

7型腺病毒E1A基因克隆及真核表达

沈鑫烽 申宝玲 黄燕燕 余雪娇 彭颖* 吕建新*

(温州医学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 为了研究7型腺病毒(Ad7) E1A在感染中的致病机制, 分离了Ad7d2病毒株, 构建了Ad7 E1A基因的真核表达体系。用A549细胞分离培养痰液标本中的腺病毒, 应用重叠延伸PCR扩增Ad7 E1A基因外显子, 产物克隆至真核表达载体pIRES-Neo, 构建重组子pIRES-Neo-Ad7E1A并转染A549细胞, 利用Western印迹对其表达产物进行鉴定。克隆测序显示扩增的Ad7 E1A基因外显子包含了完整的编码区基因, pIRES-Neo-Ad7E1A转染A549细胞的表达产物经Western印迹鉴定与设计相符。成功建立了Ad7 E1A基因的真核表达体系。

关键词 7型腺病毒; E1A基因; 克隆; 真核表达

腺病毒(adenovirus, Ad)是一群分布广泛的双链DNA病毒, 人腺病毒分为A~F六个组, 共51个血清型。其中, 7型腺病毒(adenovirus type seven, Ad7)属B组, 具有特殊的致病性: Ad7不仅与其他腺病毒一样能引起人类上呼吸道及眼部的自愈性疾病, 还可在婴幼儿和成人中引起急性致死性的下呼吸道感染; 此外, 最新的调查表明, 全世界范围内Ad所导致的人类疾病中, 约1/5由Ad7引起^[1]。因此, 无论从致病的严重性还是流行的广泛性来讲, Ad7都是一种十分重要的病原性病毒。而研究Ad7感染的分子生物学机制, 对于相关疾病的防治无疑具有十分重要的意义。

Ad基因组含有5个早期转录单位, 即E1A、E1B、E2、E3和E4。其中E1A基因在病毒基因组中最早转录, 所编码的早期蛋白正向调节Ad其他基因的活化并能启动和促进病毒复制^[2-4]。Ad7的特殊致病性必定与其特殊的基因结构与功能有关, E1A基因虽普遍存在于Ad基因组中, 但此前已报道的研究中大多以Ad的模式株Ad5 E1A为研究对象, 而国外研究表明Ad不同型别之间在E1A基因序列和表达产物的空间结构上有明显的区别^[2-4]。因此, 研究Ad7 E1A基因的结构与功能对于进一步了解Ad7的特殊致病机制是不可或缺的。为此, 本文克隆并构建了Ad7 E1A基因的真核表达载体, 为更深入的研究打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性核酸内切酶、高保真DNA聚合酶、DNA

marker、T4连接酶、pMD18-T simple载体均购于宝生物工程(大连)有限公司; Lipofecter、蛋白质预染marker和抗鼠HRP-IgG抗体购于碧云天生物公司; DAB显色试剂盒购自武汉博士德公司; 鼠源性抗E1A单克隆抗体购自BD公司; PCR引物由上海生物工程有限公司合成; 其余试剂均为国产分析纯。pIRES-Neo载体和大肠杆菌JM-109均为我室保存。A549细胞株(人肺癌上皮细胞)购自中国科学院上海细胞库, 使用含10% FBS的F12培养基(购自Gibco公司)在37℃, 5% CO₂细胞培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 Ad的分离培养和基因组DNA提取 痰液标本采自温州医学院附属育英儿童医院两岁肺炎患儿, 取500 μl与等量含双抗的PBS缓冲液混匀并反复冻融3次, 2 000 r/min离心20 min, 取上清液。六孔板中A549细胞长成单层后, 吸弃含10%小牛血清的F12培养液, 以PBS洗涤2次。加入标本上清液500 μl吸附1 h, 换以5%小牛血清的F12培养液维持。常规37℃培养并逐日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。刮下感染后7天细胞, 混合上清液反复冻融3次。2 000 r/min离心10 min, 取上清液反复感染以扩增病毒。PEG8000沉淀上清液中的病毒颗粒, 加入蛋白质裂解液(5% SDS, 20 mmol/L EDTA, 50 μg/ml蛋白酶K), 56℃水浴1 h后, 常规酚、氯

收稿日期: 2007-10-24 接受日期: 2007-12-12

浙江省自然科学基金资助项目(No.Y205188)

* 通讯作者。吕建新: Tel: 0577-86689905, E-mail: jxlu313@163.

