

脂肪储存小滴蛋白 5 重组腺病毒的制备 *

薛玲¹ 李航² 张静¹ 王净² 吴雅岚³ 姬秋和¹ 叶菁^{2△}

(1 第四军医大学西京医院内分泌代谢科 陕西 西安 710032 2 第四军医大学病理与病理生理学教研室 陕西 西安 710032 ;

3 第四军医大学唐都医院耳鼻喉科 陕西 西安 710038)

摘要 目的 利用 AdEasy 腺病毒表达系统构建含有小鼠脂肪储存小滴蛋白 5(LSDP5)基因的重组腺病毒。方法 从小鼠肝脏 cDNA 克隆出 LSDP5 基因全长,克隆至 pMD18-T 载体中,酶切测序。回收酶切产物,连接到腺病毒穿梭载体 pShuttle-CMV,构建 pShuttle-CMV-LSDP5 重组质粒。经 PmeI 酶切线性化后转化至含有腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 中。筛选阳性克隆,提取重组质粒。PacI 酶切线性化并转染 AD293 细胞进行包装,提取病毒 DNA,鉴定重组病毒并检测病毒滴度。结果 LSDP5 基因克隆经测序证实与 Genebank 公布一致,双酶切重组 pMD18-T 载体得到 1400 bp 左右的片段。重组穿梭载体经 Kpn I 和 Sal I 双酶切后得到预期片段。PacI 酶切得到 30 Kb 大片段和 4.5 Kb 小片段。转染 AD293 细胞后收集病毒,经 PCR 鉴定,获得理想的目的片段。取病毒上清反复感染 AD293 细胞以扩增病毒,最后所得病毒滴度为 2.5×10^9 pfu/ml。结论 成功构建了携带脂肪储存小滴蛋白 5 基因的重组腺病毒载体,为进一步研究 LSDP5 基因功能奠定基础。

关键词 AdEasy 腺病毒 LSDP5 小鼠

中图分类号 Q75 Q78 R735.7 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)06-1083-04

Construction and Identification of Recombinant Adenovirus Containing Lipid Storage Droplet Protein 5*

XUE Ling¹, LI Hang², ZHANG Jing¹, WANG Jing², WU Ya-lan³, JI Qiu-he¹, YE Jing^{2△}

(1 Department of Endocrinology & Metabolism, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China;

2 Department of Pathology and Pathophysiology, The Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China;

3 Department of Otolaryngology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, 710038, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To construct mouse lipid storage droplet protein 5 (LSDP5) gene recombinant adenovirus using AdEasy Adenoviral Vector System. **Methods:** The full-length LSDP5 gene cloned from mouse liver cDNA library was inserted to pMD18-T vector and sequenced after enzyme digestion. Then LSDP5 gene was cloned into adenovirus shuttle plasmid pShuttle-CMV to construct a recombinant plasmid pShuttle-CMV-LSDP5. The linearized plasmid by PmeI was transformed into E.coli strain BJ5183 with adenovirus backbone plasmid pAdEasy-1. The recombinant plasmid extracting from the positive clones was linearized by PacI and transfected into adenovirus package cells AD293. The recombinant adenovirus was harvested by several freeze-thaw cycles. The recombinant adenovirus DNA was identified by PCR, and the titer of adenovirus was detected. **Results:** LSDP5 gene was cloned successfully. The specific fragment, about 1400bp, was obtained from recombinant pMD18-T vector cleavage. The recombinant plasmid pShuttle-CMV-LSDP5 was digested by KpnI and SalI to produce anticipated fragments. A bigger fragment of 30Kb and a smaller fragment of 4.5Kb were generated when the recombinant adenovirus vector was digested by PacI. The recombinant adenovirus was constructed after packaged in AD293 cells. The target DNA fragment was gained by PCR. The extracted virus was used to infect AD293 cells repeatedly for amplification. At last, the titer was about 2.5×10^9 pfu/ml. **Conclusion:** The recombinant adenovirus containing LSDP5 was successfully established, and it may lay a foundation for the further functional study of LSDP5.

