文章编号:1000-5404(2007)09-0759-04

论著

人 DeltaNp73α 基因重组腺病毒载体的构建及其鉴定

胡义杰,范士志,蒋耀光,何 勇 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

提 要:目的 利用 Adeasy 腺病毒载体系统构建含人 DeltaNp73α cDNA 的重组腺病毒并在 293 细胞中扩增制备重组病毒。**方法** 从 pcDNA3-DeltaNp73α-HA 中酶切出 DeltaNp73α 基因,并插入 pAdTrack-CMV 中构建成腺病毒穿梭质粒;pAdTrack-CMV-DeltaNp73α 线性化后电穿孔法转化到含有腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的 *E. coli.* BJ5183 菌株内同源重组。筛选正确的重组质粒,*Pac* Ⅰ 线性化后脂质体法转染 293T 细胞包装成重组病毒颗粒;并在 293T 细胞中反复扩增;增强离心法转染树突状细胞,Western blot 检测目的蛋白的表达。**结果** 经限制性内切酶酶切鉴定、PCR 筛选、基因测序和 GFP 表达证实成功构建了携带 DeltaNp73α cDNA 的重组腺病毒载体并制备出高滴度的重组病毒;Western blot 检测出预期相对分子质量为 67×10^3 的特异条带。**结论** 成功构建了携带 DeltaNp73α cDNA 的重组病毒。

关键词: 重组腺病毒;DeltaNp73α

中图法分类号: R373;R394-33; R734.2 **文献标识码:** A

Construction of recombinant adenovirus carrying human DeltaNp73α cDNA with Adeasy system

HU Yi-jie, FAN Shi-zhi, JIANG Yao-guang, HE Yong (Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct recombinant adenovirus carrying human DeltaNp73α cDNA. **Methods** Human DeltaNp73α cDNA was cloned into adenovirus transfer vector pAdTrack-CMV. The obtained plasmid, pAdTrack-CMV-DeltaNp73α, was then linearized with *Pme* Ⅰ and transformed into *E. coli.* strain BJ5183 containing pAdeasy-1, the viral DNA plasmid, for homologous recombination. The adenoviral recombinant was then cleaved with *Pac* Ⅰ and transfected into 293T cells to produce viral particles. The virus was then transfected into dentritic cells, and the expression of DeltaNp73α was proved by GFP expression and Western blotting. **Results** Recombinants were confirmed right by restriction enzyme analysis, PCR on viral lysate and expression of green fluorscence protein. A band of 67×10^3 was observed by Western blotting as expected. **Conclusion** The recombinant adenovirus carrying human DeltaNp73α cDNA is successfully constructed, paving the way for further research about its high expression in interested cells.

Key words: recombinant adenovirus; DeltaNp73α

DeltaNp73α 基因是 2001 年发现的 p53 家族成员 p73 的异构体。研究表明 DeltaNp73 因为 N 末端转录活化区缺失其转录活化功能完全丧失,对 p53 和全长型 p73 的转录活化和促凋亡活性有明显的负调节作用[1],在肺癌组织中明显高表达,而正常肺组织中几乎不表达;在肺癌的基因、免疫等综合治疗中具有良好的靶向性。本科既往通过构建 DeltaNp73α 反义载体转染肺癌细胞,抑制肺癌细胞及肺癌血管内皮细胞内 DeltaNp73α 的表达,而抑制肺癌细胞及肺癌血管内皮细胞的生长并促进其凋亡[2]。DeltaNp73 可能是一个肺癌分子治疗重要的新靶点,对 DeltaNp73 的深入研究成为目前肿瘤生物治疗的一大热点。本研究利用腺病毒 Adeasy 载体系统成功地构建含人 DeltaNp73α 基

基金项目: 国家自然科学基金(30600611),第三军医大学中青年基金(XG200540)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30600611) and the Research Funds for Young Scholars by Third Military Medical University of China(XG200540)

作者简介: 胡义杰(1979-),男,湖北省荆门市人,博士研究生,医师,主要从事肺癌生物治疗方面的研究。电话:13228687328, E-mail:gysjf_hu@yahoo.com.cn

通讯作者: 何 勇,E-mail:heyong8998@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-12-12;**修回日期:** 2007-01-11

因的重组腺病毒，能达到使 DeltaNp73α 在各种靶细胞中的稳定高效表达的目的，为进一步研究人 DeltaNp73α 基因的功能奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

