维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)02-0113-04

人多药耐药基因 1(mdr1)的克隆及重组腺病毒制备

刘 伟, 罗 庆,金先庆

(重庆医科大学附属儿童医院普外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建表达多药耐药基因 1(MDR1)的重组腺病毒表达系统。方法:用基因工程技术将多药耐药基因 1 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,经脂质体转染 293 细胞包装、扩增腺病毒颗粒。将重组腺病毒 Ad5-mdr1 感染小鼠单个核细胞,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 结果证明多药耐药基因重组腺病毒载体构建成功,构建的人多药耐药基因 1(mdr1)重组腺病毒载体的效价达到 8.3×10^{11}pfu/ml。对小鼠单个核细胞的感染效率可达 10%~15%,转染小鼠单个核细胞细胞 48h 后,可检测到 mdr1 基因的表达。结论:成功构建了表达多药耐药基因 1 的重组腺病毒载体,为后续对 mdr1 的相关研究创造了条件。

【关键词】多药耐药基因 1;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】2006-08-30

Cloning of human mdr1 gene and preparation of its recombinant adenovirus vector

LIU Wei,et al

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

【Abstract】*Objective*:To construct the recombinant adenovirus expressing human mdr1 gene.*Methods*:The cDNA of mdr1 gene was subcloned into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV and then clone the homologous recombinant adenovirus genomic plasmid pAdEasy in bacteria.We tranfected the DNA of identified recombinant plasmid into 293 cells via liposome,and then did the package and amplification of adenovirus.The mononuclear cells of mouse were infected with Ad5-mdr1 and the target gene was determined by fluorescence microscope and flow cytometry.*Results*:Restriction endonuclease and PCR analysis confirmed that the recombinant adenovirus vector of mdr1 gene was successfully constructed. The titer of the recombinant adenovirus was 8.3×10^{11}pfu/ml,and the infection efficiency to the mononuclear cell achieve 10%~15%. The expression of mdr1 gene was observed at 48h after the transfection of the mononuclearcell with Ad5-mdr1.*Conclusion*:The recombinant adenovirus expressing mdr1 gene was successfully constructed,which paves the way for the following studies related to mdr1.

【Key words】Multidrug resistance gene 1;Adenovirus;Transfection

化疗在肿瘤的临床治疗中起着不可替代的作用,但多药耐药基因在骨髓造血干细胞的低表达导致化疗不能顺利进行,严重的骨髓抑制导致化疗失败。课题组前期通过逆转录病毒将 mdr1 基因转入骨髓造血干细胞后回输荷瘤动物体内,在有效的保护骨髓的同时,因为加大了化疗的剂量,肿瘤的治疗效果明显好于对照组,但考虑到逆转录病毒安全性的问题, 本研究拟采用腺病毒作为载体进行实验, 进一步探讨 mdr1 基因转染保护骨髓的有效性和安全性[1-3]。

作者介绍: 刘 伟(1973-),男,主治医师,博士生,主要研究方向:肿瘤基因治疗。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助项目(30330590)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 含 mdr1 基因的质粒 pTM1-MDR,BJ5183 菌株及其衍生物 Adeasy-1 细胞、含绿色荧光蛋白(GFP)的穿梭质粒 pAdTrack-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。大肠杆菌 XL-blue 菌株,腺病毒包装细胞 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 提取及回收试剂盒购自 Takara 公司,脂质体 Lipofectamine 购于 Invitrogen 公司,DMEM、1640 培养基及胎牛血清为 Hyclone 公司产

维普资讯 http://www.cqvip.com

品,PCR 引物由 Takara 合成。DNA 测序委托大连 TakaRa 公司进行。细胞因子购自 R&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 编码 mdr1 基因 cDNA 序列 DNA 片段的克隆 以含 mdr1 基因的质粒 pMT21 为模板进行 PCR 反应。上游引物:5'-cgcggatccacctacctagaacttc-3',下游引物:5'-gacctcgagagt-gaccgcgtttgt-3'(上下游引物 5'端分别引入 BamH Ⅰ和 Xho Ⅰ酶切位点);扩增条件:94℃ 30s,55℃ 1min,72℃ 5min,共 35 个循环。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/mdr1 的构建用 BamH Ⅰ和 Xho Ⅰ分别双酶切腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 和 mdr1PCR 产物回收片段,DNA 酶切后用胶回收试剂盒分别回收 mdr1 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 mdr1 的 DNA 进行纯化,用 T4 连接酶将两者连接,转导感受态细菌 XL-1,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[4]。

