

大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶基因真核表达载体的构建及其在 MKN-45 细胞中的表达

黄颖¹, 曹岩¹, 冷吉燕², 隋玉杰¹

Construction of Eukaryotic Expression Vector Containing *E. coli* Purine Nucleoside Phosphorylase and Its Expression in MKN-45 Cells

HUANG Ying, CAO Yan, LENG Ji-yan, SUI Yu-jie

1. The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China; 2. The First Hospital of Jilin University

Abstract: **Objective** To clone *E. coli* PNP gene, construct its eukaryotic expression vector and obtain positive MKN-45 cell clones expressing *E. coli* PNP gene stably. **Methods** PCR amplification was performed using primers based on *E. coli* PNP gene sequence from Genbank, *E. coli* genomic DNA as template. PCR product was inserted into pMD-18T. After the sequencing was confirmed, the gene was subcloned to pcDNA3.1 to construct recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1-EPNP. The recombinant plasmid was transfected into MKN-45 cells by lipofectamin method. **Results** PCR yielded a fragment of 716bp and EPNP was verified by sequence analysis. Enzyme digestion analysis showed that the target gene was subcloned into recombinant vector. Resistant clones MKN-45 expressed high amounts of EPNP mRNA and showed a strong sensitivity to MePdR. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid containing *E. coli* PNP gene was successfully constructed. The positive MKN-45 cell clones expressing *E. coli* PNP gene stably were obtained, which has laid a solid ground for further study of gastric cancer gene therapy with PNP/MepdR suicide gene system.

Key words: *E. coli* purine nucleoside phosphorylase; Suicide gene; Gene therapy

摘要: **目的** 克隆大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶 (EPNP) 基因并构建真核表达载体 pcDNA3.1-EPNP, 将重组质粒转染 MKN-45 细胞获得高表达大肠杆菌 PNP 基因的 MKN-45 细胞克隆。 **方法** 根据 Genbank 中大肠杆菌 PNP 基因的核苷酸序列, 设计并合成了一对引物, 以大肠杆菌基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 并将扩增产物定向插入 pMD-18T 克隆载体中进行序列测定, 测序正确后将其亚克隆至表达载体 pcDNA3.1, 利用脂质体将重组质粒转染 MKN-45 细胞。 **结果** PCR 扩增出 716bp 大小的片段, 测序结果与已报道的 EPNP 基因序列一致; 亚克隆经酶切鉴定正确; RT-PCR 证明经 G418 筛选得到的转基因 MKN-45 细胞克隆中存在大量 EPNP mRNA, 前体药 MePdR 对转染 EPNP 的 MKN-45 细胞有较强的细胞毒作用。 **结论** 成功构建了大肠杆菌 PNP 基因的真核表达载体, 获得了稳定表达大肠杆菌 PNP 基因的 MKN-45 细胞克隆, 为 PNP/MepdR 自杀基因系统在胃癌基因治疗中的应用奠定了良好的基础。

关键词: 大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶; 自杀基因; 基因治疗

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2006)04-0239-04

0 引言

随着现代生物技术的发展, 基因治疗已成为继肿瘤的手术治疗和放疗、化疗后的又一新途径。特别是自杀基因治疗为目前国内外研究的热点之一。大肠杆菌 DeoD 基因编码的嘌呤核苷磷酸化酶

(PNP) 能将无毒的前体药脱氧腺苷类似物分解产生剧毒的腺嘌呤类似物, 通过抑制 DNA、RNA 和蛋白质的合成, 而引起细胞死亡。同时它能够通过产生极强的旁观者效应, 不仅使转基因细胞被杀死, 而且大量未转基因的细胞亦被杀死^[1,2]。本文对大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶 (EPNP) 基因进行分子克隆并构建到 pcDNA 3.1 真核表达载体中, 并获得稳定表达 EPNP 基因的 MKN-45 细胞克隆, 为今后进一步研究自杀基因在胃癌基因治疗中的应用创造条件。

收稿日期: 2005-05-04; 修回日期: 2005-07-08

基金项目: 吉林省科委资助项目 (20030424-02)

