

GGPPS 基因干扰腺病毒载体的构建及鉴定

赵银娟¹, 来珊珊², 李朝军², 薛 斌²

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏省有害生物入侵与控制重点实验室, 江苏 南京 210037)
(2. 南京大学医学院, 江苏省医学分子技术重点实验室, 江苏 南京 210093)

[摘要] 构建 GGPPS 基因干扰腺病毒质粒载体并加以鉴定. 根据 GGPPS 基因序列设计 GGPPS 干扰序列引物, 定向克隆至穿梭载体 pshuttle-H1 的 *Bgl* II 和 *Hind* III 位点, *Pme* I 酶切线性化的 pShuttle-H1-SiGGPPS 干扰质粒, 并与腺病毒载体 (pAdEasy-1 质粒) 共同转化 *E. coli* BJ5183 感受态细菌, 产生重组腺病毒载体. 用 *Pac* I 酶切线性化的回收质粒, 转染 293A 细胞包装腺病毒颗粒, 在倒置显微镜下观察细胞 CPE, 用 TCID50 法测定病毒颗粒的浓度, 并初步观察病毒感染 PC12 细胞对目的基因的干扰效率. 经酶切鉴定、测序证实成功构建 GGPPS 基因干扰腺病毒载体. 包装的腺病毒浓缩悬液滴度为 1.995×10^7 PFU/mL. GGPPS 在人中具有保守性, 该病毒能在人源的 WRL-68 细胞中成功表达, 并且对 GGPPS 基因干扰效率达 70% 以上.

[关键词] GGPPS 基因, 干扰, 腺病毒

[中图分类号] Q29 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)02-0104-04

Construction and Identification of GGPPS Gene Interference Adenovirus

Zhao Yinjuan¹, Lai Shanshan², Li Chaojun², Xue Bin²

(1. College of Forestry Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasion Species, Nanjing 210037, China)
(2. Medical School of Nanjing University, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanjing 210093, China)

Abstract: To construct the recombinant adenovirus vector expressing small RNA against human GGPPS gene, the interference primer designed according to GGPPS gene sequence was cloned into pshuttle-H1 vector with *Bgl* II and *Hind* III restriction site. *E. coli* BJ5183 sensitive bacteria were cotransfected with vector linealized by *Pme* I enzyme and adenovirus vector pAdEasy-1. The adenovirus was obtained in 293A cells transfected with linearized recombinant adenovirus plasmids. The titer of virus was measured based on the appearing of CPE and was determined by TCID50 assay. The interference efficiency was caculated. The results obtained from DNA sequencing and digestion identification demonstrated that the adenovirus vectors tagerting to human GGPPS gene was constructed. The titer of concentrated virus was 1.995×10^7 PFU/mL. The interference efficiency of endogenous GGPPS gene in WRL68 cells was above 70% as evidenced by western blot analysis. The interference adenovirus vector of human GGPPS gene is successfully constructed.

Key words: GGPPS, interference, adenovirus

香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (Geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS), (GenBank Accession No. NM_010282), 是短链异戊烯二磷酸合成酶家族的成员, 可催化法尼基焦磷酸 (Farnesyl pyrophosphate, FPP) 与异戊烯焦磷酸 (Isopentenyl pyrophosphate, IPP) 的缩合反应, 产生由 20 个碳组成的复合物: 香叶基香叶基焦磷酸 (Geranylgeranyl diphosphate, GGPP)^[1]. 在甲羟戊酸代谢途径中, GGPPS 是催化 GGPP 和 FPP 合成的分支点酶^[2], 对于 C 端带有 CaaX 模区的 Ras 及 Ras 相关的小 G 蛋白的异戊二烯化修饰发挥重要作用, Ras 等小 G 蛋白经过异戊二烯化修饰后才可进行膜上定位. GGPPS 蛋白大小为 34 kDa^[3], 在人体心脏、睾丸、脾脏、大脑、肝脏、肺脏等组织中均有表达^[1,4]. 我们前期研究发现, GGPPS 可参与胰岛素信号通路调

收稿日期: 2012-10-28.
基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (31100448)、博士点基金 (2113204120004).
通讯联系人: 薛斌, 副教授, 博士, 研究方向: 细胞生物学. E-mail: xuebin@nju.edu.cn

