维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0641-04

耐药相关新基因 HA117 的克隆及重组腺病毒制备

郭玉霞,罗 庆,徐酉华

(重庆医科大学附属儿童医院血液肿瘤科,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建表达耐药相关新基因 HA117 的重组腺病毒表达系统。方法:用基因工程技术将耐药相关新基因 HA117 的 cDNA 亚克隆至穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上,然后在细菌内与 pAdEasy 同源重组,将重组腺病毒 Ad5-HA117 经脂质体转染 293 细胞包装、扩增腺病毒颗粒,通过荧光显微镜及流式细胞仪进行检测。结果:酶切鉴定及 PCR 结果证明耐药相关新基因 HA117 重组腺病毒载体构建成功,构建的耐药新基因 HA117 重组腺病毒载体的效价达到 8.3×10^{11}PFU/ml。结论:成功构建了表达 ATRA 相关耐药新基因 HA117 的重组腺病毒载体,为后续对 HA117 基因的相关研究奠定了基础。

【关键词】基因 HA117;腺病毒;转染

【中国图书分类法分类号】R737.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-06

Cloning of human HA117 gene and preparation of itsrecombinant adenovirus vector

GUO Yu-xia, et al

(*Department of Hematology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the recombinant adenovirus expressing human HA117 gene. *Methods*: The eDNA of HA117 gene was subcloned into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV and then the homologous recombinant adenovims genomie plasmid pAdEasy was cloned in bacteria. We tranfected the DNA of identified recombinant plasmid into 293 cells via liposome, made the package and amplification of adenovims, and determined them by fluorescence microscope and flow eytometry. *Results*: Restriction endonuelease and PCR analysis confirmed that the recombinant adenovims vector of HA117 gene was successfully constructed. The titer of the recombinant adenovims was 8.3×10^{11}PFU/ml, and the expression of HA117 gene was observed. *Conclusion*: The recombinant adenovims expressing HA117 gene was successfully constructed, which paves the way for the following studies related to HA117.

【Key words】 Gene HA117; Adenovirus; Transfection

恶性肿瘤是严重威胁人类生命健康的疾病,已成为造成人类死亡的第二位疾病原因,且发病率呈逐年上升趋势。目前的研究已认识到,恶性肿瘤是一种全身性、异质性的疾病,需手术、化疗、放疗、生物治疗、免疫治疗等综合治疗。而化疗在根治恶性肿瘤尤其是白血病的综合治疗中起着不可替代的作用。化疗实施中所致的肿瘤细胞对化疗药物产生耐药是化疗成功的最大障碍。因此,研究肿瘤的多药耐药性已成为生命科学研究的重点[1]。本课题组通过建立 HL-60/ATRA 多药耐药细胞系[2],采用抑制消减杂交方法结合基因芯片技术建立消减文库,筛选并克隆出在 HL-60/ATRA 差异表达的基因。为了进一步研究其功能,本实验构建新耐药相关基因 HA117 表达的腺病毒穿梭载体,经同源重组后,转染 AD-293 细胞包装成腺病毒,并对其进行PCR 鉴定、病毒滴度等检测,从而为证明耐药相关新基因 HA117 的功能奠定基础。

作者介绍:郭玉霞(1977-),女,博士,研究方向:肿瘤基因治疗。

通讯作者:徐酉华,女,教授,E-mail:etzhl@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471985)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 含 HA117 基因的质粒 PUC57-HA117(本实验室保存),BJ5183 菌株及其衍生物 Adeasy-1 细胞、含绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的穿梭质粒

维普资讯 http://www.cqvip.com

pAdTraek-CMV、腺病毒基因组质粒 pAdeasy-1 由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室 TONG-Chuan HE 教授惠赠。DH5α 细菌及腺病毒包装 293 细胞由本室保存。

1.1.2 酶类和主要生化试剂 限制性内切酶、T4 连接酶购自 NEB 公司，LA Taq DNA 聚合酶、质粒 DNA 提取及回收试剂盒、RT-PCR 试剂盒等购自 Takara 公司，脂质体 Lipofectamine 购于 Invitrogen 公司，DMEM 培养基及胎牛血清为 Hyclone 公司产品，PCR 引物由 Takara 合成。DNA 测序委托大连 TaKaRa 公司进行。

