

## 新法制备含 VEGF 启动子驱动的 CD/TK 融合基因重组腺病毒

黄元媛<sup>1</sup> 黄宗海<sup>1</sup> 陈建发<sup>1</sup> 汤福祥<sup>1</sup> 袁文字<sup>1</sup> 郑全<sup>1</sup> 袁小燕<sup>2</sup> 第一军医大学珠江医院<sup>1</sup> 普通外科袁中心实验室袁广东 广州 510282 冤

**摘要**目的 应用简化的细菌内同源重组法高效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遥方法 先以氯化钙法替代电穿孔法将腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1 导入 BJ5183 细菌袁制备 BJ5183 pAdEasy-1 细菌袁再以后者作感受态细菌袁与线性化的转移质粒 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 进行同源重组袁获得重组腺病毒质粒 pAdEasy-VEGFP-CDglyTK袁转染 293 细胞袁制备含 VEGF 启动子驱动的 CD/TK 融合基因重组腺病毒遥结果 构建重组腺病毒质粒的成功率为 60%渊6/10冤袁转染 293 细胞后 7~12 d 可收获病毒遥结论 简化的细菌内同源重组法简便易行袁重组效率较高袁易于推广应用遥

**关键词**腺病毒载体 血管内皮细胞生长因子启动子 基因治疗 肿瘤

中图分类号 院 784.6R373.1 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588渊004冤1-0117-04

## An easier method for generating recombinant adenovirus containing CD/TK fusion gene driven by vascular endothelial growth factor promoter

HUANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, HUANG Zong-hai<sup>1</sup>, CHEN Jian-fa<sup>1</sup>, TANG Fu-xiang<sup>1</sup>, YANG Wen-yu<sup>1</sup>, ZHENG Quan<sup>1</sup>, CHE Xiao-yan<sup>2</sup>

Department of General Surgery<sup>1</sup>, Central Laboratory<sup>2</sup>, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

**Abstract:** Objective To efficiently construct the recombinant adenovirus containing CD/TK fusion gene driven by vascular endothelial growth factor (VEGF) promoter using improved homologous recombination in bacteria. Methods Chemical transformation, instead of electroporation, of the plasmid pAdEasy-1 into E.coli BJ5183 strain was performed to prepare BJ5183pAdEasy-1 as the competent bacterium, in which pAdEasy-1 and pAdtrack-VEGFP-CDglyTK were recombined. Finally, the recombinant adenovirus of AdVEGFP-CDglyTK was constructed by transfecting 293 cells with linearized adenoviral genomes of pAdEasy-VEGFP-CDglyTK. Results This new transformation procedure generated recombinant plasmids in a yield of 60% (6/10), and the adenovirus AdVEGFP-CDglyTK was harvested 7-12 d after transfection. Conclusion The improved homologous recombination in bacteria is efficient, convenient and easy to be carried out.

**Key words:** adenovirus vector; vascular endothelial growth factor promoter; gene therapy; neoplasm

重组腺病毒因其感染细胞谱广尧病毒滴度高尧基因转移率高尧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遥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尧操作技术和实验设备要求高等缺陷袁不适合在普通实验室开展袁在一定程度上限制了重组腺病毒载体的应用和发展遥本研究改进了传统的细菌内同源重组法袁以简单的化学方法替代电穿孔法袁把腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1 导入 BJ5183 细菌袁筛选出 BJ5183

pAdEasy-1 细菌遥再与线性化的转移质粒同源重组袁既提高了重组效率袁又简化了实验步骤袁降低了操作难度和设备要求袁便于重组腺病毒制备技术的推广应用遥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袁取得了良好的效果遥

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

穿梭质粒 pAdtrack尧腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1 和大肠杆菌 BJ5183 由 Belt Vogelstein 博士惠赠尧EGFP-1-SV-VEGFP 由 Jiro Kishimoto 博士惠赠尧REP8-TK 由 Jay Kolls 博士惠赠尧MD18-t 载体购自大连宝生物公司尧cDNA3尧M109 细菌由第一军医大学细胞生物教研室提供尧293 细胞由第一军医大学病理生理教研室提供尧各种内切酶和 T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司尧aq PCR

收稿日期 院 003-06-28

基金项目 院 国家 野63冶计划生物和现代农业技术研究基金渊001AA217171冤尧广东省自然科学基金重点项目渊13072冤

Supported by Biological and Modern Agriculture Technology Research Foundation of National 野63冶 Project of China (2001AA217171) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (013072)

