文章编号:1000-5404(2006)10-1043-03

论著

含 rPB-DR 启动子和 TK 基因的重组腺病毒的构建和鉴定

陈 勇[1],江 军[1],张 尧[1],张小容[2],贺伟峰[2],吴 军[2] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042,[2]西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建含 rPB-DR 启动子和 TK 自杀基因的重组复制缺陷型腺病毒并进行鉴定,为前列腺癌基因治疗的研究奠定基础。**方法** 应用分子克隆技术,将 rPB-DR 启动子连接至 pBluescript SK-TK 上构建出 pBluescript SK-rPB-DR-TK,再酶切出 rPB-DR-TK 目的片断,并将其连接至穿梭质粒 pShuttle 上。将构建好的 pShuttle-rPB-DR-TK 经 *Pme* Ⅰ单切线性化后再以电穿孔法转化至 *E. coli.* BJ 5183-AdEasy -1 内进行同源重组,抽提质粒经卡那抗性筛选及酶切鉴定正确的即为 pAd-rPB-DR-TK,再经 *Pac* Ⅰ酶切回收后以脂质体法转染人胚肾 293 细胞,包装出完整腺病毒,然后大量扩增测定滴度,并行 PCR 鉴定。**结果** 经酶切、PCR 及测序鉴定证实成功构建了包含 rPB-DR 启动子和 TK 自杀基因的重组复制缺陷型腺病毒 pAd-rPB-DR-TK,包装、扩增后测病毒滴度为 1.1×10^{8} $TCID_{50}$/ ml。**结论** 成功构建出包含 rPB-DR 启动子和 TK 自杀基因的重组复制缺陷型腺病毒并鉴定正确,可用于下一步前列腺癌基因治疗的研究中。

关键词:腺病毒;rPB-DR 启动子;TK 基因;前列腺癌;基因治疗
中图法分类号:R373;R394-33;R394.3 **文献标识码**:A

Construction and identification of recombinant adenovirus with rPB-DR promoter and TK gene

CHEN Yong[1], JIANG Jun[1], ZHANG Yao[1], ZHANG Xiao-rong[2], HE Wei-feng[2], WU Jun[2] ([1]Department of Urinary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hosptial, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct replication-defective adenovirus that was recombinated with rPB-DR promoter and TK gene. **Methods** The rPB-DR promoter was linked to pBluescript SK-TK and pBluescript SK-rPB-DR-TK was constructed, then the target gene rPB-DR-TK was cut by enzyme and subcloned into the multiple cloning site (MCS) of pShuttle, and the pShuttle-rPB-DR-TK plasmid was linearized with *Pme* Ⅰ, then transformed into *E. coli.* BJ5183-AdEasy-1 by electroporation. The plasmid was named as pAd-rPB-DR-TK after homologous recombination and identification by kanamycin-selection and restriction digestion. The recombinant adenovirus was made and amplified in the transfected HEK293 cells before test for viral titer and PCR identification. **Results** Identified by restriction endonuclease analysis and PCR, recombinant adenovirus with rPB-DR promoter and TK gene was constructed successfully, with a viral titer of 1.1×10^{8} $TCID_{50}$/ml. **Conclusion** The recombinant adenovirus containing rPB-DR promoter and TK gene has been constructed successfully, and this lays the foundation for the research of gene therapy of prostate cancer.

Key words: adenovirus; rPB-DR promoter; TK gene; prostate cancer; gene therapy

前列腺癌在我国的发病率近年来明显增高,大多数患者发现时已达进展期,传统治疗效果不佳。基因治疗的出现给前列腺癌的治疗提供了新的思路,其中自杀基因疗法尤其引人注目。单纯疱疹病毒胸苷激酶基因/羟基无环鸟苷(HSV-TK/GCV)系统是目前自杀基因研究中应用最多的方案之一,而载体通常选择腺病毒载体,其最大优势在于定点整合及非致病性。为了提高对前列腺癌细胞的特异杀伤作用,我们又引入改建过的前列腺特异启动子 rPB-DR[1],成功构建出包含 rPB-DR 启动子和 TK 自杀基因的重组复制缺陷型腺病毒,为下一步前列腺癌基因治疗的研究奠定基础。

基金项目:重庆市科委攻关课题(8191)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (8191)
作者简介:陈 勇(1976-),男,新疆维吾尔自治区石河子市人,硕士研究生,医师,主要从事前列腺癌基因治疗方面的研究。电话:(023)68757344
通讯作者:江 军,E-mail: jiangjun1964@yahoo.com.cn
收稿日期:2006-01-16;修回日期:2006-03-07

