

· 论 著 ·

# 重组腺病毒 rAd-mIL-15 的构建及表达<sup>\*</sup>

谭榜云, 李 莉, 刘志武

(兰州大学第一医院检验科, 甘肃兰州 730000)

**摘要:**目的 构建并制备鼠白细胞介素-15(mIL-15)重组腺病毒(rAd-mIL-15), 感染 HEK293 细胞, 为肝细胞肝癌的免疫治疗奠定基础。方法 采用聚合酶链反应(PCR)扩增 mIL-15, 将扩增产物连接到穿梭载体 pDC316 上, 构建重组穿梭质粒 pDC316-mIL-15。在 Lipofectamine2000 脂质体介导下将腺病毒骨架载体 pBHGlox $\Delta$ E1,3 Cre 和穿梭质粒 pDC316-mIL-15 共转入 HEK293 细胞, 进行同源重组, 得到腺病毒重组质粒 pAd-mIL-15。随后在 HEK293 细胞中包装扩增病毒并测定病毒滴度。采用 PCR 对重组腺病毒进行鉴定。结果 重组腺病毒质粒经 PCR 鉴定, 证实含有 mIL-15 基因, 重组腺病毒载体构建成功, 病毒滴度达  $1.25 \times 10^{10}$  PFU/mL。结论 采用细胞内同源重组方法可成功构建含 mIL-15 基因的重组腺病毒, 并可获得高滴度病毒, 其能高效感染 HEK293 细胞, 能为进一步研究奠定基础。

**关键词:** 白细胞介素-15; 重组腺病毒载体; 包装

**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.22.008 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)22-3300-03

## Construction and expression of recombinant adenovirus rAd-mIL-15<sup>\*</sup>

TAN Bangyun, LI Li, LIU Zhiwu

(Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

**Abstract:** Objective To construct and prepare the recombinant adenovirus carrying mouse interleukin-15 (mIL-15), and to transfect it into HEK293 cells on order to lay the foundation for immunotherapy of hepatocellular carcinoma (HCC). Methods The PCR was adopted to amplify mIL-15, the amplified products were connected into shuttle vector DC316, the recombinant shuttle plasmid pDC316-mIL-15 was constructed. Under mediation of lipofectamine2000, recombinant adenovirus backbone vector pBHGlox $\Delta$ E1,3 Cre and shuttle plasmid pDC316-mIL-15 were co-transfected into HEK293 cells for conducting the homologous recombination. The recombinant adenovirus plasmid rAd-mIL-15 was obtained. Then the amplified virus was packed in HEK293 cells and the viral titer was measured. The recombinant adenovirus was identified by PCR. Results The recombinant adenovirus plasmid was verified to contain mIL-15 gene by PCR identification. The recombinant adenovirus vector was successfully constructed, the viral titer reached  $1.25 \times 10^{10}$  PFU /mL. Conclusion Recombinant adenovirus vector containing mIL-15 can be successfully constructed by adopting the intracellular homologous recombination method, moreover which can obtain high titer virus, can efficiently infect HEK293 cells and lay a foundation for further study.

**Key words:** interleukin-15; recombination adenovirus; packaging

白细胞介素(IL)-15 是学者于 1994 年从猿肾上皮细胞系成功分离时发现。IL-15 可由多种细胞和组织产生, 主要由单核细胞、树突状细胞(DC 细胞)和基质细胞产生。IL-15 属于  $\gamma$  链细胞因子 IL-2 家族成员, 其成员还包括 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13 和 IL-21, 具有较多类似 IL-2 的功能, 但其结构与 IL-2 不相似, 在众多方面还可以发挥独特的免疫调节功能<sup>[1]</sup>。IL-15 具有激活、维持和扩增 CD8<sup>+</sup> 记忆性 T 细胞等功能<sup>[2]</sup>。近年来, IL-15 在抗肿瘤免疫治疗应用方面得到学者的关注, 但 IL-15 在肿瘤发生中作用的研究结果却并不一致。本研究以鼠白细胞介素-15(mIL-15)为目的基因, 利用 AdMax 系统构建重组腺病毒 mIL-15, 能够为进一步开展 mIL-15 抗肿瘤免疫治疗及对 IL-15 的应用进行深入探索, 可为 IL-15 对恶性肿瘤的免疫治疗策略提供一定帮助。现报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** HEK293 细胞购于协和细胞库, RPMI 1640 培养基购于 Hyclone 公司; 四季青胎牛血清购于浙江天杭生物科技有限公司; Pfu DNA 聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、

