

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.005.html>

KSHV K15P 慢病毒载体的构建及其滴度测定

许常青^{1,2}, 陈伟¹, 方圆¹, 汪小五¹, 王林定¹

摘要 目的 构建含卡波肉瘤相关疱疹病毒(KSHV) ORF K15P 基因的慢病毒载体, 并对其在 293T 细胞内的表达进行研究。方法 PCR 法扩增获得 KSHV K15P 基因, 限制性内切酶 *Nhe* I 酶切和无缝克隆法构建重组慢病毒载体 pCDH-CMV-K15P-GFP, 通过脂质体转染试剂将重组慢病毒载体与 3 种辅助质粒 pMDL-PRRE、pRSV-Rev 和 pMD2. g 共转染 HEK 293T 细胞包装产生慢病毒, Western blot 法检测 K15P 蛋白的表达。结果 经酶切及测序鉴定, 成功构建慢病毒载体, 重组慢病毒质粒与辅助质粒共转染 HEK 293T 细胞可见有荧光表达, 说明 K15P 基因在细胞内有表达并且 96 h 后产生 4×10^6 TU/ml 滴度为慢病毒。结论 成功构建了 KSHV K15P 慢病毒表达载体 pCDH-CMV-K15P-GFP, 获得高效表达 K15P 基因的慢病毒颗粒, 为后续其在细胞内的功能研究奠定实验基础。

关键词 卡波肉瘤相关疱疹病毒; K15P 基因; 慢病毒

中图分类号 R 394.3; R 373.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1417-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.005

卡波肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus, KSHV), 又被称为人类疱疹病毒 8 型(human herpesvirus 8, HHV-8), 属于 γ 疱疹病毒亚科。华裔科学家 Chang et al^[1] 于 1994 年在卡波肉瘤(Kaposi's sarcoma, KS) 组织中发现该病毒, 其除了是引起 KS 的病原体, 还与多中心性 Castleman 病和原发渗液性淋巴瘤有关^[2]。ORFK15 位于 KSHV 整个基因组的最右端, 处于第 75 个开放阅读框(ORF 75) 和末端重复序列之间^[3]。研究^[4] 表明 K15P 在 KS 的发生发展过程中起重要作用, 尤其是肿瘤的血管新生。该实验通过构建 K15P 的慢病毒载体, 获得高效表达 K15P 的慢病毒, 旨在为研究

K15P 在细胞内的功能及 KSHV 的致病机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 pFJ-K15P、pCDH-CMV-GFP、pMDL-PRRE、pRSV-Rev、pMD2. g 5 种质粒和 HEK293T 细胞、宿主菌 DH5 α 均由安徽医科大学微生物学实验室保存, 其中 pFJ-K15P 重组质粒包含有 K15P 的全部 8 个外显子序列。其中 HEK293T 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM(美国 Gibco 公司) 培养基中, 培养基含有 100 μ g/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素。

1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Nhe* I、PCR 高保真酶和蛋白质预染 Maker(美国 Thermo 公司); 核酸提取试剂盒和凝胶纯化试剂盒(北京天根生化有限公司); ClonExpressTM II One Step Cloning Kit(一步法无缝克隆试剂盒)(南京诺唯赞生物科技有限公司); Opti-MEM(美国 Gibco 公司); Lip2000(美国 Invitrogen 公司); 兔抗 GFP 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 pCDH-CMV-K15P-GFP 重组质粒构建及鉴定

1.3.1 K15P 基因的扩增 根据 NCBI 上 K15P 基因序列, 引物设计合成由上海生工生物工程有限公司完成, 上游引物: 5'-AGATTCTAGAGCTAGCGAAT-GAAGACACTCATATTCTTCT-3', 下游引物: 5'-CCATAATTCGCTAGCTGTTCTGCGGAAATAAAACCTCC-3'; (下划线部分代表 *Nhe* I 的酶切位点)。以已有的 pFJ-K15P 质粒为模板, 普通 PCR 进行基因扩增。PCR 反应体系总共 25 μ l, 包括 pFJ-K15P 质粒模板 1 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, dNTP 2 μ l, 上下游引物各 1 μ l, 高保真酶 1 μ l, ddH₂O 17.5 μ l。PCR 反应体系: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min、95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、50 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 此过程共 35 个循环; 之后 72 $^{\circ}$ C、10 min。产物经 1% 琼脂糖电泳, 以 DL 5 000 Maker 为参照, 切胶回收目的条带并测定其浓度。

