

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.01.04

突变 k-ras 基因重组腺病毒的构建

赵峰 周清华 覃扬 孙芝琳 孙泽芳

【摘要】 目的 利用细菌内同源重组法构建含 12 密码子点突变的 k-ras 基因重组腺病毒。方法 用限制性内切酶 kpn⁺ + xho⁺ 从载体 pcDNA3-k-ras 12(Val) 中切出 12 密码子点突变的 k-ras 基因片段, 亚克隆至经同样酶切的腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中, 形成转移质粒 pAdTrack-CMV/k-ras 12(Val), 将之 Pme⁺ 酶切线性化后与腺病毒基因组重组质粒 pAdEasy-1 共转化大肠杆菌 BJ5183, 抽提鉴定含目的基因的重组体质粒, Pac⁺ 酶切后用脂质体转染 293 细胞, 包装成重组腺病毒 Ad-k-ras 12(Val)。采用 PCR 方法对重组腺病毒进行鉴定, 利用穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中带有 GFP 报告基因, 对病毒滴度和感染效率进行监测。结果 利用 CaCl₂ 法由 pAdTrack-CMV/k-ras 12(Val) 和 pAdEasy-1 共转化大肠杆菌 BJ5183, 可获得 25% 左右的阳性重组体细菌克隆。PCR 检测表明重组腺病毒已含有目的基因, 滴度为 1.2 × 10¹² pfu/ml。结论 细菌内同源重组法构建腺病毒相比于传统的细胞内同源重组法, 具有成功率高、方法简便、快捷、实验周期短的优点, 值得进一步推广应用。

【关键词】 腺病毒 突变 ras 基因 同源重组 细菌

【中图分类号】 Q78

Construction of mutant k-ras gene recombinant adenovirus ZHAO Feng^{*}, ZHOU Qinghua, QING Yang, SUN Zhil-ing, SUN Zefang. * Department of Thoracocardiac Surgery, West China Hospital, Sichuan University (Former The First University Hospital, West China University of Medical Sciences), Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

【Abstract】 Objective To construct the recombinant adenovirus of mutant k-ras by using the method of homogenous recombination in bacteria. **Methods** Mutant k-ras gene was liberated from the vector of pcDNA3-k-ras 12(Val) via Kpn⁺ + Xho⁺ digestion, and subcloned into shuttle vector of pAdTrack-CMV, forming transfer vector of pAdTrack-CMV/k-ras 12(Val). Then it was linearized with Pme⁺ and cotransformed into BJ5183 cells with adenoviral genome plasmid of pAdEasy-1. The DNA of identified recombinant plasmid was digested with Pac⁺ and transfected to 293 cells to package adenovirus. The PCR technique was used to detect target gene. The titre and its infection rate of the Ad-k-ras 12(Val) was measured with the aid of GFP expression. **Results** There were over 25% positive recombinant bacterial clones after cotransformation of BJ5183 bacterial cells with pAdTrack-CMV/k-ras 12(Val) and pAdEasy-1 by method of CaCl₂. PCR test indicated each the recombinant adenovirus contained the insert of k-ras 12(Val). The titre of purified recombinant adenovirus was 1.2 × 10¹² pfu/ml. **Conclusion** The method of homologous recombination in bacteria is convenient and efficient, which compared with that of in cell and the prepared Ad-k-ras 12(Val) paves a sound foundation for further study.

【Key words】 Adenovirus vector Mutant k-ras Homologous recombinant Bacteria

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

近年来,随着癌基因研究的深入,癌基因激活后产生的蛋白产物作为一种新的肿瘤抗原受到人们的关

注^[1]。Ras 原癌基因常通过点突变而被激活,编码一种含 189 个氨基酸残基的蛋白质,突变位点常发生于第 12 密码子。ras 基因点突变发生在大约 30% 的肿瘤患者中,因此建立以 ras 为靶目标的肿瘤生物治疗方法具有重要的临床价值^[2]。由于腺病毒载体具有转移效率高,感染细胞谱广、病毒滴度高和安全性好的优点,而成为肿瘤生物治疗临床试验的常用载体^[3]。本

本研究受国家自然科学基金(30000206)和教育部博士点基金(200055)资助

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院(原华西医科大学附属第一医院)胸心外科(赵峰、周清华),四川大学华西医学中心(原华西医科大学附属第一医院)基础医学院(覃扬、孙芝琳、孙泽芳)

研究利用一种新型、高效的细菌内同源重组腺病毒制备方法,构建了表达人 12 密码子点突变的 k-ras 基因的重组腺病毒,为今后的肿瘤特异性免疫治疗研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 pcDNA3-k-ras 12(Val) 由美国圣迭戈 Scripps 研究所 Janice Jackson 博士赠送,含约 0.6kb 全长 k-ras B cDNA,其 12 密码子点突变,产物由甘氨酸(Gly)转变为缬氨酸(Val)。