DNA 标记物 III 和标记物 DL5000 均购于上海生工生物有限公司; 天根质粒小提中量试剂盒、天根 DP117-无内毒素质粒大提试剂盒和 DNA 片段回收试剂盒购于天根生物科技有限公司; 转染试剂盒 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司。mIL-15 基因的质粒 pUC-mIL-15、聚合酶链反应(PCR)引物由上华大基因公司合成。质粒 pDC316、pBHGlox $\Delta$ E1,3 Cre 购于北京 BioVector 质粒载体菌种细胞基因保藏中心。

### 1.2 方 法

**1.2.1 mIL-15 基因的扩增** 取含 mIL-15(489 bp)基因的质粒作为模板进行 PCR 扩增, 其上游引物为 5'-GAA GAT CTA TGA AAA TTT TGA AAC CA-3', 下游引物为 5'-CCC AAG CTT TCA GGA CGT GTT GAT GAT G-3', 酶切位点分别为 Bgl II 和 Hind III。反应条件为 94 °C 预变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。取 5  $\mu$ L PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.2.2 穿梭质粒 pDC316-mIL-15 的构建** mIL-15 基因的扩增产物与穿梭载体 pDC316 进行双酶切 37 °C, 4 h。随后进行

<sup>\*</sup> 基金项目: 甘肃省青年科技基金计划资助项目(1606RJYA266)。

作者简介: 谭榜云, 男, 主管技师, 主要从事止血与血栓检验方面的研究。

胶回收,将回收产物进行连接。最后将连接产物转化至 DH5 $\alpha$  中。放置在 37  $^{\circ}$ C 细菌培养箱中,12~16 h 后观察细菌生长情况。

**1.2.3 重组质粒 pDC316-mIL-15 的筛选与鉴定** 挑取 pDC316-mIL-15 质粒阳性克隆菌落,将其转至 LB 液体培养基中进行增菌,随后提取质粒。以提取的质粒为模板进行 PCR 鉴定。同时,将提取的质粒进行 Bgl II 和 Hind III 双酶切鉴定,双酶切条件为 37  $^{\circ}$ C、4 h。最后将产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,并将阳性质粒送去测序。

**1.2.4 重组腺病毒 pDC316-mIL-15(rAd-mIL-15)和重组腺病毒 pDC316(rAd-pDC316)的包装** 采用无内毒素质粒抽提试剂盒提取病毒包装系统中的质粒 DNA,用 NANODROP 2000 测定其水平和纯度后进行后续的质粒转染。将穿梭质粒 pDC316-mIL-15 和腺病毒辅助质粒 pBHGlox $\Delta$ E1,3 Cre 共转染 HEK293 细胞,同时试验还设计了细胞对照,空载体 pDC316 也与腺病毒辅助质粒 pBHGlox $\Delta$ E1,3 Cre 共转染 HEK293 细胞。观察细胞的生长状况,待绝大部分细胞出现细胞病变效应(CPE)时,收集细胞,于-80  $^{\circ}$ C、37  $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次,离心,收集病毒上清液,并于-80  $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.5 rAd-mIL-15 和 rAd-pDC316 的鉴定** 将上述收集的重组腺病毒上清液 20  $\mu$ L 加入 2 g/L 蛋白酶 K 5  $\mu$ L,50  $^{\circ}$ C 处理 45 min,沸水浴煮沸 10 min,立即放入冰浴 5 min,分别取 3  $\mu$ L 作为模板采用 PCR 检测目的基因。其中,pDC316 的引物基因长度为 263 bp,其上游引物为 5'-ACGTGGGTATAAGAG-GCG-3',下游引物为 5'-CGATGCTAGACGATCCAG-3';反应条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性变性 30 s,54  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 5  $\mu$ L PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.2.6 rAd-mIL-15 和 rAd-pDC316 的扩增** 将生长状态良好的 HEK293 细胞传入 T75 细胞培养瓶中,待细胞融合至 70%~80% 时加入重组腺病毒 pDC316-mIL-15 上清液继续培养,待绝大部分细胞出现典型 CPE 时,收集病毒上清液,多次扩增,分装并于-80  $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.7 rAd-mIL-15 和 rAd-pDC316 滴度的测定** 取 50  $\mu$ L 腺病毒上清原液以 1:10 比例进行稀释,直至稀释到 1 $\times$ 10 $^{-12}$ ,依次将 10 $^{-12}$ ~10 $^{-2}$  稀释的病毒液加入 96 孔板中,10 d 后观察 CPE 并进行记录。病毒滴度计算按照相关标准进行。

