·论著·

人骨保护素基因重组腺病毒的构建及鉴定

王晓军 王爱民 张忠荣 吴思宇 郭庆山 吴军 贺伟峰 汤守营 张全顺

摘要：目的 构建人骨保护素（hOPG）基因的重组腺病毒载体并检测其转染能力。**方法** 采用基因工程技术，将hOPG基因片段插入到腺病毒载体质粒pAdTrack-CMV上，利用PadEasy系统与骨架质粒在大肠杆菌BJ5183胞内进行同源重组，经293细胞包装、扩增，得到携带hOPG基因的重组腺病毒AdEasy-PAdtrack-CMV-hOPG，将重组腺病毒AdhOPG对大鼠骨髓基质细胞（rMSCs）进行感染。采用PCR方法对重组腺病毒载体进行鉴定，利用绿色荧光报告基因转染结果，以荧光计数法检测重组腺病毒的滴度。**结果** 酶切鉴定及PCR结果证明hOPG基因重组腺病毒载体成功，病毒滴度可达2.5×10^9 pfu/ml，具有很强感染能力，**结论** 应用细菌内同源重组法，成功构建了含hOPG重组腺病毒载体。

关键词： 骨保护素；腺病毒；同源重组；基因治疗

Construction and identification of human osteoprotegerin (hOPG) gene recombinant adenovirus *WANG Xiaojun WANG Aimin, ZHANG Zhongrong, et al. Department of Orthopaedics, the 251 Hospital of PLA, Zhangjiakou, Hebei* 075000, China

Abstract: Objective To construct the recombinant adenovirus of human osteoprotegerin (hOPG) gene and to observe its transfection ability. **Methods** By the method of homogenous recombination in bacteria, the fragment of hOPG gene encoding region was cloned into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV. With the resultant plasmid and the backbone plasmid pAdEasy-1, the homologous recombination took place in the E. coliBJ5183 and the recombinant adenoviral plasmid was generated. The adenoviruses were packaged and amplified in the 293 cells. AdEasy-PAdtrack-CMV-hOPG was achieved and transferred to rMSCs. The target gene was detected by polymorase chain reaction (PCR). The titer and its infection rate were determined using the green fluorescent protein (GFP). **Results** Restriction endonuclease and PCR analyses confirmed that the hOPG gene was successfully inserted into the adenovirus vector with very strong power of transfection. The titer of the recombinant adenovirus was 2.5×10^9 pfu/ml. **Conclusions** The recombinant adenovirus containing hOPG gene was successfully constructed by the method of homogenous recombination in bacteria.

Key words: Osteoporotegerin; Adenovirus; Homogenous recombination; Gene therapy

骨保护素（osteoprotegerin，OPG），或称破骨细胞生成抑制因子，是1997年发现的有401个氨基酸残基的肝素结合分泌型糖蛋白，属于肿瘤坏死因子受体（TNFR）超家族[1]。OPG由骨髓基质细胞和成骨细胞产生，具有抑制破骨细胞分化、抑制成熟破骨细胞的活性并诱导其凋亡的功能[2]。体内调解骨代谢的激素或细胞因子均通过调节OPG/RANKL的平衡而发挥作用。故若以该基因修饰的骨髓基质细胞和成骨细胞作为种子细胞移植，则具有抑制骨吸收、促进成骨的作用，可望为骨质疏松、人工关节无菌性松动、类风湿性关节炎、癌症骨转移等疾病的治疗研究开辟了新的途径。为此，本实验采用基因工程技术，体外构建表达人骨保护素（hOPG）重组腺病毒载体，旨在为进一步进行上述疾病的基因治疗研究打下基础。

作者单位：400042 第三军医大学大坪附属医院野战外科研究所全军战创中心骨创伤科（王晓军、王爱民、张忠荣、吴思宇、郭庆山）；张家口，解放军第251医院骨科（王晓军、汤守营、张全顺），第三军医大学西南医院烧伤研究所（吴军、贺伟峰）

通讯作者：王爱民、王晓军，E-mail：wangxiaojun102@yahoo.com.cn.