节,即刻早期应答基因 *Egr-1* 可通过转录 GGPPS 促进 Ras 蛋白的异戊二烯化,激活 MAPK/ERK 信号通路,进而通过磷酸化 IRS-1 的 612 位丝氨酸使 IRS 失活,导致细胞和组织发生胰岛素抵抗^[5]. Amel Dudakovic 等报道,GGPP 缺失可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移^[6],但目前关于 GGPPS 在肝细胞增殖等功能方面的研究十分缺乏,

为了进一步研究 GGPPS 在肝细胞增殖中的作用,我们构建了人源 GGPPS 基因干扰腺病毒质粒载体,并且在 WRL-68 细胞中验证了其干扰效率,为研究 GGPPS 对肝细胞增殖的影响提供了有效的工具.

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 BJ5183、大肠杆菌 TOP10、pAdEasy-1 腺病毒骨架质粒以及 pshuttle-H1 穿梭质粒,由李朝军老师实验室惠赠. QBI-293A 包装细胞购自武汉细胞所. WRL-68 细胞,对照 Ad-scramble 为本实验室保存. 限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶、小牛碱性磷酸酶(CIP)、实时荧光定量 PCR kit 购自 Bioneer 公司. 荧光定量 PCR 仪为 ABI-7300. 胎牛血清购自 WISENT 公司. 细胞和细菌培养箱均为 Thermo 公司产品. 人源 GGPPS 基因干扰序列 GGPPSiRNA:CTGTACTATCTGGGCAGTT.

1.2 方法

1.2.1 pShuttle-H1-SiGGPPS 干扰质粒的构建

包含 GGPPS 基因干扰序列的寡核苷酸片段退火后,两端带有 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点. 退火后的寡核苷酸片段通过 T_4 DNA 连接酶磷酸化. 准备 pShuttle-H1 穿梭质粒,用 *Bgl* II 和 *Hind* III 限制性内切酶双酶切,再用小牛碱性磷酸酶(CIP)将酶切后的 pShuttle-H1 穿梭质粒去磷酸化. 利用 DNA 连接酶将带有 *Bgl* II 和 *Hind* III 位点的 pShuttle-H1 穿梭质粒与退火后的寡核苷酸片段连接,将连接产物化学转染感受态 TOP10 大肠杆菌,涂于氨苄抗性 LB 平板. 放于 37 °C 培养箱过夜后挑取生长良好的克隆进行质粒小提, *EcoR* I 酶切鉴定. 选取阳性结果,进行测序,将构建成功的质粒命名为 pShuttle-H1-SiGGPPS.

1.2.2 重组 GGPPS 干扰腺病毒质粒的构建

提取穿梭质粒,取 4 μ g ~ 10 μ g 经 *Pme* I 酶切充分线性化,琼脂糖凝胶回收纯化酶切后的 DNA,溶于 20 μ L 去离子水中. 将回收的线性化载体与 1 μ L (100 mg/L) 腺病毒载体 (pAdEasy-1 质粒) 共同转化 *E. coli* BJ5183 感受态细菌. 涂于卡那霉素抗性的 LB 平板,置于 37 °C 培养箱内培养 16 h ~ 20 h. 挑取较小的克隆,进行质粒小提, *Pac* I 酶切鉴定,阳性结果可得到 30 kb 左右及 4.5 kb 或 3.0 kb 两条带. 将阳性结果进行测序确认,并且大量提取重组成功的 GGPPS 干扰腺病毒质粒备用,命名为 pAd-SiGGPPS.

1.2.3 pAd-SiGGPPS 重组质粒的包装

取 10 μ g pAd-SiGGPPS 重组质粒用 *Pac* I 充分酶切,经 50% 异丙醇沉淀及 75% 乙醇洗涤沉淀后,溶于无菌 ddH₂O 中,于 -20 °C 冻存备用. 将上一步线性化的质粒利用 Lipo fectamine2000 脂质体转染密度,约 60% 接种于 100 mm 细胞培养皿的 QBI-293A,5% CO₂,37 °C 静止培养. 转染后不同时间,在显微镜下观察细胞状态,了解腺病毒的包装过程. 转染后 7 d ~ 10 d,细胞出现病理性变化 (Cell Pathological Effect, CPE),表现为贴壁细胞变圆、核浓缩、脱落,出现病毒空斑. 待细胞 CPE 达到 70%,离心收集细胞,于 -70 °C 和 4 °C 反复冻融 3 次,离心后收集上清于 -70 °C 保存. 由此获得的重组病毒命名为 Ad-SiGGPPS.

