

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.007

ZO-1 基因的慢病毒载体构建*

盛 陶¹ 曾建平^{2△} 李 辉³

(1 中南大学湘雅二医院心血管内科 湖南 长沙 410011; 2 湘潭市中心医院心血管内科 湖南 湘潭 411100;

3 湘潭市中心医院生殖中心 湖南 湘潭 411100)

摘要 目的:相邻两心肌纤维的连接处称心肌闰盘,它在心肌的机电活动中扮演重要角色。目前有关闰盘相关基因 Cx43 的研究已被广泛关注,而在不同心肌病理状态下,其变化及功能都与另一闰盘相关基因 ZO-1 有极为密切的联系。目前有关 ZO-1 的研究比较少,此次欲将猪 ZO-1 基因克隆到慢病毒表达载体并进行鉴定,为进一步研究其功能奠定基础。**方法:**利用聚合酶链反应(PCR)扩增猪 ZO-1 基因,并克隆到慢病毒表达载体,通过转化、抽提质粒、双酶切和测序鉴定构建的 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 重组载体。**结果:**猪 ZO-1 基因片段重组到慢病毒载体;PCR 和双酶切鉴定,电泳结果显示均能得到与理论大小相符的片段;经测序证实成功构建 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 慢病毒表达载体。**结论:**通过一系列实验证实 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 慢病毒表达载体构建成功,可利用其感染相关细胞或注入动物体内,为后续的体外及在体研究奠定基础,明确其在不同心肌病理状态下所发挥的独特作用。

关键词:ZO-1;基因克隆;慢病毒载体

中图分类号:Q95-3,Q78,Q593 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)04-628-03

Construction of Lentiviral Vector Carrying ZO-1 Gene*

SHENG Tao¹, ZENG Jian-ping^{2△}, LI Hu³

(1 Department of Cardiology, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan, 410011, China;

2 Department of Cardiology, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan, Hunan, 411100, China;

3 Reproductive center, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan, Hunan, 411100, China)

ABSTRACT Objective: The joint of adjacent heart muscle fibers is called myocardial intercalated disc, which is important for myocardial electrical activity. It has been widely concerned about the study of intercalated disc related gene Cx43. Under different pathological status, it is related to another gene ZO-1. However, the research of ZO-1 is scanty, so we cloned the ZO-1 gene of porcine into the lentiviral vector and identificate the recombinant plasmid, which will lay the foundation for further research. **Methods:** The porcine ZO-1 gene was amplified by PCR, and cloned into lentiviral expression vector. The reconstructed Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 plasmid was identified by transformation, plasmid extraction, double enzyme digestion and DNA sequencing analysis. **Results:** The porcine ZO-1 DNA sequences were successfully inserted into the lentiviral vector. The reconstructed plasmid was identified correctly by PCR and double enzyme digestion. The recombinant Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 vector was confirmed by DNA sequencing. **Conclusion:** Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 lentiviral vector has been successfully constructed, so we can use it to infect related cells or animals, which will be useful for further study *in vitro* and *in vivo*, to understand its function in different pathological status.

Key words: ZO-1; Gene cloning; Lentiviral vector

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q78, Q593 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-628-03

前言

心肌的活动分为两种,机械活动以及电活动,在生命体的循环中具有重要作用。不同学者对心肌闰盘相关基因的研究表明 Cx43 和 ZO-1 在心肌闰盘的功能和病理状态下发挥独特作用,而有关 Cx43 的研究较为广泛。ZO-1 是紧密连接蛋白的重要组成蛋白之一,作为膜相关性鸟苷酸激酶家族中的一员,既往有关 ZO-1 在胃肠道、呼吸道、脑脊液屏障等处的研究,明

确了它的功能包括调节细胞物质转运和细胞上皮极性定性^[1],信号转导,蛋白质的靶向输送等^[2]。然而它也在心肌细胞闰盘的黏附连接发挥作用^[3]。之后,Toyofitku 等^[2]发现其与心肌的缝隙连接也有相互作用。ZO-1 存在于心肌细胞闰盘的靠近浆膜处^[3],围绕在缝隙连接周围^[4]。有研究表明,心力衰竭患者闰盘中 ZO-1 减少,可能通过一系列的机制导致异常的冲动传播和心律失常,造成心衰患者的心源性猝死^[5]。而慢病毒载体系统是以人类免疫缺陷 I 型病毒为基础演变发展而来的分子生物学方