Key words: Ad Easy adenovirus LSDP5 Mouse

Chinese Library Classification (CLC): Q75, Q78, R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1083-04

前言

脂肪代谢异常与多种疾病相关,如高脂血症、冠心病、糖尿病等,这些疾病患者的非脂肪组织细胞内有过量脂质堆积。

Michio S 等人的研究发现,细胞内脂肪可通过多种途径破坏正常细胞的功能^[1,2]。

PAT 家族蛋白是脂滴表面的主要结构蛋白,包括 perilipin、ADRP、TIP47、S3-12 和 LSDP5。PAT 家族在脂肪代谢过

* 基金项目:国家自然科学基金(30700268,81070249)

作者简介:薛玲(1984-),女,硕士,主要研究方向:脂肪代谢。电话:13488192960,

E-mail: xl1205@fmmu.edu.cn

△通讯作者:叶菁:yejing@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-12-08 接受日期:2010-12-31)

程中具有重要的作用。LSDP5 是新近发现的 PAT 家族成员,在以氧化脂肪酸为能量来源的组织(心脏、骨骼肌、肝脏等)中表达水平较高,尤以在心脏表达水平最高^[3]。脂肪代谢异常参与了多种疾病形成过程,如巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞内脂滴积累过多会转化为泡沫细胞,是形成动脉粥样硬化斑块的初始环节^[4]。与正常人相比,肥胖患者脂肪细胞内脂滴的高速基础脂肪分解速率导致血中游离脂肪酸水平升高,一方面可引起血脂紊乱,另一方面会促发胰岛素抵抗和 2 型糖尿病^[5]。脂滴代谢异常参与了这些疾病的形成,脂滴相关蛋白又与脂滴代谢密切相关,所以近年关于其功能及作用机制的研究引起学者们的关注。LSDP5 作为 PAT 家族的新成员,目前的研究仅限于其功能的研究,且尚无有关功能缺陷(基因敲除或 RNA 干扰)研究的报道。本研究拟利用 AdEasy 腺病毒表达系统构建携带 LSDP5 的重组腺病毒,为深入研究 LSDP5 基因功能及机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pMD18-T、腺病毒穿梭载体 pShuttle-CMV、大肠杆菌 DH5 α 、含有骨架质粒 pAdEasy-1 的大肠杆菌 BJ5183、AD293 细胞为本实验室保存,PCR 试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、质粒大提试剂盒购自天根生化科技有限公司;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 EcoR I、Hind III、Kpn I、Sal I 购自 TaKaRa 公司,pMeI 和 PacI 购自 NEB 公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;快速腺病毒感染性滴度(TCID₅₀)检测试剂盒购自本元正阳基因技术有限公司;DMEM 培养液、胎牛血清购自 GIBCO 公司。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒穿梭载体的构建 根据 GeneBank 中报道的 Gene ID 66968 小鼠 LSDP5 序列设计扩增引物,同时在上游引物的 5' 端和下游引物的 3' 端引入 Nde I 和 Bgl II 酶切位点,上游引物为 5'-CCATATGGACCAGGAGGTGAAGACACCAC-3',下游引物为 5'-GGAAGATCTTCAGGAGTCCAGCTCTGGCA-3',由北京奥科生物技术有限公司合成。从小鼠肝脏提取 RNA,利用反转录酶合成 cDNA,以 cDNA 为模板,PCR 反应扩增,反应条件:95℃ 5min 预变性,95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 最后延伸 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,胶回收试剂盒回收 PCR 产物,将回收产物和 pMD18-T 载体用 T4 连接酶直接连接,转化到氯化钙法制备的 DH5 α 感受态,氨苄抗性 LB 培养基中 37℃ 振荡过夜,收集菌液,提取质粒,EcoR I 和 Hind III 双酶切质粒,琼脂糖凝胶电泳鉴定,并由北京奥科生物技术有限公司进行测序,序列鉴定正确后命名为 pMD18-LSDP5。