com; 彭颖: Tel: 0577-86689905, E-mail: ying7754@yahoo.com.cn

仿、异戊醇抽提 Ad 基因组 DNA。

1.2.2 Ad基因组DNA的限制性酶切及电泳 病毒DNA基因组分别用 *Bam*HI、*Hind*III 和 *Sma*I 进行酶切, 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 Ad7 E1A 基因的克隆 参照发表的 Ad7 基因组全序列 BK005235, 利用 Primer 5.0 软件设计 PCR 引物: e1aF1: 5'-aatgcccgcaccatgagacacctgct-3'(下划线为 *Not*I 位点); e1aR1: 5'-tgtaataaagtggcagtgctattctca-3'; 其预期扩增片段长度为 580 bp, e1aF2: 5'-gtcctgtgtctgatgatgagtc-3'; e1aR2: 5'-ggaattcttattgccttg-cagtttccgggtact-3'(下划线为 *Eco*RI 位点); 其预期扩增片段长度为 205 bp。以提取的 Ad7 基因组 DNA 为模板, 先分别按常规 PCR 扩增 E1A 基因的外显子 1 (exon1) (e1aF1/e1aR1) 和外显子 2 (exon2) (e1aF2/e1aR2)。然后以 exon1 和 exon2 的 PCR 回收产物为模板, 以 e1aF1 和 e1aR2 为引物, 利用重叠延伸法得到 Ad7 E1A 基因的完整 cDNA 片段(图 1)。所得 PCR 产物与 pMD18-T simple 载体连接并转化大肠杆菌 JM-109, 在氨基青霉素平板上筛选转化菌。重组子 pMD18T-Ad7E1A 经 *Not*I/*Eco*RI 双酶切鉴定后送上海生工测序。

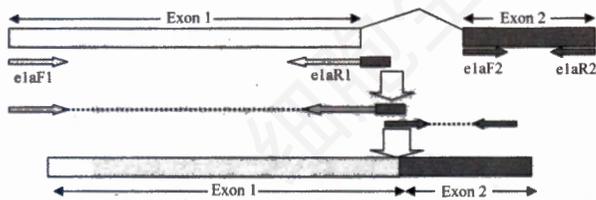


图 1 重叠延伸法扩增 Ad7 E1A 基因的 cDNA 的示意图



图 2 重组质粒 pIRES-Neo-Ad7E1A 图谱

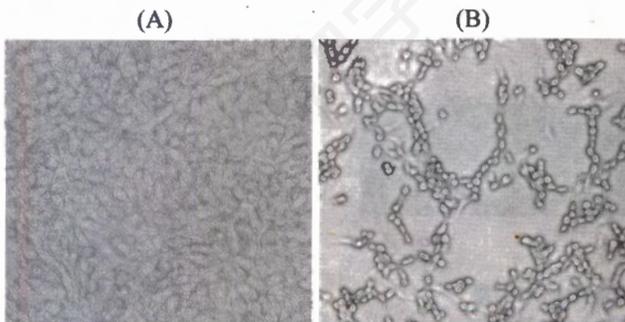


图 3 腺病毒感染 A549 细胞后的细胞病变效应

A: 正常 A549 细胞(100 ×); B: A549 细胞感染后 7 天(100 ×)。

1.2.4 pIRES-Neo-Ad7E1A 重组质粒的构建 以 *Not*I/*Eco*RI 双酶切 pMD18T-Ad7E1A, 将约 0.8 kb 的酶切片段克隆至 pIRES-Neo 的 *Not*I/*Eco*RI 位点, 将此重组质粒命名为 pIRES-Neo-Ad7E1A (图 2)。

1.2.5 Ad7E1A 基因的转染表达和免疫印迹分析 利用 Lipofecter 脂质体转染试剂, 将 pIRES-Neo-Ad7E1A 重组质粒转染至 A549 细胞(具体操作见说明书)。转染 48 h 后, 应用裂解液提取蛋白质, 以 12% SDS 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜 4 °C 封闭过夜。加入 (1 : 1 000) 的鼠抗 E1A 单抗, 于室温温育 1 h, 洗膜后加 (1 : 1 000) 的 HRP-羊抗鼠 IgG 于室温温育 1 h, 洗膜后以 DAB 试剂盒进行显色。

