

cnksr2 基因干扰腺病毒的构建及鉴定

梁 金¹, 沈 宁¹, 徐 康², 李朝军¹, 薛 斌¹

(1. 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)
(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 构建小鼠 *cnksr2* 基因干扰腺病毒质粒载体并加以鉴定. 根据小鼠 *cnksr2* 基因序列设计 *cnksr2* 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-Sic*cnksr2* 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病理性变化 (Cell pathological effect, 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、测序证实成功构建小鼠 *cnksr2* 基因干扰腺病毒载体. 包装的腺病毒浓缩悬液滴度为 3.98×10^7 PFU/mL. *cnksr2* 在大鼠及小鼠中具有保守性, 该病毒能在大鼠来源的 PC12 细胞中成功表达, 并且对 *cnksr2* 基因干扰效率达 50% 以上. 结论: 成功构建了小鼠 *cnksr2* 基因的干扰腺病毒载体.

[关键词] *cnksr2* 基因, 干扰, 腺病毒

[中图分类号] Q291 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)03-0103-05

Construction and Identification of *cnksr2* Gene Interference Adenovirus

Liang Jin¹, Shen Ning¹, Xu Kang², Li Chaojun¹, Xue Bin¹

(1. Medical School of Nanjing University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular Medicine, Nanjing 210093, China)
(2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: To construct a recombinant adenovirus vector expressing small RNA against mouse *cnksr2* gene, the interference primer were designed according to *cnksr2* gene sequence, which was cloned into pshuttle-H1 vector with *Bgl* II and *Hind* III restriction site. *E. coli* BJ5183 sensitive bacterias were cotransfected with lined vector cutted by *Pme* I enzyme and adenovirus vector pAdEasy-1. The obtained recombinant adenovirus vector was cutted with *Pac* I enzyme, then adenovirus was obtained in 293A cells transfected with lined 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 recombinant adenovirus vector targeting to *cnksr2* gene was constructed as evidenced by DNA sequencing and identification of enzyme digestion, which titer of concentrated virus was 3.98×10^7 PFU/mL. The expression of endogenous *cnksr2* mRNA in PC12 cells was specifically shutdown by the recombinant adenovirus vector with an efficiency above 50%. The interference of *cnksr2* gene was successfully constructed.

Key words: *cnksr2*, interference, adenovirus

CNKSR2 (Connector enhancer of kinase suppressor of ras 2) 是一个具有多个结构域的接头蛋白, 由 *cnksr2* 基因编码. Therrien 等人首先在果蝇中发现, *cnksr* 编码一个新的参与 Ras 信号通路调节的蛋白 CNK^[1]. 随后, Nagase 等人证实哺乳动物 *cnksr* 同源序列之一 *cnksr2* 在人脑组织中特异性高表达^[2]. 由 *cnksr2* 编码表达的蛋白质被命名为 CNK2^[3]. 以往研究表明, CNK2 具有多个结构域, 作为接头蛋白参与 MAPK 信号通路的调节^[4,5]. 而 MAPK 信号通路对于神经细胞的分化有着重要作用, 在神经生长因子 (Neuronal growth factor, NGF) 刺激下, MAPK 信号通路是调节神经细胞分化的核心信号通路^[6]. 另外, CNK2 还可以通过与 Densin-180、S-SCAM 及 PSD-95 结合, 调节神经细胞突触后蛋白复合物的聚集^[3,7],

收稿日期: 2012-10-12.

基金项目: 国家自然科学基金 (31171306)、江苏省自然科学基金 (BK2011568).

通讯联系人: 薛斌, 博士, 副教授, 研究方向: 细胞生物学. E-mail: xuebin@nju.edu.cn

而神经细胞突触后蛋白的减少是精神分裂症患者神经系统的重要病理变化之一^[8,9],最新研究还表明 *cnksr2* 的缺失很可能是引起精神发育迟滞的重要原因^[10]. 目前有关精神发育迟滞及精神分裂症等精神疾病的发病机制还不清楚,基于 *cnksr2* 通过 MAPK 信号通路调节神经细胞的分化以及参与神经细胞突触后蛋白形成的事实,推测其在神经系统发育和精神活动的调节中发挥重要作用. 因此,为了进一步研究 *cnksr2* 在调节神经细胞分化及突触后蛋白质形成的机制,继而更进一步研究 *cnksr2* 在精神发育迟滞及精神分裂症等精神疾病发病过程中的作用,构建 *cnksr2* 基因干扰腺病毒将具有重要意义. PC12 细胞是一种神经内分泌细胞,来源于大鼠嗜铬细胞瘤,是研究 ERK 依赖的神经细胞分化的理想模型,适合用于研究 MAPK 信号通路对神经细胞分化过程中生化及形态变化的作用^[11]. 由于 *cnksr2* 在大鼠及小鼠中具有保守性,为了进一步了解该基因的功能,本实验中我们构建了小鼠 *cnksr2* 干扰腺病毒质粒载体,并且在 PC12 细胞中验证了其干扰效率.