作者单位: 1. 130041 长春, 吉林大学第二医院中心实验室; 2. 吉林大学第一医院

通讯作者: 曹岩

作者简介: 黄颖 (1972-), 女, 在读博士, 讲师, 主要从事肿瘤分子生物学研究

1 材料和方法

1.1 载体与菌株 大肠杆菌 JM109 和真核表达载体 pMD-18 T 均购自 Invitrogen 公司。克隆载体 pMD-18 T 购自大连宝生物公司。

1.2 主要试剂 限制性内切酶 Bam HI 和 Hind III、T4DNA 连接酶和 TaqDNA 聚合酶、DL2000 Marker 均购自大连宝生物公司;凝胶 DNA 提取 Kit 和 PCR 产物纯化 Kit 购自 Promega 公司;LipofectaminTM Reagent、Geneticin (G418 Sulfate) 及 MePdR 为 Invitrogen 公司产品;IPTG 和 X-gal 购自上海生物工程公司。实验所用试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.3 目的基因的克隆 引物设计:根据 GenBank 数据库提供的 EPNP 基因的核苷酸序列设计一对引物。为方便克隆,在上游引物和下游引物的 5 端分别引入 Hind III 和 Bam HI 酶切位点。上游引物:5' ³/A TCA TAA GCTTA TGGCTACCCCA CACA TTAATG-3' 下游引物:5A TATGGATCCT TACTCTTTA TCGCCCA G-3' 模板提取:大肠杆菌 JM109 基因组 DNA 的提取,按文献[3]方法进行。PCR:94 变性 5min 进入循环,94 ,60 秒,56 ,60 秒,72 ,120 秒,经 30 个循环扩增后 72 延伸 10min。取 10 μ l PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定。PCR 产物的回收按 PCR 产物纯化 Kit 上的说明进行。回收产物保存于-20 备用。

1.4 PCR 产物的克隆及测序 TA 克隆载体 pMD-18 T 与胶回收纯化的 PCR 产物按 1:3(摩尔比)的比例在 T₄ DNA 连接酶作用下进行连接,16 反应 16h。取 10 μ l 连接反应液转化 JM109 感受态细菌,将转化的菌液涂在 X-gal 处理过的含有氨苄青霉素的 LB 平板上培养 12h,在长出蓝、白克隆的 LB 平板上挑取白色克隆进行少量扩增、质粒小提,用酶切初步鉴定阳性细菌克隆,将酶切鉴定正确的细菌克隆送交大连宝生物公司测序。

1.5 真核表达载体 pcDNA 3.1-EPNP 的构建和鉴定 测序正确的质粒 pMD-18 T 用限制酶 Hind III 和 Bam HI 进行双酶切反应,纯化回收约 716bp 大小的目的片段;质粒 pcDNA 3.1 也进行 Hind III 和 Bam HI 双酶切,纯化回收大片段。用 T₄ DNA 连接酶连接目的片段和线性化的空质粒 pcDNA 3.1,16 反应 16h。转化感受态细菌 JM109,将转化的菌液涂在含有氨苄青霉素的 LB 平板上培养 12h,挑取 6 个阳性克隆进行少量扩增、质粒小抽,以 Hind III 和 Bam HI 双酶切鉴定阳性细菌克隆。

1.6 真核表达载体 pcDNA 3.1-EPNP 的转染 将

重组质粒 pcDNA 3.1-EPNP 转化的感受态细菌 JM109 及以空载体 pcDNA 3.1 转化的菌株,在 LB 培养基中于 37 培养 18h,按照质粒提取说明分别提取 pcDNA 3.1-EPNP 和 pcDNA 3.1,经紫外分光光度仪测定 A_{260nm} 定量。按照 LipofectaminTM Reagent 脂质体转染说明转染胃癌细胞 MKN-45。

1.7 RT-PCR 鉴定 EPNP 基因在 MKN-45 细胞中的稳定表达 待具有 G418 抗性的 MKN-45 细胞克隆长满 6 孔板时,抽提转染 pcDNA 3.1-EPNP 细胞 (MKN-45/pcDNA 3.1-EPNP) 和转染空载体 pcDNA 3.1 细胞 (MKN-45/pcDNA 3.1) 总 RNA,进行 RT-PCR 反应,鉴定 EPNP 和内参照 GAPDH mRNA 的表达。