用 Kpn I 和 Sal I 酶切重组质粒 pMD18-LSDP5 及穿梭载体 pShuttle-CMV,琼脂糖凝胶电泳,回收目的基因 LSDP5 和载体 pShuttle-CMV,T4 连接酶 16℃ 过夜连接。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌,卡那霉素平板筛选阳性克隆并扩增培养,质粒小量抽提试剂盒提取质粒,KpnI 和 SalI 双酶切鉴定,命名为阳性克隆 pShuttle-CMV-LSDP5,序列鉴定由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.2.2 重组腺病毒载体的构建 提取质粒 pShuttle-CMV-LSDP5,经 PmeI 酶切线性化,回收电泳片段,转化至含有骨架质粒 pAdEasy-1 的大肠杆菌 BJ5183 感受态,卡那霉素培养基筛选阳性克隆,扩增培养,小提质粒,PacI 酶切鉴定,命名为 pAd-LSDP5,将质粒再次转化 DH5 α 感受态大量扩增,大量提取质粒备用。

1.2.3 重组腺病毒的包装、扩增 PacI 酶切质粒 pAd-LSDP5,异丙醇沉淀,溶于 TE。AD293 细胞融合达 80% 时,采用 Lipofectamine 2000 转染 AD293 细胞,8-10 天出现细胞病变效应(cytopathic effect,CPE),离心收集细胞,病毒保护液重悬沉淀,-70℃/37℃ 反复冻融三次,12000r/min 离心,收集上清,即为初代病毒。取部分初代病毒上清再次感染 AD293 细胞扩增,三天后出现细胞病变效应,重复包装收集病毒步骤。

1.2.4 重组腺病毒目的基因检测 在收集的病毒上清中加入蛋白酶 K,煮沸 5 分钟,以此为模板进行 PCR 扩增,条件同上。

1.2.5 病毒滴度检测 主要按产品说明书进行,将 AD293 细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,1 $\times$ 10⁴ 个细胞,按不同浓度 10 倍倍比稀释病毒,加入培养板中,培养 68h 后,预冷甲醇固定细胞,依次加入抗腺病毒单抗、酶标二抗和显色底物,20 倍视野下观察,计数出现褐色或黑色的细胞斑点孔数,按试剂盒说明计算病毒滴度。

2 结果

2.1 小鼠 LSDP5 基因的克隆

逆转录后的 PCR 产物经凝胶电泳分析,在 1400bp 处有与目的基因大小一致的特异条带(图 1)。

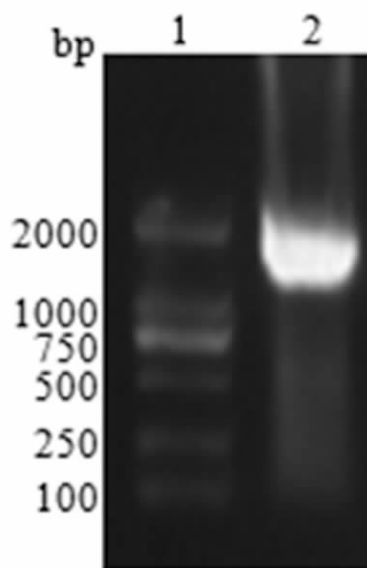


图 1 小鼠 LSDP5 基因全长 PCR 产物 1: DL 2000 DNA Marker 2: LSDP5 的 PCR 产物

Fig1 PCR product of full-length LSDP5 gene from mouse cDNA 1: DL 2000 DNA Marker 2: PCR product of LSDP5

