

## Her2/neu膜外及跨膜区蛋白基因重组腺病毒的构建和鉴定

马树东<sup>1</sup>, 罗荣城<sup>1</sup>, 丁振华<sup>2</sup>, 袁长青<sup>2</sup>, 丁雪梅<sup>1</sup>(南方医科大学<sup>1</sup>南方医院肿瘤科,<sup>2</sup>热带医学研究所放射医学教研室, 广东广州 510515)

**摘要:**目的 构建编码 Her2/neu 膜外第一受体区、全长膜外区、膜外及跨膜区 3 个蛋白的重组腺病毒真核表达载体, 为信号传导和免疫研究建立实验材料。方法 RT-PCR 扩增出 3 个目的片段的 cDNA, 克隆进 pAdTrack-CMV 穿梭质粒, 在 BJ5183 细菌内同源重组形成腺病毒质粒, 脂质体法转染 293 细胞后, 荧光显微镜观察病毒噬斑形成和绿色荧光蛋白表达, Western blot 检测目的蛋白的表达。结果 PCR 扩增出了预定大小的目的基因 cDNA 片段, 测序结果和 GenBank 完全相符。病毒质粒转染 293 细胞后形成了病毒噬斑, 绿色荧光蛋白和目的蛋白均获得表达。目的蛋白的表达量随着病毒感染复数的升高而增加。结论 成功地构建了在真核细胞中表达 Her2/neu 膜外及跨膜区蛋白的腺病毒载体, 为 Her2/neu 膜外及跨膜区蛋白的功能研究提供了材料基础。

**关键词:** Her2/neu 基因; 载体; 基因克隆; 重组腺病毒

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)11-1641-03

## Construction and identification of recombinant adenoviruses containing the gene fragments encoding Her2/neu extracellular and transmembrane domains

MA Shu-dong<sup>1</sup>, LUO Rong-cheng<sup>1</sup>, DING Zheng-hua<sup>2</sup>, YUAN Chang-qing<sup>2</sup>, DING Xue-mei<sup>1</sup>

Department of Oncology, Nanfang Hospital<sup>1</sup>, Department of Radiation Medicine, Institute of Tropical Medicine<sup>2</sup>, Southern Medical University, Guangzhou 501515, China

**Abstract: Objective** To construct eukaryotic expression vectors using recombinant adenovirus containing the gene fragments encoding Her2/neu extracellular first ligand-binding domain (Her2-ECD), full-length extracellular domain (Her2-ECD), and extracellular and transmembrane domain (Her2-TM). **Methods** The cDNAs were amplified by RT-PCR and inserted into shuttle pAdTrack-CMV plasmids. Viral plasmids were obtained from homologous recombination in *E. coli* BJ5183, and transfected into 293 cells via liposome. Formation of viral plaque and expression of green fluorescent protein were observed by fluorescence microscopy, and the target proteins were detected by Western blotting. **Results** The target cDNA fragments were amplified by PCR with expected lengths and the DNA sequences were confirmed against Genbank. Formation of viral plaque, expression of green fluorescent protein and the target proteins were detected in 293 cells transfected by the viral plasmids, which showed elevated expression of Her2/neu protein with the increase of multiplicity of infection (MOI). **Conclusion** The eukaryotic expression vectors using recombinant adenovirus have been successfully constructed for expression of Her2/neu extracellular and transmembrane domains.

**Key words:** Her2/neu gene; vector; gene clone; recombinant adenovirus

Her2/neu 不但是细胞膜上重要的酪氨酸激酶信号传导通路的受体, 而且它的膜外区和跨膜区具有很强的免疫原性, 比全长 Her2/neu 基因能更有效的诱导保护性的免疫应答<sup>[1,2]</sup>, 因此作为免疫性抗原更具有价值。为此, 我们分别构建表达 Her2/neu 基因膜外第一受体区 (Her2-ECDs), 全长膜外区 (Her2-ECD) 和全长膜外跨膜区 (Her2-TM) 蛋白的重组腺病毒载体, 为研究酪氨酸激酶信号通路和抗肿瘤疫苗治疗打下物质基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