1.8 MTT 法检测 MePdR 对转染 ECPNP 细胞的细胞毒作用 转染 pcDNA 3.1-EPNP 细胞、转染空载体 pcDNA 3.1 细胞和亲本细胞以 1 \times 10⁴/孔接种于 96 孔板,24h 后加入不同浓度的 MePdR 使终浓度分别为 10⁻⁷、2.5 \times 10⁻⁷、5 \times 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L,以不加药的未转染细胞作对照。每实验组设 3 个复孔,培养 72h 后加入 MTT 20 μ l (5 μ g/ml),4h 后弃上清加入 DMSO 溶解,震荡 10min 后,酶标仪测 490nm 处吸光度(A)值,进而按下式计算各组细胞存活率:存活率 = 实验组 A 值/对照组 A 值 \times 100 %

2 结果

2.1 目的基因克隆及测序

以大肠杆菌基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增出一条约 716bp 的特异条带,将纯化的 PCR 产物克隆于载体 pMD-18 T 中,转化 JM109 感受态细菌。蓝白筛选,随机挑取 6 个白色菌落提取质粒,用 Hind III 和 Bam HI 双酶切后,释放出 716bp 左右的片段,见图 1。测序结果经与 Genbank 中登录的序列相比较,序列完全正确(本文资料未列出),说明已成功扩增了大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶基因的 DNA 序列。

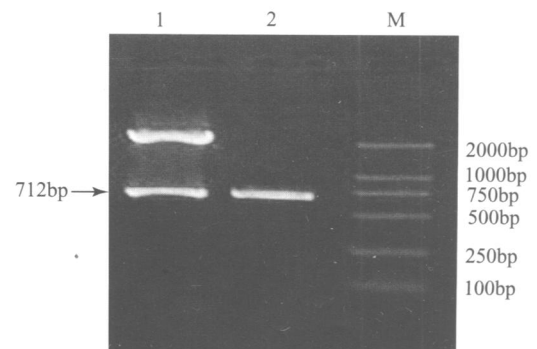


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

M:DNA Marker (DL2000); 1:pMD-18 T 载体和 EPNP 基因; 2: PCR 产物

2.2 重组表达载体 pcDNA 3.1-EPNP 的构建和酶切鉴定

重组质粒用限制酶 Hind III 和 BamHI 双酶切,电泳结果显示约 716bp 处有一特异条带,证明目的基因已正确插入质粒 pcDNA 3.1,得到了真核表达载体 pcDNA 3.1-ECPNP,见图 2。

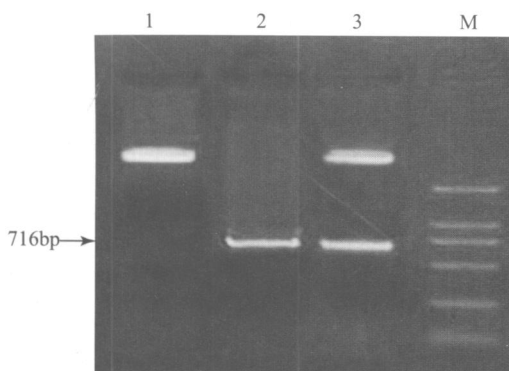


图 2 重组质粒 HindIII 和 BamHI 双酶切鉴

M: DNA Marker (DL2000); 1: pcDNA3.1; 2: EPNP 基因; 3: 重组质粒 pcDNA3.1-EPNP 双酶切

2.3 RT-PCR 鉴定 EPNP 基因在 MKN-45 细胞中的稳定表达

重组质粒 pcDNA 3.1-EPNP 转染后经 G418 (500μg/ml) 筛选得到 G418 抗性细胞克隆,抽提细胞总 RNA 行逆转录反应,采用特异性扩增 EPNP 基因的上、下游引物进行 PCR 反应,得到了 EPNP 基因的目的条带(716bp),提示 G418 抗性细胞克隆中存在 ECPNP 基因。空质粒 pcDNA 3.1 转染后获得的 G418 抗性细胞克隆经 RT-PCR 后无特异性条带生成,见图 3。