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 宿主菌 *E. coli.* DH5α 及复制缺陷型腺病毒载体系统，包括穿梭质粒 pShuttle，含有骨架质粒 pAdEasy-1 的 *E. coli.* BJ 5183 等均为第三军医大学全军烧伤研究所重点实验室惠赠；含 rPB-DR 启动子的质粒 PUC-119 由我实验室制备并保存；含 TK 自杀基因的质粒 pBluescript SK-TK 由第四军医大学鱼兵博士惠赠。

1.1.2 细胞培养 人胚肾 293 细胞（HEK293）由第三军医大学全军烧伤研究所重点实验室保存，培养液为 DMEM，其中含 5% 胎牛血清、100 IU 青霉素和 100 μg/ml 链霉素，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

1.1.3 主要试剂和试剂盒 限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Bam*H Ⅰ、*Not* Ⅰ、T_4DNA 连接酶、T_4DNA 聚合酶均购自大连宝生生物工程有限公司（TaKaRa）；*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ 酶购自 NEB 公司；质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司。

1.2 主要实验方法

1.2.1 pBluescript SK-rPB-DR-TK 的构建 用 *Bam*H Ⅰ 单切包含 rPB-DR 启动子的 PUC-119 后，回收线性化质粒片断，T_4 DNA 聚合酶平两端后，再用 *Hind* Ⅲ 单切，回收大小约0.5 kb目的片断（即 rPB-DR 启动子）待用；用 *Eco*R Ⅰ 单切 pBluescript SK-TK 后，回收线性化质粒片断，T_4DNA 聚合酶填平两端后，再用 *Hind* Ⅲ 单切，回收整个线性化质粒片断（即自多克隆酶切位点切除了几个 bp 的 pBluescript SK-TK，大小约 4.3 kb）待用；将以上两片段用 T_4 DNA 连接酶连接，连接产物转化大肠杆菌 *E. coli.* DH5α，挑取克隆，抽提质粒 DNA，再用 *Eco*R Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定，能切出 0.5 kb 左右的片断，将酶切鉴定正确的阳性克隆命名为 pBluescript SK-rPB-DR-TK。

1.2.2 穿梭质粒 pShuttle-rPB-DR-TK 的构建 用 *Hind* Ⅲ 和 *Not* Ⅰ 双酶切构建好的 pBluescript SK-rPB-DR-TK 质粒，回收 1.8 kb 左右的目的片断（即 rPB-DR-TK 片断）待用；用 *Hind* Ⅲ 和 *Not* Ⅰ 双切 pShuttle 质粒，回收整个线性化片断（即自多克隆酶切位点切除了几个 bp 的 pShuttle，大小约 6.6 kb）待用；将以上两片段用 T_4DNA 连接酶连接，连接产物转化大肠杆菌 *E. coli.* DH5α，挑取克隆，抽提质粒 DNA，再用 *Not* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定，能切出 1.8 kb 左右的片断，将酶切鉴定正确的阳性克隆命名为 pShuttle-rPB-DR-TK。抽提纯化质粒送北京三博远志生物公司测序。

1.2.3 细菌内同源重组法构建腺病毒质粒 100 μl 感受态 *E. coli.* BJ 5183-AdEasy -1 和 5 μl *Pme* Ⅰ 线性化的 pShuttle-rPB-DR-TK，在 2 500 V、200 Ω、25 μF 的条件下行电穿孔（Bio-Rad）。卡那抗性固体 LB 培养基筛选，挑取克隆，提取质粒 DNA，电泳初筛正确后应用 *Pac* Ⅰ 酶切鉴定，鉴定正确的阳性克隆的重组腺病毒质粒命名为 pAd-rPB-DR-TK。

1.2.4 重组腺病毒在 293 细胞中的包装 HEK 293 细胞长至 70% ~80% 融合时，用脂质体介导经 *Pac* Ⅰ 酶切线形化的 pAd-rPB-DR-TK 转染 293 细胞，具体方法参照 Lipofection 2000 说明书进行。2 h 后换成含 5% FBS 的 DMEM 培养液，培养 10 ~14 d，出现细胞病变效应（CPE），即原来贴壁的细胞肿胀、变圆、脱落。收集病变细胞，37 ℃、-70 ℃反复冻融 3 次，高速离心收集病毒上清，-70 ℃保存备用。

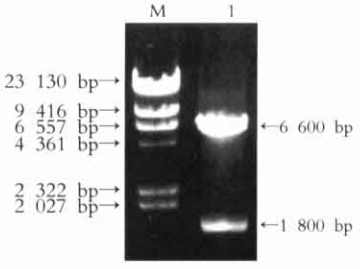
1.2.5 重组腺病毒的扩增和滴度测定 HEK293 细胞长至 70% ~80% 融合时，用重组腺病毒初提液感染细胞，培养 10 ~12 d后出现细胞病变效应，同前收集病毒。用该病毒液再感染 HEK293 细胞，如此重复 3 次。得到的病毒液同上鉴定正确后保存于 -70 ℃。扩增后的病毒滴度采用 TCID50 测定法进行测定。