2.2 pMD18-LSDP5 酶切鉴定

用 EcoR I 和 Hind III 酶切重组质粒 pMD18-LSDP5,琼脂糖凝胶电泳证实与预期结果一致(图 2)。

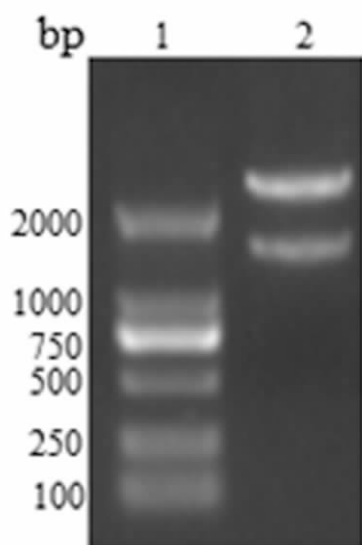


图2 pMD18-LSDP5 酶切鉴定 :1: DL 2000 DNA Marker

2: pMD18-LSDP5 酶切鉴定结果

Fig2 Restriction enzyme digestion identification of pMD18-LSDP5 :

1: DL 2000 DNA Marker 2: Enzyme digestion of pMD18-LSDP5

2.3 重组穿梭载体的鉴定

提取重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-LSDP5 ,KpnI 和 SalI 双酶切 琼脂糖凝胶电泳显示切出的片段与预期结果相符 ,测序证实与基因序列一致(图 3)。

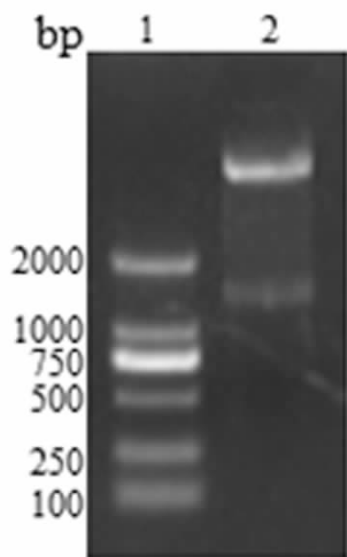


图3 穿梭载体 pShuttle-CMV-LSDP5 的酶切鉴定 :1: DL 2000 DNA

Marker 2: pShuttle-CMV-LSDP5 酶切鉴定结果

Fig3 Restriction enzyme digestion identification of

pShuttle-CMV-LSDP5 with KpnI and SalI :

1: DL 2000 DNA Marker 2: Enzyme digestion of pShuttle-CMV-LSDP5

2.4 重组腺病毒的鉴定

重组腺病毒质粒 pAd-LSDP5 经 PacI 酶切, 获得 30Kb 和 4.5Kb 两个片段(图 4)。病毒滴度检测按照 TCID₅₀ 试剂盒说明操作 根据公式 $T = 101 + d(s-0.5)$ 计算得到病毒滴度为 2.5×10^3 pfu/ml。