1.2.4 病毒滴度的测定 (TCID₅₀ 法)

Ad-SiGGPPS 在 QBI-293A 细胞中扩增三代后利用半数组织培养感染量 (Tissue Culture Infectious Dose 50, TCID₅₀) 法检测腺病毒滴度. QBI-293A 细胞用 2% 的胎牛培养基制成浓度约 1×10^5 mL⁻¹ 的细胞悬液,以 100 μ L 每孔接种于 96 孔板 (同时按 10 倍稀释制备病毒稀释液感染上述细胞). 每排前 10 孔各加入 100 μ L 同一浓度的病毒稀释液,第 11、12 孔加入 100 μ L 的 2% 胎牛培养基作为阴性对照. 置于 CO₂ 培养箱,37 °C 培养 10 d,然后显微镜下观察每排细胞出现 CPE 的情况. 以发生 CPE 即为阳性作为判定标准.

按下列公式计算滴度: $T = 101 + d(S - 0.5) IU/m$. 其中: $d = \text{Log}_{10}$ 稀释倍数; $S =$ 从第一个稀释度起的阳性比率之和.

1.2.5 细胞培养

腺病毒感染所用细胞: QBI-293A, 以 10% 胎牛的 DMEM 培养基, 5% CO₂, 37 °C 静置培养. 正常人源肝

细胞:WRL68 细胞,以 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,5% CO₂,37 ℃ 静置培养.

1.2.6 腺病毒感染

WRL-68 细胞在感染病毒时换成无血清 DMEM 培养基,然后分别加入 Ad-SiGGPPS 和 Ad-scramble,待腺病毒感染 6 h 后换 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h.

1.2.7 Western Blotting

培养的 WRL-68 细胞分别感染 Ad-SiGGPPS 和 Ad-scramble 病毒,感染 48 h 后将培养液弃掉,用冰预冷的 PBS 洗 2 遍,加入 500 μL 裂解缓冲液(50 mmol/L HEPES、500 mmol/L NaCl、10 g/L NP40、1 mg/L 抑蛋白酶肽 aprotinin 及 100 mg/L PMSF),冰浴 30 min,刮取细胞,以 12 000 g 离心 15 min. 收集上清,经蛋白定量后,加入 5 μL 5×SDS 上样缓冲液,99 ℃ 煮 5 min. 样品以 10% 的 SDS-PAGE 电泳,120 V 恒压 2 h;常规转膜,5% 脱脂奶粉封闭;兔抗 GGPPS(5% 脱脂奶粉 1:1000 稀释)抗体 4 ℃ 孵育过夜,PBST 洗脱 10 min×3 次;山羊抗兔 HRP 二抗(PBST1:3000 稀释)室温孵育 1 h,PBST 洗脱 5 min×6 次;ECL 化学发光检测.

2 结果

2.1 Ad-SiGGPPS 的构建

将人源 GGPPS 基因干扰序列亚克隆至 pShuttle-H1 穿梭质粒中,构建重组质粒 pShuttle-H1,经 *EcoR* I 酶切鉴定,阳性结果出现 314 bp 的释放条带(图 1). 通过进一步测序证实后,将重组质粒经 *Pme* I 单酶切线性化后与腺病毒基因重组质粒在细菌内进行同源重组,挑选阳性菌落,质粒小提后经 *Pac* I 酶切鉴定,重组病毒出现两条带,一条约为 30 kb 的大片段,另一条为 3.0 kb 的小片段(图 2).

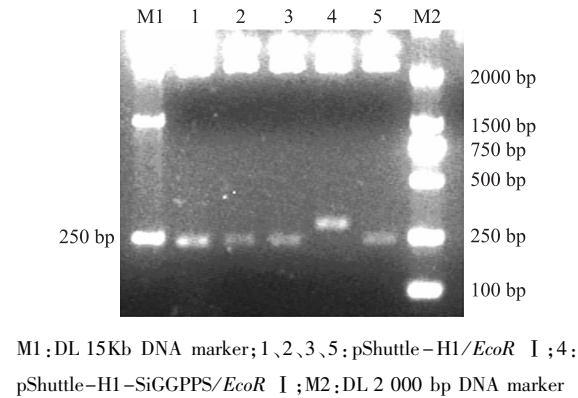


图 1 重组质粒 pShuttle-H1 的 *EcoR* I 酶切鉴定
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pShuttle-H1 after *EcoR* I digestion