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,由本实验室保存. QBI-293A 包装细胞购自武汉细胞所. PC12 细胞及对照 Ad-scramble 为本实验室保存. 限制性内切酶、T4 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,马血清购自 Hyclone 公司. 细胞和细菌培养箱均为 Thermo 公司产品. 大鼠 *cnksr2* 基因干扰序列 *cnksr2* SiRNA:CAACAATTGTGCAACAGGA.

1.2 方 法

1.2.1 pShuttle-H1-Sicnksr2 干扰质粒的构建

包含 *cnksr2* 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 T4 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,涂于氨苄青霉素 LB 平板. 放于 37 ℃ 培养箱过夜后挑取生长良好的克隆进行质粒小提,*Eco*R 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-Sicnksr2.

1.2.2 重组 *cnksr2* 干扰腺病毒质粒的构建

提取穿梭质粒,取 4 μg~10 μg 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 μL 去离子水中. 将回收的线性化质粒与 1 μL(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 ℃ 培养箱内培养 16 h~20 h. 挑取生长较好的克隆,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 *cnksr2* 干扰腺病毒质粒备用,命名为 pAd-Sicnksr2.

1.2.3 pAd-Sicnksr2 重组质粒的包装

取 10 μg 所得 pAd-Sicnksr2 重组质粒用 *Pac* I 充分酶切,经 50% 异丙醇及 75% 乙醇洗涤沉淀后,溶于无菌 ddH₂O 中于 -20 ℃ 冻存备用. 将上一步线性化的质粒利用 Lipofectamine 2000 脂质体转染密度约 60%,接种于 100mm 细胞培养皿的 QBI-293A,5% CO₂,37 ℃ 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 ℃ 和 4 ℃ 反复冻融 3 次,离心后收集上清于 -70 ℃ 保存备用. 获得的重组病毒命名为 Ad-Sicnksr2.

1.2.4 病毒滴度的测定(TCID50 法)

Ad-Sicnksr2 在 QBI-293A 细胞中扩增 3 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 1×10⁵/mL 的细胞悬液,以 100 μL 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 μL 同一浓度的病毒稀释液,第 11、12 孔加入 100 μL 的 2% 胎牛培养基作为阴性对照. 置于 50% CO₂ 培养箱,37 ℃ 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: $T=10^{1+d(S-0.5)}$ 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 ℃ 静置培养. 大鼠来源肾上腺嗜铬细胞瘤细胞:PC12 细胞,以 10% 马血清、5% 胎牛血清的 DMEM 培养基,5% CO₂,37 ℃ 静置培养.

1.2.6 腺病毒感染

PC12 细胞在感染病毒时换成无血清 DMEM 培养基,然后分别加入 Ad-Sicnksr2 和 Ad-scramble,待腺病毒感染 6 h 后换 10% 马血清、5% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h.

1.2.7 Real-time PCR 检测

培养的 PC12 细胞感染 48 h 后将培养基弃掉,用事先预冷的 PBS 洗 2 遍,Trizol 抽提 RNA. RNA 用 NanoPhotometer(Implen 公司)定量后取 800 ng 进行反转录. 反转录采用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒,37 ℃ 反应 15 min,85 ℃ 5 s 终止反应. Real-time PCR 反应体系为:2×SYBR green 10 μL,Primers 1 μL,50×ROX 0.4 μL,cDNA 1 μL,H₂O 补平体积 20 μL. 检测时使用的引物:cnksr2-forward:GGAGGAAGCCAGTCT-GTCACC,cnksr2-reverse:TTACACGTGTGTCTCAAT;18s-forward:GTCTGTGATGCCCTTAGATG,18s-reverse:AGCTTATGACCCGCACCTTAC.

