DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.007

论著

文章编号:1000-5404(2003)08-0666-03

腺病毒穿梭质粒 pAdCMVlacZ 的构建及鉴定

杨 萍,应大君 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 为了构建复制缺陷型腺病毒 AdCMV-lacZ,我们首先构建了腺病毒穿梭质粒 pAdCMVlacZ。方法 将含 *lacZ* cDNA 基因克隆到腺病毒穿梭质粒 pAdCMV 的 *Hind* Ⅲ和 *Eco*RⅤ位点。结果 pAdCMVlacZ 经双酶切鉴定图谱正确,在含诱导剂和 X-gal 的氨苄平板上显示蓝色菌落。结论 成功构建了 pAdCMVlacZ。

关键词:腺病毒载体;*lacZ*

中图法分类号:Q782;R373.1;R394-3 文献标识码:A

Construction and identification of recombinant adenovirus shuttle plasmid pAdCMV-LacZ

YANG Ping, YING Da-jun (Department of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct replication-deficient adenovirus vector AdCMV-lacZ. Methods Recombinant adenovirus shuttle plasmid pAdCMVlacZ was first constructed and then *lacZ* cDNA cloned into *Hind* Ⅲ and *Eco*RⅤ of adenovirus shuttle plasmid pAdCMV by conventional methods. Results The restriction enzymatic map of pAdCMVlacZ accorded with theoretic analyses and pAdCMVlacZ showed blue bacterium groups under the existence of revulsant and X-gal. Conclusion The adenovirus shuttle plasmid pAdCMVlacZ has been constructed successfully.

Key words: adenovirus vector; *lacZ*

重组腺病毒作为一种高效基因转移载体被广泛用于将外源基因导入哺乳细胞,原因是腺病毒本身分子稳定,基因组不会发生分子重排,插入的外源基因也相当稳定。腺病毒允许插入外源基因容量可达 7.5 kb,病毒容易增殖和纯化,病毒滴度高达 10^{11} pfu/ml。不仅能感染分裂期细胞,也可感染静止期细胞,感染率几乎 100%[1~5]。另外,它不与宿主基因组整合,没有基因毒性,比较安全。腺病毒的上述优点是逆转录病毒所不具备的,因此在基因治疗与基因免疫中具有极大的应用前景[6]。为了构建复制缺陷型腺病毒 AdCMV-lacZ,我们首先构建了腺病毒穿梭质粒 pAdCMVlacZ。

1 材料和方法

1.1 质粒和主要试剂

腺病毒穿梭质粒 pAdCMV 由美国宾州大学 Guo 博士转赠;含人 *lacZ* cDNA 的质粒 pCMVβ 由北京军区总医院白雪原博士惠赠。限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Eco*RⅤ为 New England 产品,*Sma* Ⅰ购买于美国 Promega 公司,T_4 DNA 连接酶为上海生物工程公司产品、DNA marker λDNA/*Hind* Ⅲ为华美公司产品。