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

含hOPGcDNA的质粒PUCl9-hOPG由第四军医大学西京医院刘继中博士惠赠。应用新型腺病毒载体构建系统AdEasy-system（购自Stratagene公司），BJ5183菌株、腺病毒基因组质粒pAdEasyl（卡那霉素抗性）、含绿色荧光蛋白（greenfluorescentprotein，GFP）的穿梭质粒pAdTrack-CMV（卡那霉素抗性）、腺病毒包装细胞293细胞均为第三军医大学烧伤研究所馈赠。

1.2 酶类和主要生化试剂

限制性内切酶EcoRI、EcoRV、BamHI、KpNⅠ、PmeⅠ、PacⅠ，T4DNA连接酶（MBI公司）。T4polymerase、taq酶、Mgcl2、DNTP、CIAP（New England Biolabs公司）。小规模质粒提取试剂盒、纯化试剂盒、胶回收试剂盒、PCR回收试剂盒（Omega公司）。脂质体LipofectamineTM2000（GibcoBRL公司）。

1.3 腺病毒穿梭质粒PAdtrack-CMV-hOPG的构建

用EcoRV单酶切PAdtrack-CMV，0.8%琼脂糖凝胶电泳回收，再用dAP去磷酸化，用PCR回收试剂盒回收并测定浓度。用EcoRI、BamHI双酶切质粒PUCl9-hOPG，0.8%琼脂糖凝胶电泳分离，并回收1.2 kb大小的hOPG片断，T4 polymerase填平，PCR回收试剂盒回收并测定浓度。将两片断在T4DNA连接酶作用下4℃，16h，平端连接，连接后电转DH5α感受态。涂加有卡那霉素的LB平板，37℃过夜，挑单菌落振摇培养过夜，试剂盒提取质粒。用KpNI单酶切鉴定，0.8%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

1.4 PAdtrack-CMV-hOPG穿梭质粒的鉴别

（1）酶切法：根据PAdtrack-CMV质粒上多克隆位点有一个KpnI酶切位点，hOPGcDNA300bp处也有一个Kpnl酶切位点，所以正确连接，用Kpnl单酶切应是300bp和10.2kb，而反向连接是1.1kb和9.4kb。（2）PCR法：根据PAdtrack-CMV-hOPG正确连接设计两对引物P_1、P_2和P_c、P_0。P_1、P_2均根据hOPGcDNA序列所设计的引物，上游引物P_1：5′-AGGAGGCATTCTTCA-3′；下游引物P_2：5′-GACCTGGTTACCTATCA-3′，产物为572bp。而上游引物P_c是以载体中紧靠目的基因的CMV的序列为模板设计的引物：5′-TGGGTAACTGCAGTTACCT-3′，下游引物P_c以hOPG序列为模板的引物：5′-CGATCGTACTGACCACCTGT-3′，产物为543bp，含有载体及插入的目的基因的序列。引物由大连宝生物公司合成。扩增条件为：94℃预变性5min；94℃变性30s，55℃退火30s，72℃延伸1min，循环30次，最后72℃延伸10min。反应结束后取适量PCR产物行电泳。

1.5 在细菌内应用同源重组法构建重组腺病毒质粒pAdhOPG

①在BJ 5183菌内进行同源重组。以碱法提取小量PAdTrack-CMV-hOPG质粒，以PmeI酶酶切线性化。将酶切产物以酚/氯仿抽提、乙醇沉淀，以30μl水溶解。将6μl酶切产物和1μlpAdEasyl质粒加入100μl BJ5183感受态细菌中混匀。并将其转入两侧电极板间距为0.2cm的电转杯中。以1.5kV，200Ω，25μF进行电转，立即加入900μlLB细菌培养液并混匀，直接以50、200和700μ/L菌液涂于含50μ g/ml卡那霉素的LB细菌培养基平板，置37℃孵箱内过夜培养。②重组质粒的筛选和鉴定。挑取平皿中的小菌落于含有50μ g/mL卡那霉素的LB液中振摇过夜。提取质粒，于0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行初步筛选鉴定。将进一步选定的质粒以PacI酶切鉴定进行。将所选定的质粒应用hOPG基因引物进行PCR扩，并将扩增产物进行序列测定。

