

## 新法制备含VEGF启动子驱动的CD/TK融合基因重组腺病毒

重组腺病毒因其感染细胞谱广、病毒滴度高、基因转移率高、较适合体内基因转移等特点已被广泛应用于恶性肿瘤的基因治疗。但无论是细胞内同源重组法还是细菌内同源重组法都存在成功率低、对操作技术和实验设备要求高等缺陷,不适合在普通实验室开展,在一定程度上限制了重组腺病毒载体的应用和发展[1][2][3][4]。本研究改进了传统的细菌内同源重组法,以简单的化学方法替代电穿孔法,先把腺病毒基因组质粒pAdEasy-1导入BJ5183细菌,筛选出BJ5183 pAdEasy-1细菌。再与线性化的转移质粒同源重组,既提高了重组效率,又简化了实验步骤,降低了操作难度和设备要求,便于重组腺病毒制备技术的推广应用。作者应用该法制备含血管内皮细胞生长因子(VEGF)启动子驱动的CD/TK融合基因重组腺病毒,取得了良好的效果。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

穿梭质粒pAdtrack、腺病毒基因组质粒pAdEasy-1和大肠杆菌BJ5183由Belt Vogelstein博士惠赠; pEGFP-1-SV-VEGFP由Jiro Kishimoto博士惠赠; pREP8-TK由Jay Kolls博士惠赠; pMD18-t载体购自大连宝生物公司; pcDNA3、JM109细菌由第一军医大学细胞生物教研室提供; 293细胞由第一军医大学病理生理教研室提供; 各种内切酶和T4DNA连接酶购自New England Biolabs公司; Taq PCR Master Mix购自QIAGEN公司; DMEM、胎牛血清和转染试剂LipofectAMINE2000购自Gibco公司; CD和TK的引物合成和DNA序列的测定由上海申友生物技术有限公司完成。

#### 1.2 方法

1.2.1 pAdtrack-VEGF-CDglyTK转移质粒的构建 根据Rogulski等[5]的方法,以JM109细菌基因组为模板,用Taq PCR Master Mix扩增E.coli CD,并在其上下游分别引入Hind III和BamH I酶切位点。E.coli CD上下游引物分别为5'-GGGAAGCTTAGGCTAG CAATGTCGAATAACGCT-3'和5'-GGGGGATC-CTC CACGTTTGTAAATCGATGGCTTC-3'。PCR反应参数为98 °C变性5 min, 94 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C 1 min,共28个循环; 72 °C 10 min延伸, 4 °C 2 h保存。HSV-TK则以pREP8-TK为模板,其上下游分别引入BamH I和Xba I的酶切位点。HSV-TK的上下游引物分别为5'-GGGGGATCCGGCGGGGGCGGTGGA GGAGGGGTATGGCTTCGTAC-3'和5'-GGGTC-TA GATTAGTTAGCCTCCCCATCTC-3'。PCR反应参数为98 °C变性5 min, 94 °C 40 s, 50 °C 40 s, 72 °C 1 min,共28个循环; 72 °C 10 min延伸, 4 °C 2 h保存。PCR产物分别与T载体(pMD 18-T)连接,构建质粒pMD 18-CD和pMD 18-TK,送上海申友生物技术有限公司测序。鉴定正确后,分别以上述限制性内切酶切下CD基因片段和TK基因片段,先后连接于以相同酶切处理的pcDNA3上,构建pcDNA3-CDg-lyTK,再用Hind III和Pvu II切下一长约2.6 kb、含poly A尾的片段CDglyTK-pA。用Not I和XhoI I将VEGF启动子从pEGFP-1-SV-VEGFP上切下,连接于穿梭质粒pAdtrack,获得pAdtrack-VEGFP。用Xba I将前者切开,再以Klenow I补平粘性末端,而后用Hind III处理该载体,最后连接片段CDglyTK-pA,构建转移质粒pAdtrack-VEGFP-CDglyTK。

