

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2003.03.01

Smad3D 和 Smad7 重组腺病毒载体的快速构建

秦建军 周清华 覃扬 孙芝琳 赵峰 孙泽芳 王艳萍 易成 朱文

【摘要】 目的 简化重组腺病毒载体的构造方法, 构建含 Smad3D cDNA 或 Smad7 cDNA 的重组腺病毒载体, 为下一步的基因治疗奠定基础。方法 以 AdEasy System 为基础, 应用序贯化学转化方法, 在大肠杆菌 *E. coli* BJ5183 体内将携带目的基因的穿梭质粒和骨架质粒重组。结果 成功构建了重组腺病毒载体 pAd-Smad3D 和 pAd-Smad7 及空腺病毒载体, 并经酶切鉴定证实。结论 用序贯化学转化方法, 可以快速高效地在大肠杆菌内构建重组腺病毒载体。

【关键词】 自体重组 腺病毒载体 Smad TGF- β

【中图分类号】 Q78

Construction of adenoviral vector carrying Smad3D or Smad7 QIN Jianjun*, ZHOU Qinghua, QIN Yang, SUN Zhilin, ZHAO Feng, SUN Zefang, WANG Yanping, YI Cheng, ZHU Wen. * Key Laboratory of Sichuan Province, Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology, Department of Thoracocardiac Vascular Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

【Abstract】 Objective To construct recombinant adenoviral vector carrying Smad3D or Smad7 by a simplified means. **Methods** Based on AdEasy System, adenoviral backbone plasmid vector and shuttle vector carrying the gene of interest were transferred into *E. coli* BJ5183 by chemical transformation methods in special order. The homologous recombination was performed. **Results** Recombinant adenoviral vector pAd-Smad3D and pAd-Smad7 were constructed successfully, which were confirmed by restriction enzyme digesting. **Conclusion** Recombinant adenoviral vector may be constructed quickly and efficiently in *E. coli* by sequential chemical transformation methods.

【Key words】 Homologous recombination Adenoviral vector Smad TGF- β

This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (to YI Cheng) (No. 30000206) and Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (to ZHOU Qinghua) (No. 200055).

腺病毒(adenovirus, Ad)载体是一类已得到大量研究并有临床应用报道的载体系统。与逆转录病毒载体相比,它具有病毒滴度高、宿主细胞范围广、转染效率高和不会整合入靶细胞基因组等优点。但传统的重组腺病毒载体构建过程复杂,耗时费力且效率低。He 等^[1]在 1998 年报道了一种经过改良了的重组腺病毒载体系统 AdEasy System,它使得构建过程大为简化,而且成功效率显著增加。

转化生长因子 α (Tumor growth factor- β , TGF- β) 家族在胚胎发育、分化和肿瘤发生、发展及多种病理

生理过程中发挥着重要的作用。研究表明,Smad 家族是 TGF- β 胞内信号传递通路的主要组成部分^[2]。本研究以 AdEasy System 为基础,应用较 He 等^[1]推荐的更为简便易行的方法,构建了分别含负性显性突变 Smad3 (dominant-negative mutant Smad3, Smad3D) 和 Smad7 的重组腺病毒载体及空重组腺病毒载体,即 pAdSmad3D、pAdSmad7 和 pAd,从而为下一步的基因治疗奠定了基础。现将重组腺病毒载体的构建方法报道如下。

1 材料与方法

1.1 质粒 pcDNA3.1(+)-Smad3D 由日本东京医科和牙科大学研究生院细胞生物学实验室 Yasuko Yamamura 博士惠赠,pcDNA3-Smad7 由日本国癌症研究基金会肿瘤研究所 Takeshi Imamura 博士惠赠(图 1)。AdEasy System 由美国 Johns Hopkins 肿瘤中心 Bert Vogelstein 博士惠赠,包括穿梭质粒 pAdtrack-CMV,腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1,重组用大肠杆菌 BJ5183(*E. coli*