1.6 在293细胞内生成腺病毒AdhOPG

①将293细胞以2×10^6细胞接种于25cm² 培养瓶中，于50ml/L CO_2孵箱中培养24h至约有50～70%的细胞汇合。转染当天，以PacI酶切pAdhOPG质粒，乙醇沉淀，重悬于20μl超纯水中。将12μl FUGENE[TM]6转染液（Roche公司）小心加入180μl无血清DMEM培养基中。再加入2μg PacI酶切线性化的质粒，轻轻使之混合，于室温孵育15～30min。在等待过程中，吸出受体细胞的培养基，用2ml无血清培养液洗涤细胞1次，然后每个25cm² 培养瓶内加12.5ml单纯DMEM培养基，重置37℃CO_2孵箱中孵育10min。加FUGENE[TM]6pAdhOPG质粒混合物于培养瓶内使分布均匀，重置于CO_2孵箱内孵育4～6h，于4～6h后吸出含FUGENE[TM]6重组腺病毒质粒混合物的培养基，加入3ml新的DMEM（100ml/L FBS）培养液。②腺病毒生成的观察。由于Adeasy system在细胞内可以表达绿色荧光蛋白（Greenfluorescent protein，GFP），因此可以通过在荧光显微镜下观测荧光来观察腺病毒生成情况。于转染24～48h

后，即可在荧光显微镜下观察到绿色荧光。③腺病毒的提取。将转染后培养7d的293细胞轻轻吹下，加DMEM，2ml，1000r/min离心5min弃上清液，用1ml冷PBS重悬，将其-20℃与37℃反复冻融3次以上，于20000×g离心15min，小心吸取上清液即为病毒液于EP管中，-20℃保存（-80℃长期保存）。用所提取的病毒液备感染293细胞，以进一步扩增腺病毒。

1.7 重组腺病毒AdhOPG的包装、扩增和提取

感染腺病毒前1d，293细胞进行传代，当细胞至80%融合即可进行转染，100μl病毒原液感染5×10^6细胞。将病毒原液加无血清培养基1ml加入293细胞于37℃，50ml/LCO_2孵育4～6h，弃掉培养液，换新鲜含血清的培养基，感染不同时间后在荧光显微镜下观察GFP表达情况，待有大量细胞表达GFP且有部分细胞漂浮时（约7～10d），将293细胞吹打下，加DMEM培养基2ml 1000r/min离心5min弃上清液，用1ml冷PBS液重悬，收集细胞并反复冻融提取病毒液，-20℃保存。以所提取的病毒液再感染293细胞，以大量制备病毒液。

1.8 重组腺病毒AdhOPG的病毒滴度测定

将多次感染制备的病毒液作不同比例（1∶10^5～1∶10^{12}稀释，将400μl稀释液加至293细胞培养板（24孔板）中，37℃，于50ml/LCO_2孵箱中吸附4～6h，换新鲜培养基，继续培养18～24h于荧光显微镜下计数GFP阳性细胞数。选择能感染的最高稀释倍数孔内细胞（有荧光），按下列公式计算病毒滴度：病毒滴度＝GFP阳性细胞数×病毒上清稀释倍数（PFU·ml^{-1}）/0.4ml。