**2 结 果**

**2.1 mIL-15 基因扩增 PCR 产物的鉴定** 从 pUC57-mIL-15 质粒中,利用 PCR 方法扩增 mIL-15 基因后得到 mIL-15 基因片段,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到的 PCR 产物大小约为 500 bp,与 Genbank 中 mIL-15 cDNA 大小一致。见图 1。

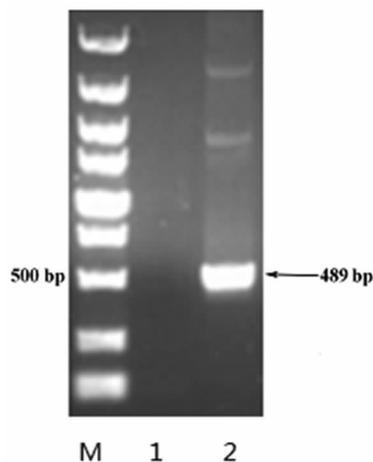
**2.2 重组穿梭质粒 pDC316- mIL-15 的鉴定**

**2.2.1 pDC316- mIL-15 阳性克隆的 PCR 和双酶切鉴定** 用 mIL-15 引物对随机挑选转化子进行 PCR 鉴定,经电泳检测可看到阳性转化子扩增获得约为 500 bp 的条带;双酶切鉴定显示,酶切到 1 条约为 500 bp 的条带,与 mIL-15 cDNA 相当,表明阳性转化子中含有 mIL-15 目的基因。见图 2。

**2.2.2 pDC316-mIL-15 阳性克隆测序鉴定** 测序结果显示,mIL-15 基因相对分子质量和理论值完全一致,基因序列和 NCBI 数据库中的基因序列 100% 匹配且无基因突变。表明 pDC316-mIL-15 为正确克隆。

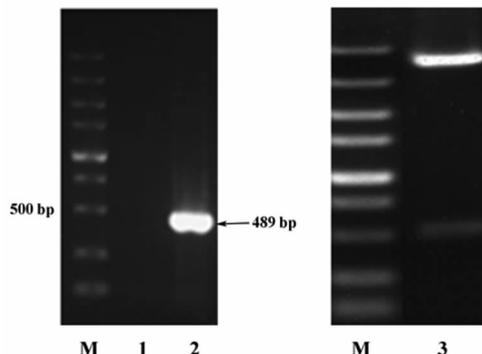
**2.3 rAd-mIL-15 和 rAd-pDC316 的包装** 穿梭质粒 pDC316-mIL-15 和腺病毒辅助质粒 pBHGlox $\Delta$ E1,3 Cre 共转染

HEK293 细胞,同时试验还设计了细胞对照,空载体 pDC316 也与腺病毒辅助质粒 pBHGlox $\Delta$ E1,3 Cre 共转染了 HEK293 细胞。8~10 d 后 HEK293 细胞开始飘落,出现细胞肿大变圆、聚集成团、折光性增强等特征性 CPE。反复感染 HEK293 细胞,出现明显的 CPE 现象。见图 3。



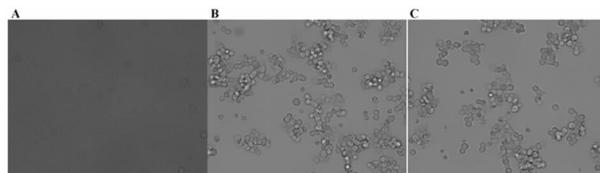
注:泳道 M 为标记物 DL5000,泳道 1 为经 PCR 的阴性对照,泳道 2 为经 PCR 扩增的 mIL-15 产物