* 基金项目:湖南省科技厅科技计划重点项目(2012SK2015)

作者简介:盛陶(1988-),女,硕士研究生,医师,主要研究方向:心血管内科,电话:18773194645, E-mail: shengtao1018@163.com

△ 通讯作者:曾建平, E-mail: zengjp88@163.com

(收稿日期:2013-06-12 接受日期:2013-07-06)

法^[9]。本研究通过慢病毒载体构建 ZO-1 基因高表达重组载体, 目的在于为继续研究 ZO-1 的功能及其在心肌病理情况下发挥的作用有所了解。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

拟胚体细胞 cDNA、Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-Oct4、GBE180 感受态; PFX、PFX mix、*Bam*H I、*Spe* I、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司(加拿大); 质粒提取试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司); DNA 纯化回收试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)。

1.2 猪 ZO-1 基因克隆

1.2.1 引物设计 引物根据 Genbank XM 003353439 序列设计, 提交序列到华大基因合成。上游引物序列为: 5'-GCGCGGATCCGCCACCATGGCGGAAAGTGAACCTCGAGAT-3', 含 *Bam*H I 酶切位点(GGATTC)。下游引物序列为: 5'-GGGGACTAGTTTAAAAGTGGTCAATCAGGACAGAGACAC-3', 含 *Spe* I 酶切位点(ACTAGT)。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系 50 μ L: 灭菌水 21.5 μ L, PFX mix 2.5 μ L, PFX 酶 0.25 μ L, 模板 cDNA 为 0.5 μ L, 上、下游引物各 0.25 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后以 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 62 $^{\circ}$ C 复性 30s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 3min10s, 进行 35 个循环, 最后于 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 4 μ L 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 PCR 产物纯化 取 PCR 产物, 采用 TIANGEN DNA 纯化回收试剂盒, 得到纯化的 PCR 产物 30 μ L。取 1 μ L 纯化产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 酶切 PCR 产物 反应体系 50 μ L: 灭菌水 13 μ L, *Bam*H I 1 μ L, *Spe* I 2 μ L, Buffer *Bam*H I 5 μ L, PCR 纯化产物 29 μ L。37 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时。之后, 将此反应体系扩大成 60 μ L, 即补加 *Bam*H I 0.5 μ L, *Spe* I 1 μ L, Buffer *Bam*H I 1 μ L, 无菌水 7.5 μ L。25 $^{\circ}$ C 室温过夜。采用 TIANGEN DNA 纯化回收试剂盒, 得到纯化的酶切产物。

1.2.5 构建重组质粒 将 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-Oct4 质粒, 用 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切鉴定、凝胶回收纯化, 得到 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE 双粘质粒。将纯化的目的片段在 T4 DNA 连接酶作用下与双粘质粒连接, 构建重组质粒。转化 GBE180 感受态细胞于氨苄霉素阳性的 LB 平板上, 初筛阳性克隆并小提质粒, 用 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切后将阳性质粒送铂尚生物技术公司测序。

2 结果

2.1 ZO-1 基因克隆

将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在约 3300bp 得到条带, 与目的片段大小位置相符。

2.2 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 重组慢病毒表达载体的构建

将连接产物 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 转化 GBE180 感受态细胞, 涂布氨苄(Amp)抗性 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养可见阳性菌落生成。

2.3 慢病毒载体 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 双酶切鉴定和测

序

经 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切后, 可获得约 3300bp 的 DNA 片段, 与预期片段大小相符。表明目的基因已成功克隆, 送铂尚生物技术公司测序, 结果显 ZO-1 基因序列正确。以上结果表明: Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 重组慢病毒表达载体构建成功。

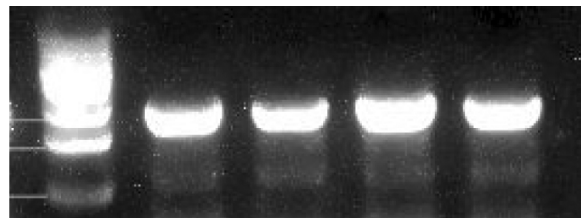


图 2-1 ZO-1 基因克隆

Fig. 2-1 ZO-1 gene clone

注: marker 条带由上到下依次为 3、2、1kb。

Note: the lanes of marker from top to bottom represented 3、2、1kb.