1.2.2 BJ5183 pAdEasy-1感受态细菌的制备 取约50 ng pAdEasy-1转化BJ5183细菌,用含100  $\mu$ g/ml氨苄青霉素和100  $\mu$ g/ml链霉素的LB琼脂平板筛选,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱。12~16 h后,挑取10~20个菌落分别置于2 ml含上述浓度抗生素的LB培养基中,在37  $^{\circ}$ C恒温箱中振培10~15 h。由于pAdEasy-1在BJ5183细菌内易发生重组或突变,所以抽提质粒后用Hind III进行酶切鉴定,并与pAdEasy-1对比,大小与pAdEasy-1相同且不能被Hind III消化的为正确的质粒。用氯化钙法,将BJ5183 pAdEasy-1细菌制成感受态细菌,用于下一步实验,并用20%~30%甘油保存剩余的BJ5183 pAdEasy-1细菌于-70  $^{\circ}$ C冰箱。

1.2.3 pAdEasy-VEGFP-CDglyTK重组腺病毒质粒的构建 用Pme I线性化转移质粒pAdtrack-VEGFP-CDglyTK。灭活Pme I,取100~500 ng线性化质粒转化BJ5183 pAdEasy-1感受态细菌,用含25  $\mu$ g/ml卡那霉素的LB琼脂平板筛选,置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养16~20 h。因为重组的腺病毒质粒具有卡那霉素抗性,且含有重组质粒的细菌生长相对缓慢,所以在挑选菌落时要选取最小的10~20个菌落进行扩增。提取质粒,与pAdtrack-VEGFP-CDglyTK和pAdEasy-1一起在0.6%的琼脂糖中电泳,并进一步用Pac I酶切鉴定。将所需细菌进行进一步扩增,抽提质粒,以备转染293细胞。

1.2.4 制备含VEGFP-CDglyTK的重组腺病毒 以含10%胎牛血清的DMEM、37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养293细胞。当细胞丰度达50%~70%时参照He等[6]的方法和LipofectAMINE2000说明书进行pAdEasy-VEGFP-CDglyTK的转染。然后,通过荧光显微镜观察GFP的表达情况。7~12 d后刮下细胞,以冻融法收集病毒上清,PCR鉴定重组腺病毒。

## 2 结果

### 2.1 转移质粒pAdtrack-VEGFP-CDglyTK的鉴定

在转移质粒pAdtrack-VEGFP-CDglyTK的构建过程中,主要采用酶切和测序的方法进行鉴定。将PCR所得的CD片段和TK片段分别连于T载体(p MD 18-T)进行测序,选择序列和片段方向正确的质粒进行下一步实验。而后,把CD片段(约1.3 kb)连接到pcDNA3上,用Hind III和BamH I鉴定。选取正确的质粒连接TK片段(约1.1 kb),构建含融合基因的pcDNA3-CDglyTK。该步以BamH I和Xba I鉴定。用Not I和Xho I切下pEGFP-1-SV-VEGFP上的VEGF启动子,与pAdtrack相连,再以相同的酶切鉴定(图1)。因为pAdtrack上无转录所需的polyA,所以用Hind III和Pvu II把pcDNA3上的CD/TK融合基因连同Xba I位点和polyA一起切下(约2.6 kb),与正确的pAdtrack-VEGFP相连,构建转移质粒pAd-track-VEGFP-CDglyTK,以Hind III和Xba I鉴定(图1)。