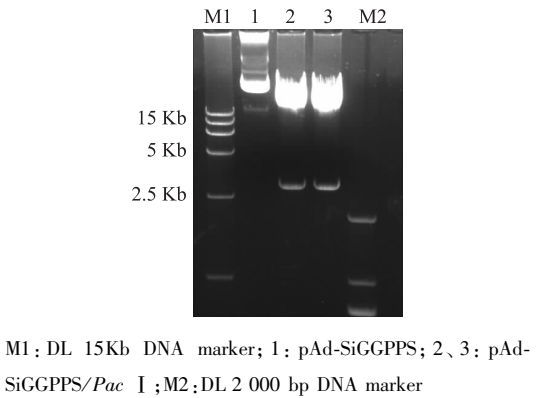


图 2 重组腺病毒质粒 pAd-SiGGPPS 的 *Pac* I 酶切鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pAd-SiGGPPS after *Pac* I digestion

2.2 腺病毒颗粒滴度的检测

重组腺病毒在 QBI-293A 细胞中扩增三代后,进行滴度测定. 依照 TCID₅₀ 法,在感染后第 10 d 观察 CPE(图 3),计算每个稀释度产生的 CPE 的孔数,计算得到腺病毒的滴度为:

$$T = 10^{1+d(s-0.5)} = 10^{1+1(6.5-0.5)} = 10^7 \text{ (每 } 100 \text{ } \mu\text{L} \text{ 病毒储存液中)},$$
$$T = 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}.$$

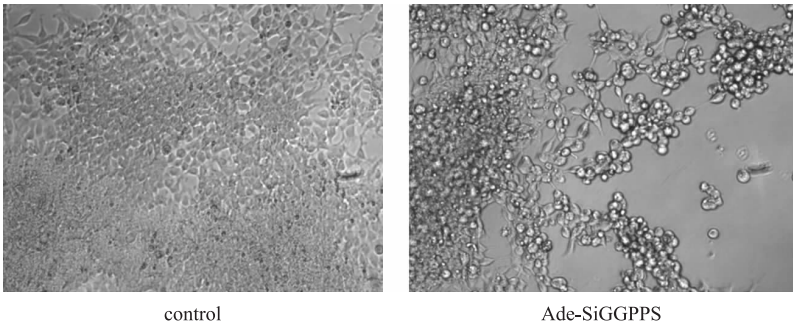


图 3 QBI-293A 在感染 Ad-SiGGPPS 后 CPE 的产生
Fig. 3 The cytopathic effect of QBI-293A after being infected by Ad-SiGGPPS

由于 TCID₅₀ 法测到的滴度 $d = \log_{10}$ 值比标准空斑法高 0.7, 所以将 TCID₅₀/mL 转换成 PFU/mL:

$$T = 1 \times 10^{8-0.7} \text{ PFU/mL} = 1 \times 10^{7.3} \text{ PFU/mL} = 1.995 \times 10^7 \text{ PFU/mL}.$$

2.3 重组干扰 GGPPS 腺病毒感染 WRL-68 细胞

分别提取感染 Ad-SiGGPPS 和 Ad-scramble 的 WRL-68 细胞与正常 WRL-68 细胞的总蛋白质,进行 Western blotting 检测. 结果显示,Ad-SiGGPPS 感染的 WRL-68 细胞中 GGPPS 的蛋白表达明显低于感染对照腺病毒 Ad-scramble 和正常的 PC12 细胞(图 4). 该结果证实重组干扰 GGPPS 腺病毒在 WRL-68 细胞中成功干扰 GGPPS 的表达.