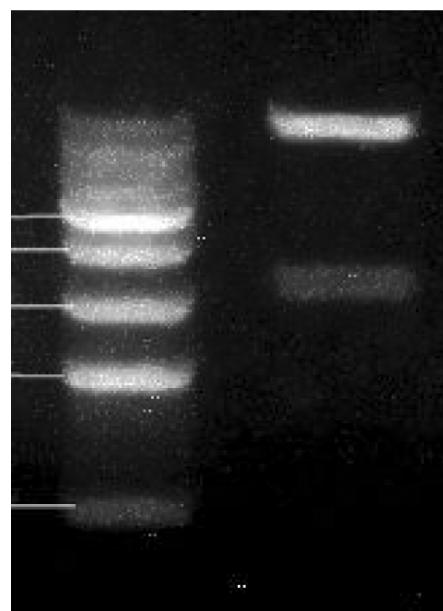


图 2-2 慢病毒载体 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 双酶切鉴定

Fig.2-2 Lentivirus vector Lenti - EF1 α -EGFP - TRE - ZO - 1 double enzyme identification

注: marker 条带由上到下依次为 5、4、3、2、1Kb。

Note: the lanes of marker from top to bottom represented 5、4、3、2、1Kb.

3 讨论

该实验使用能高效整合入宿主细胞基因组的慢病毒载体, 能有效实现后续实验步骤的顺利进行, 包括稳定转染细胞或者注射入动物体内。而该载体含 EGFP 基因, 即增强型绿色荧光蛋白, 具有结构稳定、高效表达、无种系依赖性等特点, 作为细胞基因表达及细胞示踪标记是非常合适的, 也能方便研究者的直观观察。

在心脏, 缝隙连接调控相邻心肌细胞间的机电和化学耦联^[7]。心肌缺血、心肌肥厚、心力衰竭、高脂血症等都可能致缝隙连接的重构。在代谢抑制和缺血的情况下都可能导致心律失常^[8]。

ZO-1 在心肌缝隙连接处发挥重要作用, 而以前的研究也显示 ZO-1 也起着稳定机电活动联系的作用^[9]。

ZO-1 和 Cx43 的 C 端相互作用, 决定着缝隙连接的大小和定位, 在正常心肌和病理心肌中都扮演着重要的作用^[10]。在压力负荷性心肌梗厚的晚期, Cx43 和 ZO-1 的相互作用是明显下降的, 而 endothelin-1 (ET-1) 和 sphingosine-1-phosphate (S1P) 都影响着 Cx43 的磷酸化^[11], Cx43 的脱磷酸化与 ZO-1 密切相关, 并与心电的延迟传导有关^[12]。实验证明在氧化应激可改变 ZO-1 蛋白的表达与定位^[13]。心肌梗塞正是心肌氧需及氧供的不平衡, 在一项犬类心肌梗塞模型实验中表明 Src 降低了 Cx43 和 ZO-1 之间的联系, 导致了 Cx43 从 ZO-1 上解离, Cx43 实现重新分配, 而降低了传导速度和导致心律失常形成^[14]。由此可以推论, ZO-1 在心电的传导当中具有举足轻重的作用, 在不同病理情况下, 它的上调或下调, 及它与其他相关蛋白的相互作用, 在心肌病理情况下导致的心律失常中可能发挥着独特的作用。

目前的实验方法有通过转染, 病毒载体介导的基因转移等来实现将目的基因导入靶细胞或器官, 真核表达质粒的转染对于分裂增殖比较旺盛的体外培养细胞转染效果较好, 但表达的目的基因常随时间的延长而发生丢失, 然而后者可以高效整合入宿主细胞基因组中, 稳定性比较好^[15]。也是目前感染效率最高的载体。此外, 慢病毒载体还具有转移基因片段容量较大, 长期稳定表达, 不易诱发宿主免疫反应等特点^[16], 在实验研究中广泛的被作为首选载体^[17]。