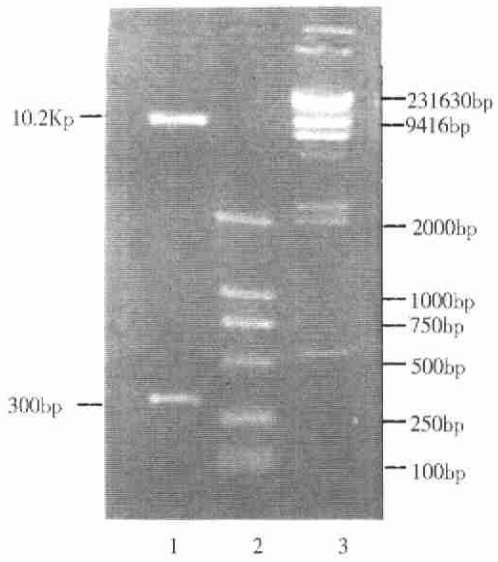
1.9 重组腺病毒AdhOPG的鉴定

（1）观测GFP表达确认重组腺病毒的重组及包装成功。（2）PCR法鉴定重组病毒DNA中是否正确插入目的基因。取4μl病毒上清，加入5ul蛋白酶K，37℃水浴1h，再煮沸5min。取5μl所得产物做PCR模板，引物及反应条件同前。以未插入目的基因的腺病毒AdEasy-PAdTrack-CMV为阴性对照，PUC19-hOPG质粒为阳性对照。反应结束后取适量PCR产物行电泳。

2 结果

2.1 穿梭质粒PAdtrack-CMV-hOPG构建的鉴定

提取重组PAdtrack-CMV-hOPG质粒，电泳结果显示目的质粒略大于Track-CMV质粒；并用KPNI酶切鉴定，经单酶切后为300bp和10.2Kb两个片段（图1）。表明重组穿梭质粒PAdtrack-CMV-hOPG构建成功。

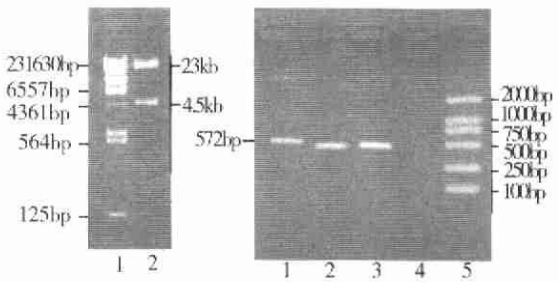


1为PAdtrack-CMV-h0PG经KpM酶切为300bp和10.2Kb两个片断；2为DL2000maker；3为λHindIIImaker

图1

2.2 重组腺病毒质粒pAdhOPG的鉴定

大肠杆菌BJ5183内同源重组产生重组腺病毒质粒AdEasy-PAdtrack-CMV-hOPG，用PacI酶切后，产生大小分别约为33kb和4.5kb的两个片段（图2A）。PCR（引物同前）鉴定证实有的克隆目的基因在同原重组时丢失了，挑选正确克隆继续进行（图2B）。



A1为AHindIIImaker，A2均为AdEasy-PAdtrack-CMV-hOPG经PacI酶切为33kb和4.5kb两个片段；B1为P_1、P_2扩增产物572bp，B2为P_c、P_o扩增产物543bp，B3为阳性对照，B4为阴性对照，B5为DL2000maker

图2

2.3 在293细胞内腺病毒AdhOPG的生成及扩增

应用PacI酶切线性化的重组腺病毒质粒pAd-

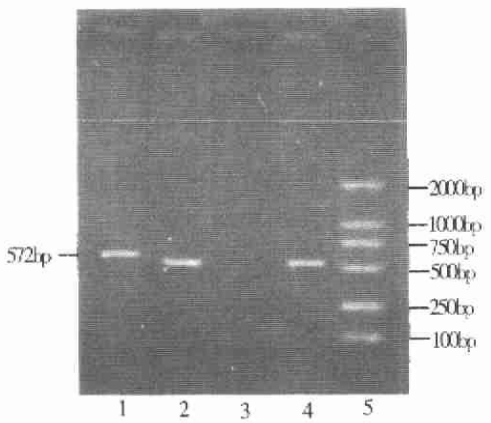
hOPG转染293细胞。转染24h后，即可在荧光显微镜下观察到散在少量的绿色荧光。随后荧光量逐渐有所增加，至8～9d绿色荧光斑点最多。以提取的第一代腺病毒感染293细胞72h以后，可见细胞约90%被感染。在荧光显微镜下可观察到大量的绿色荧光。