2016-06-02 接收

项目基金: 国家自然科学基金(编号: 81271837); 安徽省高校省级科学研究项目(编号: KJ2012A161); 安徽医科大学博士科研经费资助项目(编号: XJ200914)

作者单位: ¹安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032

²合肥市第三人民医院检验科, 合肥 230000

作者简介: 许常青, 男, 硕士研究生;

王林定, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wan-glinding@ahmu.edu.cn

1.3.2 pCDH-CMV-K15P-GFP 重组质粒的构建及鉴定 用 *Nhe* I 单酶切 pCDH-CMV-GFP 质粒,于 37 °C 酶切 2 h,将其线性化,切胶回收,并测其浓度。按照 ClonExpress™ II One Step Cloning Kit 的说明书进行重组质粒构建。将构建好的重组质粒转化 DH5 α 感受态细胞后均匀涂布于含有氨苄青霉素 (Amp) 的平板中,18 ~ 24 h 后挑取阳性克隆,摇菌过夜并加入终浓度为 30% 甘油,冻存于 -80 °C 冰箱。用试剂盒提取质粒,进行酶切初步鉴定,并送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.4 慢病毒的包装及滴度测定

1.4.1 慢病毒的包装 转染前将 HEK 293T 细胞调整浓度为 1×10^6 个/ml 加入 100 mm 细胞培养皿中,待细胞融合度达到 70% ~ 80% 时进行转染。慢病毒包装过程如下: 1.5 ml 离心管中加入 500 μ l Opti-MEM 培养基,依次加入 1.6 μ g pCDH-CMV-GFP/pCDH-CMV-K15P-GFP、4 μ g pMDL-PRRE、2 μ g pRSV-Rev、2.4 μ g pMD2.g,轻轻混匀,室温静置 5 min。取另一支 1.5 ml 离心管加入 500 μ l Opti-MEM 培养基,在其中加入 36 μ l Lip2000 并轻轻混匀。然后混合上述两管溶液,轻轻混匀,室温静置 30 min 形成质粒-Lip2000 复合物。在静置期间,将培养皿中原培养液弃去,加入无双抗无血清的 DMEM 培养皿。30 min 后将质粒-Lip2000 复合物轻轻混匀后加入到细胞中,缓慢摇匀使复合物分布均匀。6 h 后弃去培养基换成 10 ml 完全培养基。细胞置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 48 h 后收集上清液 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片,0.45 μ m 针式过滤器过滤,然后 60 000 r/min 超速离心 2 h 收集沉淀,将病毒液分装,冻存于 -80 °C 冰箱备用。

1.4.2 慢病毒滴度测定 在 96 孔细胞培养板中每孔接种 1×10^5 个 HEK 293T 细胞,加入 100 μ l 的 DMEM 完全培养基,37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后进行感染。取 50 μ l 的病毒原液,用培养基按 1×10^{-1} ~ 1×10^{-9} 比例进行梯度稀释,每个稀释梯度平行重复 3 孔,每孔加入 5 μ l 病毒稀释液,感染 24 h 后,每孔换 100 μ l 新鲜培养液,继续培养,以利于细胞的生长。感染 96 h 后,荧光显微镜下观察细胞荧光情况并找出有 GFP 荧光细胞 (GFP⁺ 细胞) 的病毒稀释梯度,同时记录下该梯度病毒稀释液感染的细胞中各孔中荧光细胞的数目,取平均值根据以下公式计算病毒滴度 (BT = TU/ml): 病毒滴度 (TU/ml) = (荧光细胞数/每孔加入病毒稀释液体积) $\times$ 稀释倍