1.2 方法

1.2.1 编码 HA117 基因 cDNA 序列 DNA 片段的克隆 以含 HA117 基因的质粒 PUC57-HA117 为模板进行 PCR 反应。上游引物：5'-GGCGGTACCATGGGCAGCGGGAATCTGCACTGT-3'，下游引物：5'-GCCAAGCTTTCACTCCCAACCAGGCTGCCAGGC-3'（上下游引物 5'端分别引入 *Hind* Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ酶切位点）；扩增条件：94℃ 5min，94℃ 30s，65℃ 30s，72℃ 1min，共 35 个循环 72℃ 7min。扩增完毕后 PCR 产物进行纯化及测序鉴定。

1.2.2 腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV，HA117 的构建 用 *Hind* Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ双酶切腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 和 HA117PCR 产物回收片段，DNA 酶切后用胶回收试剂盒分别回收 HA117 片段和 pAdTrack-CMV 载体骨架，用去磷酸化酶将酶切后的载体去磷酸化，收获载体，同时目的基因 HA117 的 DNA 进行纯化，用 T4 连接酶将两者连接，转导感受态细菌 DH5α，挑选转化后中等大小克隆，PCR 法筛选克隆后酶切鉴定正确后送大连 TaKaRa 公司进行测序分析[3]。

1.2.3 重组腺病毒 Adeasy-HA117 的构建及鉴定 *Pme* Ⅰ酶切质粒 DNA pAdTrack-HA117 使其线性化，$CaCl_2$ 法转导酶切后的质粒 pAdTrack-HA117 入腺病毒同源穿梭质粒 BJ-Adeasy 中，产物涂布于含卡那霉素的 LB 平板，置于 37℃，5%CO_2 孵箱中孵育过夜，在 LB 平板上随机挑选 10 个偏小的、独立的克隆，接种于 2ml 含卡那霉素的 LB 培养液中，37℃振荡过夜；碱裂解法小量抽提质粒，根据琼脂糖凝胶电泳质粒大小筛选出筛选已导入 HA117 的质粒 BJ-Adeasy-HA117 阳性克隆；转导 BJ-Adeasy-HA117 入感受态细胞 DH5α，培养生长腺病毒质粒 Adeasy-HA117，进一步用 *Pac* Ⅰ酶切鉴定 Adeasy-HA117[3]。

1.2.4 重组腺病毒的包装、扩增和纯化 将准备好的经 *Pac* Ⅰ酶切后的 30 mlAdeasy-HA117，30ml 脂质体，500ml DMEM 培养基（不含 FBS，含 1% P/S）混合于 2ml 的微量离心管中，室温下放置 10~30min；将 12～16h 前准备的细胞融合度已达到 40%～80%的 293 细胞取出，吸去培养基，加入 2ml 不含 FBS 的 DMEM 培养基，轻轻洗涤细胞后吸去培养基，再次加入 2.5ml 不含 FBS 的 DMEM 培养基，置入 5% CO_2，37℃孵箱中孵育约 10min；将脂质体混合液加入 293 细胞，轻轻地摇晃培养瓶后，置入 5% CO_2，37℃孵箱中孵育；3~6h 后，吸去不含 FBS 的 DMEM 培养基，加入 6.0～8.0ml 完全 DMEM 培养基（含 10%FBS，1%P/S），放入 5%CO_2，37℃孵箱中孵育；48～96h 后，观察荧光以检查转染是否成功；转染成功后 10～14d 后，待大部分细胞飘浮，将细胞收集到 50ml 离心管中，1 000r/min 离心 5min，移去 DMEM 培养基，加入 2ml 消毒的 PBS；干冰中冰冻 10min，37℃温水中溶解 10min，震荡；重复冻溶过程 3 次；收集含病毒的上清并用以感染准备好的 293 细胞，将重组腺病毒大量扩增，乒乓交互感染扩增 3 轮后用 CsC1 密度梯度离心纯化后，收获高滴度 Ad5-HA117 腺病毒，保存于 -80℃待用[3]。

1.2.5 重组腺病毒的滴度测定 测定前 12～16 h，在 24 孔板中接种 293 细胞（10^5 个/孔），第 2d 依次加入按 10 倍比稀释的待检病毒悬液 400ml，37℃感染 60min 后，吸去400ml 上清，加入 1ml DMEM 培养基继续培养，24h 后在荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况，并按下列公式计算病毒滴度[3]，病毒滴度（PFU/ml）=（GFP 阳性细胞数 × 病毒上清稀释倍数）/0.4。

