

采用 GatewayTM 系统构建人 Rb94 基因重组腺病毒载体

李进, 王芹, 宋力, 刘强, 王月英, 唐卫生, 张宁, 王蕾

Construction of Recombinant Adenovirus Vector for hRb94 Gene Using GatewayTM Clone Technology

LI Jin, WANG Qin, SONG Li, LIU Qiang, WANG Yue-ying, TANG Wei-sheng, ZHANG Ning, WANG Lei

Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding Author: WANG Qin, E-mail: wangqin_1005@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To establish a recombinant adenovirus vector with hRb94 by λ phage-site specific recombination systems. **Methods** Total RNA was extracted from human embryo and reversed transcript to get object cDNA, the hRb94 gene fragment was amplified by PCR. The attB-flanked PCR primers were designed and used to amplify hRb94 gene by PCR. An entry clone was performed by a BP recombination reaction with attB-PCR products and donor vector pDONRTM221. Then the entry clone and the target vector Ad/CMV/V5-DEST with attR1 and attR2 sites was recombined together *in vivo* to create the expression clone (Ad-hRb94) by an efficient LR recombination reaction. After the expression clone was confirmed by PCR and sequencing, Ad-hRb94 was digested with Pac I and transferred into 293A cells to be packaged into adenovirus stock. Ad-hRb94 was amplified by infection of 293A cells and the titer was measured. **Results** The target gene of hRb94 was transferred into Ad/CMV/V5-DEST vector correctly with the right ORF (open reading frame) by LR recombination reaction and it was confirmed by PCR and sequencing. The expression clone Ad-hRb94 was packaged into matured adenovirus successfully. The titer of Ad-hRb94 was 9.41×10^{10} pfu/ml. **Conclusion** Ad-hRb94 was constructed with GatewayTM clone technology, which lays an experimental foundation for the further research on the genetic therapy of hRb94.

Key words: Human retinoblastoma 94 gene; GatewayTM clone technology; Recombinant adenovirus vector

摘要:目的 采用 GatewayTM 技术构建人 Rb94 基因重组腺病毒载体 (Ad-hRb94)。 **方法** 从人类胚胎中提取总 RNA, 经反转录得到目的 cDNA, PCR 扩增 Rb94 目的基因片段。设计含有 attB 侧翼序列的引物, 用于重组片段的 PCR 扩增, 在 BP 重组酶的作用下, 将含 attB 位点的 PCR 产物与受体载体 pDONRTM221 发生重组反应, 产生入门克隆。在 LR 重组酶作用下, 将入门克隆与带 attR1, attR2 位点的目的载体 Ad/CMV/V5-DEST 体外重组形成表达克隆 Ad-hRb94。经 PCR 和测序鉴定, 将 Ad-hRb94 线性化后转入 293A 细胞进行病毒的包装、扩增及病毒滴度测定。 **结果** 经 PCR 和测序证实目的基因 Rb94 片段按正确方向重组入目的载体中, 带 Rb94 基因的目的载体在 293A 细胞中包装成功, 获得高滴度的病毒颗粒, 滴度为 9.41×10^{10} pfu/ml。 **结论** 本实验利用 GatewayTM 技术成功构建了 Ad-hRb94, 为进一步进行肿瘤基因治疗研究奠定了实验基础。

关键词: 人视网膜母细胞瘤 94 基因; GatewayTM 技术; 重组腺病毒

中图分类号: R730; R739.41

文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2010)09-0975-04

收稿日期: 2009-05-20; **修回日期:** 2009-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770638); 中国医学科学院放射医学研究所基金资助项目 (ST0837, ST0838)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 王芹, E-mail: wangqin_1005@yahoo.com.cn