BJ5183 菌株、含绿色荧光蛋白(GFP)的穿梭质粒 pAdTrack-CMV、腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1 由美国 John Hopkins 肿瘤中心 Bert Vogelstein 教授赠送(质粒结构可查网址:www.hopkinscancercenter.org)。

DH5 和 JM109 菌株由我室保存,腺病毒包装细胞 293 细胞购于中国科学院上海细胞生物所。

1.2 酶及其它生化试剂 限制性内切酶、T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶等分别购自基因公司和华美公司,小牛碱性磷酸酶(CIP)、脂质体 Lipofectamine、RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品,PCR 引物由上海生工公司合成。

1.3 k-ras 12(Val) 重组腺病毒 携带 k-ras 12(Val) 的重组腺病毒的构建,构建流程见图 1。

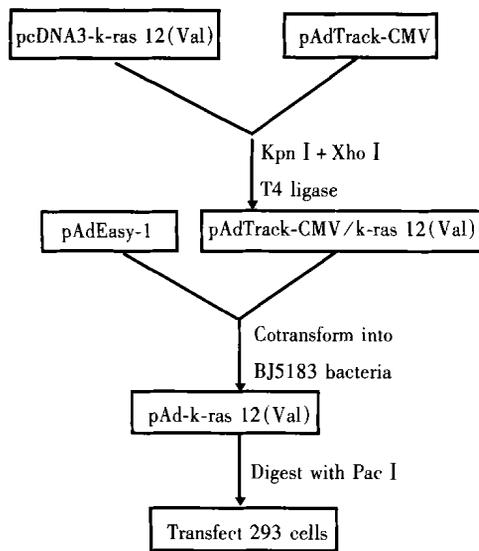


图 1 k-ras 12(Val) 重组腺病毒构建流程图

Fig 1 Flow chart of construction of recombinant adenoviral vectors Ad-k-ras 12(Val)

1.3.1 转移质粒 pAdTrack CMV/ k-ras 12(Val) 的构建

用 Kpn + Xho 分别双酶切 pAdTrack-CMV 和 pcDNA3/ k-ras 12(Val),电泳后用玻璃乳分别回收 k-ras

cDNA 片断及 pAdTrack-CMV 载体骨架,用 T4 DNA 连接酶将两者连接,然后转化大肠杆菌 JM109,挑选转化菌落,少量快速提取质粒,双酶切鉴定转移质粒 pAdTrack CMV/ k-ras 12(Val)。

1.3.2 重组腺病毒质粒载体的构建及鉴定 取 1 μg pAdTrack CMV/ k-ras 12(Val) DNA, Pme 酶切线性化后与 0.1 μg 的质粒 pAdEasy-1 混匀,加至感受态菌 BJ5183 中,用 CaCl₂ 法转化细菌。少量抽提转化菌落,根据琼脂糖电泳质粒大小,初步筛选重组体,再进一步经 Pac 酶切鉴定正确后,抽提重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/ k-ras 12(Val) DNA 备用。

1.3.3 重组腺病毒的包装、扩增和纯化 pAdEasy-1/ k-ras 12(Val) 质粒 DNA 经 Pac 酶切、酚-氯仿抽提,乙醇沉淀后,脂质体 Lipofectamine 介导转染 293 细胞,转染方法按说明书进行。于转染后不同时间在荧光显微镜下观察 GFP 表达状况,了解腺病毒包装过程。转染后 7~10 d,出现细胞病变(cytopathic effects, CPE),表现为贴壁细胞变圆、核浓缩、脱落,出现病毒空斑,收集细胞,于 -80 及 37 反复冻融 4 次裂解细胞,离心后采取含病毒的上清,重新感染 293 细胞进行病毒的大量扩增。重组腺病毒大量繁殖后用 CsCl 密度梯度超离心法进行纯化,-80 保存备用。

1.4 滴度测定 取 0.1 ml 浓缩后的病毒贮存液加入 0.9 ml 无血清培养基中,混匀后取 0.1 ml 依次作 10 倍比例稀释,各取 0.6 ml 稀释液感染 293 细胞,于感染后 24 h 在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数,按下列公式计算病毒滴度:

$$\text{病毒滴度} = \frac{\text{GFP 阳性细胞数} \times \text{病毒稀释度}}{0.6 \text{ ml}} \text{ (pfu/ml)}$$

1.5 重组腺病毒的鉴定 抽提重组腺病毒基因组 DNA,用目的基因 k-ras 引物进行 PCR 反应,对腺病毒进行鉴定。上下游引物顺序分别为 5'-ATGACT-GAATATAAACTTGF-3 和 5'-GTGGIATGGCTGATTATGATCAG-3。PCR 扩增条件是 94 变性 60 s,45 退火 60 s,72 延伸 60 s,30 次循环后,72 继续延伸 10 min。