1.2.3 重组腺病毒 Adeasy-MDR1 的构建及鉴定 Pme Ⅰ酶切 pAdTrack-MDR1 的质粒 DNA 过夜使其线性化,电穿孔法转导酶切后的质粒 pAdTrack-MDR1 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 37.0°C,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,37.0°C 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 MDR1 的质粒 BJ-Adeasy-MDR1 阳性克隆;转导 BJ-Adeasy-MDR1 入感受态细胞 XL-1,培养生长腺病毒质粒 Adeasy-MDR1,进一步用 Pac Ⅰ酶切鉴定 Adeasy-MDR1[4]。

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 30mlAdeasy-MDR1,15μl 脂质体,500ml DMEM 培养基(不含 FBS,含 1%P/S)混合于一 2ml 的微量离心管中,室温下放置 10 至 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°C 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°C 孵箱中孵育;3 至 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),置入 5%CO_2,37°C 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 10~14 天后,待大部分细胞飘浮,将细胞收集到 50ml 离心管中,1000r/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 CsCl 密度梯度离心纯化后,收获高滴度 Ad5-MDR1 腺病毒,保存于负 80℃待用[4]。

1.2.5 重组腺病毒的滴度测定 测定前 12~16h,在 24 孔板中接种 293 细胞(10^5 个/孔),第二天依次加入按 10 倍比稀释的待检病毒悬液 400ul,37℃感染 60min 后,吸去 400μl 上清,加入 1ml 1640 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[5],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'-CCCATCATTG-CAATAGCAGG-3';下游引物:5'- GTTCAAACTTCTGCTC-CTCA-3';扩增条件:94℃ 5min→94℃ 45s,58℃ 45s,72℃ 1min,共 35 个循环→72℃ 7min。

1.2.7 病毒感染效率的测定 小鼠单个核细胞的分离、培养,然后将细胞按照 1×10^6/孔接种在六孔板上,在含 10%胎牛血清的 1640 培养基中培养,观察细胞融合度达到 70%~80%时,用感染复数(multiplicity of infection MOI)分别为 1、10、50、100、500 的腺病毒感染细胞,24h、48h 后在荧光倒置显微镜下计数 GFP 阳性细胞率及收集细胞用流式细胞仪计数感染效率,选择最佳感染配伍。

2 结 果

2.1 质粒的构建及鉴定

2.1.1 MDR1 基因 cDNA 片段的获得 经 PCR 扩增后可以获得长度为 3840bp 的 cDNA 片段。见图 1。

2.1.2 pAdTrack-CMV/mdr1 的酶切鉴定和测序结果 用 BamH Ⅰ和 Xho Ⅰ双酶切质粒后琼脂糖电泳检测到大小分别为 9kb(质粒骨架)和 3840bp(MDR1 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 MDR1 基因。见图 2。

2.1.3 pAdeasy-1/MDR1 的酶切鉴定 构建成功的质粒 pAdTrack-MDR1 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 左右的条带各一条,证明同源重组成功。

2.2 重组腺病毒的鉴定

2.2.1 包装细胞病变和绿色荧光蛋白(GFP)的表达 pAdeasy-1/MDR1 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,此过程约两周。见图 3。

2.2.2 PCR 鉴定 抽提病毒基因组 DNA,PCR 扩增,可以检测到 157bp 大小的 MDR1 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 4。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2.3 重组腺病毒滴度及感染效率的测定 GFP 计数法测定病毒滴度为 8.3×10^{11}pfu/ml。用不同 MOI 值的腺病毒感染小鼠小鼠单个核细胞，发现随着 MOI 值的增加感染效率也增加，MOI 值为 100 时可以达到 11.96%，细胞生长状态较好，MOI 值为 500 时可以达到 14.77%，但细胞受到较严重的损伤。见图 5。

