文章编号:1000-5404(2006)05-0387-04

论著

反义 B7-H1 位置特异性腺病毒载体的构建与鉴定

吴 森,余佩武,王自强,赵永亮,雷 晓,曾冬竹,朱自满 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 构建人反义 B7-H1 位置特异性腺病毒载体。**方法** 将 B7-H1cDNA 反向连接到穿梭质粒 pDC315 上以构建重组反义 B7-H1 穿梭质粒 pDC315. ASB7-H1,用脂质体将 pDC315. ASB7-H1 和腺病毒质粒 pBHGloxΔE1,3Cre 转染 293 细胞,通过位置特异性重组产生反义 B7-H1 腺病毒载体 Ad. ASB7-H1。**结果** 穿梭质粒经酶切、凝胶电泳和测序鉴定与预期结果一致,重组腺病毒载体经 PCR 扩增后得到 564 bp 和 872 bp 特征性片段;其病毒滴度达:5×10^{10} pfu/ml。**结论** 利用位置特性重组技术,成功的构建了人反义 B7-H1 的腺病毒载体,为后续对 B7-H1 的相关研究创造了条件。

关键词: B7-H1;重组腺病毒载体;反义技术
中图法分类号: R341.6; R373.1; R394-33 **文献标识码**: A

Construction and identification of adenovirus vector site-specific for antisense B7-H1 gene

WU Miao, YU Pei-wu, WANG Zi-qiang, ZHAO Yong-liang, LEI Xiao, ZENG Dong-zhu, ZHU Zi-man (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenoviral vector site-specific for B7-H1 antisense gene. Methods B7-H1 cDNA was inserted reversely into shuttle plasmid pDC315 to construct the recombinant antisense B7-H1 shuttle plasmid, named as pDC315. ASB7-H1. pDC315. ASB7-H1 and adenovirus genomic plasmid pBHGloxΔE1, 3Cre were cotransfected into 293 cells to construct antisense B7-H1 adenovirus vector, named as Ad. ASB7-H1 by site-specific recombination. Results Agarose gel electrophoresis and sequencing confirmed that the B7-H1 cDNA was successfully bound to pDC315. The recombinant adenovirus vector was confirmed to contain 564 bp and 872 bp specific fragment by PCR and agarose gel electrophore. Plaque titration on 293 cells showed virus titers was 5×10^{10} pfu/ml. Conclusion The recombinant adenovirus vector was constructed successfully by site-specific recombination technique, which provides a foundation for further research about B7-H1.

Key words: B7-H1; adenovirus vector; antisense technology

近年来新发现的广泛表达于人肺癌、卵巢癌及结肠癌等肿瘤细胞的 B7-H1,与受体 PD-1 结合后传递一种 T 细负性调节信号,并被认为与肿瘤的免疫逃逸相关[1]。新近研究表明在树突状细胞(dendritic cells, DCs)尤其是在成熟 DCs 上也有高水平 B7-H1 表达[2]。本实验利用位置特异性重组技术,使转染了 pDC315ASB7-H1 与 pBHGlox△E1,3cre 的 293 细胞在复制过程中发生位置特异性重组,构建反义 B7-H1 重组腺病毒载体,为后续干预 DCs 的 B7-H1 的表达,探讨 DCsB7-H1 的表达是否具有与高表达于肿瘤细胞表面的 B7-H1 类似的对 T 细胞功能的抑制效应的相关研究创造条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒载体及细胞 pcDNA3.1. B7-H1 质粒由美国 Yuaeian W. Shi 博士(美国,Long Island Jewish Medical Center)惠赠。pDC315 质粒、pBHGloxΔE1,3Cre 质粒购自美国 Microbix 公司。Ad. LacZ 由韩国 Lee. C. T 博士(韩国汉城国立医学院)惠赠。293 细胞、*E. coli*. DH5-α 由西南医院心血管内科钟理博士

作者简介:吴 森(1969-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事微创技术在腹部肿瘤外科治疗中的应用研究和肿瘤生物治疗方面的研究,发表论文6篇,现在解放军第180医院普通外科。电话:(023)68765267, E-mail: wumiao-@163.com
通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com
收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-09-10