本研究受国家自然科学基金(30000206)和高等学校博士点基金(200055)资助

作者单位 610041 成都 四川省重点实验室四川大学华西医院肺癌分子实验室、胸心外科(秦建军、周清华、孙芝琳、赵峰、孙泽芳、王艳萍、朱文),四川大学基础医学与法医学院分子生物学开放实验室(覃扬),四川大学华西医院肿瘤中心化疗科(易成),赵峰现在华中科技大学同济医学院附属协和医院)

BJ5183)。质粒小量抽提均采用碱裂解法,大量抽提、纯化均采用碱裂解加聚乙二醇沉淀法。

1.2 目的基因的克隆 用 Kpn1 和 Xho1 双酶切 pcDNA3.1(+)-Smad3D、pcDNA3-Smad7 和 pAdtrack-CMV 0.8%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下切下目的基因片断或穿

梭载体,用玻璃乳法从凝胶上回收 DNA 片断^[3]。目的基因与载体摩尔比为 2:1 于 4℃连接 24 h,连接酶(Ligase)为大连宝生物公司产品,取 50 ng 连接产物用 CaCl₂ 法转入 *E. coli* DH5α。Kpn1 和 Xho1 双酶切鉴定转化产物。

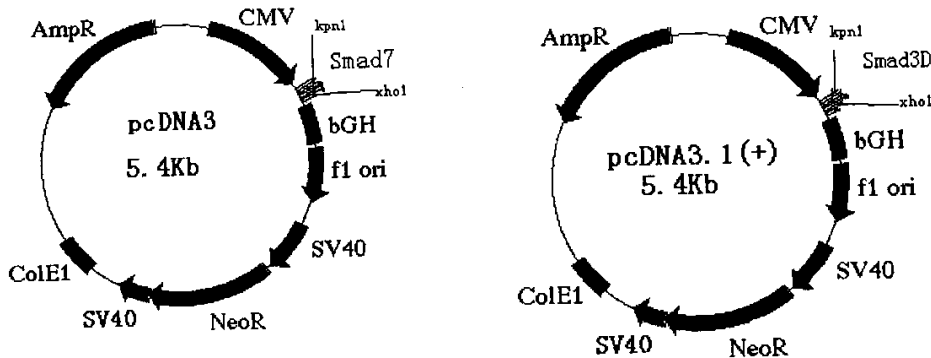


图 1 pcDNA3.1(+)-Smad3D 和 pcDNA3-Smad7 的质粒图谱

Fig 1 Map of pcDNA3.1(+)-Smad3D and pcDNA3-Smad7

1.3 制备感受态的 BjpAdeasy-1 细胞 用 CaCl₂ 法将 50~100 ng pAdeasy-1 转入 *E. coli* BJ5183,菌液涂于固体氨苄青霉素板上。挑多个单菌落置于含氨苄青霉素的 LB 培养基振摇,小量抽提质粒,经 Hind III 酶切鉴定筛选出阳性克隆 BjpAdeasy-1,避免选到质粒 pAdeasy-1 在 *E. coli* BJ5183 中发生了自体重组的克隆。在加入链霉素和氨苄青霉素的 LB 培养基中振摇阳性克隆菌株,用 CaCl₂ 法制备感受态的 BjpAdeasy-1 细胞,备用。

1.4 细菌内重组 PmeI(美国 NEB 公司产品)单酶切得到线性化的 pAdtrack-CMV、pAdtrack-CMV-Smad3D、pAdtrack-CMV-Smad7 酚、氯仿抽提纯化、乙醇沉淀,牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)处理 37℃ 15 min 50℃ 45 min。5 mmol/L EDTA(pH8.0)存在下,75℃ 10 min 以失活 CIAP。重复酚、氯仿抽提纯化。上述质粒转化前于 65℃ 加热 10 min 以使重新退火的粘端解链,冰浴 5 min 后,各取 50~100 ng 转化感受态的 BjpAdeasy-1 细胞,菌液涂布于卡那霉素板,37℃ 培养 12~16 h。各挑取 10~20 个体积较小的单菌落置于 2 ml 含卡那霉素的 LB 培养基振摇过夜,小量抽提,取 30% 于 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳,与质粒 pAdeasy-1 比较,与之大小相近的即为候选克隆,否则多为重新环化的穿梭载体。再将候选克隆质粒转化入 *E. coli* DH5α,小量抽提质粒, PacI(美国 NEB 公司产品)单酶切,鉴定。