收稿日期: 2005-12-23

作者简介: 马树东 (1967-), 男, 中山大学博士后, 电话: 020-61641655,

E-mail: mshudong@yahoo.com.cn

Her2 高表达的 SK-BR-3 乳腺癌细胞株, 本科生物治疗中心保存; 人胚肾 293 细胞株, 由本校丁振华教授惠赠。表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的 pAdTrack 穿梭质粒、已转化 5 型腺病毒骨架质粒 A deasy-1 的 BJ5183 菌株由本校鲁枫博士惠赠。逆转录反应试剂盒购自上海申能博采生物工程公司。Pfu-DNA 聚合酶 PCR 试剂盒、DNA 加 A 试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程公司。pMD18-T 载体连接试剂盒为大连 Takara 产品。Wizard Plus SV DNA 纯化试剂盒和内切酶为 Promega 公司产品。引物合成和测序由上海生物工程公司完成。Polyfect 转染试剂为 Qiagen 产品; Her2-ECD 的 Ab-20 单抗为 Neo-marker 产品。

#### 1.2 引物的设计

用软件 Primer Premier 5.0 在 Her2 的 cDNA 全长序列 (Genbank: M11730.1|p04626) 中设计 3 对引

物,引物 1:5'-TGAGCACCATGGAGCTGGC-3';引物 2:5'-CTACGGCAGAAATGCCAGGCTCC-3';引物 3:5'-CTAGCAGCCCTTGTTCATCCAG-3';引物 4:5'-CTACTGCCGTCGCTTGATGAGGAT-3';引物 1 含起始密码子,引物 2,3,4 加上终止密码子。引物 1 和引物 2 扩增 Her2-ECDs(143U-1284L,M1-P378),引物 1 和引物 3 扩增 Her2-ECD(143U-2076L,M1-C642),引物 1 和引物 4 扩增 Her2-TM(143U-2187L,M1-Q679)。

1.3 目的基因的扩增

以 Trizol 法从 SK-BR-3 细胞株中提取的总 RNA 为模板,引物 4 为特异性逆转录引物,逆转录酶 MM-LV,37℃,1h;70℃,10min,合成 cDNA。以 cDNA 2μl 为模板,PfuDNA 聚合酶 PCR 扩增。反应条件:94℃,1min;94℃,30s;58℃,45s;68℃,5min 30s (ECD & TM) or 3min (ECDs);共 30 个循环;68℃,7min。琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳带。

1.4 目的基因的 PMD18-T 载体克隆和转化大肠杆菌

PCR 产物纯化后,用 DNA 加 A 试剂盒使其末段加上 A,胶回收,加入 T<sub>4</sub> DNA 连接酶,与 pMD18-T 载体,16℃,连接 30min。按文献[3]转化用氯化钙法制备大肠杆菌 DH5α 感受态,涂布于含 2% X-gal,7μl 20% IPTG 和 50μg/ml 氨苄抗性的 LB 平板上,37℃ 倒置平皿培养 18~20h。

1.5 目的 DNA 片段与 pAdTrack 载体的连接和转化

用 Promega Wizard Plus SV DNA 纯化试剂盒制备质粒 DNA,Nde I 和 EcoR V 双酶切筛选正确的重组 pMD18,目的基因测序正确后,将 pAdTrack-CMV 载体和重组 pMD18 的 DNA 用 Kpn I 和 HindIII 双酶切,胶回收目的片段。加入 T<sub>4</sub> DNA 连接酶,22℃ 连接 3h,按 1.4 的方法转化转化大肠杆菌 DH5α,Pac I 酶切筛选连接正确的质粒。

1.6 细菌内同源重组构建 Her2-ECDs,ECD 和 TM 病毒质粒

将 pAdTrack-CMV 重组穿梭质粒 DNA 经 Pme I 酶切线性化,胶回收纯化,按 1.4 方法将 2μg DNA 转化含腺病毒骨架质粒 Adeasy-1 的 BJ5183 感受态细菌,铺卡那抗性的平板。经 20h 培养后,挑取菌落摇菌,SDS 碱裂解法<sup>[3]</sup>小量提取质粒 DNA。Pac I 酶切筛选正确质粒,

1.7 重组腺病毒载体的产生和筛选

碱裂解法<sup>[3]</sup>大量提取重组病毒质粒 DNA,各取 12μg,经 Pac I 酶切后,用酚/氯仿法抽提纯化。加 40μl Polyfect 转染试剂到 DNA 溶液中,转染 293 细胞,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 2h 后,用 1.25% 琼脂糖和 3.75% FBS 的 DMEM 混合培养基覆盖。以后每 3~4 d

补加混合培养基 1.5ml 直至病毒噬斑形成。

1.8 病毒的筛选和扩增

挑出单个病毒噬斑,感染培养的 293 细胞,48h 后按文献[4]采用 Hit 试验提取病毒 DNA,PCR 筛选。将含目的片段 DNA 的病毒感染的 293 细胞悬液-20℃~37℃ 冻溶 3 次,离心,取上清,加 50μl 到近 80% 融合的 293 细胞的 6 孔板中。达到完全细胞病变效应时振摇收集细胞悬液。冻溶 3 次,离心,取病毒上清。