2.4 重组腺病毒AdhOPG的鉴定

经蛋白酶K处理后的腺病毒AdhOPG液作模板行PCR反应，可扩增出与阳性对照一样，大小约500bp的片断，作为阴性对照的腺病毒AdEasy-PAdtrack-CMV液无片段扩增（图3）。

2.5 重组腺病毒AdhOPG的病毒滴度

以不同稀释度的重组腺病毒转染293细胞，在荧光显微镜下观察GFP的表达，见1∶10^5和1∶10^6稀释孔内有较多细胞内有荧光，10∶10^4稀释孔内几乎全部细胞内有荧光，而而1∶10^7至1∶10^8GFP表达的细胞逐渐减少。测得腺病毒感染滴度为2.5×10^9PFU/ml。



1为P1、P2扩增产物572bp 2为Pc、Po扩增产物543bp 3为阴性对照 4为阳性对照 5为DL2000maker

图3

3 讨论

在骨质疏松、人工关节假体周围骨溶解等骨破坏性疾病的病变过程中，破骨细胞数量增多、骨吸收能力增强是其主要特征。而骨保护素（OPG）是近年来骨吸收领域的研究热点。其主要功能是抑制破骨细胞的分化，抑制成熟破骨细胞的骨吸收活性并诱导其凋亡。实验研究证实：OPG基因敲除小鼠出现破骨细胞数量增多和严重的骨质疏松[3]，OPG转基因小鼠有全身性的骨质硬化，除有脾脏增大外，其它组织器官无异常。破骨细胞数量显著减少，但造血细胞和单核巨噬细胞系统正常[1]，说明OPG主要功能是抑制破骨细胞生成、分化及活性，并作用于破骨细胞分化的较为终末的阶段。体内调解骨代谢的激素或细胞因子可能均通过调节OPG/RANKL的平衡而发挥作用。而因此以破骨细胞作为治疗上述疾病的靶细胞，构建含OPG基因的重组腺病毒进行基因治疗，可望为骨破坏性疾病的治疗提供新的思路[4]。

腺病毒载体具高转移效率，高滴度，高表达率，而且因其为缺陷型病毒载体在宿主体内不能自我复制，不能表达病毒蛋白，相对安全，并能有效转染软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨髓基质细胞、关节滑膜细胞等，是目前体内基因治疗研究应用最为广泛的载体[5]。但以往目的基因重组腺病毒载体的构建、制备过程较为复杂，并且不易检测是否构建成功。本文所采用的腺病毒表达系统含有GFP基因，在体内外检测是否转染成功，以及测病毒滴度时较以往的方法更简单、直观。

本实验在目的基因与穿梭质粒连接、穿梭质粒与Adeasy-1同原重组，以及病毒液的检测中除酶切鉴定外，均用了PCR法。P_1、P_2均以hOPGcDNA为模板设计的引物，其产物可鉴定目的基因是否与载体连接上。而P_c、P_o则是一个以载体为模板，一个以目的基因为模板设计的引物，其产物将跨越载体与目的基因的连接点，可鉴定重组体上的目的基因的数目、方向是否正确。经过滴度测定证实本方法制备的重组腺病毒滴度高，能够达到直接转染动物体内的要求。这为今后进行OPG基因治疗骨质疏松症等疾病的研究提供了良好的实验基础。

〔参考文献〕

[1] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involvedin the regulation of bone density. J Cell, 1997, 89 (2): 309-319.

[2] Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis, J Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 234: 137-142.

[3] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onsetosteoporosis and arterial calcification, J Genes Dev, 1998, 12: 1260-1268.

[4] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. J Science, 2000, 289: 1508-1512.

[5] Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy, J Oncologist, 2002, 7 (1): 46-59.

（收稿日期：2004-08-01）