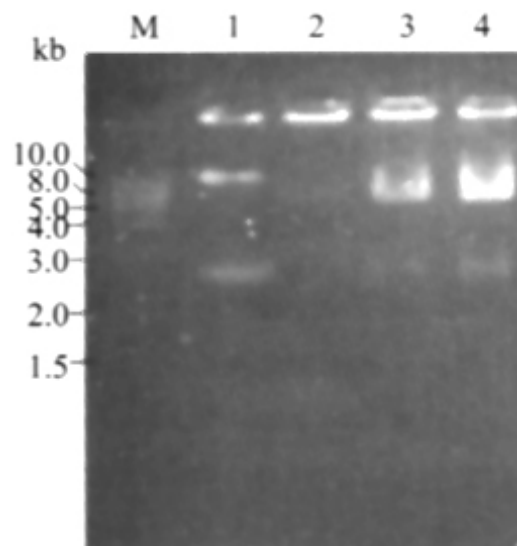


图1 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK及pAdtrack-VEGFP的酶切鉴定

Fig.1 Endonuclease digestion map of pAdtrack-VEGFP-CDglyTK and pAdtrack-VEGFP  
M: DNA ladder; Lane 1: CD/TK fusion gene (2.4 kb) and pAdtrack-VEGFP (10.8 kb, Hind

III/Xba I); Lanes 2-4: VEGF promoter (2.5 kb) and pAdtrack (8.3 kb, Not I/Xho I), of which lanes 3 and 4 are positive

## 2.2 pAdEasy-VEGFP-CDglyTK重组腺病毒的鉴定

由于BJ5183 pAdEasy-1细菌不具备卡那霉素抗性，因此，转化转移质粒后，获得卡那霉素抗性的细菌只有两种，一种含重组质粒pAdEasy-VEGFP-CDg-lyTK(约46.6 kb)，另一种含未重组的转移质粒pAd-track-VEGFP-CDglyTK(约13.2 kb)。两者可以琼脂糖电泳区分(图2)，重组成功率为60%。为进一步鉴定，根据AdEasy-1系统的特点，用Pac I酶切重组质粒可产生2条DNA片段，其中小片段约为3.0 kb(图3)。线性化的病毒质粒转染293细胞后，可在荧光显微镜下直接观察(图4)，7~12 d后便可收集病毒，PCR鉴定结果。

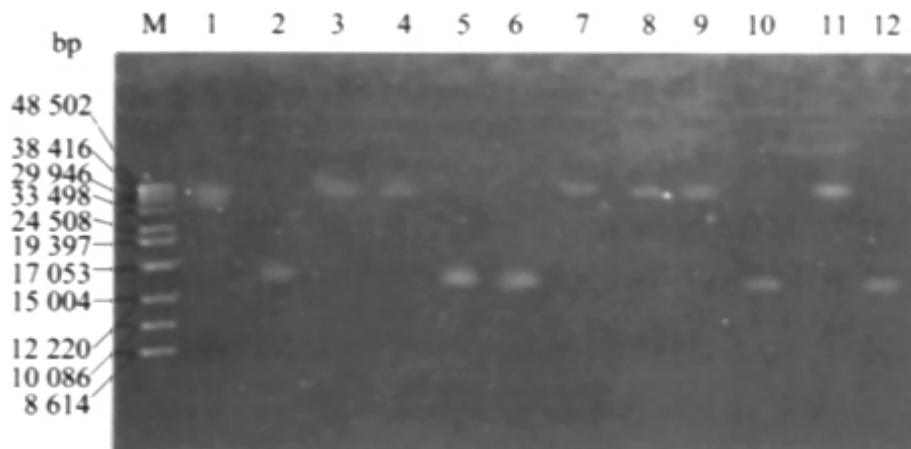


图2 卡那霉素抗性细菌质粒的电泳图谱

Fig.2 Electrophoretic analysis of the bacterial plasmids with kanamycin resistance M: DNA Ladder; Lanes 1-10: Bacterial plasmids with kanamycin resistance, of which 2, 5, 6 and 10 were pAdtrack-VEGFP with all the other lanes being pAdEasy-VEGFP-CdglyTK; Lane 11: pAdEasy-1 (about 33.4 kb); Lane 12: pAdtrack-VEGFP-CdglyTK (about 13.2 kb)