2.3 重组腺病毒功能的检测

2.3.1 培养的小鼠单个核细胞，细胞生长状态好，转染重组腺病毒后 48h 可观察到约 10%~15%的细胞发出绿色荧光。见图 5。

3 讨 论

恶性肿瘤作为一种全身性、异质性疾病，化疗在杀灭局部原发癌灶的同时也消灭了全身微小转移病灶，在防止恶性肿瘤的转移和复发以达到最终根治恶性肿瘤的综合治疗中起着不可替代的作用。但研究发现多药耐药(mdr1)基因是导致化疗不能顺利进行的重要因素之一；一方面其在肿瘤细胞高表达导致肿瘤耐药，另一方面它在骨髓低表达导致骨髓抑制。本课题前期[6,7]已经成功的构建了含人全

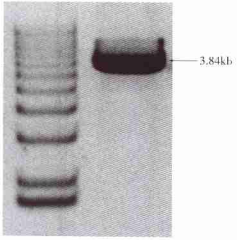


图 1 PCR 扩增后得到的 mdr1 基因 cDNA 片段

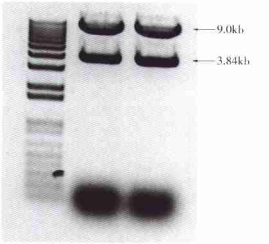


图 2 pAdTrack-CMV/mdr1 经 BamH Ⅰ和 Xho Ⅰ双酶切后得到大小分别为 9kb(质粒骨架)和 3840bp(MDR1 基因)的 DNA 片段

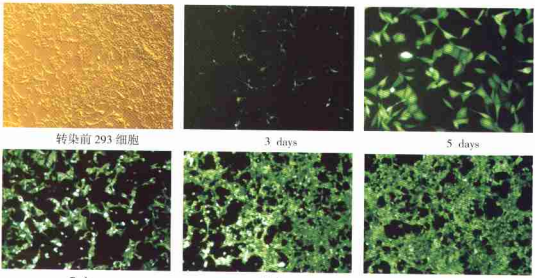


图 3 pAdeasy-1/MDR1 采用脂质体介导转染 293 细胞，48~96h 后即可观察到绿色荧光，并随时间荧光强度逐渐增强，同时细胞逐渐由贴壁状态转为悬浮，此过程约两周

维普资讯 http://www.cqvip.com

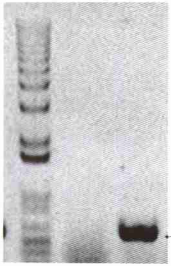


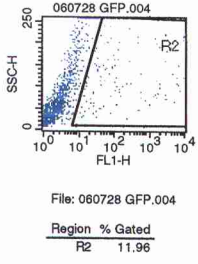
图 4 抽提病毒基因组 DNA,PCR 扩增，可以检测到 157bp 大小的 MDR1 基因 DNA 片段

长 mdr cDNA 的逆转录病毒包装细胞 PA317-HaMDR1/A，并通过浓缩病毒上清转染法将 mdr1 基因转染骨髓造血干细胞后回输荷瘤动物体内，分别在白血病、H22 腹水癌及 VX2 肝癌模型中实验取得了理想的实验结果；很好保护骨髓的同时有效的杀灭了肿瘤。但是考虑到逆转录病毒可能存在的安全性方面的因素，所以选用目前公认的比较安全的腺病毒载体来进行实验，腺病毒载体不仅能够高效感染多种增生细胞，而且也能感染静息哺乳类细胞，且不与细胞的基因组发生整合，不引起基因突变，可以携带较大片段的外源基因，是一种比较理想的用于基因治疗的表达载体。

基因治疗中就如何将目的基因有效、安全的转入靶细胞，是决定基因治疗成功与否的关键因素。本研究采用 AdEasy 系统是利用细菌进行重组的腺病毒系统，相对于早期在 293 细胞中重组的腺病毒