Smad7 的 cDNA(图 2)。

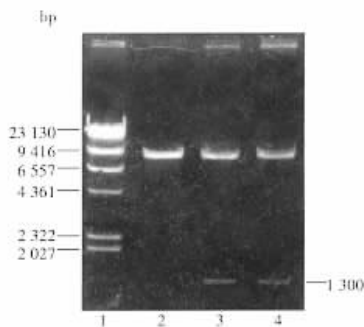


图 2 穿梭载体的酶切鉴定

1. λDNA/Hind III DNA 分子量标准;2. 质粒 pAdtrack-CMV;3. 质粒 pAdtrack-CMV-Smad3D;4. 质粒 pAdtrack-CMV-Smad7

Fig 2 Restriction enzyme digestion of plasmid shuttle vector

1. λDNA/Hind III DNA digest marker;2. pAdtrack-CMV;3. pAdtrack-CMV-Smad3D;4. pAdtrack-CMV-Smad7

2.2 BjpAdeasy-1 的鉴定 理论上, Hind III 酶切质粒 pAdeasy-1,可得到 75、2 081、2 937、3 010、4 597、5 322、7 382 和 8 010 bp 等 8 个片断,实际电泳时,因

2 结果

2.1 穿梭质粒 pAdtrack-CMV-Smad3D、pAdtrack-CMV-Smad7 的鉴定 粘端连接效率较高, Kpn1 和 Xho1 双酶切均可得到一个约 1.3 kb 的插入片断(Smad3D 和

有些大小十分相近的片段不易分开,本组 0.8% 琼脂糖凝胶电泳得到 2 081 bp, 2 937 bp(与 3 010 bp), 4 597 bp, 5 322 bp, 7 382 bp(与 8 010 bp)等 5 个片断。

2.3 重组腺病毒载体的鉴定 Pac1 单酶切阳性重组体,可得到一个大片断约 30 kb,还有一个小片断因重组发生部位不同,小片断为 3.0 kb 或 4.5 kb(图 3)。

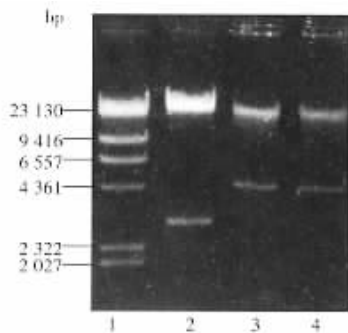


图 3 重组腺病毒载体的酶切鉴定电泳图

1. λ DNA/Hind III 分子量标准; 2. 重组对照腺病毒载体; 3. 重组 pAd-Smad3D; 4. 重组 pAd-Smad7。

Fig 3 Identification of recombinant adenoviral vector

1. λ DNA/Hind III digest marker; 2. pAd control vector; 3. pAd-Smad3D; 4. pAd-Smad7。

