

大鼠 5-脂肪氧合酶 cDNA 的重组腺病毒制备及在大鼠血管外膜成纤维细胞中的表达[△]

董 晓^{1,2}, 柯尊平³, 王俊峰¹, 周 明¹, 谭 利¹, 党书毅¹

(1.湖北医药学院附属太和医院心内科,湖北省十堰市 442000; 2.湖北医药学院胚胎干细胞研究湖北省重点实验室,湖北省十堰市 442000; 3.湖北医药学院计算机实验教学中心,湖北省十堰市 442000)

摘要:目的 利用细菌内同源重组法快速构建携带大鼠 5-脂肪氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LO)cDNA 的重组腺病毒质粒和制备表达大鼠 5-LO 的重组腺病毒,并在大鼠原代血管外膜成纤维细胞中实现过表达。方法 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增大鼠 5-LOcDNA 片段,亚克隆至腺病毒穿梭质粒中,构建成转移质粒 pshuttle-CMV-5LO; 用 PmeI 线性化的 pshuttle-CMV-5LO 转化含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的感受态 BJ5183,通过同源重组获得阳性重组质粒 pAdEasy-1-5LO。重组质粒经鉴定后用 PacI 酶切,转入 HEK293 细胞,包装成重组腺病毒 Ad-1-5LO,经纯化,鉴定,滴度测定,转染体外培养的大鼠原代血管外膜成纤维细胞,Western blot 检测腺病毒载体在体外的过表达。结果 5-LOcDNA 成功地插入到穿梭质粒中,pshuttle-CMV-5LO 与 pAdEasy-1 在 BJ5183 中成功发生了同源重组,得到了重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-5LO,重组腺病毒经 PCR 和酶切鉴定表明携带有目的基因 5-LOcDNA,滴度约为 1.0×10^{15} pfu/L,转染大鼠原代血管外膜成纤维细胞后经 Western blot 检测,细胞内 5-LO 的表达明显增加。结论 细菌内同源重组法构建腺病毒载体具有高效、省时、省力的特点,制备出的高滴度重组腺病毒 Ad-1-5LO 实现了在血管外膜成纤维细胞中的过表达,为研究 5-LO 途径在血管重构中的作用奠定了基础。

关键词:5-脂肪氧合酶;白三烯;腺病毒载体;同源重组;克隆

中图分类号:R33 文献标志码:A 文章编号:1007-9688(2016)02-0201-06

Construction of recombinant adenoviral plasmid by homologous recombination in bacteria and expression of 5-lipoxygenase in rat adventitial fibroblasts

DONG Xiao^{1,2}, KE Zun-ping³, WANG Jun-feng¹, ZHOU Ming¹, TAN Li¹, DANG Shu-yi¹

(1.Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Hubei University of Medicine, Shian, Hubei 442000, China; 2.Department of Physiology and Key Lab of Embryonic Stem Cell of Hubei Province, Hubei University of Medicine, Shian, Hubei 442000, China; 3.Experimental Teaching Center of Computer, Hubei University of Medicine, Shian, Hubei 442000, China)

Abstract: Objectives To construct recombinant adenoviral plasmid containing rat 5-lipoxygenase (5-LO) cDNA using homologous recombination in bacteria and to express 5-LO in rat adventitial fibroblasts. **Methods** 5-LO cDNA was amplified from recombinant pBluescript-5LO plasmid using special primers containing Sall and XhoII restriction enzyme sites. The polymerase chain reaction (PCR) product was subcloned into the shuttle vector to generate transferred plasmid pShuttle-CMV-5LO. The vector pShuttle-CMV-5LO was linearized with Pme I and transformed into ultracompetent BJ5183 bacteria containing pAdEasy-1. Positive clone of homologous recombination (pAdEasy-1-5LO) was identified by PCR, enzyme digestion and DNA sequencing. The positive recombinant adenoviral plasmid was digested with PacI and transfected HEK293 cells with Lipofectamine 2000 to package recombinant adenovirus particles (Ad-1-5LO). The recombinant adenovirus was purified with density gradient centrifugation of cesium chloride. PCR was used to characterize the recombinant adenovirus expressing 5-LO. The titer and purity of the recombinant adenovirus