1.9 Western blot 检测 293 中 Her-ECDs,ECD 和 TM 蛋白的表达

分别用纯化的表达 Her2-ECDs,ECD 及 TM 的重组腺病毒以感染复数 (MOI)=100;表达 Her2-TM 的重组腺病毒分别按 MOI 为 8×10<sup>3</sup>,1.6×10<sup>3</sup>,3.2×10<sup>2</sup>,64,13 感染 1×10<sup>6</sup> 293 细胞 48h 后,收集细胞,按文献[3]操作。蛋白信号由 ECL 试剂盒检测。成像后的胶片在凝胶成像分析系统上测定灰度值。以 MOI=13 的灰度值作为参照,计算每个梯度与其的比值(相对值)进行分析。对于不同 MOI 感染 293 细胞的蛋白测定,试剂用量及处理过程均相同。

2 结果

2.1 Her2/neu 膜外及跨膜区基因 RT-PCR 结果

通过 RT-PCR 扩增出了 Her2-ECDs,ECD 及 TM 三个目的基因片段,长度分别为 1147bp,1940bp 和 2051bp。凝胶电泳显示条带清楚,特异性好(图 1)。

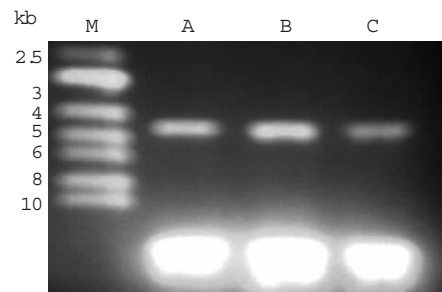


图 1 RT-PCR 扩增 Her2-ECDs,ECD 及 TM 蛋白基因

Fig.1 RT-PCR for Her2-ECDs, ECD and TM cDNA

Lane A: Her2-ECDs; Lane B: Her2-TM; Lane C: Her2-ECD

2.2 重组 PMD18 载体的目的基因的测序

测序结果经 Blast 比较 (RID:1084341062-12428-209726979065BLASTQ3),序列完全正确。TM 片段基因在跨膜区第一和二氨基酸(644 和 645)密码子均为 GTC,即缬氨酸 (val)-缬氨酸 (val),这是 Her2/neu 基因多态性在这个位点出现的频率最低 (1.2%) 的一种排列。

2.3 Her2-ECDs,ECD 及 TM 的重组腺病毒质粒

DNA的 Pac I 酶切鉴定

正确的 Her2-ECDs,ECD 及 TM 的重组腺病毒质粒应见到 3.5kb 或 4.5kb,以及 30kb 附近的两条带,凝胶电泳显示获得了正确的重组腺病毒质粒(图 2)。

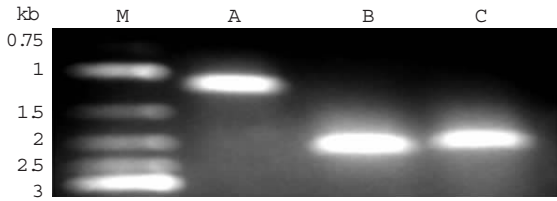


图 2 Her2-ECDs,ECD 及 TM 的重组腺病毒质粒 DNA Pac I 酶切鉴定

Fig.2 Identification of the inserted DNA in recombinant adenoviral plasmids encoding Her2-ECDs, ECD and TM with Pac I

Lane A : Her2-ECDs; Lane B : Her2-ECD ; Lane C : Her2-TM

2.4 脂质体转染线性化病毒质粒 DNA 到 293 细胞

在转染后第 4 天,可见到明显的绿色荧光,第 7 天荧光进一步增强,第 10 天见到明显的病毒噬斑产生(图 3)。

2.5 Western blot检测 293 中 Her2-ECDs,ECD 和 TM 蛋白的表达

结果显示,Her2-ECDs, ECD 和 TM 蛋白在 293 细胞中获得了表达,蛋白表达量随着 MOI 的升高而增高。以 MOI=13 的灰度值作为参照,在 MOI 为 13, 64, 3.2×10<sup>2</sup>, 1.6×10<sup>3</sup>, 8×10<sup>3</sup> 时, 相对比值分别为 1, 1.1, 1.5, 2.7, 3.3。见图 4、5。