数。

1.5 Western blot 法检测 K15P 蛋白的表达 将感染 K15P 重组慢病毒的细胞裂解、离心收集蛋白上清液并制样,经 SDS-PAGE 电泳,电转至 PVDF 膜后,5% 脱脂牛奶封闭,以免抗 GFP 多克隆抗体为一抗,4 °C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜,加 1 : 5 000 的 HRP 标记的山羊抗兔的二抗,室温孵育 2 h,洗膜后曝光显影。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体的构建和鉴定 以实验室保存的质粒 pFJ-K15P 为模板,PCR 扩增 K15P 基因片段,在 1 500 bp 位置附近可见出现目的条带。见图 1A。根据 ClonExpress™ II One Step Cloning Kit 说明书进行重组载体的构建。经 *Nhe* I 酶切后出现载体 pCDH-CMV-GFP 和 K15P 两条带,大小分别为 6 947 bp 和 1 470 bp。见图 1B。重组慢病毒质粒进行测序,并与 GenBank 中的 K15P 序列进行比对,结果正确,证明重组质粒连接成功。

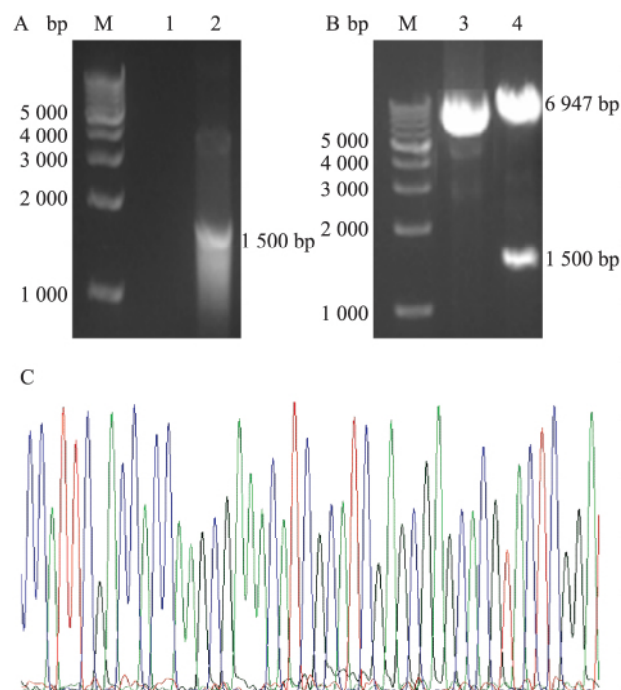


图1 K15P 基因 PCR 扩增及重组慢病毒载体的酶切鉴定

A: K15P 基因 PCR 扩增图; B: 重组慢病毒载体酶切鉴定图; C: 重组质粒测序报告; M: DNA Marker; 1: PCR 对照组; 2: PCR 扩增产物约 1 500 bp; 3: 重组 pCDH-CMV-K15P-GFP 质粒; 4: 重组 pCDH-CMV-K15P-GFP 质粒 *Nhe* I 酶切

2.2 慢病毒的包装及滴度测定 重组慢病毒载体与辅助包装质粒共转染到 HEK 293T 细胞中,96 h

后荧光显微镜下观察到绿色荧光,表明质粒已成功转染到细胞内。收集对照组和慢病毒组的细胞上清液,分别测定对照组病毒滴度为 1×10^7 TU/ml, K15P 慢病毒组病毒滴度为 4×10^6 TU/ml。见图 2。

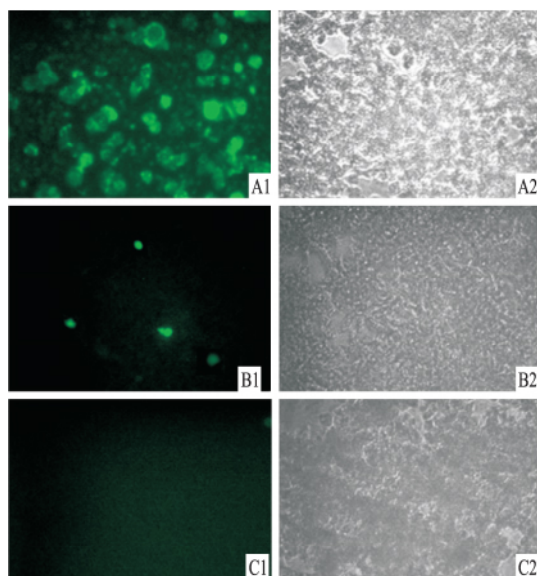


图 2 慢病毒载体转染 48 h 后细胞状态

及慢病毒阳性对照组和重组慢病毒组滴度测定 $\times 100$

A: 慢病毒载体和辅助质粒共转 48 h; B: 慢病毒阳性对照组病毒做 10^{-7} 稀释后感染 HEK 293T 细胞 72 h; C: 重组慢病毒组病毒做 10^{-7} 稀释后感染 HEK 293T 细胞 72 h; 1: 荧光显微镜; 2: 光学显微镜