[△]基金项目:湖北省自然科学基金青年项目(项目编号:2015CFB211);湖北省教育厅科学技术研究项目(项目编号:Q20132104),湖北医药学院附属太和医院国家级项目培育基金(项目编号:2013PY01)。

作者简介:董晓(1981-),女,主治医师,讲师,研究方向为血管重构和动脉粥样硬化的机制。

通信作者:党书毅, E-mail: hbsythdsy@sina.com

were determined by ultraviolet spectroscopy. Rat adventitial fibroblasts were infected with the recombinant adenovirus and the expression of 5-LO in adventitial fibroblasts was detected by Western blot. **Results** 5-LO cDNA was successfully inserted into the shuttle vector. Homologous recombination occurred between pShuttle-CMV-5LO and pAdEasy-1 within BJ5183 to generate pAdEasy-1-5LO. The recombinant adenovirus was confirmed to be successfully constructed with PCR. The titer of the purified Ad-1-5LO was 1.0×10^{15} pfu/L and the infection efficiency was detected by 5-LO expression in rat adventitial fibroblasts. **Conclusions** The construction of adenovirus plasmid by homologous recombination in bacteria is quick and easy to perform. The preparation of recombinant adenovirus Ad-1-5LO with high titer provides a basis for further studies of 5-LO in vascular remodeling.

Key words: 5-lipoxygenase; leukotrienes; adenovirus; homologous recombination; clone

5-脂肪氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LO)途径是产生炎症介质白三烯(leukotrienes, LTs)的一条代谢通路,这条代谢途径中包括5-LO、5-LO 激活蛋白(FLAP)、LTA4 脱氢酶(LTA4H)、LTC4 合成酶(LTC4S)四种酶,其中5-LO 是LTs 合成过程中的限速酶。LTs 最早被发现参与了哮喘、类风湿性关节炎和炎症性肠病的发病,后来的研究显示这种脂质炎症因子在中枢神经系统中具有内分泌功能^[1]。近年来的研究更表明,它还参与了血管壁炎症性病变如动脉粥样硬化和血管瘤的发生、发展^[2-4]。因此,作为LTs 合成过程中的限速酶,5-LO 在正常细胞的生理过程和炎症及过敏反应的病理生理过程中都发挥了重要作用。5-LO 主要表达于各种白细胞、单核/巨噬细胞、肥大细胞、B 细胞、树突状细胞和动脉粥样硬化组织中的泡沫细胞。目前已经从人和猪的白细胞、大鼠嗜碱性粒细胞白血病细胞系(RBL-1)以及小鼠肥大细胞瘤细胞中纯化出了5-LO 蛋白^[1,5]。我们的前期研究显示血管外膜成纤维细胞中有5-LO 的表达,并且其表达的变化受到血管活性肽尾加压素 II(urotensin II)的调控^[6];大鼠主动脉球囊拉伤后血管外膜5-LO 的表达增加,外膜炎症细胞浸润增多^[7]。这些都表明5-LO 途径参与了血管壁炎症反应的过程。为了进一步研究5-LO 在血管壁病变中的作用,在特定细胞内过表达5-LO 就成了一种有效手段,然而要实现在细胞内过表达5-LO 就必须先构建高效的哺乳动物细胞表达载体。腺病毒载体具有转移效率高、感染细胞谱广、病毒滴度高和安全性好等优点,已经成为基因疫苗、基因治疗、细胞工程等研究中重要的转基因病毒载体。本研究利用高效的细菌内同源重组腺病毒质粒的制备方法,简单快速地构建出了携带大鼠5-LO 全长cDNA 的重组腺病毒质粒,并制备了表达大鼠5-LO 的重组腺病毒,在原代培养的大鼠血管外膜成纤维细胞中成功过表达出5-LO 蛋白,为研究5-