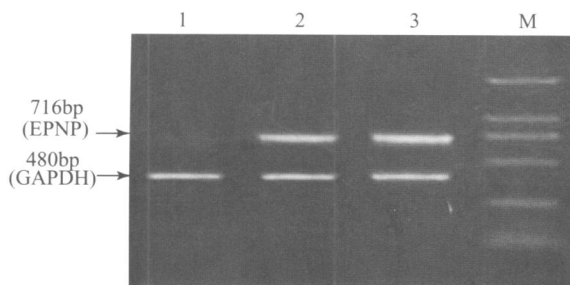


图 3 RT-PCR 鉴定 pcDNA3.1-ECPNP 转染细胞情况

1: MKN-45/pcDNA3.1; 2、3: MKN-45/pcDNA 3.1-EPNP; M: DNA Marker (DL2000)

2.4 MePdR 对转染 EPNP 细胞的杀伤作用

用不同浓度的 MePdR 处理转染细胞和未转染细胞,MTT 法检测细胞存活率。处理 72h 后,许多转染 pcDNA 3.1/EPNP 细胞脱离了培养皿并且出现“收缩”现象,同时转染空载体 pcDNA 3.1 细胞和

未转染细胞仍然吸附在培养皿上未出现任何明显的细胞毒迹象,各种细胞存活率,见表 4。很明显,MePdR 并没有影响亲本细胞和转染空载体细胞的存活率,相反,MePdR 对转染 pcDNA 3.1-EPNP 细胞有明显的细胞毒作用。

表 4 不同终浓度的 MePdR (0 ~ 10⁻⁵ mol/L) 处理 72 小时后胃癌细胞的存活率

Group	Survival rate (%)					
	0	10 ⁻⁷	2.5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
MKN-45	100	100	98.2	98.9	100	100
MKN-45/pcDNA3.1	100	99.0	97.6	100	98.5	99.1
MKN-45/pcDNA3.1-EPNP	100	65.7	23.8	36.4	8.6	2.3

3 结论

目前常用的自杀基因体系如: HSV-TK 体系和 CD 体系只能抑制 DNA 的复制,只能杀伤处于分裂期的肿瘤细胞,而在实体肿瘤中只有一部分肿瘤细胞处于分裂期,故对此类肿瘤,其杀伤力受到一定限制^[4,5]。而经大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶 (EPNP) 催化分解药物前体 6-甲基嘌呤脱氧核糖核苷 (MePdR) 产生的 MeP 不但可以抑制 DNA 的合成,而且可以抑制 RNA 和蛋白质的合成,从多个环节杀伤肿瘤细胞,不但可以杀伤处于分裂期的瘤细胞,而且可以杀伤静止的瘤细胞,具有强大的杀伤力。另外,MeP 可以穿过脂质膜,不需依赖细胞连接即可到达邻近细胞,将其杀伤,旁观者效应明显^[6,7]。一个自杀基因体系的旁观者效应越强,其疗效就越好。HSV-TK 体系的毒性产物为磷酸化物。不能透过脂质膜,只能通过细胞连接进入紧邻细胞,故其旁观者效应必须依赖细胞连接^[8]。

本实验中构建的重组质粒限制性内切酶酶切图谱与预期结果相符,获得了约 716bp 大小的目的条带。目的基因测序结果与 Genbank 中登录的序列一致。因此,本实验中克隆的 EPNP DNA 序列是完全正确的。我们在实验中采用特异性扩增 EPNP 基因的上、下游引物,通过 RT-PCR 反应鉴定 EPNP 基因在转基因 MKN-45 细胞中的表达,证实了具有 G418 抗性的转染重组质粒 pcDNA 3.1-EPNP 的 MKN-45 细胞克隆中有 EPNP 基因的 mRNA 水平的表达;同时,用 MTT 法检测前体药 MePdR 对 EPNP 高表达细胞的杀伤作用,发现前体药 MePdR 对转染 EPNP 的 MKN-45 细胞有较强的细胞毒作用。说明 EPNP 确实是药物敏感基因即自杀基因,也证明了这些细胞中有 EPNP 基因活性蛋白的表达。本实验中我们成功获得了稳定转染

乙酰肝素酶基因表达增强大肠癌转化细胞侵袭能力的实验研究

刘玉¹, 丁彦青², 辛晓燕¹, 刘淑娟¹, 王德堂¹, 郭惠玲¹

The Enhanced Effect of Heparanase Gene Expression on the Invasive Ability of Colorectal Cancer Transformed Cell