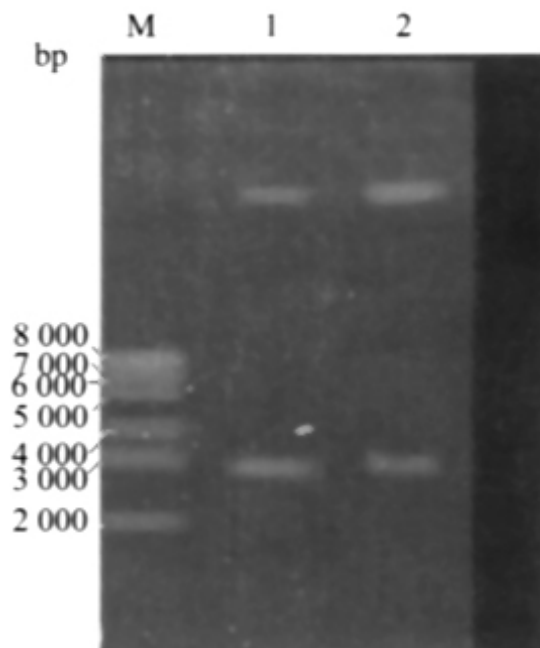


图3 重组腺病毒质粒的酶切图谱 (Pac I)

Fig.3 Endonuclease digestion of the recombinant adenovirus plasmids (Pac I)  
M: DNA Ladder; Lanes 1-2: pAdEasy-VEGFP-CDglyTK(Pac I)

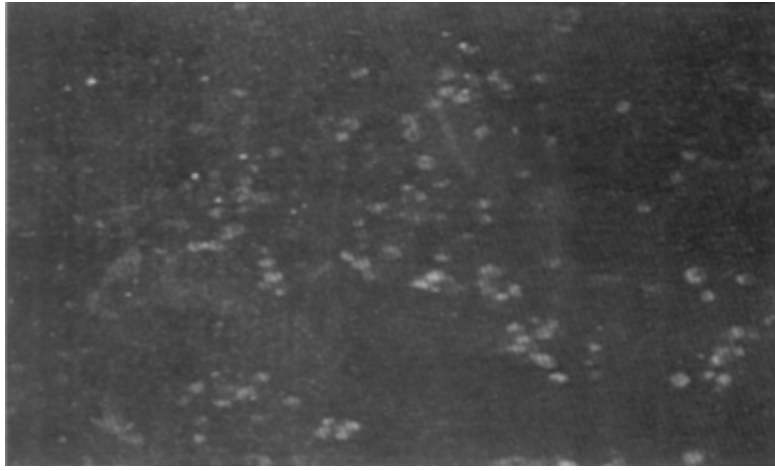


图4 线性化pAdEasy-VEGFP-CDglyTK 转染293细胞后病毒包装情况

Fig.4 Generation of adenovirus after linearized pAdEasy-VEGFP-CDglyTK was transfected into 293 cells.

### 3 讨论

改良的细菌内同源重组法构建重组腺病毒的方法简单，有利于腺病毒载体的推广应用。在基因治疗中，重组腺病毒是应用最广泛的载体之一，其优点为：(1) 宿主细胞谱广，既能感染分裂期细胞，又能感染静止期细胞；(2) 病毒滴度高，一般可高达 $1 \times 10^{11}/\text{ml}$ 以上；(3) 外源基因的表达效率较高；(4) 病毒DNA不整合入宿主细胞的基因组，致突变的可能性很小，致癌危险性极低；(5) 适合体内基因直接转移；(6) 易于浓缩、贮存。早期，人们采用细胞内同源重组法，将外源基因片段与去除了个别基因的腺病毒基因组共转染一种人类胚肾细胞，即293细胞，成功地制备了重组腺病毒。但该方法成功率低，步骤繁琐，工作量大，实验周期长，只有少数实验室能完成制备工作。为简化方法，缩短周期，Rogulski [5]的研究小组开创了细菌内同源重组法，即先用电穿孔法把目的基因和腺病毒基因组质粒pAdEasy-1导入BJ5183细菌进行同源重组，再筛选出正确的重组腺病毒质粒转染293细胞，完成腺病毒的包装、扩增。不过，该方法的成功率仍然较低(约12%)，且实验要求特殊的电穿孔机及相关技术，不易在普通实验室推广应用。因此，本实验以氯化钙法替代电穿孔法导入目的基因及pAdEasy-1，并借鉴Zeng等[7]的“两步法”制备重组腺病毒质粒，使成功率提高到60%，并进一步简化了实验步骤，大大降低了操作难度和设备要求，缩短了实验周期，便于腺病毒制备技术的推广应用。