LO 途径在血管壁病变中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 试剂 GoTaq Green Maser Mix, dNTP Mix 购自美国 Promega 公司;琼脂、琼脂糖购自西班牙 Yito 公司;T4DNA 连接酶、Prim STAR HS DNA Polymerase 购自日本 TaKaRa 公司;限制性内切酶 PmeI、SalI、XhoI、PacI 购自美国 NEB 公司;DNA 分子量标准 BM2000 和 10 kb DNA ladder、λDNA/Hind III DNALadder 购自北京宝瑞杰公司;质粒小量提取试剂盒 DP01P-300 购自台湾 GeneMark 公司;引物合成和 DNA 测序由北京天一辉远公司完成;蛋白胨、酵母提取物购自英国 OXOID 公司;DMEM/F12、DMEM 高糖培养基和胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 生物化学制品有限公司;0.25%胰蛋白酶(不含 EDTA 含酚红)购自 Hyclone 和杭州四季青科技有限责任公司;Lipofectamine 2000 购自 invitrogen 公司;I 抗小鼠抗-GAPDH 单克隆抗体(TA-08),II 抗过氧化物酶结合的山羊抗小鼠 IgG(ZB-2305),过氧化物酶结合的山羊抗兔 IgG(ZB-2301) 购自中山金桥生物科技有限公司;兔抗 5-LO 多克隆抗体(ab39347) 购自英国 Abcam 公司;Western blot ECL 增强型发光液购自美国 GE healthcare 公司;其他试剂为国产分析纯。

1.1.2 质粒、菌株与引物 pBluescript-5LO 由本课题组在前期工作中构建所得;pAdEasy-1、穿梭质粒 pshuttle-CMV、大肠杆菌 XL-10gold、BJ5183 购自美国 stratagene 公司,大肠杆菌 Top10 F' 由北京大学中心实验室卜定方教授惠赠。根据大鼠 5-LO 序列设计一对含有 SalI 和 XhoI 酶切位点的特异性寡核苷酸引物:Forward Primer:5'-GATCGGT CGACCATGCCTTCCTACTGTACCG -3',Reverse Primer:5'-ATCGACTCGAGTTAGATGGC TACTACTGT

TTGGAATC-3'。

1.1.3 实验动物和细胞系 SD 大鼠由湖北医药学院实验动物中心提供;HEK293 细胞购自中科院细胞库。

1.1.4 仪器 二氧化碳培养箱(Thermo, 美国), 高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国), 超高速冷冻离心机(Hitachi, 日本), 倒置相差显微镜(Olympus BH2, 日本), 紫外凝胶成像仪(KCBIO-2800 Gel-proAnalyzer, 中国), Bio-Rad 基因导入电转仪(Bio-RAD CEModule, 美国), 化学发光检测系统(Kodak Image Station 4000MM PRO, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 转移质粒 pshuttle-CMV-5LO 的构建 我们在前期工作中已从大鼠胚胎肝脏中获取 mRNA 并克隆出 5-LO 全长 cDNA 片段并证实其正确性, 构建出了重组质粒 pBluescript-5LO。用带有 SalI 和 XhoI 酶切位点的引物从重组质粒 pBluescript-5LO 上 PCR 扩增出约 2 kb 的 5-LOcDNA 片段, PCR 反应条件为 98℃ 预变性 5 min, 98℃ 10 s, 68℃ 2 min 15 s, 30 个循环, 68℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行酚、氯仿抽提, 然后用 SalI 和 XhoI 双酶切, 酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后将 2 kb 的 5-LOcDNA 片段切下纯化。腺病毒穿梭质粒 pshuttle-CMV 经 SalI 和 XhoI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳回收线性化载体质粒后纯化。用 T4DNA 连接酶将带有 SalI 和 XhoI 粘性末端的 5-LOcDNA 片段与酶切后的 pshuttle-CMV 于 16℃ 连接过夜, 接着转化感受态大肠杆菌 XL10-gold, 挑取转化菌落, 获得插入 5-LOcDNA 的重组穿梭质粒 pshuttle-CMV-5LO。经 PCR、SalI 和 XhoI 双酶切鉴定重组是否成功。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 2 min 15 s, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min。