LIU Yu¹, DING Yan-qing², XIN Xiao-yan¹, LIU Shu-juan¹, WANG De-tang¹, GUO Hui-ling¹

1. Department of Obstetric and Gynecology, Fourth Military Medical University, Xian 710032, China; 2. Cancer Research Institute Southern Medical University

Abstract :Objective This study was invested the effects of heparanase gene on the invasive ability of colorectal cancer cells. **Methods** Heparanase gene was transfected to human colorectal cancer cell lines HT29. The cell growth kinetics and the ability of invading in vitro were detected by MTT and invading chamber. Tumorigenicity and orthotopic implantation of histologically intact tumor in nude mice's ileocecal junction indicated the invasive ability of colorectal cancer transformed cell by the exogenous expression of heparanase gene. **Results** After being transfected with this gene, the growth velocity of these transfected cells was significantly rapider than the parental cell line. The Boyden invasion chamber test were displayed the invasive ability of transfected cell (45.5 ± 0.501) was stronger than no-transfected cell (29.3 ± 0.062) and blank-transfected cell (30.1 ± 0.247). There was significantly difference ($P < 0.01$) among three kinds of cells. In the same time, the entity neoplasm with the transfected cell ($12 \text{ mm} \times 9 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$) is larger than the control group ($6 \text{ mm} \times 8 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$). The incidences of the liver metastases (71.43%) is higher than the control group (14.29%). The rate of tumorigenicity and metastasis in nude mice was significantly different than before thansfected ($P < 0.01$). **Conclusion** It suggests that human exogenous heparanase gene can facilitate to enhance the growth, invasion and metastasis in cell line HT29.

Key words: Heparanase; Colorectal neoplasm; Transfection; Metastasis

收稿日期: 2005-04-01; 修回日期: 2005-05-11

作者单位: 1. 710032 西安 第四军医大学西京医院妇产科; 2. 广州南方医科大学肿瘤研究所

作者简介: 刘玉 (1963-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的研究

摘要: 目的 探讨外源性乙酰肝素酶基因对增强大肠癌 HT29 细胞转移侵袭能力的影响。方法 乙酰肝素酶 (Heparanase, Hpa) 基因真核表达载体转染大肠癌 HT29 细胞, 观察转化细

EPNP 基因的 MKN-45 细胞克隆, 为进一步研究 PNP 的生物学功能以及在胃癌基因治疗中的应用奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Mao C, Cook WJ, Zhou M, et al. The crystal structure of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase: a comparison with the human enzyme reveals a conserved topology [J]. Structure, 1997, 5 (10): 1373-1383.
- [2] Sorscher EJ, Peng SY, Bebok Z, et al. et al. Tumor cell bystander killing in colonic carcinoma utilizing the E. coli DeoD gene product to generate toxic purine [J]. Proc Am Assoc Cancer research, 1994, 7 (4) 35: 229.
- [3] 奥斯特伯 F, 金斯顿 RE, 塞德曼 JG, 等. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 39-40.
- [4] Martiniello-Wilks R, Garcia-Aragon J, Daja MM, et al. In vivo gene therapy for prostate cancer: preclinical evaluation of two different enzyme directed prodrug therapy systems delivered by identical adenovirus Vectors [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9 (11): 1617-1626.
- [5] Huber BE, Austin EA, Richards CA, et al. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91 (17): 8302-8306.
- [6] Hughes BW, King SA, Allan PW, et al. Cell to cell contact is not required for bystander cell killing by Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase [J]. J Biol Chem, 1998, 273 (4): 2322-2328.
- [7] Krohne TU, Shankara S, Geissler M, et al. Mechanisms of cell death induced by suicide genes encoding purine nucleoside phosphorylase and thymidine kinase in human hepatocellular carcinoma cells in vitro [J]. Hepatology, 2001, 34 (3): 511-518.
- [8] Freenab SM, Abboud CN, Whartenby KA, et al. The "bystandereffect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified [J]. Cancer Res, 1993, 53 (21): 5274-5283.

[编辑: 贺文]