2 结果

2.1 腺病毒感染 A549 细胞

A549 细胞于感染痰液腺病毒后 5~7 天后能引起细胞肿胀、变圆、聚集成葡萄串珠状的典型细胞病变(图 3A、图 3B)。



图 4 病毒基因组 DNA 的酶切图谱

M1: 1 kb DNA ladder; M2: λ DNA *Hind*III; S: *Sma*I; H: *Hind*III; B: *Bam*HI。

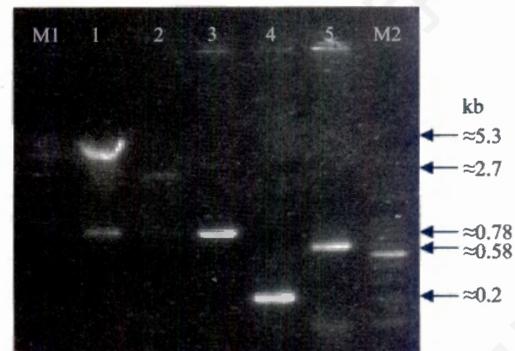


图 5 Ad7 E1A 基因 PCR 及酶切鉴定电泳图

M1: 1 kb ladder marker; 1: pIRES-Neo-Ad7E1A/*Not*I+*Eco*RI; 2: pMD18T-Ad7E1A/*Not*I+*Eco*RI; 3: Ad7 E1A; 4: exon2 PCR 产物; 5: exon1 PCR 产物; M2: 100 bp ladder marker。

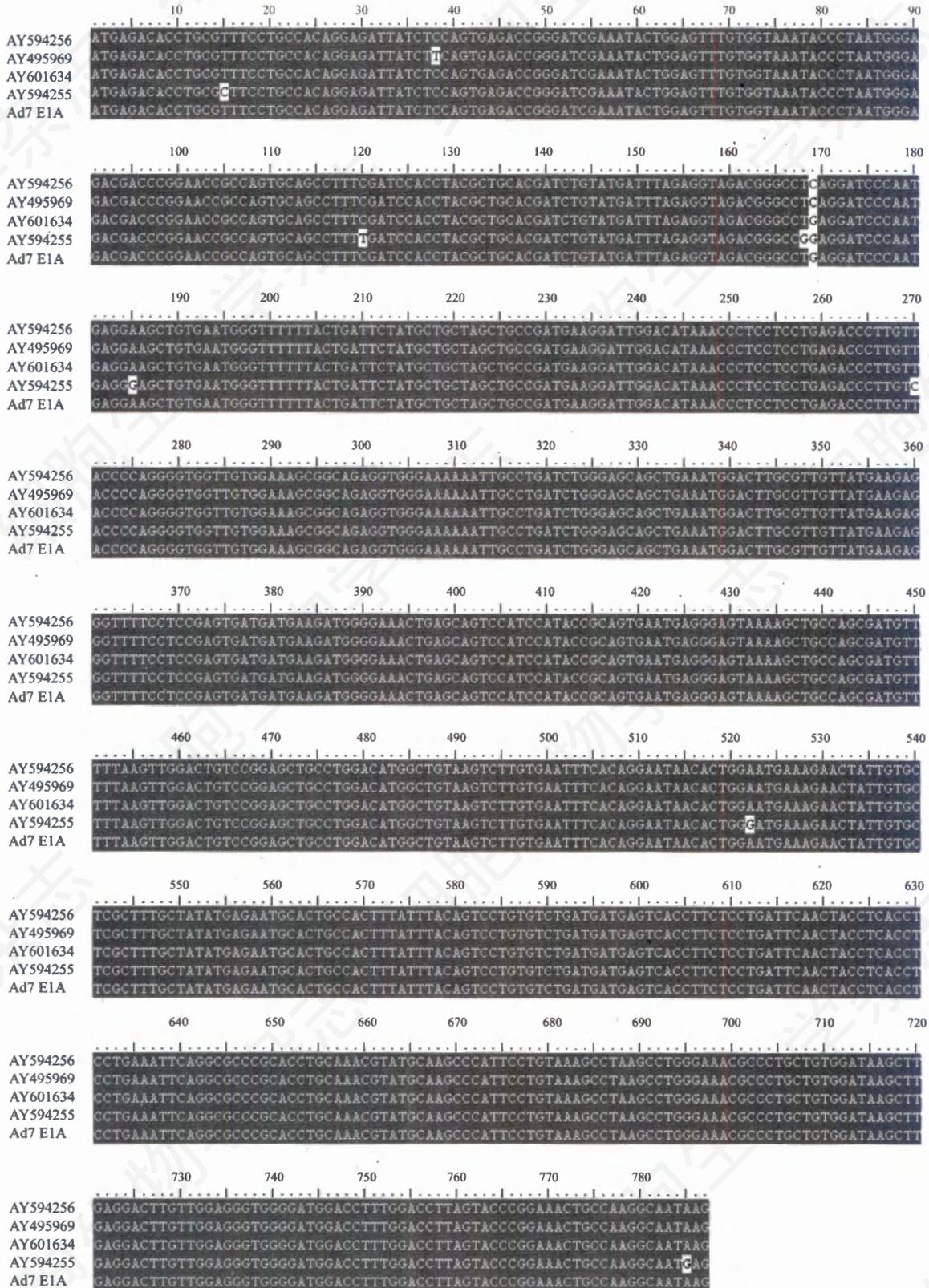


图6 Ad7 E1A 克隆测序的比对结果

Ad7 E1A: 克隆的完整 cDNA 序列; AY594256、AY495969、AY601634、AY594255: 4 个 Ad7 基因组的 E1A 完整 cDNA 序列。