1.2.2 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-5LO 的构建 制备含 pAdEasy-1 的超感受态 BJ5183。pshuttle-CMV-5LO 经 PmeI 在 37℃ 酶切 15 min 后, 用酚、氯仿抽提, 纯化后加入含 pAdEasy-1 的超感受态 BJ5183 的菌液中混匀, 用电穿孔法转化含 pAdEasy-1 的超感受态 BJ5183。电穿孔条件为 2 500 V, 25 uF, 200 Ω, 电穿孔完毕后立即将转化菌液加入 1 mL SOC 培养基中, 37℃ 培养 1 h 后铺板。由于 pAdEasy-1 是氨苄抗性, pShuttle-CMV-5LO 是卡那抗性, 二者在细菌内同源重组后, pAdEasy-1 中的氨苄抗性基因及复制起始位点被

重组掉, 重组后的质粒上具有卡那抗性, 根据此特点用含有卡那抗性的 LB 培养板可对含有重组质粒的 BJ5183 进行初筛。挑取 3 个单克隆菌落, 少量培养, 碱裂解法少量提取质粒, 经 PacI 酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 若出现一大于 23 kb 和 4.5 kb 或 3.0 kb 的特征性条带, 即为可能的阳性质粒。最后挑选可能的阳性克隆进行 PCR 鉴定(PCR 反应条件同前)。将重组的 pAdEasy-1-5LO 在 XL10-gold 中大量扩增。

1.2.3 重组腺病毒在 HEK293 细胞中的包装、扩增 用 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养 HEK293 细胞, 当细胞生长至 5%~50% 融合时按 1:10 进行传代。取 4 μg PacI 线性化的 pAdEasy-1-5LO 质粒, 利用 Lipofectamine 2 000 转染 25 cm² 培养瓶中达到 80% 融合的 HEK293 细胞。细胞培养 2 d 后在显微镜下观察, 待有明显的病毒蚀斑形成, 约 90% 的 HEK293 细胞脱落后, 收集细胞, -20℃/37℃ 反复冻融裂解细胞 4 次, 4℃、12 000 g 离心 10 min, 收集含重组腺病毒的上清, 重新感染 HEK293 细胞, 按上述步骤重复收集/再感染。提取重组腺病毒 DNA 进行 PCR 鉴定。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 2 min 15 s, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min。

1.2.4 重组腺病毒的纯化及滴度测定 经过足够的收集/再感染循环后(约达到 60 个 75 cm² 培养瓶), 收集最后病毒感染的 HEK293 细胞, -20℃/37℃ 反复冻融裂解细胞 4 次, 4℃、12 000 g 离心 10 min, 取上清。参照文献报道的方法纯化重组腺病毒^[8]。取纯化后的病毒 100 μL, 10% SDS 20 μL, 磷酸盐缓冲液 880 μL, 混匀, 测定重组腺病毒的吸光度 A₂₆₀ 和 A₂₈₀, 据此计算出病毒的颗粒数及纯度。1A₂₆₀ = 10¹⁵ pfu/L, A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.3 表明纯度较高, 病毒滴度 (pfu/L) = A₂₆₀ × 稀释倍数 × 10。

1.2.5 Western blot 检测 5-LO 蛋白在 Ad-1-5LO 转染后的原代大鼠血管外膜成纤维细胞中表达

根据我们之前报道的方法培养原代大鼠血管外膜成纤维细胞^[9], 即 90~120 g 体质量的 Wistar 大鼠腹腔麻醉后断颈处死, 取胸主动脉分离出血管外膜, 组织块贴壁法培养原代大鼠血管外膜成纤维细胞, 原瓶消化后传代。将 P2 代大鼠血管外膜成纤维细胞以 1 × 10⁴ 个/cm² 接种于六孔板中, 当细胞生长至 70% 融合时, 用 Ad-1-5LO 转染成纤维细胞。转染 3 d 后弃去培养基, 磷酸盐缓冲液洗