1.2.6 重组腺病毒的鉴定 抽提重组腺病毒基因组 DNA，采用 PCR 的方法对其进行鉴定。上游引物：5'-CAGAGTCAGGGACTTCAGCCTTAT-3'；下游引物：5'-CTGTTTCCTTCTCACTCCCAACCA-3'；扩增条件：94℃ 5min，94℃ 30s，68℃ 30s，72℃ 1min，共 35 个循环 72℃ 7min。

2 结 果

2.1 质粒的构建及鉴定

2.1.1 HA117 基因 cDNA 片段的获得 经 PCR 扩增后可获得长度为 1 110bp 的 cDNA 片段。见图 1。

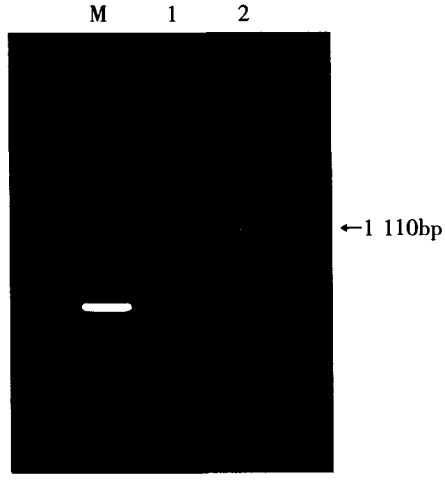


图 1 PCR 扩增后的得到的 HA117 基因 cDNA 片段大小为 1 110bp

2.1.2 pAdTrack-CMV/HA117 的酶切鉴定 用 *Hind* Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ双酶切质粒后琼脂糖电泳检测到大小分别为 9kb（质粒架）和 1 110bp（HA117 基因）的 DNA 片段，表明构建成功，测序结果证实克隆得到的确实是 HA117 基因。见图 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1.3 pAdeasy-1/HA117 的酶切鉴定 构建成功的质粒 pAdTrack-HA117 转入 BJ-Adeasy 中，同源重组后挑选转化克隆，小量抽提质粒 DNA 经 *Pac* Ⅰ酶切后电泳，可见 30kb 和 4.5kb 左右的条带各 1 条，证明同源重组成功。见图 3。

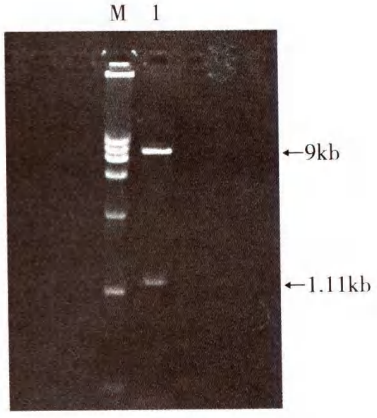
2.2 重组腺病毒的鉴定

2.2.1 包装细胞病变和 GFP 的表达 pAdeasy-1/HA117 采用脂质体介导转染 293 细胞，48～96h 后即可观察到绿色荧光，并随时间荧光强度逐渐增强，同时细胞逐渐由贴壁状态转为悬浮，此过程约 2 周。见图 4。

2.2.2 重组腺病毒滴度测定 实验中应用 GFP 计数法以及倍比稀释法测定重组病毒滴度，最后求得纯化后病毒的滴度约为 8.3×10^{11}PFU/ml。

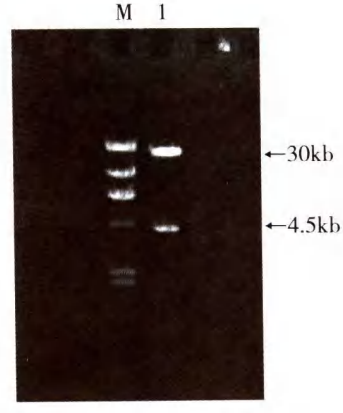
2.2.3 重组腺病毒 PCR 鉴定 抽提病毒基因组 DNA，PCR 扩增，可以检测到 119bp 大小的 HA117 基因 DNA 片段，而未转染组没有扩增出相应的片段，至此表明腺病毒构建成功。见图 5。

3 讨 论



M. DNA Marker DL15 000

图 2 pAdTrack-CMV/HA117 经 *Hind*Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ双酶切质粒后到大小分别为 9kb 和 1 110bp 的 DNA 片段