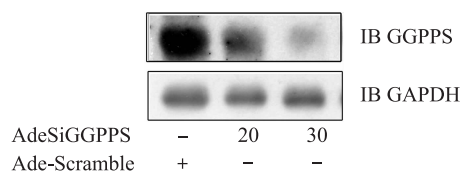
3 讨论

蛋白的翻译后异戊二烯化修饰对于蛋白间的相互作用及蛋白的膜上运输起关键作用,并参与细胞生长、分化、骨架系统、膜泡运输等重要生理过程^[1]. 细胞内许多行使重要生理功能的蛋白会发生异戊二烯化修饰,如 G 蛋白异源三聚体亚基以及核 lamins,特别是作为分子开关的小 G 蛋白家族^[2]. 蛋白的异戊二烯化是通过 C 末端半胱氨酸残基与 FPP 或 GGPP 的共价结合来实现的. GGPPS 介导一分子 IPP 与一分子 FPP 缩合反应为 GGPP,是 GGPP 合成的关键分支点酶^[1,2],可作为蛋白异戊二烯化研究的重要靶点. 在肿瘤的发生过程中,癌基因和抑癌基因的变异引起细胞内信号通路失调则是肝细胞癌变的主要机制. Ras,作为原癌基因,与肿瘤的发生有着密切的关系,在肝癌病人的标本中,RAS 基因阳性率高达 90%. RAS 蛋白,必须经过香叶基化转移酶或法呢基化转移酶修饰后才能转运到细胞膜上,在膜上 RAS 将进一步被甲基化修饰后,才能激活^[3]. 目前已开发有多种试剂进行抑制 RAS 介导肿瘤的研究. 目前研究表明慢性乙肝、丙肝病毒感染,慢性酒精中毒,长期摄入含黄曲霉毒素 B1 的食物等病原因子均可导致肝细胞膜表面生长因子如 EGF、VEGF、PDGF-B 及相应的膜受体过度表达,过度表达的生长因子通过自分泌及旁分泌的方式与肝细胞表面的同源受体结合^[7,8],受体过度磷酸化结合载体蛋白如 SEM-5、SOC-1 募集鸟苷酸转换因子如 SOS-1 至细胞膜上通过刺激 Ras-GDP 转换为 Ras-GTP 从而导致 Ras 激酶过度活化^[9,10]. Terence F 等^[11]发现蛋白香叶基化修饰在血小板源性生长因子诱导的 PDGF 受体的酪氨酸磷酸化中发挥作用,香叶基化转移酶的抑制剂 GGTI-298 可以强烈抑制受体的酪氨酸磷酸化,提示 GGTase 促进 PDGF 介导的信号通路. 目前以开发多种针对香叶基化转移酶的抑制剂如 GGTI2279、GGTI2287、GGTI2297、GGTI2298,应用于 RAS 介导的肿瘤的治疗研究.

可见香叶基化修饰的蛋白质在肿瘤的发生与治疗中发挥着重要的作用,而 GGPPS 作为 GGPP 的重要的合成酶,目前有关 GGPPS 与肿瘤的相互作用的研究并无报道,我们实验室将深入研究 GGPPS 调控肿瘤的发生的作用机制. 在本实验中,我们成功构建的人源 GGPPS 干扰腺病毒,将为深入研究 GGPPS 在通过香叶基化修饰调节 RAS/MAPK 信号通路等其他小 G 蛋白信号通路调控肿瘤细胞的增殖及发现新的治疗肿瘤的靶点提供了有效的工具.

[参考文献]

- [1] Zhao Y, Yu L, Gao J, et al. cDNA cloning, chromosome mapping and expression characterization of human geranylgeranyl pyrophosphate synthase[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2000, 43(6): 613-622.
- [2] Vicent D, Maratos-Flier E, Kahn C R. The branch point enzyme of the mevalonate pathway for protein prenylation is overexpressed in the ob/ob mouse and induced by adipogenesis[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(6): 2 158-2 166.
- [3] Hudock M P, Zhang Y, Guo R T, et al. Inhibition of geranylgeranyl diphosphate synthase by bisphosphonates: A crystallographic and computational investigation[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 51(18): 5 594-5 607.
- [4] Ericsson J, Greene J M, Carter K C, et al. Human geranylgeranyl diphosphate synthase: isolation of the cDNA, chromosomal mapping and tissue expression[J]. Journal of Lipid Research, 1998, 39(9): 1 731-1 739.
- [5] Shen N, Yu X, Pan F Y, et al. An early response transcription factor, Egr-1, enhances insulin resistance in type 2 diabetes with chronic hyperinsulinism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(61): 14 508.