1.2.6 重组腺病毒的鉴定 重组腺病毒的鉴定方法如下：取 100 μl 腺病毒初提液，加入 400 μl 腺病毒裂解液（0. 5% SDS，20 mmol/L EDTA ，50 μg/ ml 蛋白酶 K），55 ℃作用 1 h，酚、氯仿/氯仿抽提，无水乙醇沉淀，70% 乙醇洗涤，干燥后 20 μl ddH_2O 溶解腺病毒 DNA ，取 5 μl 同前进行 PCR 鉴定。

2 结果

2.1 pShuttle-rPB-DR-TK 的构建和鉴定

将 rPB-DR 启动子自 PUC-119 质粒上酶切下，连接到 pBluescript SK-TK 质粒上，构建出 pBluescript SK-rPB-DR-TK。再通过双酶切（*Not* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ）pBluescript SK-rPB-DR-TK 来获得 rPB-DR-TK 目的片断，将其连接到双酶切（*Not* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ）的 pShuttle 上，构建出 pShuttle-rPB-DR-TK。将酶切鉴定正确的质粒（图 1）送北京三博远志生物公司进行测序。

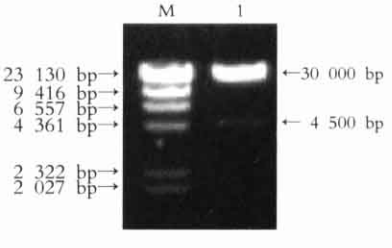


M：λ DNA/*Hind* Ⅲ 标准；1：pShuttle-rPB-DR-TK

图 1 pShuttle-rPB-DR-TK 酶切鉴定图谱

2.2 重组腺病毒的构建和包装

将 *Pme* Ⅰ酶切线性化的 pShuttle-rPB-DR-TK 用电穿孔法转化 BJ 5183-AdEasy-1 感受态细菌，进行细菌内同源重组。提取阳性克隆，经 *Pac* Ⅰ 酶切后，pAd-rPB-DR-TK 质粒能释放出约 4.5 kb 的片段（图 2）。用脂质体介导法将腺病毒质粒 pAd-rPB-DR-TK 转染 293 细胞，细胞病理学效应（CPE）在转染后 12 d 出现。



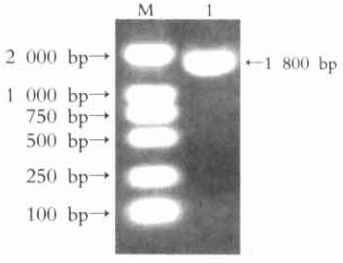
M：λ DNA/*Hind* Ⅲ 标准；1：pAd-rPB-DR-TK

图 2 pAd-rPB-DR-TK *Pac* Ⅰ 酶切鉴定图

2.3 重组腺病毒的鉴定和滴度测定

反复冻融回收的病毒可重复感染 293 细胞。抽提病毒 DNA，用 rPB-DR-TK 的引物和条件行 PCR，电泳后可见目的条

带(图 3)。应用终点稀释法测定重组腺病毒的病毒滴度为 1.1×10^{8} pfu/ ml。



M: DNA 标准;1: rPB-DR-TK

图 3　rPB-DR-TK 的 PCR 电泳图

3　讨论

Probasin(PB)是自大鼠前列腺背侧叶分离出的一种核碱性蛋白[2],其表达具有前列腺特异性[3]并受雄激素调节[4]。研究表明 PB 结构基因[4]全长为 17.5 kb,包含有 7 个外显子、6 个内含子及 426 bp 的上游调节序列,而其 5′端的片断(－426 至＋28 bp)主要调控着 PB 的表达。因此,国外学者将－426 至＋28 bp 的 PB 基因片断称为 rPB 启动子[5]。实验证实 rPB 启动子可驱动外源基因在活体前列腺组织内或体外培养的前列腺细胞特异的表达并受雄激素调节,因而被应用于前列腺癌基因治疗的研究中。rPB 启动子包含有 2 个雄激素结合位点(ARBS-1, －209 ~ －196 bp; ARBS-2, －107 ~ －93 bp),通过 ARBS 与雄激素受体(AR)结合而发挥作用。因此,rPB 启动子只能应用于雄激素依赖性前列腺癌细胞(AR 阳性)的实验中,而不能用于雄激素非依赖性前列腺癌细胞(AR 阴性)[6]。维甲酸受体与 AR 同属核转录因子超家族,Koshiuka 等[7]研究发现 AR 表达阳性和 AR 表达阴性的前列腺癌细胞均有维甲酸受体表达,而在正常前列腺细胞中无表达。我们在此基础上,利用维甲酸反应元件(RARE)替换出雄激素受体结合位点(ARBS-1; ARBS-2)而构建出 rPB-DR 启动子,使其在雄激素依赖性前列腺癌细胞(AR 阳性)和雄激素非依赖性前列腺癌细胞(AR 阴性)中均能发挥作用[1]。