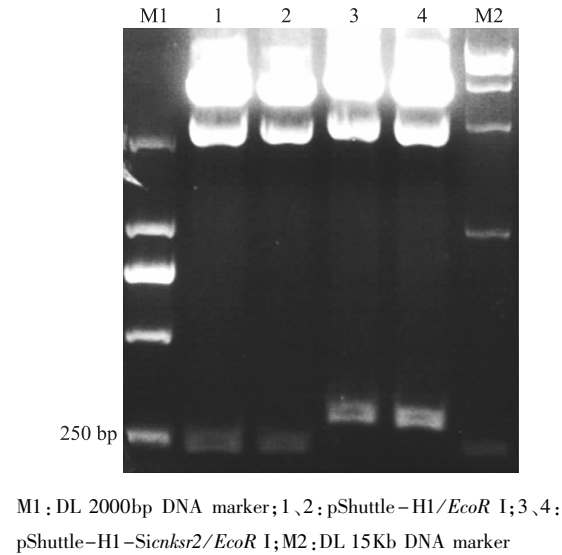
1.2.8 统计学分析

采用 Excel 2003 对实时荧光定量 PCR 的结果进行 t 检验,所有结果均以 $\pm S$ 表示. 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

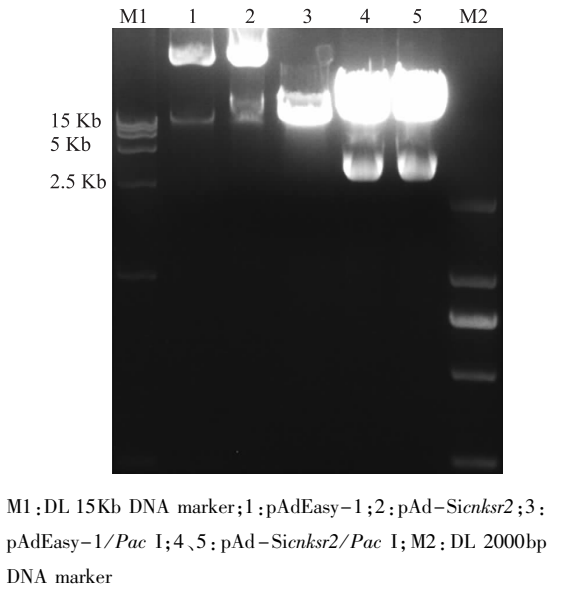
2.1 Ad-Sicnksr2 的构建

将大鼠 cnksr2 基因干扰序列亚克隆至 pShuttle-H1 穿梭质粒中,构建成重组质粒 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).



M1: DL 2000bp DNA marker; 1, 2: pShuttle-H1/*EcoR* I; 3, 4: pShuttle-H1-Sicnksr2/*EcoR* I; M2: DL 15Kb DNA marker

图 1 重组质粒 pshuttle-H1 的 *EcoR* I 酶切鉴定
Fig.1 Identification of recombinant vector pshuttle-H1 by *EcoR* I enzyme digestion



M1: DL 15Kb DNA marker; 1: pAdEasy-1; 2: pAd-Sicnksr2; 3: pAdEasy-1/*Pac* I; 4, 5: pAd-Sicnksr2/*Pac* I; M2: DL 2000bp DNA marker

图 2 重组腺病毒质粒 pAd-Sicnksr2 的 *Pac* I 酶切鉴定
Fig.2 Identification of recombinant vector pAd-Sicnksr2 by *Pac* I enzyme 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 3 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:

$$T=10^{1+d(s-0.5)}=10^{1+1(6.8-0.5)}=10^{7.3} \text{ (每 } 100 \text{ }\mu\text{L 病毒储存液中)}$$
$$T=10^{8.3} \text{ TCID}_{50}/\text{mL}.$$

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:
 $T=1\times 10^{8.3-0.7} \text{ PFU}/\text{mL}=1\times 10^{7.6} \text{ PFU}/\text{mL}\approx 3.98\times 10^7 \text{ PFU}/\text{mL}.$