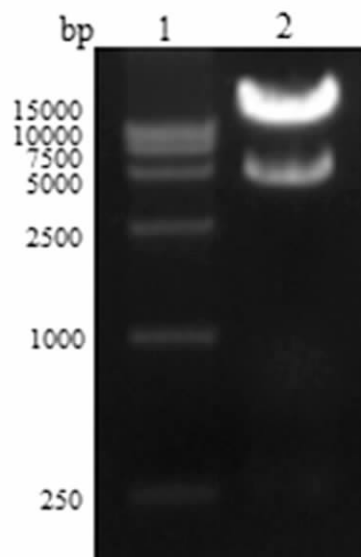


图4 重组腺病毒质粒 pAd-LSDP5 的 PacI 酶切鉴定 :1: DL 15000 DNA

Marker 2: pAd-LSDP5 酶切鉴定结果

Fig4 Restriction enzyme digestion identification of pAd-LSDP5 with

PacI :1: DL 15000 DNA Marker 2: Enzyme digestion of pAd-LSDP5

2.5 重组腺病毒目的基因的鉴定及滴度检测

收集 CPE 的细胞 ,提取病毒 DNA 进行 PCR 扩增 ,1%凝胶电泳得到目的条带(图 5)。

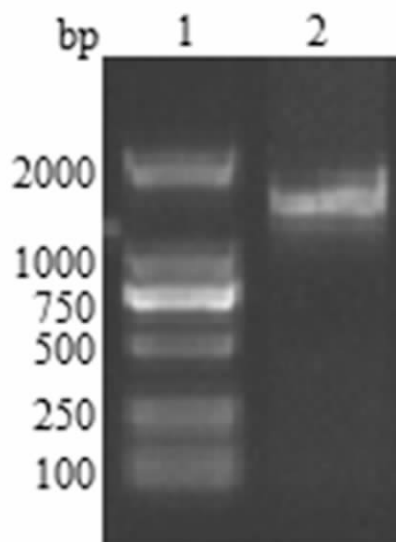


图5 重组腺病毒 pAd-LSDP5 的 PCR 鉴定 :1: DL 2000 DNA Marker

2: pAd-LSDP5 的 PCR 产物

Fig5 Identification of recombinant adenovirus pAd-LSDP5 by PCR :1: DL

2000 DNA Marker 2: PCR product of pAd-LSDP5

3 讨论

不仅脂肪组织 在哺乳动物几乎所有的真核细胞 ,甚至原核细胞都能以脂滴的形式储存一定量的脂肪^[6]。脂滴的结构已经明确 脂类构成核心 外围被单层磷脂覆盖 单层磷脂内镶嵌

有多种脂滴相关蛋白。研究表明,这些蛋白参与调控脂滴的生成、融合、转运、储存和脂肪分解代谢的分子调控过程^[7,8]。

PAT 家族是脂滴表面主要的结构蛋白,也是人们了解比较多的蛋白。其中,perilipin 的研究是最明确的,通过磷酸化形式对脂肪的贮存和消耗起双向调节作用^[9]。关于 ADRP 的功能目前不完全明确,可能在前脂肪细胞的早期分化过程中具有重要作用^[10]。TIP47 和 S3-12 在胞浆和脂滴表面均有分布,与脂滴的结合取决于细胞的代谢状态^[11]。LSDP5 是新近发现的脂滴相关蛋白, PAT 家族中一员,主要表达于肌肉、心脏、肝脏、棕色脂肪组织,其表达受 PPAR α 调控^[3,12,13],而 PPAR α 是脂肪代谢的主要转录调节因子^[14]。

LSDP5 主要表达于心脏。正常情况下,心脏优先利用脂肪酸作为能量来源,其脂解率较高但贮存脂肪的能力有限^[15]。在 Zhou YT 的实验中,肥胖大鼠的心肌细胞凋亡明显,心脏功能显著减退,同时观察到细胞 PPAR α 表达下降,Troglitazone 治疗后,细胞凋亡和心脏功能都有明显的改善^[16]。另一方面,PPAR α 的激活能减少心肌梗死面积,保护心脏缺血再灌注损伤^[17]。正常情况下 LSDP5 选择性地表达于心脏,可被 PPAR α 或禁食上调^[3,12,13]。LSDP5 存在于脂解率较高的组织可能是便于细胞内甘油三酯的储存并促进脂肪酸氧化^[18],避免脂肪酸堆积对细胞产生毒性作用。

腺病毒作为一种基因转移工具,能有效感染一系列哺乳动物细胞,可转染增殖和非增殖细胞,包装容量大,能容纳 7.5Kb 的外源 DNA,经过扩增纯化可达到较高的滴度,外源基因不整合到宿主基因,无插入致突变的危险。以上优点使腺病毒成为基因治疗、组织工程等研究领域中的应用较为广泛的病毒载体之一^[19,20]。因其转染不依赖细胞分裂状态,所以是研究原代非增殖细胞(如心肌细胞)基因表达的最佳系统。