涤细胞, 根据我们之前报道的方法提取蛋白并进行 Western blot 检测, 经化学发光系统成像^[9]。兔抗大鼠 5-LO 多克隆抗体稀释浓度为 1:250, 小鼠抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体稀释浓度为 1:2 000, 山羊抗小鼠和山羊抗兔 II 抗稀释浓度为 1:5 000。

2 结果

2.1 转移质粒 pshuttle-CMV-5LO 的鉴定结果

转移质粒 pshuttle-CMV-5LO 以 5-LO 特异性引物进行 PCR 扩增的产物只在 2 kb 处有一特异的条带, 说明重组的 pshuttle-CMV-5LO 含有目的基因 5-LOcDNA。转移质粒 pshuttle-CMV-5LO 进一步经 SalI 和 XhoI 酶切后获得了预期大小的两个片段, 即 7.5 kb 的 pShuttle-CMV 和 2 kb 的 5-LO 序列。证明大鼠 5-LO 已成功正向的插入了腺病毒的穿梭质粒, 酶切结果见图 1。

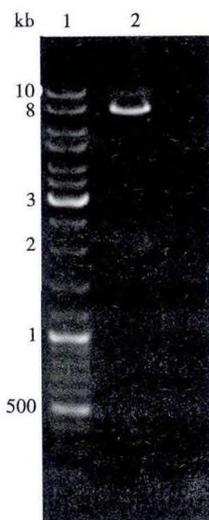


图 1 pShuttle-CMV-5-LO 重组质粒的酶切鉴定结果 (Line1: 10 kb DNA Ladder; Line 2: pShuttle-CMV-5-LO 经 SalI 和 XhoI 酶切, 获得 7.5 kb 的 pShuttle-CMV 和 2 kb 的 5-LO 序列)

2.2 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-5LO 的鉴定结果

pShuttle-CMV-5-LO 转化含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 细菌后, 含有重组质粒的细菌可在含卡那霉素抗性的培养基中生长形成克隆。挑取转化克隆, 扩增后小量抽提重组质粒 DNA, 用 PacI 酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳后重组质粒出现一大于 23 kb 和 4.5 kb 的片段, 说明 pAdEasy-1 与 pShuttle-CMV-5-LO 在复制起始位点发生了同源重组; 出现一大于 23 kb 和 3.0 kb 的片段, 说明 pAdEasy-1 与 pShuttle-CMV-5-LO 在左臂之间发生了同源重

组(图 2)。同时, 用 pAdEasy-1-5LO 质粒以大鼠 5-LO 特异引物进行 PCR 扩增, 电泳后只在 2 kb 处有一特异性条带, 说明 pAdEasy-1-5LO 含有目的基因大鼠 5-LOcDNA(图 3)。