真核表达质粒 pcDNA3-DeltaNp73α-HA 由意大利罗马大学 Gerry Melino 教授和 Vincenzo De laurenzi 博士惠赠，含 DeltaNp73α 基因 cDNA 全长约 1.7 kb。pAdTrack-CMV 由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所贺伟峰博士惠赠。*Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ限制性内切酶以及 T_4 DNA 连接酶分别为 TaKaRa、NEB 公司产品。脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。Anti-HA Tag Mouse monoclonal Antibody 购自 Applygen 公司；goat anti-mouse IgG/HRP 二抗购自 Biosythesis。

1.2 菌株与细胞株

293T 细胞、*E. coli.* BJ5183、DH5α 大肠杆菌由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所提供。

1.3 PCR 筛选引物设计

参照 GenBank 中获得的 DeltaNp73α cDNA 的序列，根据测序的要求，采用 Primer 5.0 软件设计 1 对 DeltaNp73α cDNA 的引物（由 Invitrogen 公司合成），序列如下：上游引物 5′-GACCGAAAAGCTGATGAGGA-3′；下游引物 5′-CAGGTCCTCAATGGTCAGGT-3′。

1.4 pAdTrack-DeltaNp73α 质粒的构建及鉴定

将 pcDNA3-DeltaNp73α-HA 质粒转化 DH5α 大肠杆菌扩增后，大量提取 pcDNA3-DeltaNp73α-HA 质粒。部分含上述质粒的菌液送上海博亚生物工程有限公司测序。用 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切，获得约 1.9 kb 含 HA 标记的 DeltaNp73α 基因片段。腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 亦采用 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切，回收获得大小约为 9.2 kb 的载体 DNA 片段。目得基因片段与载体 DNA 片段在 16 ℃连接 1 h 后，4 ℃过夜。将连接产物转化感受态 DH5α 大肠杆菌，接种卡那霉素抗性平板培养过夜后，挑取阳性克隆扩增；试剂盒抽提获得重组穿梭质粒。对此重组穿梭质粒 pAdTrack-DeltaNp73α 进行 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切，0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 pAdTrack-DeltaNp73α 与 pAdeasy 的同源重组及鉴定

将正确重组的穿梭质粒 pAdTrack-DeltaNp73α 用 *Pme* Ⅰ酶切线性化后，电穿孔转化含腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的高活性感受态 *E. coli.* BJ5183 菌。接种卡那霉素抗性平板培养过夜后，挑取阳性克隆扩增并抽提重组质粒。经 *Pac* Ⅰ酶切鉴定，将正确的重组子再次转化 DH5α 大肠杆菌，筛选阳性克隆并提取纯化，得到重组腺病毒质粒 pAd-DeltaNp73α-HA。

1.6 人 DeltaNp73α 基因重组腺病毒的包装、鉴定及滴度测定

①293T 细胞的培养：含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。至转染前 293T 细胞的融合应达到 90% ~95%。②重组腺病毒质粒转染 293T 细胞：重组腺病毒质粒 pAd-DeltaNp73α 经 *Pac* Ⅰ酶切线性化（大片段电泳胶回收）后，采用脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染 6 孔培养板中的 293T 细胞，继续 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。培养过程中光镜观察细胞形态以及倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达及其变化情况。③包装的重组腺病毒鉴定：蛋白酶 K 处理过的重组腺病毒液进行 PCR 扩增。④重组腺病毒的滴度测定：通过测定基因转移单位（gene transfect unit，GTU）来描述病毒溶液的滴度，即通过测定在 1 个感染周期结束前能表达报告基因 GFP 的细胞数量。将浓缩后的病毒溶液作不同比例的稀释，取 100 μl 稀释液加至 293T 细胞培养瓶中，放置 37 ℃吸附 30 min，换新鲜培养基继续培养 18 ~24 h，于倒置荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数；按公式计算病毒滴度（pfu/ml）。