惠赠。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ以及 PyrobestTMDNA 聚合酶、*Taq*DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker DL2000、DNA Marker DL15000、腺病毒基因组特征片断引物和 B7-H1 引物购自日本 Takara 公司。胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,DMEM(高糖型)购自美国 GiBCO 公司。高纯度质粒提取试剂盒、细胞病毒 DNA 提取试剂盒、DNA 快速连接试剂盒及 DOTAP 脂质体购自德国 Roche 公司,凝胶 DNA 片断回收试剂盒购自上海华舜公司。

1.1.3 引物 按 GenBank 公布的 B7-H1 cDNA 序列(accession No: U76456),设计一对引物,上游:5′- CGGAATTCTCAATGCCCCATACAACAAA-3′, 下游: 5′- CGGGATCCTGCTTGTCCAGATGACTTCG-3′,分别带有 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切位点。引物由日本 Takara 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 反义 B7-H1 穿梭质粒载体的构建与鉴定

1.2.1.1 质粒转化、扩增、提取及纯化 将感受态 *E. coli.* DH5-α 和质粒 DNA 冰浴 30 min,42 ℃热休克 90 s,冰浴 2 min,37 ℃水浴 5 min。加无抗生素的 LB 培养液 100 μl,37 ℃水浴 45 min。将转化菌液涂于含 Amp(100 μg/ml)的固体 LB 培养基平皿。37 ℃倒置培养过夜,以生长单菌落为转化成功。挑取单个转化菌落,接种到 5 ml LB 培养液中,37 ℃振摇过夜,进行质粒少量扩增。按质粒 DNA 少量提取试剂盒说明书提取及纯化质粒。

1.2.1.2 质粒 DNA 酶切片断的分离、回收和鉴定 用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ对 pDC315 和 B7-H1 cDNA 进行双酶切。酶切反应物在 0.75% 琼脂糖凝胶、5 V/cm 条件下电泳,待片断分开后切取含有 B7-H1 cDNA 片段和 pDC315 的凝胶,称质量(g)。按质粒 DNA 回收试剂盒操作说明书分别回收目的基因 B7-H1 片段和 pDC315。

1.2.1.3 pDC315ASB7-H1 重组子的构建 取回收 B7-H1 cDNA 片段 12 μl,pDC315 4 μl,加 ddH_2O 1 μl,于 45 ℃水浴 5 min,加 T4 DNA 连接酶 1 μl 及连接缓冲液 2 μl,置 16 ℃水浴反应过夜。挑取连接产物转化感受态 *E. coli.* DH5-α,接种于 5 ml LB 液体培养液中 37 ℃振摇培养过夜。碱裂解法小量抽提质粒,以 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切鉴定,再以 pDC315. ASB7-H1 为测序模板,送 Takara 公司测序。

1.2.2 反义 B7-H1 腺病毒载体的重组与鉴定

1.2.2.1 构建位置特异性重组产生反义 B7-H1 腺病毒载体

1.2.2.2 质粒的转化、提取和鉴定 参照 1.2.1.1 方法分别用感受态 *E. coli.* DH5-α 转化、小量质粒 DNA 提取试剂盒提取 pDC315. ASB7-H1 和 pBHGloxΔE1, 3Cre 质粒。pBHGloxΔE1, 3Cre 用 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定,再以 pBHGloxΔE1,3cre 为模板,用腺病毒基因组特征片段引物进行 PCR。上游:5′-GTGGCAGCGGCGCGGAAGAGAAC-3′,下游:5′-CGGGAAAGCGATTGAACACG-3′。反应条件:94 ℃、5 min→加 *Taq* 酶 1 μl(2.5 U)→94 ℃变性 30 s→58 ℃退火 30 s→72 ℃延伸 45 s,共 30 个循环→72 ℃温育 10 min→4 ℃结束反应。然后进行 1% 琼脂糖凝胶常规电泳。

1.2.2.3 脂质体介导 pDC315. ASB7-H1 和 pBHGloxΔE1,3Cre 共转染 293 细胞及阳性重组克隆筛选、扩增 参照 DOTAP 使用说明书转染 293 细胞。挑取空斑反复冻融、低速离,取上清 0.2 ml/孔加入 24 孔板中预先培养 90% 融合 293 细胞中,37 ℃培养 1 h,并摇动培养板 1 次/15 min,1 h 后再加入 1.5 ml/孔培养液。同时设立阴性转染对照。36 ~ 48 h 后,收集出现细胞病变效应的 293 细胞以 1 500 × g/min,室温离心 3 ~ 5 min,上清 - 70 ℃冻存。