作者简介: 李进 (1958-), 女, 本科, 研究员, 主要从事肿瘤基因-放射治疗研究

0 引言

人 Rb 基因 (视网膜母细胞瘤基因, Retinoblastoma gene) 是最早克隆出来的人类肿瘤抑制基因^[1], 位于人类

13 号染色体 q14 部位, mRNA 为 4.6 kb, 编码由 928 个氨基酸组成的磷酸蛋白, 相对分子质量为 110kDa (PRb110), 主要功能是参与细胞周期调控、促进细胞分化和控制细胞增殖等。Rb 基因的缺失和突变将引起细胞无限生长和繁殖, 进而导致肿瘤的发生。Rb94 基因是 Rb 基因的一部分, pRb94 (野生型全长 pRb110 的 NH₂ 末端缺失 112 个氨基酸残基) 在抑瘤实验中发现对不同种类肿瘤细胞具有比 pRb110 更强的肿瘤抑制效应, 其在 Rb^{-/-} 肿瘤细胞中的半衰期为 12 小时, 比 pRb110 长 3 倍, 在生长受抑制和(或)分化的肿瘤细胞内常有 pRb94 蛋白的积累。在以 Rb94 为靶基因的抗肿瘤基因治疗研究中发现, Rb94 基因对多种肿瘤均有抑制作用^[2-4]。近年来, 有人将放疗与病毒介导基因治疗联合使用, 有明显的相互增强的作用^[5-6]。为了深入开展 Rb94 基因治疗肿瘤的研究, 有必要着手 Rb94 基因表达质粒的构建。本研究采用 GatewayTM 技术, 构建含有人 Rb94 基因的重组腺病毒载体 (Ad-hRb94), 为 Rb94 基因治疗肿瘤的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Trizol 试剂、受体载体 pDONRTM221、表达载体 Ad/CMV/V5-DESTTM、人胚肾 293A 细胞、BP clonaseTM II 和 LR clonaseTM II、脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 (均为美国 Invitrogen 公司), 大肠杆菌 JM109 和 DH5α 感受态细胞 (北京天根公司)。

1.2 Rb94 目的基因的获取

1.2.1 引物设计 根据 Genbank 中 Rb94 基因的 cDNA 序列设计引物, 上游引物序列 WQ-F1: 5'-AAGAAAAGGAAGTGTGGGGAATC-3', 下游引物序列 WQ-R1: 5'-ACAAAAGAAGGCAAAGTAGTCAGA-3'。

1.2.2 RT-PCR 扩增目的片段 按 Trizol 试剂操作提取人胚胎组织总 RNA, 用 SuperScriptTM III First Strand Kits 合成 cDNA 第一链, 以该 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50μl: cDNA 模板 0.5μl, 10×buffer 5μl, MgSO₄ (50mM) 1μl, dNTP (10mM) 1μl, plantinum pfx (5u/μl) 0.5μl, 上下游引物各 2μl, ddH₂O 38μl。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 30s, 57℃ 退火 30s, 68℃ 延伸 3min, 循环 30 次, 电泳检测 PCR 产物, 回收纯化目的条带。

1.2.3 TA 克隆测序 按 TA 克隆试剂盒方法将 PCR 产物克隆于 pGEM-T 载体, 转化 JM109 大肠杆菌感受态, 挑取白色菌落于 LB 培养液振摇过夜,

菌液用 pGEM-T 载体通用引物由上海英骏公司测序。

1.2.4 根据测序结果, 选择与目的序列最匹配的克隆 WQ8-3 为模板, 有两处点突变即目的基因的 988bp 和 2 173bp 位点, 设计点突变引物进行多轮点突变, 上游引物 5'-GGACGCCCGCCAAAAC-3', 下游引物 3'-GGTATCAGGACTCCCCTACTA-5', 上游引物 5'-GGGGTACCATGTCGTTCACTTTACTGA-3', 下游引物 3'-CACCTCAGGACTATTGGGAGCTCGCC-5', 得到和目的序列完全一样的克隆, 提取 DNA。

1.3 入门克隆的构建和鉴定

1.3.1 含 attB 位点的引物设计 根据 Genbank 中 Rb94 cds 序列设计 Gateway 重组的 PCR 引物, 在需要进行 BP 重组的上、下游引物 5' 端分别加上 attB1 和 attB2。

attB1: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT, attB2: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT。重组引物序列为: WQBPF1:

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCACCATGTCGTTCACTTTACTGAGCTACAG-3'; WQBPR1: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATTTCTCTTCTTGT TTGAGGTATC-3'。

1.3.2 PCR 扩增 在上述引物的作用下, 以含目的基因的 DNA 为模板, 使用高保真 platinum pfx polymerase 进行扩增, 电泳检测并回收 PCR 产物。

1.3.3 BP 重组克隆 用侧翼含 attB 位点的 PCR 产物与受体载体 pDONRTM 221 进行重组反应, BP 重组反应体系: attB PCR 产物 2μl, pDONRTM 221 vector 1μl, BP clonase II enzyme mix 2μl, ddH₂O 5 μl, 反应物在 25℃ 下反应 1h, 然后加入 1 μl proteinase K (2μg/μl), 37℃ 温育 10 min, 取 5μl 重组反应液转化 100μl DH5α 感受态细胞。细胞涂布于含有 50μg/ml 卡那霉素的 LB 平板, 37℃ 过夜培养。