2.4 测序 将经酶切鉴定得到的重组腺病毒载体质粒 pAdSmad3D 和 pAdSmad7 进行测序,结果证实插入片断基因序列完全正确。

3 讨论

重组腺病毒载体在基因转染和表达的研究中有着广泛的用途。传统的构造腺病毒载体的方法有两种。第一种是将目的基因直接连入腺病毒基因组,但腺病毒基因组约 36 kb 大小,大片段连接的低效率及有限的限制性内切酶位点使得这一方法实际操作极为困难。第二种方法则是先将目的基因克隆入穿梭质粒,再在腺病毒包装细胞系中通过自体重组将目的基因转入腺病毒基因组,随后还要进行多次的空斑筛选鉴定,加之包装细胞系中自体重组发生率低(并受 293 细胞代数影响大),故而试验过程繁琐、周期长,成功率低,这限制了腺病毒载体的广泛应用^[1]。1998 年,He 和他的同事们开发了一种新的重组腺病毒载体系统^[1]。这一系统包括三部分:一是穿梭质粒,具卡那霉素抗性,可将目的基因克隆入其多克隆位点;二是腺病毒基因组骨架质粒载体,具氨苄青霉素抗性,需在超螺旋状态下被使用,省却了酶切操作;三是重组用大肠杆菌 *E. coli* BJ5183,具链霉素抗性,可省却连接的步骤。

但是 He 等推荐的方法是要让 Pme1 线性化的穿梭质粒与超螺旋的骨架质粒被同时用来共转化 *E. coli* BJ5183,为了将线性化的穿梭质粒和高达 33 kb 大小的骨架质粒共转化 *E. coli* BJ5183,以完成自体重组,需

要用电穿孔法制备高质量的感受态 *E. coli* BJ5183。这一步是此方法的主要限速步骤。一般认为,电穿孔法制备的感受态细胞转化效率可高达 $1 \mu\text{g DNA } 10^9$ 个以上,而传统的 CaCl_2 法等化学转化方法只能达到 $10^6 \sim 10^8$ 个。本研究以 He 等以往的工作为基础,先将 pAdeasy-1 转入 BJ5183,再将 Pme1 线性化的穿梭质粒转入 BJadeasy-1 进行重组^[4],以卡那霉素筛选。上述过程中使用的均是传统的 CaCl_2 转化法,最后的重组产物得率约 30%。 CaCl_2 转化法是一个经典的转化方法,操作简便。而电穿孔法条件要求高,实验操作繁琐和耗时,而且需专用设备。对于一个有相关分子生物学基础的实验室来说,应用本组改进的方法成功完成构建重组腺病毒载体只需约 2 周。在后来的实验中,我们使用上述质粒在 293 细胞中成功包装出了重组腺病毒。

然而,在应用这个方法时,需注意以下几点:①确保 Pme1 对穿梭质粒酶切完全,为降低重组的背景,可加用 CIAP 处理,转化前还可将单酶切后的穿梭质粒于 65°C 作用 10 min 以解链;②鉴定 BjpAdeasy-1 时,宜选用 Hind III 等有较多切点的酶;③TSS 一步法^[5]制备感受态细胞也是一个常用的化学转化方法,但本研究中发现用 TSS 法制备感受态的 BjpAdeasy-1 细胞效果不佳,推测是 PEG8000 的存在可能会增高背景,对此尚需过一步的研究;④制备感受态 BJ5183 或 BjpAdeasy-1 时,培养基中需加入相应的抗生素,以保持一定的选择压力。

TGF- β 胞内信号传递通路中,Smad3 属于受体调节性 Smad,Smad7 属于抑制性 Smad^[6]。脂质体和逆转录病毒对分裂不旺盛的细胞转染效率很低,我们构造的 pAd-Smad3D 和 pAd-Smad7 则为以后深入研究 TGF- β 家族的功能乃至基因治疗奠定了基础。

参考文献

- 1 He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): 2509-2514.
- 2 Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, et al. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*, 2000, 267(24): 6954-6967.
- 3 李永明, 赵玉琪主编. 实用分子生物学方法手册. 北京: 科学出版社, 2000. 179-180.
- 4 赵峰, 周清华, 覃扬, 等. 突变 k-ras 基因重组腺病毒的构建. *中国肺癌杂志*, 2002, 5(1): 14-17.
- 5 Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(7): 2172-2175.
- 6 Miyazono K. TGF-beta/SMAD signaling and its involvement in tumor progression. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(10): 1125-1130.

(收稿 2002-12-12 修回 2003-01-10)

(本文编辑 张世雯)