3 讨论

Her2/neu 原癌基因编码 p185 跨膜蛋白,是酪氨酸激酶信号通路的重要受体,通常也被认为是一种自身抗原<sup>[5]</sup>,主要在胚胎发育期间表达,在成人正常组

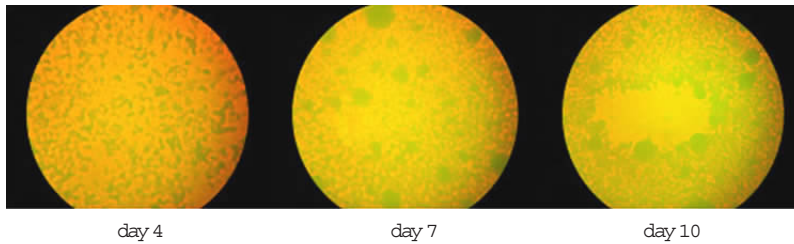


图 3 线性化病毒质粒 DNA 转染 293 细胞后 4、7、10 天 GFP 的表达和病毒噬斑形成  
Fig.3 Expression of GFP and viral plaque formation on days 4, 7, and 10 in 293 cells transfected by linearized viral plasmids (Original magnification: ×100)

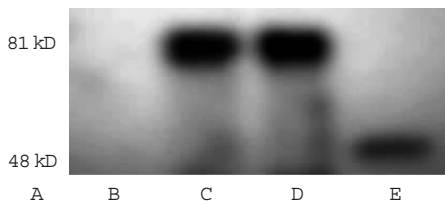


图 4 Her2-ECDs,ECD 和 TM 蛋白在 293 细胞中的表达

Fig.4 Expression of Her2-ECDs, ECD and TM in 293 cells

Lane A : Predicted molecular weight of proteins; Lane B : Negative control; Lane C : Her2-ECD ; Lane D : Her2-TM ; Lane E : Her2-ECDs

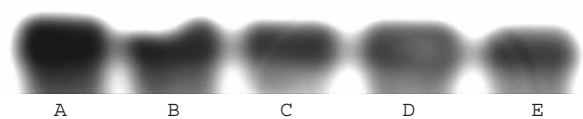


图 5 不同 MOI 的 Her2-TM 重组腺病毒感染 1×10<sup>6</sup> 293 细胞 48 h 后蛋白表达差异

Fig.5 Amount of Her2-TM expression in 1×10<sup>6</sup> 293 cells infected by recombinant adenovirus of different MOIs

Lanes A-E correspond to MOI of 8×10<sup>3</sup>, 1.6×10<sup>3</sup>, 3.2×10<sup>2</sup>, 64 and 13, respectively

织极少表达<sup>[6]</sup>,但超过 1/3 的乳腺癌和卵巢癌组织中存在 Her2/neu 原癌基因扩增和 /或过度表达<sup>[7]</sup>。如何打破肌体已经产生的免疫耐受,诱导针对 Her2/neu 基因产物的有效应答,是 Her2/neu 疫苗研究的重点。

以 Her2/neu 膜外区和跨膜区作为靶向抗原基因,对 Her2/neu 而言,首先,避免了整个原癌基因被

完整表达,在体内有潜在的转化危险。为避免上述问题,人们以 Her2/neu 为抗原基因时通常对其进行修饰<sup>[8]</sup>。其次,除了完整的自我蛋白抗原能否诱导免疫应答存在着疑问之外,用与人 Her2/neu 蛋白高度同源的完整小鼠 neu 基因病毒载体疫苗诱导小鼠的免疫应答已有失败的报道<sup>[9]</sup>,更多一致的观点是截尾的 Her2/neu 基因诱导的免疫应答的效率比完整的 Her2/neu 基因明显为高<sup>[1,2,9]</sup>。

(下转 1647 页)



生长受到明显抑制 ( $P < 0.05$ )。与单独应用 *survivin*-ASODN 治疗组比较,联合应用 ADM 和 *survivin*-ASODN 作用的细胞生长受到更明显抑制 ( $P < 0.05$ )。因此,认为 *survivin*-ASODN 能降低肝癌耐药细胞的 *survivin* 表达,增强人肝癌耐药细胞对 ADM 的化疗敏感性。

本研究通过 ASODN 下调 *survivin* 基因的表达,联合 ADM 作用人肝癌耐药细胞株 SMMC-7721/ADM,证实 *survivin*-ASODN 能加强 ADM 诱导 SMMC-7721/ADM 细胞凋亡,其意义在于一方面能够减少 ADM 的药物临床用量,减轻 ADM 的毒副作用;另一方面加强了 ADM 的治疗作用,使其应用更加安全有效,有利于进一步扩大应用范围。将 *survivin*-ASODN 与传统的化疗药物联合应用,有望得到更好的临床治疗效果。

#### 参考文献:

[1] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of dis-

ease[J]. *Science*, 1995, 267 (5203): 1456-62.