2.2 病毒基因组DNA的酶切图谱

病毒基因组DNA的 *Bam*HI、*Hind*III 和 *Sma*I 酶切图谱(图4), 对照国外文献, 从 *Bam*HI 的带型初步确定本次分离的 Ad 毒株为 Ad7d2 型^[5]。

2.3 Ad7 E1A 基因的PCR扩增

以 Ad7 基因组 DNA 为模板, e1aF1/e1aR1 和 e1aF2/e1aR2 为引物, 经 PCR 分别扩增出约 580 bp (图5的5泳道)和 205 bp 片段(图5的4泳道); 以此为模板, e1aF1 和 e1aR2 为引物, 经 PCR 扩增出约 785 bp 片段(图5的3泳道)。重组子 pMD18T-Ad7E1A(图5的2泳道, 以 *Not*I/*Eco*RI 双酶切后得到大小约 2.7 kb 的载体片段和约 0.78 kb 的 E1A 基因 cDNA 片段)进一步测序结果显示与 Ad7 E1A 序列一致(图6)。

2.4 pIRES-Neo-Ad7E1A 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒经 *Not*I/*Eco*RI 双酶切, 电泳显示在约 0.78 kb (E1AcDNA 片段)和约 5.3kb (载体)处呈现两明显条带, 提示 Ad7 E1A 基因被克隆入 pIRES-Neo 中, 表明 pIRES-Neo-Ad7E1A 表达载体构建成功(图5的1泳道)。

2.5 Ad7 E1A 基因克隆测序的比对结果

Ad7 E1A 基因克隆测序的完整 cDNA 序列经 BioEdit 序列比对, 结果显示与4个在 GenBank 已经发表的 Ad7 基因组序列中的 E1A 序列基本相同, 达到 99%~100% 的相似度。4个 Ad7 基因组在 GenBank 的编号分别为 AY594256^[6]、AY495969、AY601634^[7]、AY594255^[1], 我们所得到的 Ad7 E1A 基因跟 AY601634 的 E1A 序列的相似度更是达到 100%(图6)。

2.6 Western 印迹结果

免疫印迹结果显示, 转染了 pIRES-Neo-Ad7E1A 的 A549 细胞 48 h 后的蛋白质提取物在大约 33 kDa 处有一条特异性蛋白质条带, 而相对应的无质粒转染的 A549 细胞蛋白提取物则无此条带, 证实 Ad7 E1A 基因已被成功转染入 A549 细胞并产生表达(图7)。

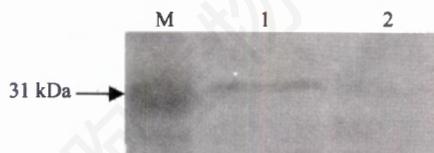


图7 表达产物的 Western 印迹分析

M: 预染蛋白 marker 箭头所指处大小为 31 kDa; 1: 转染了 Ad7 E1A 基因的 A549 细胞 48 h 蛋白质提取物印迹 (大小为约 33 kDa); 2: A549 细胞蛋白提取物。

3 讨论

Li 等^[8]于上世纪 80 年代用 DNA 限制性酶切分析的方法, 对 Ad7 的分子流行病学进行研究, 建立了基因组分型方法并从基因水平上阐述了 Ad7 的流行特点。Ad7d 在 1958 年至 1984 年间首次在中国境内分离到, 自 1980 年以后 Ad7d 逐步取代 Ad7b 成为我国的主要流行株^[9]。本文分离的野生型腺病毒毒株经酶切图谱分析初步确定为 Ad7d2 型。Ad7d2 首先在以色列分离到^[10], 1995 年在日本^[11]、1998 年在美国也出现了 Ad7d2 的流行^[1]。本文则报道了 Ad7d2 病毒株的分离和鉴定, 这对于 Ad7d2 在我国的流行趋势分析和致病机制研究具有重要的意义。