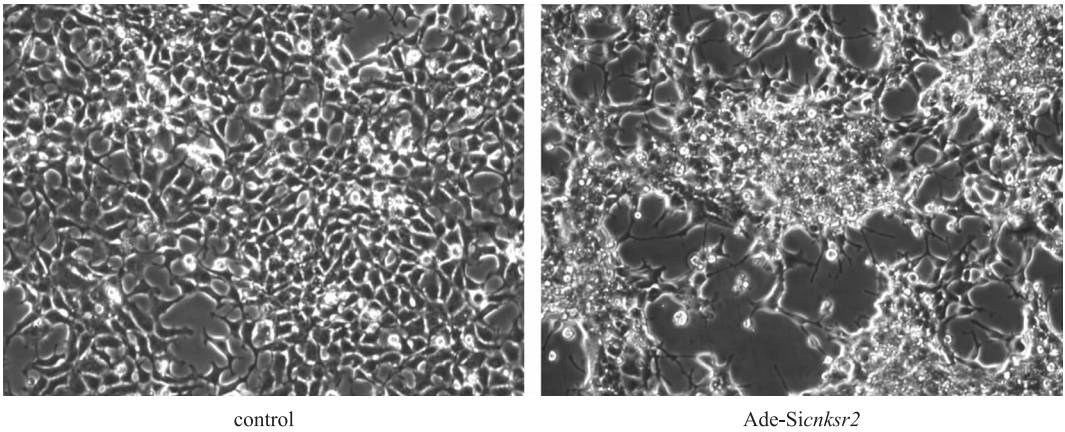


图 3 QBI-293A 在感染 Ad-Sicnksr2 后 CPE 的产生
Fig. 3 CPE occurs in QBI-293A cell after infected with Ad-Sicnksr2

2.3 重组干扰 *cnksr2* 腺病毒感染 PC12 细胞

分别提取感染 Ad-Sicnksr2 和 Ad-scramble 的 PC12 细胞与正常 PC12 细胞总 RNA, 进行 Real-time PCR 检测. 结果显示, Ad-Sicnksr2 感染的 PC12 细胞中 *cnksr2* 的 mRNA 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 *cnksr2* 腺病毒在 PC12 细胞中成功干扰 *cnksr2* 的表达.

3 讨论

促丝裂原活化蛋白激酶 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 是细胞内重要的信号通路, 调节细胞的增殖、分化、有丝分裂、细胞凋亡及下游基因的表达^[12]. 在果蝇当中, CNK 是 Raf 结合蛋白, 并且参与到 Raf 向细胞膜募集的调节. 在果蝇眼睛细胞里, CNK 通过对 Ras 及 Raf 的调节, 调控 MAPK 信号通路的活性, 影响细胞的增殖、分化和有丝分裂, 使果蝇眼睛细胞产生不同的表型^[1, 13-16]. 在果蝇 S2 细胞中, CNK 还是胰岛素诱导的 ERK 及 Raf 活性所必需的重要蛋白^[17]. 哺乳动物 CNK2 可以与 Raf-1 的 C 端结合, 通过其 PH 结构域将 Raf-1 定位于细胞膜上^[1, 18]. 而 MAPK 信号通路对于神经细胞分化有着重要作用, 在 NGF 刺激下, MAPK 信号通路是调节神经细胞分化的核心信号通路^[6], CNK2 还是 NGF 所诱导的 Ras/ERK 信号通路活性及 PC12 细胞分化所必需的重要接头蛋白^[5]. 哺乳动物 CNK2 有 CNK2A 及 CNK2B 2 个亚型, 2 种亚型的区别在于 C 端结构域不同. CNK2A 的 C 端结构域包含一个 PDZ 结构域结合序列, 可以结合 Densin-180、S-SCAM 和 PSD-95 等具有 PDZ 结构域的蛋白, 并且通过结合这些蛋白, 调节神经细胞突触后蛋白复合物的聚集, 在 CNK2 缺失的情况下, 神经细胞突触后蛋白复合物明显减少^[3, 7]. 在精神分裂症患者中, 存在着神经细胞突触后蛋白质的数量减少, 神经细胞突触后蛋白的减少是精神分裂症患者神经系统的重要病理变化之一^[8, 9]. 最近还发现, 智力障碍和癫痫的男性患者存在 *cnksr2* 基因的缺失, 提示 *cnksr2* 的缺失很可能是引起精神发育迟滞的重要原因, 结合 *cnksr2* 的染色体定位及功能, *cnksr2* 可能是非综合征 X 连锁智力障碍的重要候选基因^[10]. 以往研究表明, *cnksr2* 可以通过 MAPK 信号通路调节神经细胞的分化并且参与到神经细胞突触后蛋白复合物的形成, 是影响到精神发育迟滞及精神分裂症等精神疾病发病机制的重要基因. 我们选择构建干扰 *cnksr2* 基因的重组腺病毒, 因为腺病毒在众多生物载体里以安