以VEGF启动子驱动CD/TK融合基因重组腺病毒可用于多种恶性肿瘤自杀基因疗法的研究。缺氧是实体瘤的共同特点。在缺氧条件下产生的多种细胞因子可促使肿瘤新生血管形成，而后者则是肿瘤生长、转移的重要促进因素。在这些细胞因子中，VEGF受到广泛重视。它是已知最强的促血管内皮细胞有丝分裂原。VEGF过度表达于乳腺癌[8]、肺癌[9]、大肠癌[10]、神经胶质瘤[11]、卵巢癌[12]、肝癌[13]等多种恶性肿瘤，而在正常组织细胞中表达甚少或不表达。已有实验证明，在缺氧条件下，VEGF启动子的效率可以增强2~3倍[14]。因此，以VEGF启动子驱动CD/TK融合基因，能够使融合基因靶向表达于肿瘤细胞，从而提高其的治疗效果，减少自杀基因和腺病毒扩散对正常组织的损伤，并可用于多种恶性肿瘤自杀基因疗法的研究，为今后的深入研究奠定基础。

#### 参考文献：

[1] 郑 权, 黄宗海, 汤福祥, 等. 应用两步氯化钙转化法高效制备双自杀基因重组腺病毒[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(6): 575-7.

Zheng Q, Huang ZH, Tang FX, et al. Highly efficient construction of recombinant adenovirus containing double suicide gene driven by cytomegalovirus promoter using two-step  $\text{CaCl}_2$  transformation method[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao,

2003, 23(6): 575-7.

[2]汤福祥, 郑 权, 黄宗海, 等. 应用改进的AdEasy系统制备重组腺病毒[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 501-3.

Tang FX, Zheng Q, Huang ZH, et al. Construction of recombinant adenovirus using modified AdEasy system[J]. J First Mil Med U-niv/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 501-3.

[3]周忠江, 刘伊丽, 吴平生. 带信号肽人血管内皮生长因子基因VEGF121及VEGF165载体的克隆[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 111-3.

Zhou ZJ, Liu YL, Wu PS, et al. Cloning of expression vector for VEGF121 and VEGF165 genes encoding human vascular endothelial growth factor[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 111-3.

[4]胡贵方, 吴小兵, 俞守义, 等. 含乙型肝炎表面抗原基因重组腺相关病毒的构建及其基因的表达和功能初步研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(6): 553-6.

Hu GF, Wu XB, Yu SY, et al. Construction of recombinant adenovirus carrying hepatitis B surface antigen gene and preliminary study of the gene expression and function[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(6): 553-6.

[5]Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, et al. Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(1): 73-85.

[6]He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-14.

[7]Zeng M, Smith SK, Siegel F, et al. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination[J]. Biotechniques, 2001, 31(2): 260-2.

[8]敬 静, 赵扬冰, 李宏江, 等. 乳腺癌血管内皮生长因子表达的预后意义[J]. 华西医科大学学报, 2001, 32(4): 566-8.

Jing J, Zhao BY, Li HJ, et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer[J]. Western China Med U-niv J, 2001, 32(4): 566-8.

[9]Ohta Y, Ohta N, Tamura M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in airways of patients with lung cancer: a possible diagnostic tool of responsive angiogenic status on the host side[J]. Chest, 2002, 121(5): 1624-7.