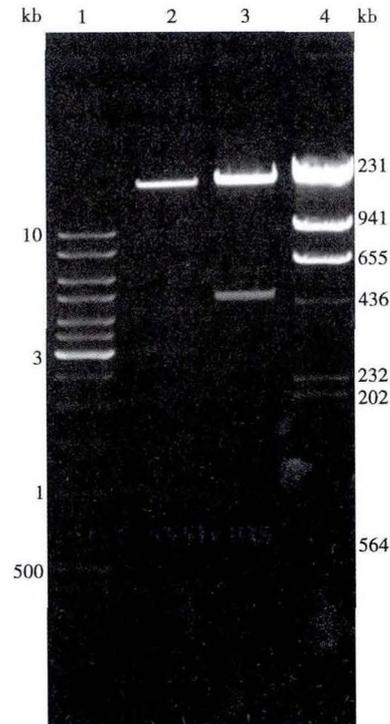


图 2 pAdEasy-1-5-LO 重组质粒的酶切鉴定结果 (Line1: 10 kb DNA Ladder; Line 2: 在 BJ5183 细菌中同源重组的 pAdEasy-1-5-LO 质粒; Line 3: 在 BJ5183 细菌中同源重组的 pAdEasy-1-5-LO 质粒; Line4: λDNA/Hind III DNALadder。同源重组质粒 pAdEasy-1-5-LO 经 PacI 酶切, 根据同源重组的方式不同, 得到约 30 kb 条带和分别为 3.0 kb 或 4.5 kb 条带)

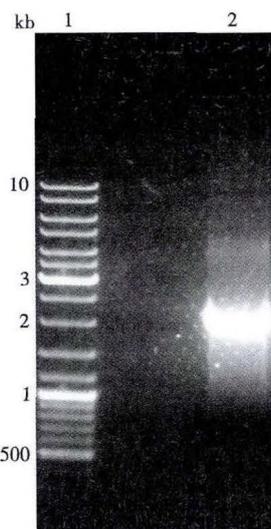


图 3 pAdEasy-1-5-LO 的 PCR 鉴定结果 (Line1: 10 kb DNA Ladder; Line2: 在 BJ5183 细菌中同源重组的 pAdEasy-1-5-LO 质粒经大鼠 5-LO 特异性引物 PCR 扩增后的产物, 为 2 kb)

2.3 重组腺病毒滴度测定结果

线性化的 pAdEasy-1-5-LO 经 Lipofectamine 2000 介导转染 3~10 d, 在倒置显微镜下可见受病毒感染 HEK293 细胞逐渐出现细胞病变, 即细胞肿胀、变圆, 随后聚集成葡萄状, 崩解脱落形成蚀斑, 表明重组腺病毒在 HEK293 细胞中成功包装和扩增。包装和扩增的重组腺病毒经纯化后经紫外分光光度计测定, 病毒滴度为 1.0×10^{15} pfu/L, $OD_{260}/OD_{280} = 1.36 > 1.3$, 说明病毒滴度较高, 可以满足转染的需要, 纯度较高。

2.4 Western blot 检测 5-LO 在原代大鼠血管外膜成纤维细胞中的过表达结果

培养大鼠原代血管外膜成纤维细胞, Ad-1-5LO 转染血管外膜成纤维细胞, 转染 3 d 后提取蛋白用 Western blot 检测细胞内 5-LO 的表达, 与对照组相比, 转染 Ad-1-5LO 的血管外膜成纤维细胞中 5-LO 表达明显增加(图 4)。

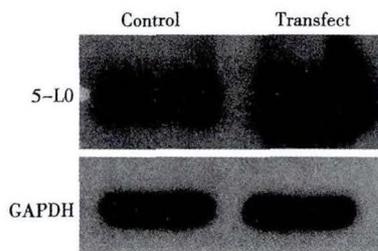


图 4 Western blot 检测腺病毒表达载体 pAdEasy-1-5-LO 转染大鼠血管外膜成纤维细胞过表达 5-LO

3 讨论

LTs 是由多不饱和脂肪酸花生四烯酸代谢而来的一系列有生物活性的脂质调节因子, 它们参与了很多破坏性的炎症疾病, 包括哮喘、关节炎、动脉粥样硬化、疼痛和癌症的病理生理过程^[10]。LTs 的合成起始于胞浆磷脂酶 A2 (phospholipase A2, cPLA2) 被激活引起膜甘油磷脂释放花生四烯酸。在 Ca^{2+} 离子、细胞应激等刺激下 cPLA2 作用于细胞膜、核膜释放花生四烯酸(AA), 花生四烯酸随后被激活的 5-LO 从胞浆转移至核膜与 5-LOX 激活蛋白 (5-lipoxygenase-activating protein, FLAP) 结合并催化花生四烯酸氧化、脱水合成 LTA₄; LTA₄ 被下游的 LTA₄H 和 LTC₄S 两种酶分别代谢为两种白三烯: LTB₄ 和 LTC₄; LTC₄ 随后被代谢为 LTD₄ 和 LTE₄。这条代谢通路被称为 5-LO 途径, 其代谢产生的 LTs 都是强有力的炎症因子, 能促进单核巨噬细胞的趋化和平滑肌细胞的