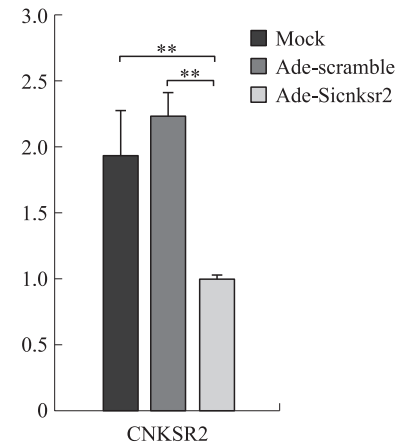


图 4 荧光定量 PCR 检测 *cnksr2* 在 PC12 细胞中的表达
Fig. 4 Real-time PCR analysis of *cnksr2* after infected with Ad-Sicnksr2 in PC12 cell
** : $P<0.01$

全性较高(不整合到宿主的基因组中,仅瞬间表达),转染效率高,宿主范围大,滴度高、稳定,不易致癌等优点被广泛地应用^[19,20]。

PC12 细胞是大鼠来源神经细胞,是研究 ERK 依赖的神经细胞分化的理想模型,适合用于研究 MAPK 信号通路对神经细胞分化过程中生化及形态变化的作用^[11]。由于 *cnksr2* 在大鼠及小鼠中具有保守性,本实验成功构建小鼠 *cnksr2* 基因干扰腺病毒质粒载体,可以更加便于研究该基因在 PC12 细胞中的作用,从而进一步研究 *cnksr2* 基因对 MAPK 信号通路的调节及对神经细胞增殖、分化及突触后蛋白聚集的影响,对将来研究精神疾病的发病机制具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Therrien M, Wong A M, Rubin G M. CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling[J]. *Cell*, 1998, 95(3):343-353.
- [2] Nagase T, Ischikawa K, Suyama M, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins *in vitro*[J]. *DNA Res*, 1998, 5(6):355-364.
- [3] Yao I, Hata Y, Ide N, et al. MAGUIN, a novel neuronal membrane-associated guanylate kinase-interacting protein[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17):11 889-11 896.
- [4] Roy F, Iaberge G, Douziech M, et al. KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(4):427-438.
- [5] Bumeister R, Rosse C, Anselmo A, et al. CNK2 couples NGF signal propagation to multiple regulatory cascades driving cell differentiation[J]. *Curr Biol*, 2004, 14(5):439-445.
- [6] Santos S D, Verveer P J, Bastiaens P I. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(3):324-330.
- [7] Ohtakara K, Nishizawa M, Izawa I, et al. Densin-180, a synaptic protein, links to PSD-95 through its direct interaction with MAGUIN-1[J]. *Genes Cells*, 2002, 7(11):1 149-1 160.
- [8] Eastwood S L, Burnet P W, Harrison P J. Altered synaptophysin expression as a marker of synaptic pathology in schizophrenia[J]. *Neuroscience*, 1995, 66(2):309-319.
- [9] Deakin J F, Simpson M D. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain[J]. *J Psychiatr Res*, 1997, 31(2):277-295.
- [10] Houge G, Rasmussen I H, Hovland R. Loss-of-function CNKSR2 mutation is a likely cause of non-syndromic X-linked intellectual disability[J]. *Mol Syndromol*, 2012, 2(2):60-63.
- [11] Vaudry D, Stork P J, Lazarovici P, et al. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections[J]. *Science*, 2002, 296(5573):1 648-1 649.
- [12] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein(MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions[J]. *Endocr Rev*, 2001, 22(2):153-183.
- [13] Therrien M, Wong A M, Kwan E, et al. Functional analysis of CNK in RAS signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(23):13 259-13 263.
- [14] Douziech M, Sahmi M, Laberge G, et al. A KSR/CNK complex mediated by HYP, a novel SAM domain-containing protein, regulates RAS-dependent RAF activation in *Drosophila*[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(7):807-819.
- [15] Roignant J Y, Hamel S, Janody F, et al. The novel SAM domain protein Aveugle is required for Raf activation in the *Drosophila* EGF receptor signaling pathway[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(7):795-806.
- [16] Friedman A, Perrimon N. A functional RNAi screen for regulators of receptor tyrosine kinase and ERK signalling[J]. *Nature*, 2006, 444(7116):230-234.
- [17] Anselmo A N, Burneister R, Thomas J M, et al. Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(8):5 940-5 943.
- [18] Yao I, Ohtsuke T, Kawabe H, et al. Association of membrane-associated guanylate kinase-interacting protein-1 with Raf-1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270(2):538-42.
- [19] 卢大儒, 邱信芳. 腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体与基因治疗[J]. 国外医学遗传学分册, 1995, 18:61-64.
- [20] 何金生, 王健伟, 涛洪. 腺病毒载体构建原理与方法的研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15:399-400.

[责任编辑:黄 敏]