病毒滴度 = GFP 细胞阳性数 × 病毒上清稀释倍数/0.1 ml

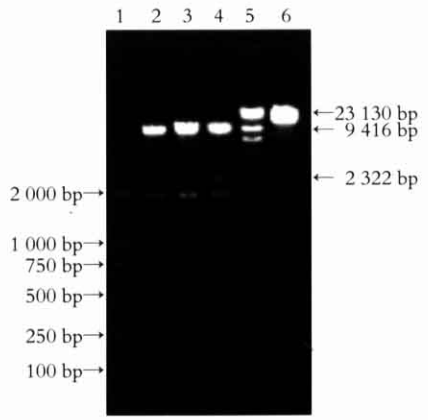
1.7 DeltaNp73α 腺病毒载体在树突状细胞中的表达

根据文献[3]提供的方法，培养树突状细胞；在培养第 6 天采用增强离心方法[4]将 MOI 200 重组人 DeltaNp73α 腺病毒转染未成熟树突状细胞；转染 48 h 后观察绿色荧光蛋白的表达、Western blot 分析鉴定 DeltaNp73α 蛋白的表达。

2 结果

2.1 pAdTrack-DeltaNp73α 质粒的鉴定

对重组穿梭质粒 pAdTrack-DeltaNp73α 进行 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切，0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定：得到大小约 1.9 kb 和 9.2 kb的 2 个片段，与插入的目的片段大小一致（图 1）。上海博亚生物工程有限公司测得序列与 GenBank 提供的 DeltaNp73α 序列一致。

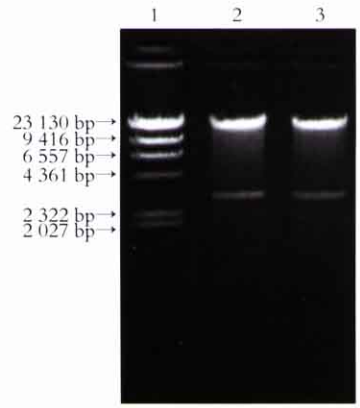


1：标准（DL 2000）；2 -4：pAdTrack-DeltaNp73α 双酶切产物；5：*Hind* Ⅲ 标准；6：pAdTrack-DeltaNp73α *Pme* Ⅰ线性化产物

图 1 pAdTrack-DeltaNp73α 穿梭质粒行双酶切及其 *Pme* Ⅰ线性化

2.2 pAd-DeltaNp73α 的鉴定

用 *Pac* Ⅰ酶切重组腺病毒质粒 pAd-DeltaNp73α 可以得到大小 2 个片段，大片段约为 30 kb（图 2）。

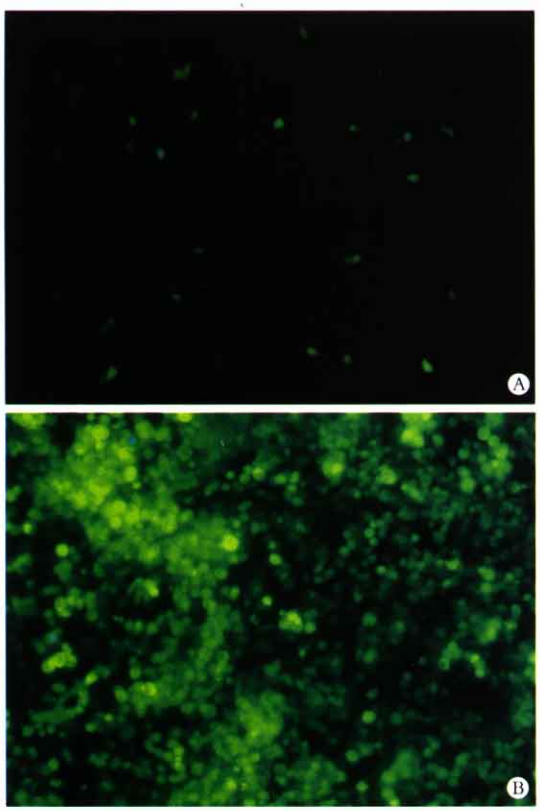


1：*Hind* Ⅲ标准；2，3：pAd-DeltaNp73α-HA *Pac* Ⅰ酶切产物

图 2　重组腺病毒质粒 pAd-DeltaNp73α *Pac* Ⅰ线性化

2.3　人 DeltaNp73α 基因重组腺病毒的包装

用 *Pac* Ⅰ线性化重组腺病毒质粒 pAd-DeltaNp73α 后转染 293T 细胞，培养约 10 d 可观察到细胞病变效应（cytopathieffect，CPE）：细胞出现空泡样病变，倒置荧光显微镜下见绿色荧光逐渐增加（图 3）；贴壁的 293T 细胞逐渐呈悬浮生长。将该病毒上清再次感染 293T 细胞，收集细胞沉淀；经 PCR 鉴定，可以扩增出 1 条约 680 bp 的条带（与预期扩增片段大小相符）。重组腺病毒在 293T 细胞大量扩增后，－20 ℃/37 ℃反复冻融，离心收集病毒培养上清后分装，－70 ℃保存备用。经过 3 轮反复感染后测定病毒滴度为 2.5×10^8 pfu/ml。