[10]Cascinu S, Graziano F, Valentini M, et al. Vascular endothelial growth factor expression, S-phase fraction and thymidylate synthase quantitation in node-positive colon cancer: relationships with tumor recurrence and resistance to adjuvant chemotherapy[J]. Ann Oncol, 2001, 12(2): 239-44.

[11]Machein MR, Plate KH. VEGF in brain tumors[J]. J Neurooncol, 2000, 50(1-2): 109-20.

[12]Orre M, Rogers PA. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, microvessel density and endothelial cell proliferation in tumours of the ovary[J]. Int J Cancer, 1999, 84(2): 101-8.

[13]Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(13): 3004-9.

[14]Koshikawa N, Takenaga K, Tagawa M, et al. Therapeutic efficacy of the suicide gene driven by the promoter of vascular endothelial growth factor gene against hypoxic tumor cells[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 2936-41.



参考文献:

- [1]郑 权, 黄宗海, 汤福祥, 等. 应用两步氯化钙转化法高效制备双自杀基因重组腺病毒[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(6): 575-7.
- Zheng Q, Huang ZH, Tang FX, et al. Highly efficient construction of recombinant adenovirus containing double suicide gene driven by cytomegalovirus promoter using two-step CaCl<sub>2</sub> transformation method[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(6): 575-7.
- [2]汤福祥, 郑 权, 黄宗海, 等. 应用改进的AdEasy系统制备重组腺病毒[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 501-3.
- Tang FX, Zheng Q, Huang ZH, et al. Construction of recombinant adenovirus using modified AdEasy system[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 501-3.
- [3]周忠江, 刘伊丽, 吴平生. 带信号肽人血管内皮生长因子基因VEGF121及VEGF165载体的克隆[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 111-3.
- Zhou ZJ, Liu YL, Wu PS, et al. Cloning of expression vector for VEGF121 and VEGF165 genes encoding human vascular endothelial growth factor[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 111-3.
- [4]胡贵方, 吴小兵, 俞守义, 等. 含乙型肝炎表面抗原基因重组腺相关病毒的构建及其基因的表达和功能初步研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(6): 553-6.
- Hu GF, Wu XB, Yu SY, et al. Construction of recombinant adenovirus carrying hepatitis B surface antigen gene and preliminary study of the gene expression and function[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(6): 553-6.
- [5]Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, et al. Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(1): 73-85.
- [6]He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-14.
- [7]Zeng M, Smith SK, Siegel F, et al. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination[J]. Biotechniques, 2001, 31(2): 260-2.
- [8]敬 静, 赵扬冰, 李宏江, 等. 乳腺癌血管内皮生长因子表达的预后意义[J]. 华西医科大学学报, 2001, 32(4): 566-8.
- Jing J, Zhao BY, Li HJ, et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer[J]. Western China Med Univ J, 2001, 32(4): 566-8.
- [9]Ohta Y, Ohta N, Tamura M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in airways of patients with lung cancer: a possible diagnostic tool of responsive angiogenic status on the host side[J]. Chest, 2002, 121(5): 1624-7.
- [10]Cascinu S, Graziano F, Valentini M, et al. Vascular endothelial growth factor expression, S-phase fraction and thymidylate synthase quantitation in node-positive colon cancer: relationships with tumor recurrence and resistance to adjuvant chemotherapy[J]. Ann Oncol, 2001, 12(2): 239-44.
- [11]Machein MR, Plate KH. VEGF in brain tumors[J]. J Neurooncol, 2000, 50(1-2): 109-20.
- [12]Orre M, Rogers PA. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, microvessel density and endothelial

cell proliferation in tumours of the ovary[J]. Int J Cancer, 1999, 84(2): 101-8.

[13]Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(13): 3004-9.

[14]Koshikawa N, Takenaga K, Tagawa M, et al. Therapeutic efficacy of the suicide gene driven by the promoter of vascular endothelial growth factor gene against hypoxic tumor cells[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 2936-41.

---

[回结果列表](#)