TK 基因应用于前列腺癌的基因治疗是近年来的研究热点。体外实验证实对前列腺癌细胞的杀伤作用显著[8],体内实验证实可明显抑制裸鼠皮下前列腺癌移植瘤的生长[9],I期临床实验表明:TK 基因治疗引起的毒性反应少,而且轻微,但其疗效有待进一步提高[10]。

本实验使用的复制缺陷型腺病毒载体系统包括两部分:一是穿梭质粒 pShuttle,具卡那霉素抗性,可将目的基因克隆入其多克隆位点(multiple cloning site, MCS);二是复制缺陷型腺病毒基因组质粒载体,通过与穿梭质粒重组可将目的基因连同其前方的调控序列一同亚克隆至腺病毒载体。该腺病毒是一种 E1 区和 E3 区缺失的复制缺陷型人血清 5 型腺病毒,感染性病毒颗粒所必需的 E1 区由转化了 E1 区的包装细胞即 293 细胞提供。利用细菌内同源重组的方法,明显提高了病毒重组的效率,缩短了病毒载体构建的时间。

我们将 rPB-DR 启动子连接至 pBluescript SK-TK 上,再酶切出所需片断 rPB-DR-TK,并将其连接至穿梭质粒 pShuttle 上。PmeI 单切 pShuttle-rPB-DR-TK 线性化后,将其以电穿孔法转化至 *E. coli.* BJ 5183-AdEasy-1 内进行同源重组,抽提出正确的 pAd-rPB-DR-TK,再经 *Pac* Ⅰ酶切回收后以脂质体法转染人胚肾 293 细胞,包装出完整腺病毒,然后大量扩增测定滴度为 1.1×10^{8} $TCID_{50}$/ml,PCR 鉴定正确。我们成功的构建了包含 rPB-DR 启动子和 TK 自杀基因的重组复制缺陷型腺病毒,为下一步前列腺癌基因治疗的体内体外实验奠定了基础。

参考文献:

[1] 张　尧, 江　军, 王洛夫. 前列腺特异性启动子 rPB 的改造及其载体质粒的构建和活性测定[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 981－984.

[2] MATUO Y, NISHI N, NEGI T, *et al*. Isolation and characterization of androgen-dependent non-histone chromosomal protein from dorsolateral prostate of rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 109(2): 334－340.

[3] MATUSIK R J, KREIS C, MCNICOL P, *et al*. Regulation of prostatic genes: role of androgens and zinc in gene expression[J]. Biochem Cell Biol, 1986, 64(6): 601－607.

[4] DODD J G, SHEPPARD P C, MATUSIK R J. Characterization and cloning of rat dorsal prostate mRNAs. Androgen regulation of two closely related abundant mRNAs[J]. J Biol Chem, 1983, 258(17): 10731－10737.

[5] GREENBERG N M, DEMAYO F J, SHEPPARD P C, *et al*. The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice[J]. Mol Endocrinol, 1994, 8(2): 230－239.

[6] IDE H, OSADA Y, YOSHIDA T, *et al*. Evaluation of prostate-specific promoters for a suicide gene therapy of prostate cancer[J]. Nishinihon J Urol, 1999, 57: 412－417.

[7] KOSHIUKA K, ELSTNER E, WILLIAMSON E, *et al*. Novel therapeutic approach: organic arsenical melarsoprol) alone or with all-trans-retinoic acid markedly inhibits growth of human breast and prostate cancer cells in vitro and in vivo[J]. Br J Cancer, 2000, 82(2): 452－458.

[8] LOIMAS S, TOPPINEN M R, VISAKORPI T, *et al*. Human prostate carcinoma cells as targets for herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(2): 137－144.

[9] EASTHAM J A, CHEN S H, SEHGAL I, *et al*. Prostate cancer gene therapy: herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed by ganciclovir in mouse and human prostate cancer models[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(4): 515－523.

[10] SIMPSON L, PARSONS R. PTEN: life as a tumor suppressor [J]. Exp Cell Res, 2001, 264(1): 29－41.

(编辑　陈聪连)