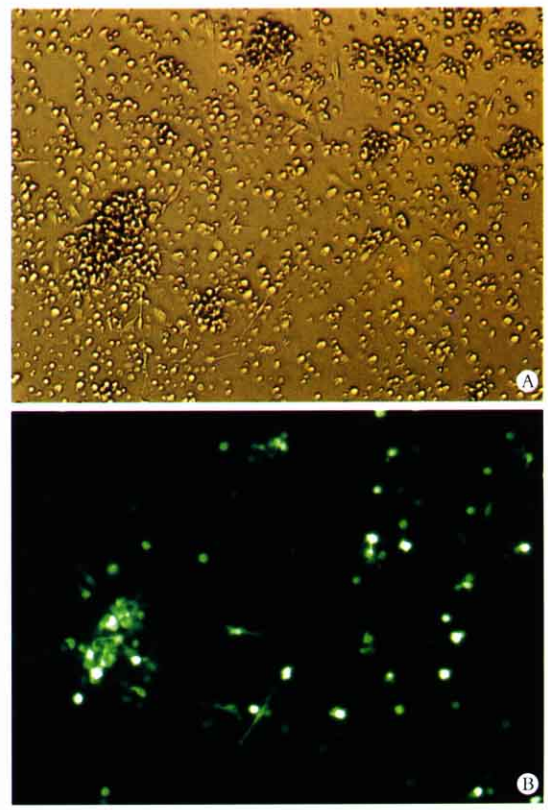


A：12 h；B：10 d

图 3　重组腺病毒转染 293T 细胞后绿色荧光蛋白的表达　（倒置荧光显微镜×100）

2.4　DeltaNp73α 在树突状细胞（DCs）中的表达

增强离心法重组腺病毒感染未成熟树突状细胞，在感染后 24 h 即可见绿色荧光蛋白表达（图 4），以后渐增强。通过 Western bolt 检测带 HA 标签的 DeltaNp73α 蛋白表达，在相对分子质量为 67×10^3 附近可见明显条带。



A：转染 DCs 24 h 表现　（LM×100）；B：转染 DCs 24 h 绿色荧光表达　（倒置荧光显微镜×100）

图 4　重组腺病毒转染 DCs

3　讨论

DeltaNp73α 是属于 p53 基因家族中 p73 的异构体。与 p73 相比较，它的 N 端转录活化区发生缺失；在正常组织中 DeltaNp73α 不表达，但在肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌以及神经母细胞瘤等肿瘤组织中高表达[5]。Cuadros 等[6]证实 DeltaNp73α 在 B 和 T 细胞非何杰金淋巴瘤中高表达，其中在 B 细胞非何杰金淋巴瘤中的量高于 T 细胞非何杰金淋巴瘤 10 倍。Guan 等[7]研究了 P73 蛋白产物在前列腺癌和前列腺增生组织中的表达情况，发现正常组织中不表达 DeltaNp73α，而在前列腺癌组织和前列腺增生组织中高表达；且其表达水平与前列腺癌 Gleason 评分显著相关；提示 DeltaNp73α 在前列腺癌进展中的重要作用。我们及 Uramoto 等[8-10]的通过单因素及多因素分析显示 DeltaNp73α 的阳性表达和临床病理的 T、N 分

期一样，是提示肺癌患者预后的重要独立因素。这也使得 DeltaNp73α 蛋白可能作为肺癌免疫抗瘤治疗的重要靶点。我们在动物实验中，通过向肺癌细胞中转染反义 DeltaNp73α 基因，封闭 DeltaNp73α 的表达，可以使其对 p53 和 Tap73 的抑制失活，恢复正常的细胞凋亡并抑制肺癌细胞的增殖[2]。因此，DeltaNp73 为肺癌等肿瘤生物、免疫治疗提供了较好的靶点。