Ad5 E1A 基因编码两个主要的多肽, 一个含 243 个氨基酸(12 S, 243 R), 一个含 289 个氨基酸(13 S, 289 R), 是由于同一转录本被不同剪接而成的。E1A-289R 共有 3 个功能区, 即 N 末端 CR1、CR2、CR3 区。E1A-243R 有两个功能区, 除了不具有 CR3 区外, 其他与 E1A-289R 相同。Ad7 基因组测序表明, Ad7 E1A 与 Ad5 E1A 在基因结构的特点上是类似的^[2-4]。Ad7 E1A 由两个不相邻的外显子构成的, 中间被内含子所隔断。因此, 本课题采用重叠 PCR 的方法: 首先利用两对引物 e1aF1/e1aR1 和 e1aF2/e1aR2 分别扩增两个外显子片段 1 和 2; 由于 e1aR1 和 e1aF2 的 5' 端部分碱基互补, 当两个外显子片段混合后进行 PCR 扩增时两个片段的 3' 端就会有部分碱基互补, 利用重叠延伸法就可以将 E1A 基因的两个外显子连接起来, 得到 E1A 的完整 cDNA。克隆测序结果经 BLAST 软件分析表明, 本实验所得到的 Ad7 E1A 与已发表的 Ad7 E1A 序列同源性达到 99%, 对于 Ad7 E1A 的研究具有较好的代表性。

本课题中, 我们将 E1A 基因定向克隆至真核表达载体 pIRES-Neo, 构建了重组质粒 pIRES-Neo-Ad7E1A。pIRES-Neo 含新霉素耐药基因(Neo^R), 也便于今后构建 Ad7 E1A 的稳定表达体系。由于没有现成的 Ad7 E1A 单克隆抗体, 所以我们尝试使用了 Ad5 E1A 的单克隆抗体 M58, M58 是由原核表达的 *trpE*-E1A 融合蛋白所诱导的一株单抗^[12]。实验结果显示这一抗体也能特异地检测 Ad7 E1A 的表达产物, 说明 M58 所识别的抗原表位为 Ad7 E1A 与 Ad5 E1A 所共有。

总之, 通过本文的研究, 我们不仅分离到了 Ad7d2 病毒株, 而且成功对其 E1A 的完整 cDNA 进行了克隆及真核表达, 为深入研究 E1A 在 Ad7 感染中的致病机

制提供了坚实的实验基础。

参考文献(References)

- [1] Purkayastha A *et al. Virology*, 2005, **332**: 114
- [2] Avvakumov N *et al. J Virol*, 2002, **76**: 7968
- [3] Avvakumov N *et al. Virology*, 2004, **329**: 477
- [4] Howe JA *et al. Virology*, 2006, **345**: 220
- [5] Gerber SI *et al. Clin Infect Dis*, 2001, **32**: 694
- [6] Purkayastha A *et al. J Clin Microbiol*, 2005, **43**: 3083
- [7] Lin B *et al. Genome Res*, 2006, **16**: 527
- [8] Li QG *et al. J Virol*, 1986, **60**: 331
- [9] Li QG *et al. J Med Virol*, 1996, **49**: 170
- [10] Azar R *et al. J Med Virol*, 1998, **54**: 291
- [11] Noda M *et al. J Clin Microbiol*, 2002, **40**: 140
- [12] Harlow E *et al. J Virol*, 1985, **55**: 533

Cloning and Eukaryotic Expression of Adenovirus Type 7 E1A Gene

Xin-Feng Shen, Bao-Ling Shen, Yan-Yan Huang, Xue-Jiao Yu, Ying Peng*, Jian-Xin Lu*
(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract To provided data and material for the future study on the pathogenic mechanism of the adenovirus type 7 (Ad7) E1A, we isolated the Ad7d2 and constructed eukaryotic expression vector of Ad7 E1A gene. Respiratory specimens were inoculated into A549 cells to isolate adenovirus and extract viral DNA. Overlap extension PCR was applied to amplify the exon of E1A gene. PCR products were cloned into the pIRES-Neo vector to produce the expression vector pIRES-Neo-Ad7E1A. After transfection to A549 cell lines, Western blot was applied to identify the expression products. The correct clone of complete cDNA of Ad7 E1A were confirmed by DNA sequencing. The recombinant E1A products were identified by Western blot. The eukaryotic expression system of adenovirus type 7 E1A gene was constructed.

Key words adenovirus type 7; E1A gene; cloning; eukaryotic expression

Received: October 24, 2007 Accepted: December 12, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y205188)

*Corresponding author. Jian-Xin Lu: Tel: 86-577-86689905, E-mail: jxlu313@163.com

Ying Peng: Tel: 86-577-86689905, E-mail: ying7754@yahoo.com.cn