LSDP5 作为一个新型的脂滴相关蛋白,其功能和具体作用机制尚不明确,本研究利用 AdEasy 系统成功构建了能够携带小鼠 LSDP5 基因的高效价的重组腺病毒 pAd-LSDP5,为进一步研究其具体作用机制奠定基础。

参考文献(Reference)

- [1] Michio S, Moritake H, Zhou YT, et al. Lipoapoptosis in Beta-cells of Obese Prediabetic fa/fa Rats [J]. The journal of biological chemistry, 1998,273(49): 32487-32490
- [2] Laura LL, Daniel SO. Palmitate-induced Apoptosis Can Occur through a Ceramide-independent Pathway[J]. The journal of biological chemistry, 2001, 276(18): 14890-14895
- [3] Tomohiro Y, Shuhei M, Kiyoto M, et al. MLDP, a Novel PAT Family Protein Localized to Lipid Droplets and Enriched in the Heart, Is Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor[J]. The journal of biological chemistry, 2006,281(20): 14232-14240
- [4] Birgit CGF, Kitty BJMC, Ron LJN, et al. Identification of Genes Potentially Involved in Rupture of Human Atherosclerotic Plaques[J]. Circ. Res, 2001,89:547-554
- [5] Bergman RN, Van Citters GW, Mittelman SD. Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome[J]. J Investig Med, 2001, 49(1): 119-26
- [6] Nicole AD, Perry EB. Minireview: Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis[J]. Endocrinology, 2008, 149(3):942-949
- [7] Deborah AB. Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat[J]. Current Biology,2001,11:R446-R449
- [8] Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms [J]. Progress in Lipid Research, 2001,40: 325-438
- [9] Londos C, Gruia GJ, Brasaemle DL, et al. Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells [J]. Int J Obes Relat Metab Disord,1996, 3: S97-101
- [10] Gary MC, Constantine L, Fredric BK. Translocation of Hormone-sensitive Lipase and Perilipin upon Lipolytic Stimulation of Rat Adipocytes [J]. The journal of biological chemistry, 2000, 275 (7), 5011-5015
- [11] Nathan EW, Benjamin KQ, James RS, et al. S3-12, Adipophilin, and TIP47 Package Lipid in Adipocytes [J]. The journal of biological chemistry, 2005, 280(19): 19146-19155
- [12] Knut TD, Tuva D, Elin H, et al. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1771(2):210-227
- [13] Nathan EW, Benjamin KQ, James RS, et al. OXPAT/PAT-1 Is a PPAR-Induced Lipid Droplet Protein That Promotes Fatty Acid Utilization[J]. Diabetes, 2006, 55:3418-3428
- [14] Janice MH, Daniel PK. Nuclear Receptor Signaling and Cardiac Energetics[J]. Circ Res, 2004,95:568-578
- [15] William CS, Fabio AR, Gary DL. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart[J]. Physiol Rev, 2005, 85: 1093-1129
- [16] Zhou YT, Grayburn P, Karim A, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity[J]. Proc Nati Acad Sci USA, 2000, 97(4): 1784-1789
- [17] Yue TL, Bao WK, Beat MJ, et al. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Protects the Heart From Ischemia/Reperfusion Injury[J]. Circulation, 2003,108(19):2393-2399
- [18] James G. G, Hsiao-Ping H. M, Emilio P. M, et al. Functional Interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the Control of Intracellular Lipid Accumulation [J]. The journal of biological chemistry vol, 2009,284(5): 3049-3057
- [19] Min W, Xin YZ, Xiao MR, et al. Adenoviral vector systems for gene therapy[J]. Gene Ther Mol Biol, 2005,9:291-300
- [20] Samuel KC, Michael AB. Current Advances and Future Challenges in Adenoviral Vector Biology and Targeting[J]. Curr Gene Ther, 2007, 7 (3): 189-204