- [2] 韩 锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 211-46.
- [3] 周信达. 肝癌诊治的若干进展及展望[J]. *中华消化杂志*, 1999, 19 (1): 5-7.
- [4] Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, et al. Survivin as a predictor of cisplatin and 5-fluorouracil sensitivity in gastric cancer patients [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95 (1): 44-51.
- [5] Griffith TS, Kemp TJ. The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/apo2L-induced apoptosis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 52 (3): 175-84.
- [6] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, *survivin*, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3: 917-21.
- [7] Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, et al. Expression of *survivin* mRNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2002, 11 (1): 33-40.
- [8] Green DW, Roh H, Pippin J, et al. Antisense oligonucleotides: an evolving technology for the modulation of gene expression in human disease [J]. *J Am Coll Surg*, 2000, 191 (1): 93-105.

(上接 1643 页)

腺病毒因其具有安全性较好,感染能力强,可感染各细胞周期的细胞,蛋白表达量高,不整合到宿主的染色体中,没有插入性突变而成为基因转染和治疗常用的载体<sup>[10-12]</sup>。目前,制备重组腺病毒主要方法是,同源重组产生能在包装细胞系(293 或 911 等)复制的缺陷型腺病毒,由包装细胞系提供其缺失的基因。然后通过包装细胞形成的噬斑筛选获得需要的重组病毒。虽然这种方法已被证明非常有效,但是存在着同源重组效率低下,需要多轮次的反复噬斑纯化和花费时间较长等缺点。为此,Bert Vogelstein 等开发了新的腺病毒重组系统—AdeasyTM 系统,它有如下特点:(1)骨架载体包含腺病毒以超螺旋形式存在的大部分基因组,无需酶切;(2)重组在大肠杆菌,而不是在哺乳细胞内进行;(3)利用细菌内的高效同源重组,不需连接步骤;(4)载体可以插入 10 kb 以上的基因序列和在同一病毒内允许表达多个目的基因;(5)将 GFP 基因并入腺病毒骨架质粒,可以直接地观察转染和感染的效率。这些特点使同源重组效率大为提高,简化了噬斑纯化,只需较短的时间就可以生产出有用的重组腺病毒<sup>[12]</sup>。据此,我们利用 AdeasyTM 系统成功地构建了表达 Her2-ECDs, ECD 和 TM 基因蛋白的重组腺病毒,为进一步的免疫研究打下基础。

#### 参考文献:

[1] Amici A, Smorlesi A, Noce G, et al. DNA vaccination with full-length or truncated *neu* induces protective immunity against the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/*neu* transgenic mice [J]. *Gene Ther*, 2000, 7 (8): 703-6.

- [2] Chen Y, Hu D, Eling DJ, et al. DNA vaccines encoding full-length or truncated *Neu* induce protective immunity against *Neu*-expressing mammary tumors [J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (9): 1965-71.
- [3] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版, 北京: 科学出版社, 2002: 26-34.
- [4] DL 斯佩克特, RD 戈德曼, LA 莱因万德著. 黄培堂, 译. 细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 827-9.
- [5] Cheever MA, D'Isis ML, Bernhard H, et al. Immunity to oncogenic proteins [J]. *Immunol Rev*, 1995, 145: 33-59.
- [6] Kokai Y, Cohen JA, Drebin JA, et al. Stage- and tissue-specific expression of the *neu* oncogene in rat development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 (23): 8498-501.
- [7] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer [J]. *Science*, 1989, 244 (4905): 707-12.
- [8] Wei W Z, Shi W P, Galy A, et al. Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length, modified human ErbB-2 DNA [J]. *Int J Cancer*, 1999, 81 (5): 748-54.
- [9] Bernards R, Destree A, McKenzie S, et al. Effective tumor immunotherapy directed against an oncogene-encoded product using a vaccinia virus vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 (19): 6854-8.
- [10] Shen LZ, Wu W X, Xu DH, et al. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8: 270-5.
- [11] Wu HG, Zhou LB, Shi DR, et al. Morphological study on colonic ulcerative colitis treated by moxibustion [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6: 861-5.
- [12] He TC, Zhou SB, Da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2509-14.

(责任编辑:陈望忠)