收缩, 在多种炎症性疾病中发挥了重要作用^[11]。近来的研究发现, LTs 是参与血管重构的炎症介质之一, 它能促进血管内皮细胞和平滑肌细胞的增殖、迁移和炎症反应^[12-14], 我们的前期研究也显示球囊拉伤的大鼠主动脉血管外膜成纤维细胞中 5-LO 表达增加, 血管外膜炎症细胞浸润增多^[7]。因此, 阻断 LTs 的产生可能对以上多种炎症性疾病的治疗具有重要作用。5-LO 是白三烯合成过程中的限速酶, 在 LTs 病理生理作用的研究中具有重要作用, 也是阻断 LTs 产生的最佳靶点。

为了进一步探索 5-LO 在血管重构中的病理生理作用, 为抑制血管重构选择新的治疗靶点, 在组织中过表达 5-LO 就成为了一种理想的研究方法。但是如何将外源基因有效地导入靶细胞并使其稳定表达则是过表达的关键环节。目前, 腺病毒被认为是高效表达的基因转移载体, 腺病毒宿主范围广, 不仅可感染复制分裂的细胞, 也可感染静止期细胞; 腺病毒包装容量大, 可以插入 7.5 kb 的外源性基因片段; 转染过程中腺病毒基因不整合到宿主细胞的染色体中, 不存在激活致癌基因或插入突变等危险; 病毒经繁殖、纯化后可达到很高滴度, 并达 100% 的感染率; 还有性质比较稳定, 对人类相对安全等诸多优点。这些优点使其在在体基因转移中具有较大优势, 成为目前外源基因过表达中应用最广泛的载体。

传统的腺病毒载体制备方法是将穿梭载体和腺病毒基因组质粒共转染 293 细胞, 存在同源重组率低的缺点。本研究采用了细菌内同源重组法快速构建重组腺病毒质粒, 将质粒的转染和同源重组在 BJ5183 菌中完成, 由于质粒转化细菌的效率极高, 细菌繁殖速度快, BJ5183 菌中的 RecA 具有很强的重组活性, 极大地提高了同源重组率。在构建 Ad-1-5LO 的过程中, 我们将线性化的 pShuttle-CMV-5LO 导入含有 pAdEasy-1 质粒的感受态 BJ5183 细菌, 同源重组后 pShuttle-CMV-5LO 的耐卡那抗性基因被重组进去, 而 pAdEasy-1 的耐氨苄抗性被重组掉, 成功同源重组的细菌在含卡那霉素培养板上能生长, 未发生同源重组的细菌不能生长。经过筛选, 成功重组的腺病毒质粒用 PacI 酶切后可获得一个约 30 kb 的大片段和一个 4.5 kb 或 3.0 kb 的特征性小片段。经鉴定的重组腺病毒质粒通过转染 HEK293 细胞, 最终包装产生具有感染能力的腺病毒。这种病毒载体构建方法省却了细胞内同源重组法必须进行的多轮

费时、费力的筛选鉴定,大大缩短了实验周期,显著提高了成功率。

本研究在构建腺病毒载体中使用了大肠杆菌 BJ5183 和 XL10-gold, BJ5183 具有 RecA 的遗传重组活性,使转入细菌内的腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 和携带 5-LO 的穿梭质粒 pShuttle-CMV-5LO 发生同源重组。XL10-gold 菌具有 RecA 和 EndA1 缺陷,成功重组的腺病毒质粒在 XL10-gold 中扩增时大大提高了提取质粒的质量和确保插入的 5-LO 基因的稳定性。同时,本研究采用了电穿孔法将穿梭质粒转入 BJ5183,与传统的化学转化法相比大大提高了转染效率,简化了转染步骤。