2.3 慢病毒感染 HEK 293T 细胞后 K15P 蛋白的检测 将相同体积的对照组和慢病毒组分别感染 HEK 293T 细胞,观察 GFP 的表达情况,提取总蛋白,Western blot 法检测 K15P 蛋白的表达情况。见图 3。

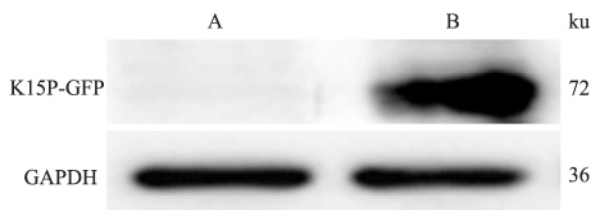


图 3 Western blot 法检测 HEK 293T 细胞中 K15P 蛋白的表达

A: 对照组病毒感染细胞所得样本; B: 慢病毒组病毒感染细胞所得样本

3 讨论

KSHV 又名卡波肉瘤相关疱疹病毒,为双链 DNA 病毒,属于 γ 疱疹病毒亚科^[5]。KS 是一种血管性恶性肿瘤, KSHV 引起的相关肿瘤中 KS 发病

率较高。研究^[6]表明 KS 有 4 种不同的类型,地域型 KS、经典型 KS、移植型 KS 和 AIDS 相关型 KS。KS 好发于皮肤,也可累及黏膜和内脏器官,主要表现为全身或者局部出现内皮细胞来源的高度血管化的赘生物^[7]。KS 的发病率通常在非洲及部分欧洲地区及地中海国家比较高,尤其在非洲撒哈拉沙漠以南地区更为流行。但近些年来在美洲地区、台湾及韩国也出现卡波肉瘤病例^[8-9]。我国 KS 的发病率较低,因此对 KSHV 的研究开展较晚,但近些年来,研究^[10]显示我国新疆地区典型 KS 发病率较高,而在其他区域或民族人群发病较罕见。

K15 基因位于 KSHV 基因组的最右端,由 8 个外显子构成,编码约 45 ku,由 12 个跨膜结构域构成和 1 个位于细胞内的 C 端的膜蛋白^[3]。K15 基因至少存在 3 种等位基因,分别为 P、M 和 N 型,N 型仅在非洲南部有发现,P 和 M 型有 33% 的同源区域,而 KS 病例中主要是 P 型^[11]。位于细胞质内的 C 端编码一个保守的 SH 2 结构域,能与酪氨酸激酶 (Src) 和肿瘤坏死因子相关受体因子 (TRAF) 结合,进一步激活 JNK、ERK、MAPK 等信号通路,发挥 K15 促进细胞增殖迁移和血管新生的作用^[12-14]。

与传统的脂质体转染方法比较,慢病毒载体的操作更复杂,既要和辅助质粒共转染,还要经过病毒包装,产生具有感染能力的病毒颗粒以感染宿主细胞,但慢病毒能介导将目的基因整合到宿主基因组中,有助于获得目的基因长期稳定表达的细胞株,同时对于难以采用脂质体转染或者转染效率不高的细胞,脂质体转染就存在弊端,而从理论上说病毒能够感染所有细胞,因而慢病毒较脂质体更具优势^[15]。