作者简介 院 黄元媛 渊978-冤 女 袁 2003 年毕业于第一军医大学 袁 硕士 袁 袁 电话 院 20-61643211

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 芋和 BamH 玉酶切位点 E.coli CD 上下游引物分别为 5'-GGGAAGCTTAGGCTAGCAATGTCGAATAACGCT-3' 和 5'-GGGGGATCCTC CACGTTTGTAATCGATGGCTTC-3' PCR 反应参数为 98 益变性 5 min 衰 4 益 40 s 衰 8 益 40 s 衰 2 益 1 min 衰共 28 个循环曰 2 益 10 min 延伸衰 益 2 h 保存遥 HSV-TK 则以 pREP8-TK 为模板衰其上下游分别引入 BamH 玉和 Xba 玉的酶切位点遥 HSV-TK 的上下游引物分别为 5'-GGGGGATCCGGCGGGGCGGTTGGA GGAGGGGTATGGCTTCGTAC-3' 和 5'-GGGTC-TA GATTAGTTAGCTCCCCCATCTC-3' PCR 反应参数为 98 益变性 5 min 衰 4 益 40 s 衰 0 益 40 s 衰 72 益 1 min 衰共 28 个循环曰 2 益 10 min 延伸衰 益 2 h 保存遥 CR 产物分别与 T 载体渊 MD 18-T 冤连接衰构建质粒 pMD 18-CD 和 pMD 18-TK 衰上海申友生物技术有限公司测序遥鉴定正确后衰分别以上述限制性内切酶切下 CD 基因片段和 TK 基因片段衰后连接于以相同酶切处理的 pcDNA3 上衰构建 pcDNA3-CDglyTK 衰再用 Hind 芋和 Pvu 域切下一长约 2.6 kb 衰 poly A 尾的片段 CDglyTK-pA 遥用 Not 玉和 Xho 玉将 VEGF 启动子从 pEGFP-1-SV-VEGFP 上切下衰连接于穿梭质粒 pAdtrack 衰获得 pAdtrack-VEGFP 遥用 Xba 玉将前者切开衰再以 Klenow 玉补平粘性末端衰而后用 Hind 芋处理该载体衰最后连接片段 CDglyTK-pA 衰构建转移质粒 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 遥

1.2.2 BJ5183 pAdEasy-1 感受态细菌的制备 取约 50 ng pAdEasy-1 转化 BJ5183 细菌衰用含 100 滋/ml 氨苄青霉素和 100 滋/ml 链霉素的 LB 琼脂平板筛选衰置于 37 益尧% CO<sub>2</sub> 培养箱遥 12~16 h 后衰挑取 10~20 个菌落分别置于 2 ml 含上述浓度抗生素的 LB 培养基中衰在 37 益恒温箱中振培 10~15 h 遥由于 pAdEasy-1 在 BJ5183 细菌内易发生重组或突变衰所以抽提质粒后用 Hind 芋进行酶切鉴定衰并与 pAdEasy-1 对比衰大小与 pAdEasy-1 相同且不能被 Hind 芋消化的为正确的质粒遥用氯化钙法衰将 BJ5183 pAdEasy-1 细菌制成感受态细菌衰用于下一步实验衰并用 20%~30% 甘油保存剩余的 BJ5183 pAdEasy-1 细菌于 -70 益冰箱遥

1.2.3 pAdEasy-VEGFP-CDglyTK 重组腺病毒质粒的

构建 用 Pme 玉线性化转移质粒 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 遥灭活 Pme 玉衰 100~500 ng 线性化质粒转化 BJ5183 pAdEasy-1 感受态细菌衰用含 25 滋/ml 卡那霉素的 LB 琼脂平板筛选衰置于 37 益尧% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16~20 h 遥因为重组的腺病毒质粒具有卡那霉素抗性衰且含有重组质粒的细菌生长相对缓慢衰所以在挑选菌落时要选取最小的 10~20 个菌落进行扩增遥提取质粒衰与 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 和 pAdEasy-1 一起在 0.6% 的琼脂糖中电泳衰进一步用 Pac 玉酶切鉴定遥将所需细菌进行进一步扩增衰提质粒衰以备转染 293 细胞遥

1.2.4 制备含 VEGFP-CDglyTK 的重组腺病毒 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 尧 7 益尧% CO<sub>2</sub> 培养 293 细胞遥当细胞丰度达 50%~70% 时参照 He 等[6]的方法和 LipofectAMINE2000 说明书进行 pAdEasy-VEGFP-CDglyTK 的转染遥然后衰通过荧光显微镜观察 GFP 的表达情况遥 7~12 d 后刮下细胞衰以冻融法收集病毒上清衰 CR 鉴定重组腺病毒遥

2 结果

2.1 转移质粒 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 的鉴定

在转移质粒 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 的构建过程中衰主要采用酶切和测序的方法进行鉴定遥将 PCR 所得的 CD 片段和 TK 片段分别连于 T 载体渊 MD 18-T 冤进行测序衰选择序列和片段方向正确的质粒进行下一步实验遥而后衰把 CD 片段渊 1.3 kb 冤连接到 pcDNA3 上衰用 Hind 芋和 BamH 玉鉴定遥选取正确的质粒连接 TK 片段(约 1.1 kb)衰构建含融合基因的 pcDNA3-CDglyTK 遥该步以 BamH 玉和 Xba 玉鉴定遥用 Not 玉和 Xho 玉切下 pEGFP-1-SV-VEGFP 上的 VEGF 启动子衰与 pAdtrack 相连衰再以相同的酶切鉴定渊图 1 冤遥因为 pAdtrack 上无转录所需的 polyA 衰所以用 Hind 芋和 Pvu 域把 pcDNA3 上的 CD/TK 融合基因连同 Xba 玉位点和 polyA 一起切下渊 2.6 kb 冤衰与正确的 pAdtrack-VEGFP 相连衰构建转移质粒 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 衰以 Hind 芋和 Xba 玉鉴定渊图 1 冤遥