1.3.4 鉴定 从平板挑单克隆接种于 LB 液体培养液中, 37℃ 220r/min 振摇过夜培养, 菌液行 PCR 扩增验证。上游引物: 5'-ATGTCGTTCACTTTACTGAGCTA-3', 下游引物: 5'-TCATTTCTCTTCTTGT TTGAGG-3'。挑取构建正确的菌落培养过夜, 提取质粒 DNA, 测序验证。

1.4 Ad-hRb94 表达克隆的构建和鉴定

使用 Invitrogen 公司的 LR 重组反应将入门克隆与目的载体 Ad/CMV/V5-DEST 重组, 反应体系: BP 重组质粒 1μl, Ad/CMV/V5-DEST 1μl, LR clonase II enzyme mix 2μl, ddH₂O 6μl, 25℃ 反应

1h, 然后加入 1 μ l 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 反应 10min. 取 5 μ l 重组反应液转化 100 μ l DH5 α 感受态细胞, 氨苄霉素 LB 培养液平板筛选阳性重组克隆并扩增, 菌液行 PCR 扩增验证, 条件同入门克隆的鉴定. 挑取构建正确的菌落培养过夜, 提取质粒 DNA, 测序验证.

1.5 Ad-hRb94 的包装和扩增

将 Pac I 酶切消化 3 μ g Ad-hRb94, 将 293A 细胞转种于 6 孔板, 每孔 5 \times 10⁵ 个细胞, 待 70% 汇合时进行转染. 分别用 250 μ l 无血清 Opti-MEM 稀释酶切重组质粒和 10 μ l lipofectamine 2000 试剂, 室温孵育 5 min, 二者混匀后将 500 μ l 复合物加入到 6 孔板中, 室温放置 20 min. 在 37 $^{\circ}$ C, 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 3~4 h 后, 换上完全培养液, 在培养箱中继续培养. 转染 48 h 后, 胰酶消化细胞转移至 10 cm 培养皿中, 加入 10 ml 完全培养液, 每 2~3 天换新鲜培养液, 待 80% 细胞发生病变效应后收集细胞, 于 -80 $^{\circ}$ C/37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 离心收集上清液, 获得粗制腺病毒溶胞产物. 取粗制腺病毒溶胞产物以 1:10 的比例转染 80% 汇合的 293A 细胞, 2~3 天待细胞发生病变后, 按上述操作收获病毒液, 获得腺病毒颗粒.

1.6 Ad-hRb94 的滴度测定

准备每毫升 5 \times 10⁵ 细胞的 293A 细胞, 用无血清培养液将 Ad-hRb94 病毒样品做 10 倍系列稀释, 从 10⁻² 到 10⁻⁶. 摇匀上述准备好的细胞, 接种 24 孔板, 每孔 0.5 ml. 在接种细胞未完全贴壁情况下, 每孔滴加 50 μ l Ad-hRb94 病毒样品. 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养 48 h. 吸去培养液, 室温下干燥 5 min, 每孔加入冰预冷的甲醇 0.5 ml. 将板放于 -20 $^{\circ}$ C 10 min. 吸去甲醇, 洗涤板孔内细胞 3 次. 1:1 000 稀释一抗兔抗腺病毒多抗, 每孔加入 250 μ l 一抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h. 吸出一抗, 洗板, 1:1 000 稀释二抗辣根过氧化物酶标记的兔抗, 每孔加入 250 μ l 二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h. 吸出二抗, 洗板, 用 DAB 显色液染色, 被感染的细胞显示棕色, 通过计算公式即可确定腺病毒的滴度. 每孔感染单位 (pfu/ml)

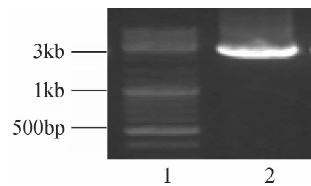
$$= \frac{(\text{平均阳性细胞数}/\text{视野}) \times (\text{视野数}/\text{孔})}{\text{病毒体积}(\text{ml}) \times \text{稀释倍数}}$$

2 结果

2.1 Rb94 目的基因的获得和鉴定

所要扩增的 Rb94 基因的长度为 2 450bp, 经 RT-PCR 扩增, 所得条带大小与预期值一致, 见图 1. 回收纯化目的条带, 经 TA 克隆测序和点突变, 获得与 Genbank 中 Rb94 基因的 cDNA 序列完全

一致的目的片段, 表明成功扩增出 Rb94 基因.