1.2.2.4 反义 B7-H1 重组腺病毒载体的鉴定 取 250 μl 前述上清液,按细胞病毒 DNA 提取试剂盒说明书方法提取重组腺病毒,并将收集液保存于 - 20 ℃。以提取的重组病毒 DNA 作 PCR 模板,用 B7-H1 及腺病毒基因组特征片段引物进行扩 PCR 双重扩增。Ad 引物(564 bp):同前。B7-H1 引物(872 bp)上游:5′-TCAATGCCCCATACAACAAA-3′ ,下游:5′-TGCTTGTCCAGATGACTTCG -3′,反应条件:94 ℃ 5 min→ 加 *Taq* 酶 2.5 U (1 μl)→ 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 90 s, 72 ℃ 2 min, 30 个循环 → 72 ℃ 10 min → 4℃保存。然后进行 1% 琼脂糖凝胶常规电泳以鉴定 PCR 产物。

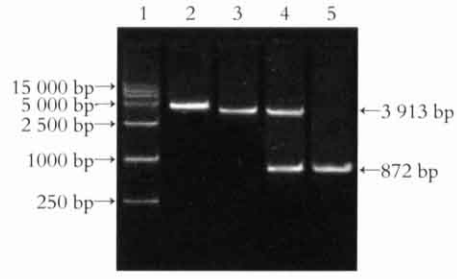
1.2.3 重组腺病毒载体的滴度测定 参照文献[3]测定病毒滴度,并按下列公式计算病毒滴度:

$$pfu/ml = \frac{10^5 \text{ 细胞} \times \text{稀释度} \times 10 \text{ 个病毒/细胞}}{0.2 \text{ ml}}$$

2 结果

2.1 反义 B7-H1 穿梭质粒 pDC315. ASB7-H1 的构建与鉴定

B7-H1cDNA 片段与线性化 pDC315 连接后产生重组子 pDC315. AS B7-H1,该重组子质粒经 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切后则产生 3.9 kb 和 872 bp 两条 DNA 片段,结果与理论酶切分子质量一致(图 1)。



1: 标准; 2: pDC315. B7-H1/*Eco*R Ⅰ; 3: pDC315/*Eco*R Ⅰ; 4: pDC315. ASB7-H1/*Eco*R Ⅰ + *Bam*H Ⅰ; 5: B7-H1 PCR 产物

图 1 pDC315. ASB7-H1 质粒酶切鉴定

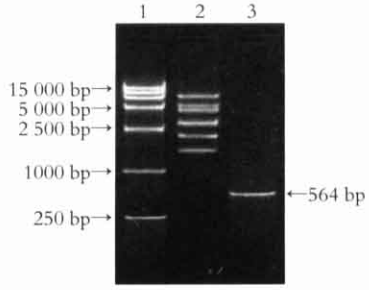
2.2 反义 B7-H1 穿梭质粒 pDC315. ASB7-H1 中外源性基因测序

由 Takara 公司完成,测序结果与 Imternet GenBank 中公布的 B7-H1 mRNA 序列比较,未发现有突变或碱基置换。说明重

组质粒获得成功。

2.3　pBHGlox△E1，3cre 的 PCR 及酶切鉴定

pBHGloxΔE1，3cre 用 *Hind*Ⅲ 酶切后，电泳可见典型的阶梯片段。以 pBHGloxΔE1，3cre 为模板，用腺病毒基因组特征片段引物进行 PCR，扩增出 564 bp 的片段（图 2），与理论预期值一致。