M. DNA Marker λ -*Hind*Ⅲ

图 3 pAdeasy-1/HA117 质粒 DNA 经 *Pac* Ⅰ酶切后电泳，可见 30kb 和 4.5kb 左右的条带各 1 条

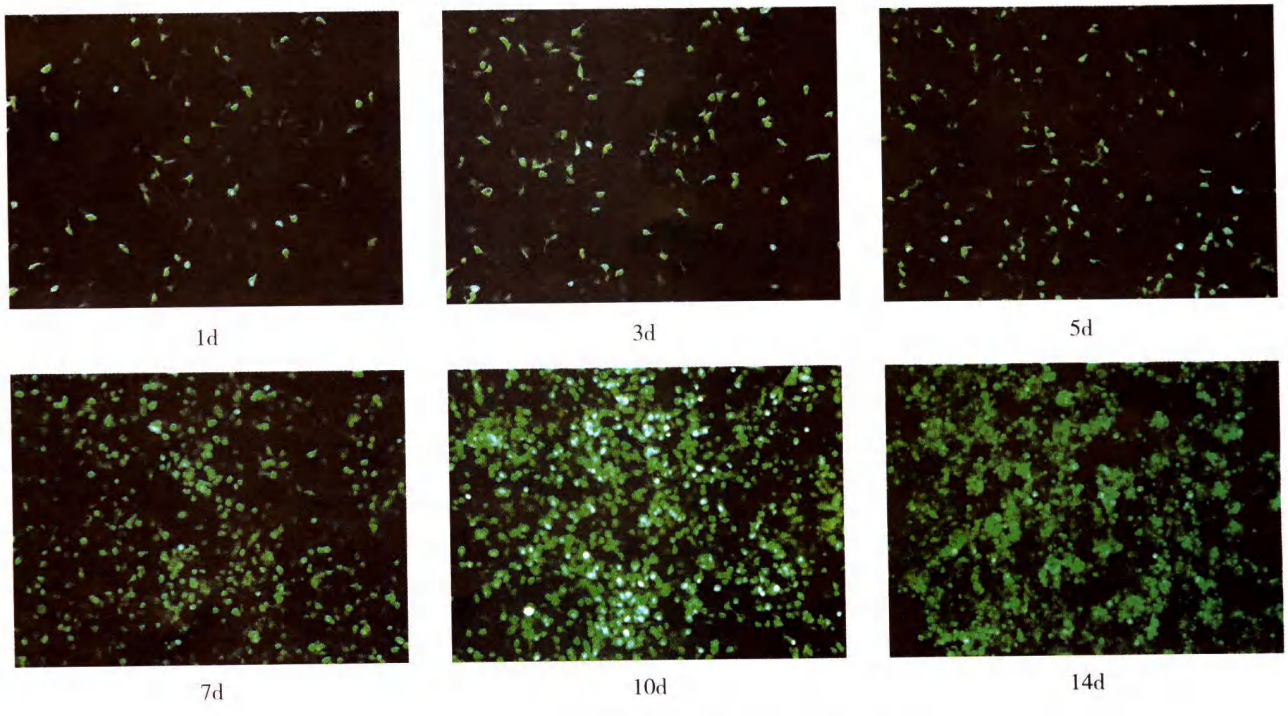
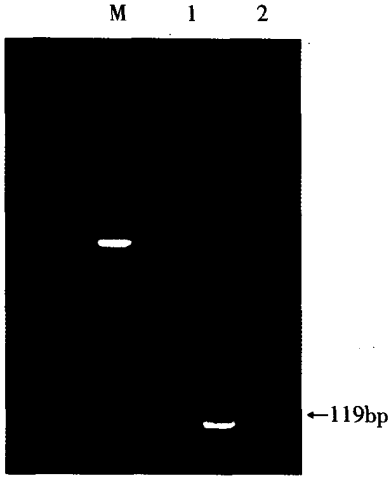


图 4 pAdeasy-1/HA117 转染 HEK293 细胞后的荧光显微镜观察(×100)