进一步研究 DeltaNp73 在肿瘤细胞中的功能以及开发针对 DeltaNp73 特异靶点的抗瘤疫苗，需要实现 DeltaNp73 高效稳定的转染或表达。而在目前所有转染手段中，重组腺病毒因为容易将外源基因导入受体细胞并表达、效率高、基因转移过程中不易受 DNA 酶的降解等有点备受青睐。目前重组腺病毒构建的方法较多，包括：体外连接法、293 细胞内的同源重组法、细菌内的同源重组法以及改进的体外连接法[11]。本研究采用腺病毒 Adeasy 系统，其骨架质粒 pAdeasy-1 带有病毒的大部分基因组，已经被转化到 BJ5183 细胞中，该特性显著降低了由于非重组穿梭质粒所引起的背景，使其更容易获得含有重组腺病毒质粒的克隆。另外，穿梭质粒 pAdTrack-CMV 具有左右臂同源区，借助 *E. coli.* BJ5183 细菌内高效的同源重组机制并进行抗生素筛选，可以在很短的时间内得到重组腺病毒质粒。再经 *Pac* Ⅰ 酶切线性化后转染 293T 包装细胞，即可得到表达外源基因的重组腺病毒，该方法简化了实验步骤，缩短了载体构建周期。而载体中融合的 GFP，不影响 DeltaNp73 在后续研究中的作用，也可以为后续实验提供示踪的作用。

总之，本实验成功构建了携带人 DeltaNp73 cDNA 基因的重组腺病毒，并获得了较高的病毒滴度。这就为利用构建的重组腺病毒转染肿瘤细胞研究 DeltaNp73 的功能，以及转染树突状细胞并在靶部位获得其长期而高效的表达，构建 DeltaNp73 特异性的 DC 疫苗等抗瘤研究奠定了基础。

（致谢：感谢意大利罗马大学 Gerry Melino 教授和 Vincenzo De laurenzi 博士惠赠 pcDNA3-DeltaNp73α-HA；感谢第三军医大学大坪医院野战外科研究所蒋建新教授和西南医院全军烧伤研究所贺伟峰博士给予的技术支持！）

参考文献：

[1] Tomkova K, Belkhiri A, El-Rifai W, *et al*. p73 isoforms can induce T-cell factor-dependent transcription in gastrointestinal cells[J]. Cancer Res, 2004, 64(18): 6390－6393.

[2] 何 勇，范士志，蒋耀光，等. ΔNp73 基因在人非小细胞肺癌中的转录表达及其临床意义[J]. 中国肺癌杂志，2006，9(3)：263－266.

[3] Morse M A, Zhou L J, Tedder T F, *et al*. Generation of dendritic cells in vitro from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha for use in cancer immunotherapy[J]. Ann Surg, 1997, 226(1): 6－16.

[4] Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, *et al*. Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells[J]. J Immunol Methods, 2001, 253(1－2): 113－124.

[5] Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, *et al*. Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73[J]. Cancer Res, 2002, 62(3): 636－641.

[6] Cuadros M, Ribas G, Fernandez V, *et al*. Allelic expression and quantitative RT-PCR study of TAp73 and DeltaNp73 in non-Hodgkin's lymphomas[J]. Leuk Res, 2006, 30(2): 170－177.

[7] Guan X, Peng J R, Yuan L, *et al*. A novel, rapid strategy to form dendritomas from human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells using mature dendritic cells derived from human peripheral blood CD14 + monocytes within 48 hours of *in vitro* culture[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(24): 3564－3568.

[8] 何 勇，范士志，蒋耀光，等. DNp73 反义基因对人肺腺癌细胞系生物学行为的影响[C]//首届全国胸部肿瘤外科学术研讨会. 海口：2003，3 月 21 日.

[9] Uramoto H, Sugio K, Oyama T, *et al*. Expression of the p53 family in lung cancer[J]. Anticancer Res, 2006, 26(3A): 1785－1790.

[10] Uramoto H, Sugio K, Oyama T, *et al*. Expression of DeltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(20): 6905－6911.

[11] Mizuguchi H, Kay M A, Hayakawa T. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 52(3): 165－176.

（编辑 邓强庭）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱（mmHg），但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡]（kPa）的换算系数（1 mmHg＝0.133 kPa）。

本刊编辑部