1.6 病毒感染效率的测定 按每孔 2 × 10⁶ 细胞的量将体外培养扩增的小鼠骨髓树突状细胞接种于 6 孔板,用感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10、50、80、100 的腺病毒感染,24 h 在荧光显微镜下计数 GFP 阳性率。

2 结果

2.1 pAd-k-ras 12(Val) 的构建及鉴定 目的基因首先亚克隆至穿梭质粒中,构建成转移质粒 pAdTrack

CMV/ k-ras 12 (Val), 然后与腺病毒基因组质粒在细菌内进行同源重组, 在形成的转化细菌克隆中, 约有 25 % 左右为含有目的基因重组质粒。挑选转化克隆, 少量抽提质粒 DNA 电泳, 根据重组质粒大小至少与 pAdEasy-1 相近, 可进行初步筛选, 然后用 Pac 酶切, 重组质粒可出现一个大于 23kb 的大片段和 4.5kb 的特征性小带而得以鉴定(图 2)。

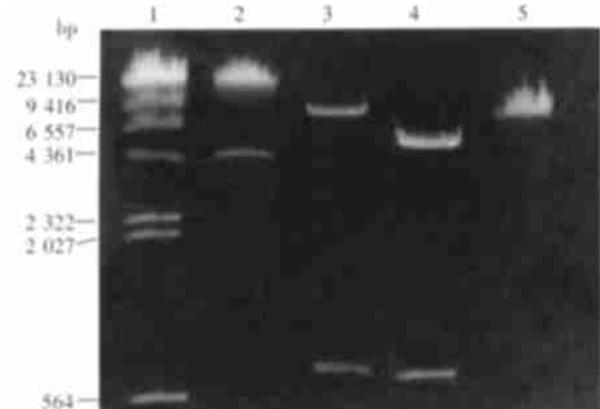


图 2 构建重组腺病毒质粒载体 pAd-k-ras 12(Val) 的限制性内切酶图谱

Fig 2 Electrophoresis pattern of the restriction products of pAd-k-ras 12(Val)

1. DNA marker -DNA/ Hind
2. pAd-k-ras 12(kpn + xho)
3. pAdTrack-CMV/ k-ras(kpn + xho)
4. pcDNA3/ k-ras 12(kpn + xho)
5. pAdTrack-CMV(kpn + xho)

2.2 重组腺病毒的产生 pAd-k-ras 12(Val) 经 Pac 酶切后, 经脂质体 Lipofectamine 传染 293 细胞, 24 h 出现绿色荧光, 逐渐增强, 呈集落状, 7~10 d 左右集落中央出现 CPE 反应, 并向周围蔓延, 表明包装病毒的形成和扩增, 而此时普通显微镜难以观察到上述现象(图 3)。

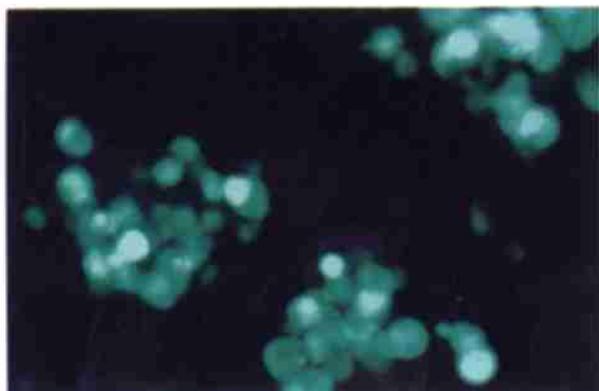


图 3 线性化 pAd-k-ras 12(Val) DNA 转染 293 细胞后形成彗星状病毒空斑

Fig 3 Comet-like adenovirus-producing plaque after transfection of 293 cells linearized plasmid of pAd-k-ras 12 observed by fluorescence microscopy (×200)

2.3 重组腺病毒的鉴定和滴度测定 抽提 Ad-k-ras

12(Val) 感染后的 293 细胞基因组 DNA 进行 PCR 检测, 可特异性扩增出 700 bp 的 k-ras B cDNA 编码序列, 而未感染细胞未能扩增出此片段(图 4), 表明重组腺病毒构建已成功, 根据 GFP 计数法测得的腺病毒滴度为 1.2×10^{12} pfu/ml。