图 1 mIL-15 基因的 PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图



注:泳道 M 为标记物 DL5000,泳道 1 为经 PCR 的阴性对照,泳道 2 为经 PCR 的 pDC316-mIL-15,泳道 3 为经 Bgl II、Hind III 双酶切的 pDC316-mIL-15

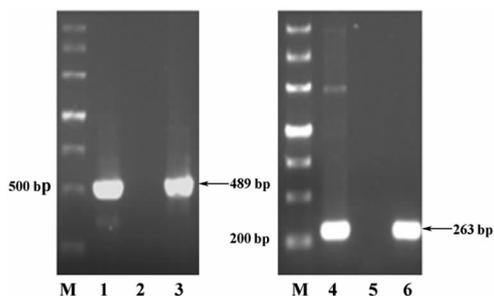
图 2 pDC316-mIL-15 阳性克隆 PCR 和双酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图



注:A 为未经任何处理的 HEK293 细胞,B 为 rAd-mIL-15 感染的 HEK293 细胞,C 为 rAd-pDC316 感染的 HEK293 细胞

图 3 重组腺病毒 pDC316-mIL-15 感染 HEK293 细胞后产生明显的 CPE(倒置相差显微镜 $\times$ 100)

**2.4 rAd-mIL-15 和 rAd-pDC316 的鉴定** 将提取的重组腺病毒以基因 mIL-15 和 pDC316 的特异度引物进行 PCR 扩增鉴定,mIL-15 基因重组腺病毒得到约 500 bp 的特异度目的条带,pDC316 基因重组腺病毒得到约 200 bp 的特异度目的条带,其大小与 mIL-15 和 pDC316 的基因片段基本吻合,阴性对照未见目的条带,证明腺病毒包装成功。见图 4。



注:泳道 M 为 DNA 标记物Ⅲ,泳道 1 为阳性对照(以 pDC316-mIL-15 为模板所得 PCR 产物),泳道 2 为阴性对照(加 mIL-15 的上下游引物,以双蒸水为模板);泳道 3 为以 rAd-mIL-15 为模板所得 PCR 产物;泳道 4 为阳性对照(以 pDC316 为模板所得 PCR 产物);泳道 5 为阴性对照(加 pDC316 的上下游引物,以双蒸水为模板);泳道 6 为以 rAd-pDC316 为模板所得 PCR 产物

图 4 PCR 检测 mIL-15 基因和 pDC316 的部分基因的重组腺病毒 DNA

**2.5 rAd-mIL-15 和 rAd-pDC316 滴度的测定** 经过反复感染、扩增,根据 TCID<sub>50</sub> 法进行滴度测定,测得 rAd-mIL-15 的滴度为  $1.25 \times 10^{10}$  PFU/mL, rAd-pDC316 的滴度为  $8 \times 10^9$  PFU/mL。最终获得高滴度的 rAd-mIL-15 和 rAd-pDC316。

### 3 讨论

大量研究表明,IL-15 是一种抗肿瘤细胞因子,可以增强机体对肿瘤的免疫力。IL-15 多种肿瘤均有明显的抑制作用<sup>[3-4]</sup>。IL-15 的抗肿瘤作用是通过促进自然杀伤细胞(NK 细胞)和/或 CD8<sup>+</sup> 细胞的作用而实现。也有研究表明,IL-15 本身就具有强大的抗肿瘤作用,不需要通过 CD8<sup>+</sup> 细胞和 NK 细胞介导<sup>[5]</sup>。在肺癌免疫治疗研究中,认为 IL-15 是较 IL-2 更为理想的细胞因子。然而,有研究表明,肿瘤细胞中 IL-15 的旁/自分泌增加可能在肿瘤的发生、生长、转移中起促进作用。也有研究表明,IL-15 还可促进血管生成,促进肿瘤生长。因此,需要系统地对 IL-15 抗肿瘤作用进行深入研究。