分别感染不同量:20 μ L、30 μ L 的病毒,滴度为 1.995×10^7 PFU/mL,检测干扰效率

图 4 免疫印迹检测 AdeSiGGPPS 在 WRL68 细胞中的抑制效率

Fig. 4 Western blotting analyzing the thhibition effiaeng of Ade SiGGPPS in cells WRL68

(Dihydrolipoamide dehydrogenase)^[14]、热激蛋白(Heat shock protein)、碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase family member)等蛋白在胁迫条件均发挥重要作用^[15]。

综上所述,本研究首次采用串联质谱方法对泛素化蛋白进行鉴定,这对研究泛素在昆虫细胞中的功能具有重要意义,同时也为寻找害虫防治新策略提供基础。但是泛素化蛋白与耐药性之间的关系目前还不清楚,有关泛素的抗逆性情况还需要作进一步的探究和验证。

[参考文献]

- [1] Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases; a novel platform for mechanism-based drug targeting[J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(2): 474–481.
- [2] Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy[J]. Nature, 2009, 458(7237): 438–444.
- [3] Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta(BBA) – Mol Cell Res, 2004, 1695(1): 55–72.
- [4] Shelton A, Wyman J, Cushing N, et al. Insecticide resistance of diamondback moth(*Lepidoptera: Plutellidae*) in North America[J]. J Econ Entomol, 1993, 86(1): 11–19.
- [5] 谢苗, 成娟, 尤民生, 等. 基于质谱和生物信息学分析的小菜蛾蛋白质鉴定[J]. 昆虫学报, 2009, 52(11): 1 206–1 212.
- [6] Liu C, Li F, Han Z. Studies on deltamethrin resistance breeding and its resistant mechanism of diamond back moth[J]. Acta Phytophy Sin, 1995, 22(4): 367–372.
- [7] Weill M, Berthomieu A, Berticat C, et al. Insecticide resistance; a silent base prediction[J]. Curr Biol: CB, 2004, 14(14): R552.
- [8] Bates S L, Zhao J Z, Roush R T, et al. Insect resistance management in GM crops: past, present and future[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(1): 57–62.
- [9] 张娜娜, 许勤, 李凤良, 等. 小菜蛾成虫蛋白质组双向电泳图谱的建立及条件优化[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2011, 34(2): 78–82.
- [10] Yun E Y, Goo T W, Hwang J S, et al. Bombyx mori ubiquitin mRNA[J]. GenBank Accession No AF308163, 2000.
- [11] 于航, 金丰良, 许小霞, 等. 德国小蠊泛素基因的克隆及序列分析[J]. 昆虫学报, 2004, 47(4): 522–525.
- [12] Cheng L G, Xu J N, Xue J, et al. Downregulation of ubiquitin gene expression in the deltamethrin-resistant diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) [J]. Appl Entomol, 2009, 133(7): 533–538.
- [13] 黄强, 尹沛源, 路鑫, 等. 色谱-质谱联用技术在代谢组学中的应用[J]. 色谱, 2009, 27(5): 566–572.
- [14] Huo J, Shi H, Yao Q, et al. Cloning and purification of recombinant silkworm dihydrolipoamide dehydrogenase expressed in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression Purif, 2010, 72(1): 95–100.
- [15] 刘凤沂, 须志平, 薄仙萍, 等. 昆虫抗药性与适合度[J]. 昆虫知识, 2008, 45(3): 374–378.

[责任编辑: 黄 敏]

(上接第 107 页)

- [6] Dudakovic A, Tong H, Hohl R J. Geranylgeranyl diphosphate depletion inhibits breast cancer cell migration[J]. Investigational New Drugs, 2011, 29: 912–920.
- [7] Breitkopf K, Roeyen C, Sawitza I, et al. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors α and β in activated rat hepatic stellate cells(HSC) [J]. Cytokine, 2005, 31(5): 349–357.
- [8] Roth-Eichhorn S, Eberheim A, Bode H P, et al. Transformation-dependent calcium influx by voltage-operated calcium channels in stellate cells of rat liver[J]. Journal of Hepatology, 1999, 30: 612–620.
- [9] Shen N, Gong T, Wang J D, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammatory responses are mediated by EGR-1/GGPPS/MAPK signaling[J]. The American Journal of Pathology, 2011, 178(1): 110–118.
- [10] K M C C, Hudock M P, Zhang R, et al. Inhibition of geranylgeranyl diphosphate synthase by bisphosphonates; a crystallographic and computational investigation[J]. J Med Chem, 2008, 51: 5 594–5 607.
- [11] Terence F, McGuire, Qian Y M, et al. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation. [J] The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(44): 27 402–27 407.

[责任编辑: 黄 敏]