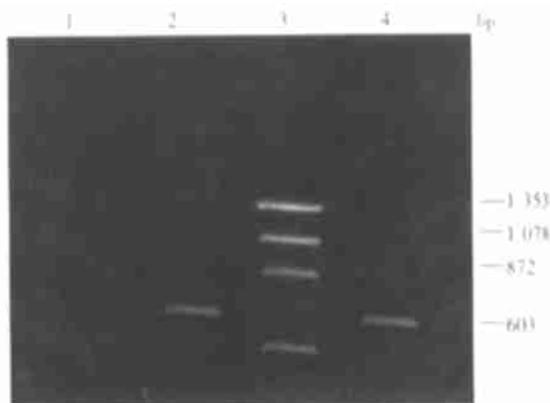


图 4 PCR 鉴定重组腺病毒产物电泳图

Fig 4 Electrophoresis analysis of recombinant adenovirus of Ad-k-ras 12(Val) by PCR

1. Negative control
2. Positive control :pAdTrack-CMV/ k-ras 12(Val)
3. DNA marker : XI174/ Hae
4. Ad-k-ras 12(Val)

2.4 重组腺病毒感染效率的测定 树突状细胞 (dendritic cell, DC) 属于非分裂细胞, 一般转染法不易感染, 用该重组腺病毒通过不同 MOI 感染 DC, 当发现 MOI 为 10, 仅少数细胞有荧光, 当 MOI=100, 约 70 % 的 DC 出现荧光, 表明该重组病毒的生物活性高, 适用于基因转运载体。

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。传统的构建腺病毒载体的方法有两种。一是将目的基因直接连入腺病毒基因组, 由于腺病毒基因组约 36kb 大小, 大片段连接的低效率及有限的限制性内切酶位点均使得这一方法实际应用起来极为困难。二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方法将目的基因转移入腺病毒基因组, 然后再进行多次空斑筛选鉴定, 加之包装细胞系中自体重组发生率低, 因此该方法试验过程繁琐, 周期长, 成功率低, 限制了腺病毒载体的广泛应用^[4,5]。1998 年, He 等^[5]报道了一种新的重组腺病毒载体系统。这一系统包括三部分组成: 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, 它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, 重组

时它省却了连接的步骤。

但是, He 等的方法需用 PmeI 线性化的穿梭质粒和超螺旋的骨架质粒被同时用来共转化 *E. Coli* BJ5183, 并要求用电穿孔法制备高质量的感受态 *E. Coli* BJ5183。这一实验步骤是此方法的主要限速步骤。为了将线性化的穿梭质粒和高达 33kb 大小的骨架质粒共转化 *E. Coli* BJ5183, 以完成自体重组, 就要求高质量的感受态细菌。本研究以 He 等的研究工作为基础, 并加以改进, 开发出一种新的细菌内同源重组法, 构建重组腺病毒。实验证明: 该重组方法简便易行, 对实验室条件要求低, 试验周期短, 成功率高。由构建流程图可见, 其主要特点是: (1) 借助细菌内高度有效的同源重组机制并进行抗生素筛选, 能够在很短的时间内得到所需要的重组腺病毒质粒, 克服了传统的细胞内同源重组法成功率低的缺陷; (2) 同源重组克隆可在卡那霉素抗性平板中生长而得以初筛, 再经酶切鉴定的重组克隆质粒 DNA 转染 293 细胞, 包装产生的重组腺病毒可省却细胞内同源重组法必须进行的多轮费时、费力的空斑纯化工作; (3) 由于腺病毒穿梭质粒中带有 GFP 报告基因, 可用以直接观察转染和感染

效率及测定病毒滴度, 因此该方法十分简便、快速和高效。用制备重组腺病毒 Ad-k-ras 12 (Val) 感染树突状细胞, 效率达 70%, 表明制备的 Ad-k-ras 12 (Val) 能有效介导基因转染, 为今后 ras 基因疫苗开展肿瘤免疫的研究打下基础。

参 考 文 献

- 1 Roth C, Rochlitz C, Kourilsky P. Immune response against tumors. *Adv Immunol*, 1994, 57(3): 281-351.
- 2 Abrams SI, Hand PH, Tsang KY, et al. Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin Oncol*, 1996, 23(1): 118-134.
- 3 Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther*, 1998, 80(1): 35-47.
- 4 Bett AJ, Haddara W, Prevec L, et al. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 13, 91(19): 8802-8806.
- 5 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.

(收稿: 2001-10-10 修回: 2001-12-24)

(本文编辑 张世雯)

· 会议消息 ·

Time Sep 5-7, 2002

Meeting Small Cell Lung Cancer

Location University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

Mail

Heather Drew

Marketing Department

Imedex

70 Technology Drive

30005, Alpharetta, Ga

USA

Tel 770-751-7332

Fax 770-751-7334

E-mail h.drew@imedex.com

Event URL <http://www.imedex.com>

时间 2002 年 9 月 5~7 日

会议 小细胞肺癌

地点 瑞士 Lausanne 大学

联系地址

Heather Drew

Marketing Department

Imedex

70 Technology Drive

30005, Alpharetta, Ga

USA

电话 770-751-7332

传真 770-751-7334

电子信箱 h.drew@imedex.com

网址 <http://www.imedex.com>