本研究选用腺病毒载体,是因为与其他病毒载体比较,其具有众多独特的优势:(1)基因组信息完全清楚,易于操作,可以插入大片段的外源基因;(2)能有效进行增殖,滴度高,非常适用于基因治疗;(3)宿主范围广,不仅可以感染分裂细胞,也可感染静止期细胞;(4)不整合至宿主 DNA 中,不引起宿主 DNA 突变,对人致病性低,安全性相对较高;(5)性质相对稳定;(6)在较好的条件下,表达系统在数升 HEK293 细胞悬浮培养液中可以按比例地增加,可使病毒大量扩增。

本研究利用的腺病毒 AdMax 包装系统,其骨架质粒 pB-HGlox $\Delta$ E1,3 Cre 含有病毒的大部分基因组,可通过重组酶系统(Cre-loxP)与克隆了外源基因并带有 loxP 位点的腺病毒穿梭质粒 pDC316 共转染 HEK293 细胞,得到含有外源基因的重组腺病毒<sup>[6]</sup>。与其他常用腺病毒载体的包装方法(如经典的同源重组法和 AdEasy 系统)比较,AdMax 包装系统具有多种优势。(1)与经典的同源重组法比较,AdMax 包装系统重组出的腺病毒成功率较高,可大于 98%,效率高。经典的同源重组法利用同源重组,在腺病毒左臂区域(通常缺失 E1 基因区)插入目的基因表达盒构成腺病毒穿梭质粒,与通常缺失 E1 基因区

的腺病毒骨架质粒共同转染携带 E1 基因区的 HEK293 细胞,2 种质粒借助所带的部分同源序列在 HEK293 细胞内发生同源重组。但其发生重组的效率较低,常常需要反复传代扩增,多轮筛选获得。(2)与 AdEasy 系统比较,AdMax 包装系统的重组过程发生在 HEK293 细胞中,不仅重组出的腺病毒成功率高,而且还保持了其对腺病毒的生存压力,有利于重组腺病毒基因组的完整性。AdEasy 系统则是通过同源臂重组的方式,在细菌 BJ5183 中获得重组腺病毒基因组质粒。重组腺病毒基因组质粒将克隆了外源基因的腺病毒穿梭质粒与腺病毒骨架质粒共转化 RecA<sup>+</sup> 细菌 BJ5183 中,在细菌 RecA 重组酶的作用下,经抗性筛选出重组腺病毒基因组质粒,并将其线性化后转染 HEK293 细胞,获得重组腺病毒。但 AdEasy 系统的出毒成功率不高,仅为 18%~34%。由于在细菌 BJ5183 中完成病毒基因组重组,失去了生存压力,使得腺病毒基因组更易发生突变,产生的重组病毒遗传背景及其活性将可能更易受到影响。AdMax 包装系统是通过重组酶在真核细胞内完成重组出毒,高效稳定,只要外源基因不超过 8 kb,超过 98% 的重组腺病毒都能携带目的基因。AdMax 包装系统是目前最方便快捷且使用较多的腺病毒载体系统。

本研究成功包装了重组腺病毒 rAd-mIL-15 和空载体 rAd-pDC316。经过 PCR 验证,上述 2 个重组腺病毒载体含有目的基因 mIL-15 和 pDC316 的部分基因片段。重组腺病毒在 HEK293 细胞中大量扩增,均获得了较高滴度的重组腺病毒。这为 IL-15 基因功能和肝癌免疫治疗的研究奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Verbist KC, Klonowski KD. Functions of IL-15 in anti-viral immunity; multiplicity and variety[J]. Cytokine, 2012, 59(3):467-478.
- [2] Richer MJ, Pewe LL, Hancox LS, et al. Inflammatory IL-15 is required for optimal memory T cell responses[J]. J Clin Invest, 2015, 125(9):3477-3490.
- [3] Mathios D, Park CK, Marcus WD, et al. Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a murine glioblastoma model[J]. Int J Cancer, 2016, 138(1):187-194.
- [4] Jakobisiak MG, Lasek W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(2):99-108.
- [5] Davies E, Reid S, Medina MF, et al. IL-15 has innate anti-tumor activity Independent of NK and CD8 T cells[J]. J Leukoc Biol, 2010, 88(3):529-536.
- [6] 郭润民, 吴子君, 黄润娜. 过表达及干扰人 APE1 重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 广东医学院学报, 2016, 34(5):463-466.

(收稿日期:2017-05-01 修回日期:2017-07-20)