通过以上方法构建的重组腺病毒 Ad-1-5LO 经纯化后病毒滴度为 1.0×10^{15} pfu/L, OD260/OD280=1.36>1.3, 病毒转染大鼠原代血管外膜成纤维细胞后能实现 5-LO 在细胞中的过表达,表明这种方法制备的腺病毒滴度高,纯度好,可以满足进一步实验的需要,为研究 5-LO 在血管重构中的病理生理作用提供了一种可靠的实验工具。

参考文献:

[1] BALCAREK J M, THEISEN T W, COOK M N, et al. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding rat 5-lipoxygenase[J]. J Biol Chem, 1988, 263(27): 13937-13941.

[2] CAO R Y, AMAND S T, GRÄBNER R, et al. Genetic and pharmacological inhibition of the 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in atherosclerotic lesion development in ApoE deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2009, 203(2): 395-400.

[3] BHAMIDIPATI C M, WHATLING C A, MEHTA G S, et al. 5-Lipoxygenase pathway in experimental abdominal aortic aneurysms[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(12): 2669-2678.

[4] LEE S J, CHOI E K, SEO K W, et al. 5-Lipoxygenase plays a pivotal role in endothelial adhesion of monocytes via an

increased expression of Mac-1[J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(4): 724-733.

[5] DIXON R A, JONES R E, DIEHL R E, et al. Cloning of the cDNA for human 5-lipoxygenase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(2): 416-420.

[6] DONG X, YE X J, SONG N N, et al. Urotensin II promotes the production of LTC4 in rat aortic adventitial fibroblasts through NF- κ B-5-LO pathway by p38 MAPK and ERK activations[J]. Heart Vessels, 2013, 28(4): 514-523.

[7] 董晓, 王俊峰, 李军, 等. 尾加压素 II 促进大鼠主动脉球囊拉伤血管新生内膜形成和 5-LO 的表达[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(2): 188-192.

[8] 唐俊明, 黄永章, 郭凌郎, 等. 细菌内同源重组法构建 pAd-EGFP-HSDF-1A 腺病毒质粒[J]. 郟阳医学院学报, 2006, 25(4): 193-197.

[9] SONG N N, DING W H, CHU S Y, et al. Urotensin II stimulates vascular endothelial growth factor secretion from adventitial fibroblasts in synergy with angiotensin II[J]. Circ J, 2012, 76(5): 1267-1273.

[10] HONDA T, KABASHIMA K. Leukotrienes as key mediators and amplifiers in allergic inflammation: insights from the bench and clinic[J]. Exp Dermatol, 2014, 23(2): 95-96.

[11] POULIN S, THOMPSON C, THIVIERGE M, et al. Cysteinyl-leukotrienes induce vascular endothelial growth factor production in human monocytes and bronchial smooth muscle cells[J]. Clin Exp Allergy, 2011, 41(2): 204-217.

[12] DUAEH E, ADAPALA R K, AL-AZZAM N, et al. Cysteinyl leukotrienes regulate endothelial cell inflammatory and proliferative signals through CysLT2 and CysLT1 receptors[J]. Sci Rep, 2013, 3: 3274.

[13] BLAZEVIC T, SCHAIBLE A M, WEINH UPL K, et al. Indirubin-3'-monoxime exerts a dual mode of inhibition towards leukotriene-mediated vascular smooth muscle cell migration[J]. Cardiovasc Res, 2014, 101(3): 522-532.

[14] YU Z, RICCIOTTI E, MIWA T, et al. Myeloid cell 5-lipoxygenase activating protein modulates the response to vascular injury[J]. Circ Res, 2013, 112(3): 432-440.

(收稿日期:2015-11-30)