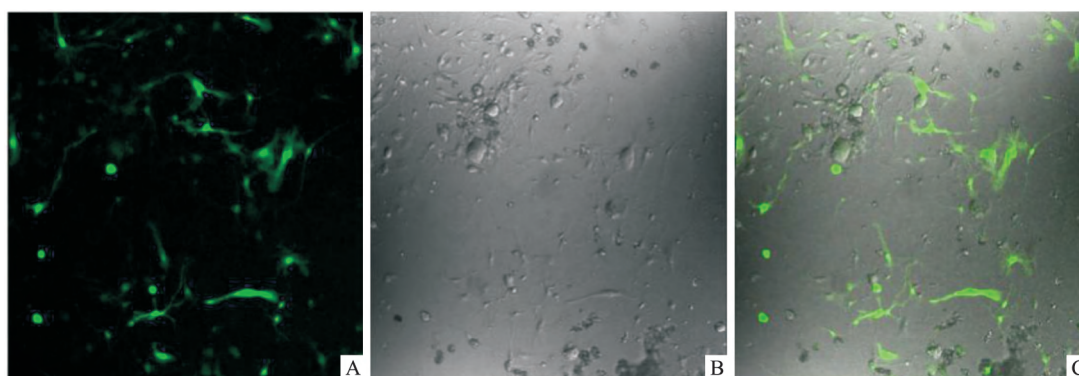
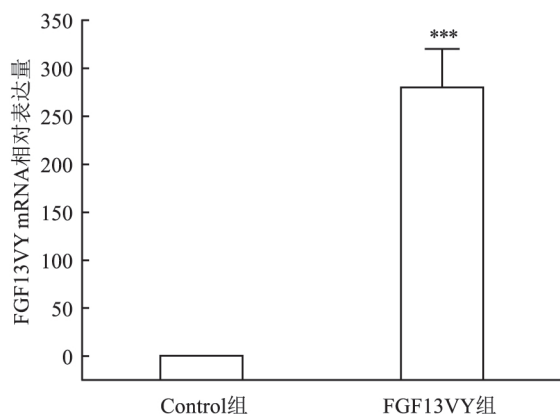


图3 FGF13VY 亚型过表达腺病毒在背根神经节神经元细胞内过表达的荧光鉴定 ×100

A: 荧光检测结果; B: 亮视野下结果; C: 荧光和亮视野重合显示的结果

图4 FGF13VY 亚型过表达腺病毒在背根神经节神经元细胞内过表达的 qPCR 检测结果
与 Control 组比较: *** $P < 0.001$

达明显升高 (280.67 ± 39.37 , $F = 50.83$, $P = 0.00003$) ,见图 4。

3 讨论

腺病毒载体是基因治疗中得到广泛应用一种病

毒载体,因其具有优点而得到广泛应用^[4-6]。腺病毒载体的基因转染效率高,对分裂与不分裂的细胞均有效,可适用于多种宿主细胞,插入致突变的可能性较低,而且所携带的目的基因的表达率高,但其制备手段繁杂,耗时较长。本研究采用了 Luo et al^[7]改进的 AdEasy 腺病毒载体系统,并且具有在细菌中复制的必需元件。与传统的重组腺病毒载体系统相比,该系统采用细菌内同源重组,制备方法更加简单快速,而且重组效率也得到明显提高,故在本实验中采用。

本实验成功构建 pShuttle - FGF13VY - AdEasy 重组腺病毒质粒,经酶切鉴定分析显示带有的 FGF13VY 基因与预期大小相吻合。在同源重组过程中,其穿梭载体 Pshuttle - CMV 携带 GFP 报告基因,可重组整合至腺病毒骨架质粒 pAdEasy 中表达,并且由双启动子各自启动 GFP 和目的基因的表达。因而既可通过 GFP 对病毒的重组过程进行追踪,对病毒转染效率进行观察;又避免了其他腺病毒体系要么无法示踪,要么为了示踪而制备报告基因和目

的基因的融合基因而带来的种种问题。

前期研究^[8]显示 FGF13 在小直径 DRG 神经元中有显著的、特征性的表达, Nav1.7 是选择性表达于小直径 DRG 神经元中的一种钠通道主要表达亚型, 可影响神经元的兴奋性。Nav1.7 在外周神经痛(如神经病理性痛和急/慢性炎性痛)中具有重要作用^[9-10]。在前期研究显示过表达 FGF13 可显著增大 Nav1.7 通道电流并改变通道的门控特征, 以上现象提示 FGF13 可能会通过调节钠通道而影响 DRG 神经元的兴奋性并在外周神经痛中扮演重要角色。综上所述, 本实验成功构建 FGF13VY 基因过表达腺病毒载体, 这将为进一步研究 FGF13VY 在外周神经痛中的作用及其作用机制奠定重要的实验基础。

参考文献

- [1] Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16: 215-20.
- [2] Rush A M, Cummins T R, Waxman S G. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons [J]. *J Physiol*, 2007, 579(Pt 1): 1-14.
- [3] Goldfarb M, Schoorlemmer J, Williams A, et al. Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels [J]. *Neuron*, 2007, 55(3): 449-63.
- [4] Das S, Somasundaram K. Therapeutic potential of an adenovirus expressing p73 beta, a p53 homologue, against human papilloma virus positive cervical cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(2): 210-7.
- [5] Fukazawa T, Walter B, Owen-schaub L B. Adenoviral Bid overexpression induces caspase-dependent cleavage of truncated Bid and p53-independent apoptosis in human non-small cell lung cancers [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28): 25428-34.
- [6] He T C, Zhou S, Da Costa L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): 2509-14.
- [7] Luo J, Deng Z L, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1236-47.
- [8] Dib-Hajj S D, Yang Y, Black J A, et al. The Na(V)1.7 sodium channel: from molecule to man [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(1): 49-62.
- [9] Brouwer B A, Merkies I S, Gerrits M M, et al. Painful neuropathies: the emerging role of sodium channelopathies [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2014, 19(2): 53-65.
- [10] Dib-Hajj S D, Cummins T R, Black J A, et al. Sodium channels in normal and pathological pain [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2010, 33: 325-47.

Construction and identification of adenovirus mediated FGF13VY overexpression vector

Dong Mei¹, Chen Yufeng², Sun Rumeng², et al

(¹The Affiliated Hospital of Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018;

²College of Basic Medicine Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

Abstract FGF13VY gene was amplified by PCR technique and inserted into pShuttle-CMV vector by enzyme digestion and ligation reaction. Then FGF13VY-pShuttle-CMV was transformed into *E. coli* containing AdEasy plasmid for recombination. The produced adenovirus vector was transfected into HEK-293 cells to package and amplify adenovirus, then the adenovirus was overexpressed in DRG neurons. Green fluorescent protein carried by adenovirus can be detected in DRG neurons. The expression of FGF13VY mRNA was significantly increased by qPCR. The successfully constructed FGF13VY overexpression adenovirus vector lays an experimental foundation for study of the role of FGF13VY in DRG neurons.

Key words FGF13VY; adenovirus vector; GFP; dorsal root ganglion