本实验通过成功构建慢病毒载体,包装、浓缩产生高效表达 K15P 基因的慢病毒颗粒,感染 HEK 293T 细胞,Western blot 法检测到 293T 细胞内表达的 K15P 蛋白。本实验结果为研究 K15P 基因在内皮细胞内的功能和 KSHV 的致病机制奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Chang Y, Cesarman E, Pessin M S, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma [J]. Science, 1994, 266(5192): 1865-9.
- [2] Wang L, Pietrek M, Brinkmann M M, et al. Identification and functional characterization of asplined rhesus rhadinovirus gene with homology to the K15 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. J Gen Virol 2009, 90(Pt 5): 1190-201.
- [3] Ouyang X X, Fu B, Li B, et al. Establishment of an ELISA to detect

- Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus using recombinant ORF73 [J]. *Viol Sin* 2010 25(3): 168–76.
- [4] Bala K, Bosco R, Gramolelli S, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus K15 protein contributes to virus-induced angiogenesis by recruiting PLC γ 1 and activating NFAT1-dependent RCAN1 expression [J]. *PLoS Pathog* 2012 8(9): e1002927.
- [5] 汪小五, 曾宪聪, 陈伟, 等. 卡波肉瘤相关疱疹病毒 ORFK12 蛋白初步研究[J]. *安徽医科大学学报* 2014 49(5): 565–8.
- [6] Chatlynne L G, Ablashi D V. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus(KSHV) [J]. *Semin Cancer Biol* 1999, 9(3): 175–85.
- [7] Mesri E A, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus [J]. *Nat Rev Cancer* 2010 10(10): 707–19.
- [8] Poole L J, Zong J C, Ciuffo D M, et al. Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end [J]. *J Virol* 1999 73(8): 6646–60.
- [9] Zong J, Ciuffo D M, Viscidi R, et al. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus(KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism [J]. *J Clin Virol* 2002 23(3): 119–48.
- [10] 张莹, 曾宪聪, 汪小五, 等. 安徽蚌埠地区卡波氏肉瘤相关疱疹病毒的血清阳性率研究[J]. *安徽医科大学学报* 2013 48(5): 493–5.
- [11] Wang L, Brinkmann M M, Pietrek M, et al. Functional characterization of the M-type K15-encoded membrane protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. *J Gen Virol* 2007 88(Pt 6): 1698–707.
- [12] Ehrlich E S, Chmura J C, Smith J C, et al. KSHV RTA abolishes NF κ B responsive gene expression during lytic reactivation by targeting vFLIP for degradation *via* the proteasome [J]. *PLoS One* 2014 9(3): e91359.
- [13] Xie J, Ajibade A O, Ye F, et al. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency requires MEK/ERK, JNK and p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Virology* 2008 371(1): 139–54.
- [14] Hävemeier A, Gramolelli S, Pietrek M, et al. Activation of NF- κ B by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 protein involves recruitment of the NF- κ B-inducing kinase, I κ B kinases, and phosphorylation of p65 [J]. *J Virol* 2014 88(22): 13161–72.
- [15] Durand S, Cimarelli A. The inside out of lentiviral vectors [J]. *Viruses* 2011 3(2): 132–59.

Construction and the titer determination of lentivirus vector containing KSHV K15P gene

Xu Changqing^{1, 2}, Chen Wei¹, Fang Yuan¹, et al

(¹Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Clinical Laboratory, The Third People's Hospital of Hefei Hefei 230000)

Abstract Objective To construct the lentivirus vector containing Kaposi sarcoma-associated herpesvirus(KSHV) ORF K15P and study its expression and functions in 293T cells. **Methods** The gene region of K15P, which was amplified by ordinary PCR, was cloned into pCDH-CMV-GFP vector with Nhe I restriction enzyme. The recombinant plasmid was then transiently transfected into HEK 293T cell. The pCDH-CMV-K15P-GFP plasmid was co-transfected with three assisted plasmids of pMDL-PRRE, pRSV-Rev, pMD2. g into HEK 293T cell to produce lentivirus particles after 96 h and Western blot was performed to detect the expression of K15P protein. **Results** The lentivirus vector was successfully constructed and the titer of lentivirus was 2×10^6 transducing units/ml at the time of 96 hours after co-transfected. **Conclusion** K15P expression lentiviral vector is successfully constructed. It builds an experimental basis for the K15P functional study in 293T cells.

Key words Kaposi sarcoma-associated herpesvirus; K15P gene; lentivirus