我们可用慢病毒载体来生产转基因动物, 或者导入细胞进行研究。而 Lenti-EF1 α -EGFP-TRE-ZO-1 重组慢病毒表达载体构建成功, 可以进行下步的慢病毒包装、纯化和滴度测定, 感染特定的细胞, 稳定标记 ZO-1 目的基因进行实验, 也有助于我们对其基因功能及其在心肌病理情况下发挥的作用做进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 李秋霞, 罗茂林, 李茹柳, 等. 紧密连接蛋白 ZO-1 研究概述 [J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(6): 523-526
Li Qiu-xia, Luo Mao-lin, Li Ru-liu, et al. General research of tight junction ZO-1 [J]. Journal of Guangzhou University of traditional Chinese medicine, 2007, 24(6): 523-526
- [2] Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, et al. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes [J]. Biol Chem, 1998, 273(21): 12725-12731
- [3] Furuse M, Itoh M, Hirase T, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions [J]. Cell Biol, 1994, 127 (6): 1617-1626
- [4] Rhett JM, Jourdan J, Gourdie RG. Connexin 43 connexon to gap junction transition regulated by zonula occludens-1 [J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(9): 1516-1528
- [5] Kostin S. Zonula occludens-1 and connexin 43 expression in the failing human heart [J]. Cell Mol Med, 2007, 11(4): 892-895
- [6] 李祥勇, 罗海清, 林观平, 等. 靶向 Bi-1 基因的重组慢病毒载体构建及其在 NIH3T3 细胞中的表达 [J]. 医学研究生学报, 2010, 23(12): 1240-1243
Li Xiang-yong, Luo Hai-qing, Lin Guan-ping, et al. Construction of recombinant lentiviral expression vector targeting human Bax inhibitor-1 gene and its expression in NIH3T3 cells [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2010, 23(12): 1240-1243
- [7] Yu ZB, Sheng JJ. Remodeling of cardiac gap junctions and arrhythmias [J]. Acta Physiologica Sinica, 2011, 63(6): 586-592
- [8] Palatinus JA, Q'Quinn MP, Barker RJ, et al. ZO-1 determines adherens and gap junction localization at intercalated disks [J]. Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300(2): H583-594
- [9] Barker RJ, Price RL, Gourdie RG. Increased association of ZO-1 with connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions [J]. Circ Res, 2002, 90(3): 317-324
- [10] Joseph A. Palatinus, J. Matthew Rhett, et al. The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012: 1831-1843
- [11] Martine Tencé, Pascal Ezan, Edwige Amigou, et al. Increased interaction of connexin43 with zonula occludens-1 during inhibition of gap junctions by G protein-coupled receptor agonists [J]. Cellular Signaling, 2012: 86-98
- [12] Jin H, Chemaly ER, Lee A, et al. Mechanoelectrical remodeling and arrhythmias during progression of hypertrophy [J]. FASEB, 2010, 24 (2): 451-463
- [13] Lorenza González-Mariscal, Miguel Quirós, Monica Díaz-Coránguez. ZO Proteins and Redox-Dependent Processes [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 5(15): 1235-1253
- [14] Kieken F, Mutsaers N, Dolmatova E, et al. Structural and molecular mechanisms of gap junction remodeling in epicardial border zone myocytes following myocardial infarction [J]. Circ Res, 2009, 104(9): 1103-1112
- [15] 王淑艳, 张愚. 慢病毒载体的设计及应用进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(11): 70-75
Wang Shu-yan, Zhang Yu. Advances of Lentiviral Vectors [J]. China Biotechnology, 2006, 26(11): 70-75
- [16] Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy [J]. Gene Ther, 2006, 13(6): 553-558
- [17] 金志良, 孙新臣, 成红艳, 等. 人高迁移率族蛋白组 A1 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建与鉴定 [J]. 医学研究生学报, 2008, 21(5): 468-471
Jin Zhi-liang, Sun Xin-chen, Cheng Hong-yan, et al. Construction and identification of a lentiviral vector harboring RNAi sequence targeting the human high mobility group A1 gene [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2008, 21(5): 468-471