1：标准；2：pBHGloxΔE1，3Cre/*Hind*Ⅲ：DNA 片段；
3：pBHGloxΔE1，3Cre PCR 产物

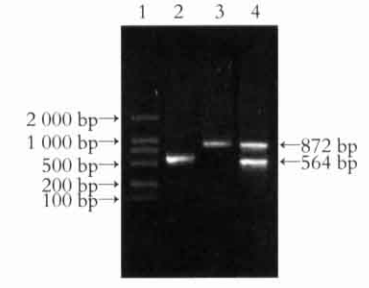
图 2　pBHGloxΔE1，3Cre 酶切鉴定及特征片段 PCR 产物

2.4　脂质体介导 pDC315. B7-H1 与 pBHGloxΔE1，3Cre 共转染 293 细胞

pDC315. B7-H1 与 pBHGloxΔE1，3Cre 以脂质体介导共转染 293 细胞后，产生重组的细胞对 293 细胞有致病效应。转染前 293 细胞多为多角形或梭形，胞体较小；转染后 10～12 d，细胞完全出现病变，大量细胞脱壁浮起，未脱壁细胞变圆呈葡萄珠状。而转染对照组 293 细胞生长至 12 d 未出现细胞病变，无空斑形成。

2.5　重组腺病毒载体克隆的 PCR 鉴定

用病毒 DNA 及目的基因特异片段双引物进行 PCR 双扩增，扩增出两条片段，一条为 564 bp 的腺病毒特异性片段，另一条为 872 bp 的 B7-H1 反义基因片段（图 3），证明挑取的空斑中带有目的反义 B7-H1 的重组腺病毒（Ad. ASB7-H1）。



1：标准；2：pBHGloxΔE1，3Cre PCR 产物；3：ASB7-H1 PCR 产物；
4：Ad. ASB7-H1 PCR 产物

图 3　重组腺病毒载体 Ad. ASB7-H1 鉴定

2.6　重组腺病毒载体的滴度测定

倍比稀释法测定病毒的空斑形成单位以评估转染液滴度，纯化提取的病毒经 10 倍倍比稀释后转染 293 细胞，36～48 h 后，稀释度为 10^5 以前的各稀释度转染孔均出现 CPE，用公式计算 Ad. ASB7-H1 滴度为 5×10^{10} pfu/ml。

3　讨论

B7-H1 是 1999 年 Dong 等[4] 进行 B7 分子同源序列分析时发现的，是 B7 协刺激分子家族中的新成员。人 B7-H1 基因位于人染色体 9p24。B7-H1 的 mRNA 在机体多种组织和绝大多数新鲜分离的人肿瘤细胞上均可见 B7-H1 的表达，如：肺癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤、头颈部肿瘤和乳腺癌等[5]。

一套高效安全的基因转移方法一直是肿瘤防治研究所追求的目标和基本要求之一。目前关于转基因研究的载体广泛选用腺病毒，腺病毒载体作为一种安全有效的基因转移工具具有众多优点[6]：①腺病毒基因组结构和功能已有较广泛深入的研究，为研制基因载体提供了坚实的基础；②容量大，所携带的基因片段可超过 7.5 kb，潜在负荷容量可达 30 kb；③感染效率高，为相同滴度逆转录病毒的 100～1 000 倍；易于收集，可获取滴度高（可达 10^{10}～10^{12} pfu/ml）。④适应范围广，其转染不依赖于细胞分裂，对增殖和非增殖细胞均可转染，DCs 等免疫细胞都是高度分化细胞，生理条件下在体内增殖不活跃，所以腺病毒载体适于 DCs 的基因转移。⑤遗传毒性较低，潜在危险性小，因为腺病毒感染和复制过程无需整合入宿主细胞基因组；由腺病毒介导的外源基因以附加型方式存在，避免了发生插入性突变的危险。因此，腺病毒载体已成为肿瘤基因治疗研究中基因转移应用最广泛的病毒载体。

重组腺病毒载体构建方法通常是：首先将目的基因连接到含多克隆酶切位点和筛选标志基因的穿梭质粒中，构建成携带外源基因的重组穿梭质粒；然后重组穿梭质粒与携带环状腺病毒 DNA 的质粒共转染包装细胞，通过同源重组获得重组腺病毒[7]。目前构建重组腺病毒载体主要有细胞内同源重组、细菌内同源重组、酶切重组及位置特异性重组等方法。位置特异性重组具有效率高、方法便捷等优点，故本实验选用位置特异性重组进行载体构建。