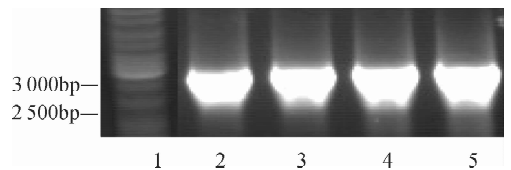
1: DNA marker; 2: PCR product of Rb94 gene

图 1 Rb94 目的基因克隆电泳图

Figure 1 Agarose electrophoresis of Rb94 gene clone

2.2 入门克隆的鉴定

经 BP 重组得到了入门克隆阳性菌落, 菌液 PCR 扩增片段大小在 2 500~3 000 bp 之间, 与 Rb94 基因理论值一致 (2 450bp), 见图 2. 挑取构建正确的菌落培养过夜后提取质粒 DNA, 经测序鉴定目的基因序列与数据库的 Rb94 基因序列吻合, 表明成功构建入门克隆.



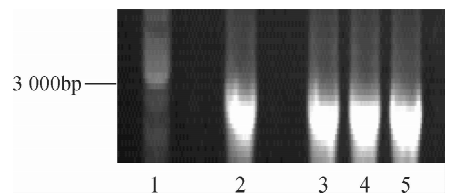
1: DNA marker; 2~5: PCR product of entry clone

图 2 入门克隆的凝胶电泳图

Figure 2 Agarose electrophoresis of PCR product of entry clone

2.3 重组表达克隆的鉴定

经 LR 重组得到了表达克隆阳性菌落, 菌液行 PCR 扩增出 Rb94 基因片段, 大小为 2 450bp, 与理论值一致, 见图 3. 挑取含有 Rb94 基因的克隆扩增后提取质粒 DNA, 经测序验证与 Genbank 中 Rb94 基因的序列相同, 表明成功构建 Ad-hRb94 表达克隆.



1: DNA marker; 2~5: PCR product of expression clone

图 3 表达克隆的凝胶电泳图

Figure 3 Agarose electrophoresis of PCR product of expression clone

2.4 重组腺病毒转染 293A 细胞的形态

将 Pac I 酶切消化的 Ad-hRb94 转染 293A 细胞后, 293A 细胞形态发生细胞病变效应. 感染病毒的细胞逐渐溶解释放腺病毒, 释放的腺病毒进一步转染周围的 293A 细胞, 从而形成斑块. 感染后 7 天左右可以在显微镜下看到小的空斑, 表现为一定区域内细胞呈现病变效应. 第 10 天可以在光学显

显微镜下看到形态完整的空斑,第 13 天空斑非常容易被挑选出来,见图 4。

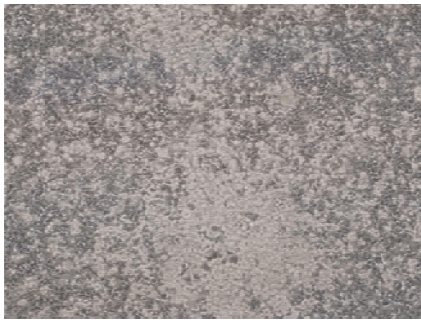


图 4 Ad-hRb94 转染 13 天 293A 细胞的形态

Figure 5 The morphology of 293A cells forms transfected by Ad-hRb94 for 13 days

2.5 重组腺病毒的滴度测定

Ad-hRb94 载体感染 293A 细胞后,采用免疫法检测腺病毒滴度,获得了质量较高的腺病毒颗粒,病毒滴度达到 9.41×10^{10} pfu/ml。

3 讨论

腺病毒具有嗜上皮细胞性,而人类的大多数肿瘤就是来源于上皮细胞。腺病毒本身对肿瘤细胞可能就有影响,曾有文献报道缺失 E1B55K 基因的腺病毒能在 p53 基因突变的肿瘤细胞中繁殖并裂解杀死肿瘤细胞。而且,腺病毒介导的转基因能高效表达转染分裂期和非分裂期的细胞。Li 等^[7]利用复制缺陷型的腺病毒介导抑癌基因治疗鼻咽癌,抑瘤作用明显,目的基因在瘤内的表达水平是正常组织的 50 倍。