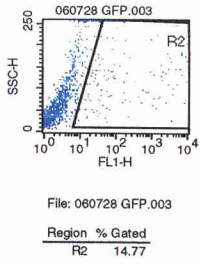


图 5 小鼠骨髓单个核细胞转染重组腺病毒以后，48h 后可观察到约 10%~15%的细胞发出绿色荧光

(下转第 120 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

端的水平条纹并且有助碱性蛋白质的聚焦。

在第二向 SDS-PAGE 前对胶条进行平衡的目的是打开蛋白分子中的二硫键，使分离的蛋白亚基充分与 SDS 结合。两步平衡是造成蛋白损失的主要原因，大约 7%~10% 的蛋白在此过程中损失，其中第一步的损失较大，凝胶条中的载体两性电解质可以有助于减少蛋白的损失。

在电泳参数一致的情况下分别比较了 10%，12% 分离胶的分离效果，结果显示 10%和 12%的分离胶分离效果均较良好，但在凝胶成像时，10%的分离胶在转移过程中容易弄碎，因此我们选用了 12%的分离胶。

本研究从 HeLa 细胞的蛋白提取、第一向等电聚焦和第二向 SDS-PAGE、染色和 2-DE 图像采集处理等几个方面优化了双向凝胶电泳条件，提高了 HeLa 细胞 2-DE 图谱中蛋白位点的分辨率及重复性，获得了比较理想的 HeLa 细胞的蛋白质双向电泳图谱，该蛋白图谱可用于 HeLa 细胞比较蛋白质组学研究，为其深入研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, et a1. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000; 97(17): 9390-9395.

[2] Paul R Graves. Timothy A.J. Molecular biologist'a guide to proteomics[J]. Micr and Mole biology review, 2002; 3: 39-63.

[3] 夏其昌，曾 嵘. 编著. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京：科学出版社，2004.242-248.

[4] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized PH gradients [J]. Electrophoresis, 2000; 21: 1037-1053.

[5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976; 72: 248-254.

[6] Bollag DM, Edelstein SJ. Protein Methods [M]. Chapter2: protein extraction, Wiley-Liss, NewYork. 1991.

[7] Bjellqvist B, Righetti P G, Gianazza E. Isoelectric focusing in immobilized PH gradient: principle, methodology and some applications[J]. J Biochem Biothys Methods, 1982; 6: 317-339.

[8] Parker R, Flowers TJ, Moore AL, et al. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina[J]. J Exp Bot, 2006; 57(5): 1109-1118.

[9] Pasquali C, Fialka I, Huber LA. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. Electrophoresis, 1997; 18(14): 2573-2581.

[10] Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis[J]. Eloctrophoresis, 1999; 20(4-5): 660-663.

[11] Barry RC, Alsaker BL, Robison-Cox JF, et al. A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure[J]. Proteomics, 2005; 5(11): 2739-2747.

(上接第 116 页)

系统而言，它具有操作简单，重组成功率较高、重组时间较短而被人们广泛应用。并且因为它同时携带了 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。

本实验构建了含有人全长的 MDR1 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，为下一步实验打下良好的基础。

(通讯作者：金先庆)

参 考 文 献

[1] Chun-Bao Guo, Ying-Cun Li, Xian-Qing Jin. Chemoprotection effect of retroviral vector encoding multidrug resistance 1 gene to allow intensified chemotherapy in vivo[J]. Cancer Chemother Pharamacol, 2006; 58: 40-49.

[2] 王 佚，金先庆，王 荠，等. mdrl 基因转染骨髓造血细胞移植联合超剂量化疗治疗兔 VX2 肝癌的实验研究[J]. 中华小儿外科杂志，2004; 25(3): 274-278.

[3] 康 权，金先庆，李英存，等. 多药耐药基因转染小鼠骨髓细胞及在化疗中骨髓保护的研究[J]. 中华小儿外科杂志，2002; 23(4): 351-354.

[4] TONG-CHUAN HE, SHIBIN ZHOU, LUIS T. DA COSTA?, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Medical Sciences, 1998; 95: 2509-2514.

[5] He T C, Zhou S, DaCosta L T, et a1. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-2514.

[6] 郭春宝，金先庆，康 权，等. 多药耐药(MDR1)基因治疗对中晚期肝癌小鼠生存率的影响[J]. 重庆医科大学学报，2003; 28(5): 580-584.

[7] 王 佚，金先庆，王 珊. 多药耐药(mdr1)基因体外转染兔骨髓造血细胞及其表达与功能的研究[J]. 重庆医科大学学报，2003; 28(4): 409-413.