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衰因此衰转化转移质粒后衰获得卡那霉素抗性的细菌只有两种衰一种含重组质粒 pAdEasy-VEGFP-CDglyTK 渊 46.6 kb 冤衰另一种含未重组的转移质粒 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 渊 13.2 kb 冤遥两者可以琼脂糖电泳区分渊图 2 冤遥重组成功率为 60% 遥为进一步鉴定衰根据 AdEasy-1 系统的特点衰用 Pac 玉酶切重组质粒可产生 2 条 DNA 片段衰其中小片段约为 3.0 kb 渊图

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 转染 12 d 后可收集病毒 PCR 鉴定结果

### 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

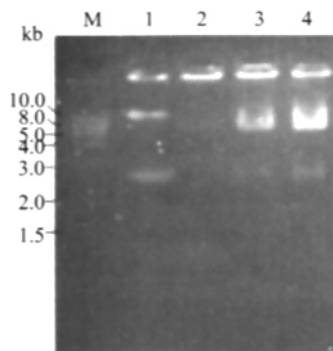


图 1 pAdtrack-VEGFP-CDglyTK 及 pAdtrack-VEGFP 的酶切鉴定

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, HindIII/XbaI); Lanes 2-4: VEGF promoter (2.5 kb) and pAdtrack (8.3 kb, NotI/XhoI), of which lanes 3 and 4 are positive

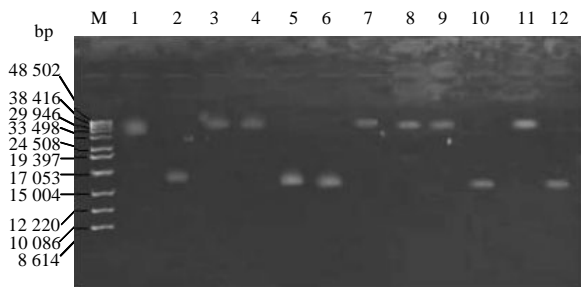


图 2 卡那霉素抗性细菌质粒的电泳图谱

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-1; Lane 11: pAdEasy-1 (about 33.4 kb); Lane 12: pAdtrack-VEGFP-CDglyTK (about 13.2 kb)

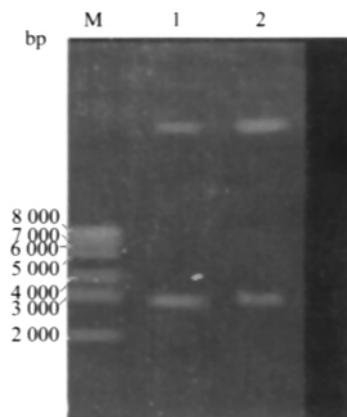


图 3 重组腺病毒质粒的酶切图谱  
Fig.3 Endonuclease digestion of the recombinant adenovirus plasmids (PacI)  
M: DNA Ladder; Lanes 1-2: pAdEasy-VEGFP-CDglyTK(PacI)

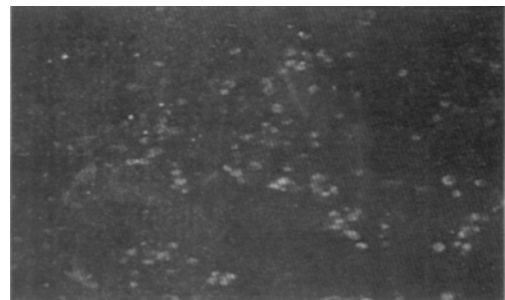


图 4 线性化 pAdEasy-VEGFP-CDglyTK 转染 293 细胞后病毒包装情况

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

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肾细胞癌 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 Logulski 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% 而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

实体瘤的共同特点是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<sup>响</sup>肺癌<sup>响</sup>大肠癌<sup>响</sup>神经胶质瘤<sup>响</sup>卵巢癌<sup>响</sup>肝癌<sup>响</sup>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<sup>响</sup>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

响 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响第一军医大学学报, 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 响 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(6): 575-7.

响 汤福祥, 郑 权, 黄宗海, 等. 应用改进的 AdEasy 系统制备重组腺病毒响第一军医大学学报, 2003, 23(5): 501-3.  
 Tang FX, Zheng Q, Huang ZH, et al. Construction of recombinant adenovirus using modified AdEasy system 响 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 501-3.

响 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 响 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 响 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 111-3.

响 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响第一军医大学学报, 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 响 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(6): 553-6.

响 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响 Hum Gene Ther, 1997, 8(1): 73-85.

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

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

响 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响华西医科大学学报, 2001, 32(4): 566-8.  
 Jing J, Zhao BY, Li HJ, et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer响 Western China Med Univ J, 2001, 32(4): 566-8.

响 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 响 Chest, 2002, 121(5): 1624-7.

响 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响 Ann Oncol, 2001, 12(2): 239-44.

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

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

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

响 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 响 Cancer Res, 2000, 60(11): 2936-41.