目前复制缺陷型的腺病毒载体得到广泛应用,因其 DNA 不整合受体细胞基因组,不使抑癌基因失活和原癌基因激活而具有很高的安全性。我们采用的 Ad/CMV/V5-DESTTM腺病毒缺失 E1 区,E1 区是腺病毒基因组进入细胞核后早期立刻表达的基因,对后续其他基因的表达以及病毒复制起到至关重要的作用,因 E1 区的缺失腺病毒不能复制和表达,增加了生物安全性。同时 Ad/CMV/V5-DESTTM腺病毒使插入的外源基因增大(可达 6 kb),提高了载体的适应性和稳定性,该载体转导后持续表达目的基因的时间可达 1~2 周时间^[8],适合后续基因治疗的需要。

GatewayTM技术是基于已研究得非常清楚的 λ 噬菌体位点特异重组系统^[9],由 BP 和 LR 两个反应构成。BP 反应是利用一个 attB DNA 片段或表达克隆和一个 attP 供体载体之间的重组反应,产生一个

入门克隆和带有 ccdB 致死基因的副产品。LR 反应是一个 attL 入门克隆和一个 attR 目的载体之间的重组反应,最后产生带有 ccdB 致死基因的副产品和需要的含有目的基因的表达载体。GatewayTM技术不再需要使用限制性内切酶和连接酶,可克隆一个或多个基因进入到 GatewayTM改造过的各种表达载体,当基因在目的表达载体之间快速简便的穿梭时,可以保证正确的方向和阅读框。此技术具有与其他方法相比明显的优势,反应快速而简单,且克隆效率高。我们利用 GatewayTM技术,将受体载体 pDONRTM221 上的 Rb94 基因转移到目的载体 Ad/CMV/V5-DEST,快速高效地构建了 Ad-hRb94。

本实验将构建的含有 Rb94 基因的重组腺病毒载体感染 293A 细胞后,获得了高滴度腺病毒颗粒,病毒滴度达 9.41×10^{10} pfu/ml,完全达到体外细胞抑瘤及裸鼠体内抑瘤实验的要求。本研究将源源不断地为进行体内、体外抑瘤效果评价提供重组腺病毒颗粒,为 Rb94 基因治疗肿瘤的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Lee WH, Bookstein R, Hong F, et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence[J]. Science, 1987, 235(4794):1394-1399.
- [2] Li D, Day KV, Yu S, et al. The role of adenovirus-mediated retinoblastoma 94 in the treatment of head and neck cancer [J]. Cancer Res, 2002, 62(16):4637-4644.
- [3] Zhang X, Multani AS, Zhou JH, et al. Adenoviral-mediated retinoblastoma 94 produces rapid telomere erosion, chromosomal crisis, and caspase-dependent apoptosis in bladder cancer and immortalized human urothelial cells but not in normal urothelial cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(4):760-765.
- [4] Roig JM, Molina MA, Cascante A, et al. Adenovirus-mediated retinoblastoma 94 gene transfer induces human pancreatic tumor regression in a mouse xenograft model[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(4):1454-1462.
- [5] Zhang M, Li S, Li J, et al. Ionizing radiation increases adenovirus uptake and improves transgene expression in intrahepatic colon cancer xenografts[J]. Mol Ther, 2003, 8(1):21-28.
- [6] Teh BS, Aguilar-Cordova E, Vlachaki MT, et al. Combining radiotherapy with gene therapy (from the bench to the bedside): a novel treatment strategy for prostate cancer[J]. Oncologist, 2002, 7(5):458-466.
- [7] Li JH, Chia M, Shi W, et al. Tumor-targeted gene therapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 2002, 62(1):171-178.
- [8] Russell WC. Update on adenovirus and its vectors [J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt11):2573-2604.
- [9] Matsuyama A, Yoshida M. Systematic cloning of an ORFome using the Gateway system[J]. Methods Mol Biol, 2009, 577:11-24.

[编辑校对:刘红武]