维普资讯 http://www.cqvip.com



M. DNA Marker 100bp; 1. 未转染组 HA117 基因的 PCR 结果; 2. 转染组 HA117 基因的 PCR 结果(119bp)

图 5 重组腺病毒 PCR 鉴定

重组腺病毒载体是目前应用最广泛的生物病毒载体之一,与其他病毒载体系统比较,它具有以下优点:宿主范围广,包装容量大。对人致病性低,在增殖和非增殖细胞中感染和表达基因,能有效进行增殖,滴度高,与人类基因同源[4,5]。由于重组腺病毒载体缺乏病毒复制所必需的早期基因 E1 区,故其为复制缺陷型病毒,将其 DNA 整合进入 HEK293 中,AD-293 的 E1 早期基因表达可以反式供给复制缺陷型病毒增殖,而且重组腺病毒载体介导的基因转染细胞后,DNA 游离于宿主基因组外,因此其基因毒性低、安全性高。腺病毒载体 pAdEasy 系统作为一种载体,以其特有的优点[6]而广泛应用于肿瘤基因治疗的研究[7]。并且具有操作简单,重组成功率较高、重组时间较短而被人们广泛应用。因为它同时携带了 GFP,可在包装和扩增的同时直接观察转染和感染的效率,大大缩短了基因治疗的构建和鉴定过程,克服了传统方法步骤周期长,效率低的缺点。因此我们选用 pAdEasy 系统作为载体构建重组分子。

基因 HA117 是本课题组通过抑制消减杂交和基因芯片相结合的方法,筛选出 ATRA 耐药相关新基因。通过基因芯片实验我们发现 HA117 是在 HL-60/ATRA 呈低丰度表达的基因,其在野生型的 HL-60 细胞中基本不表达,其基因序列与目前已知的所有 EST 序列不存在高度的同源性,为一未知的 EST 序列。利用 Internet Blast 对基因库进行搜索,未发现与 HA117 同源的基因。进一步用对该基因所编码的蛋白序列进行同源性分析,未发现人类与该序列高度同(score>40%)的序列,我们将该基因命名为 HA117。通过电子表达谱分析我们获知其主要表达于各种肿瘤组织,可能与细胞增殖、分化和凋亡相关。本研究根据以获得的电子表达谱,选择合适的肿瘤组织及癌旁正常组织。应用组织陈列仪将选择好的组织标本制成"多器官肿瘤与边缘组织组合芯片",通过原位杂交(In situ hybridization,ISH)法检测到其在肾脏组织阳性表达。应用 cDNA 末端快速扩增技术(Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 结合 PCR 方法扩增出来 ATRA 耐药相关新基因 HA117 全长 cDNA。为了进一步研究其功能,本实验构建新耐药相关基因 HA117 表达的腺病毒穿梭载体,经同源重组后,转染 AD-293 细胞包装成腺病毒,并对其进行RT-PCR 鉴定、病毒滴度以及野生型等检测,从而为证明 HA117 基因的耐药功能,逆转肿瘤细胞多药耐药奠定基础。

本实验构建了含有人全长的 HA117 基因的腺病毒载体,经酶切鉴定、基因测序、PCR 扩增证实重组腺病毒构建成功,为下一步功能试验的检测实验打下良好的基础。

参 考 文 献

[1] Cianfriglia M,Cenciarelli C,Barca S,et al. Monoclonal antibodies as a tool for structure-function studies of the MDR1-P-glycoprotein[J]. Curr Protein Pept Sci,2002;3(5):513-530.

[2] 付劲蓉,刘文励,周剑锋,等.Mcl-1 基因在 HL-60 细胞对全反式维甲酸耐药机制中的作用[J]. 华中科技大学学报(医学版),2005;26(6):352-354.

[3] He TC,Zhou S,DaCosta LT,et al. A simplified system forgenerating recombinant adenoviruses[J]. Proc Nail Acad Sci USA,1998;95(5):2509-2514.

[4] Hayashi S,I eu D,Yamii Y ,et al. Effect of adenovirus-mediated transfer of the CTI A4 IG gene in hamster-to-rat xenotransplantation[J]. Transplantation,2005;80(4):494.

[5] Kanerva A,Hemminki A. Adenoviruses for treatment of cancer [J]. Ann Med,2005;37(1):33-43.

[6] Anderson WF,Blaese RM,Culver K.The ADA human gene therapy clinical protocol[J]. Hum Gene Ther,1990;1(3):331-362.

[7] Phase 2 breast cancer study shows clinical responses in 90 percent of patients treated with Introgen,s Advexin therapy[R]. Introgen Therapeutics,Inc. News Release,2003.

(责任编辑:谭乐勤)