位置特异性重组又称保守重组，该重组过程不需要 *Rec*A 酶参与。目前常用的系统有 Cre/loxP、FLP/FRT 和 BP/attBP 系统等。Cre/loxP 系统主要原理[8]：腺病毒基因序列中包含有重组酶（Cre）序列和 LoxP 靶序列，Cre 为特异性重组酶，属于重组酶 λ 整合酶家族，LoxP 为特异性位点。Cre 重组酶可介导存在于同一条 DNA 分子内部的两个相同的 LoxP 位点之间进行重组，使得嵌于位点间的序列被切除（顺式剪切作用），产生两个重组产物，各含一个 LoxP 位点。293 细

胞共转染腺病毒基因质粒和穿梭质粒后，产生的 Cre 重组酶对两个质粒进行顺式剪切。由于 Cre 重组酶介导的顺式剪切作用过程是可逆的，故 Cre 重组酶可介导两个各含一个 LoxP 位点的分子之间进行位点特异性重组，产生整合作用而构建重组腺病毒载体。本研究将 pDC315ASB7-H1 与 pBHGlox△E1，3cre 用脂质体介导共转染 293 细胞，使其在复制过程中发生位置特异性重组，包装产生带有目的基因的腺病毒载体，并通过 PCR 法筛选、鉴定，得到携带 B7-H1 反义基因的复制缺陷型重组腺病毒载体。

由于本研究构建的载体需要将 B7-H1 cDNA 反向连接到穿梭质粒中，因此在 B7-H1 cDNA 片段的两端须具备匹配的酶切位点。我们在设计引物时引入了 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点，与穿梭质粒 pDC315 上的这两个酶切位点位置顺序相反，可按需要将 B7-H1 cDNA 片段定向连接到穿梭质粒上。在 PCR 过程中有可能发生碱基错配[9]，为确保 B7-H1 cDNA 序列的正确性，使用高保真 *Taq* 酶很有必要。

由于转基因要求所用的重组病毒载体达到一定滴度，才能满足转染要求。腺病毒易繁殖，其产生的病毒颗粒多集中在细胞内，因此有利于收集，可以获取较高的滴度。我们将实验中收集的病变 293 细胞采用反复冻融的方法，并经氯化铯梯度离心纯化，收集到的重组腺病毒载体转染液病毒滴度达 5×10^{10} pfu/ml，为下一步实验提供了保证。

我们成功构建了重组穿梭质粒 pDC315. ASB7-H1，并成功构建了含反义 B7-H1 的人类 5 型复制缺陷型腺病毒载体 Ad. ASB7-H1，获得的病毒滴度高，满足进一步实验的需求。

参考文献：

[1] TAMURA H, DONG H, ZHU G, *et al*. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function [J]. Blood, 2001, 97(6): 1809 - 1816.

[2] MAZANET M M, HUGHES C C. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis [J]. J Immunol, 2002, 169(7): 3581 - 3588.

[3] 孙树汉. 基因工程原理与方法[M]. 北京：人民军医出版社, 2001: 245 - 250.

[4] DONG H, ZHU G, TAMADA K, *et al*. B7-H1, a third member of the B7 family, comstimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J]. Nat Med, 1999, 64(5): 1365 - 1376.

[5] ISHIDA M, IWAI Y, TANAKA Y, *et al*. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues [J]. Immunol Lett, 2002, 84(1): 57 - 62.

[6] KIBBE M R, MURDOCK A, WICKHAM T, *et al*. Optimizing cardiovascular gene therapy: increased vascular gene transfer with modified adenoviral vectors [J]. Arch Surg, 2000, 135(2): 191 - 197.

[7] ELAHI S M, OUALIKENE W, NAGHDI L, *et al*. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease [J]. Gene Ther, 2002, 9(18): 1238 - 1246.

[8] BENIHOUD K, YEH P, PERRICAUDET M. Adenovirus vectors for gene delivery [J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10(5): 440 - 447.

[9] 陈昌杰，何蕴韶. 人神经营养素-4 基因的扩增及序列分析[J]. 四川解剖学杂志, 2000, 8(3): 133 - 135.

（编辑 陈聪连）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如：公元前 5 世纪，20 世纪 90 年代，1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或'95 年；1953 - 1958 年不能写成 1953 - 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用“:”分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2 计数和计量（整数、小数、分数、百分数，约数）包括序数，编号 4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如 2 431 改为 2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多，5 位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示。例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部