1.2 pAdCMVlacZ 腺病毒穿梭质粒的构建及鉴定

质粒 DNA 的克隆按标准步骤[7]进行。pCMVβ 含人β-半乳糖苷酶基因 *lacZ* cDNA,用大肠杆菌 JM109 扩增 pCMVβ,碱变性法抽提质粒,用 *Sma*Ⅰ酶切,25 ℃,3 h,电泳见全部线形化,分子量大小为 7.2 kb 左右,再用 *Hind* Ⅲ酶切,37 ℃,3 h,1.2% 琼脂糖凝胶电泳,20 V,过夜,次日见 2 条带(3.46 kb 和 3.7 kb)已分开后,仅将含 DNA 的凝胶切下,在备好的 0.8% 的琼脂糖凝胶中挖一小孔,放入含 DNA 的凝胶块,并用 0.8% 的凝胶封好周围,电泳,90 V,20 min,见两条带分开明显,并均已在 0.8% 的凝胶中,在紫外灯下挖出 3.46 kb 条带,孔中加入电泳液,继续电泳,待 3.7 kb DNA 进入挖孔的电泳液中后,进行回收,等量酚/氯仿抽提一次,小心吸出上清,加双倍体积的无水乙醇及 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钾,-20 ℃,2 h 或过夜,12 000 r/min,15 min,去上清,沉淀用 70% 乙醇洗一次,去上清,室温蒸发空干,用 10 μl 无菌双蒸水溶解沉淀,备用。与经 *Hind* Ⅲ、*Eco*RⅤ线形化的腺病毒穿梭质粒 pAdCMV 连接 20 h,17 ℃,转染感受态的大肠杆菌 JM109,接种于氨苄平板,37 ℃孵育 24 h,次日挑单菌落,用碱变性法小量抽提质粒,与空质粒 pAdCMV 一起电泳对照,滞后的为可疑阳性重组子,将筛选出的阳性重组子用 *Hind* Ⅲ酶切进一步鉴定,可见阳性重组子分子量为 10 kb 左右。将阳性重组子菌液在涂有 X-gal 和诱导剂 IPTG 的氨苄平板上划线,了解腺病毒穿梭质粒是否插入外源基因 *lacZ* cDNA。

作者简介:杨 萍(1967—),女,四川省阆中市人,博士研究生,讲师,主要从事周围神经再生方面的研究。电话:(023)68752225

收稿日期:2001-04-10;修回日期:2001-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果

2.1　穿梭质粒 pAdCMVlacZ 的构建, 见图 1

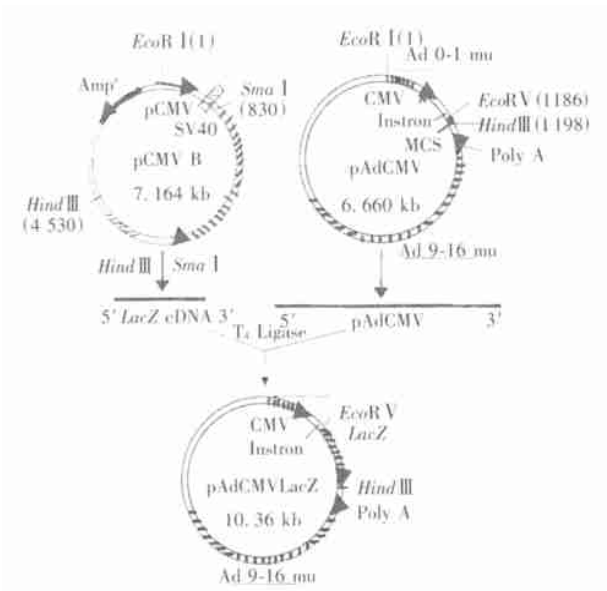
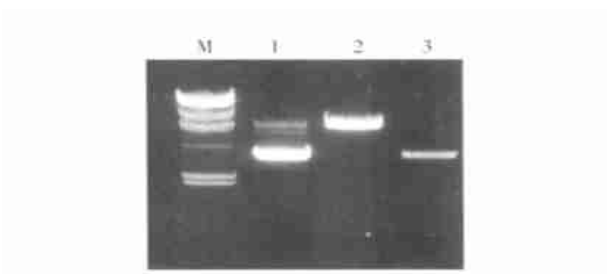


图 1　pAdCMVLacZ 的构建图

Fig 1　Construction of pAdCMVLacZ

2.2　穿梭质粒 pAdCMVlacZ 的酶切鉴定及表达

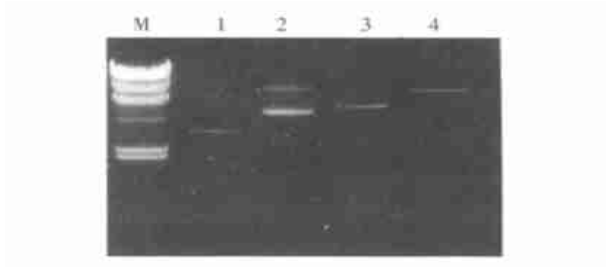
从图 2 中可见 0.8%琼脂糖凝胶电泳不能分开 3.7 kb 和 3.46 kb 条带。用 1.2%琼脂糖凝胶电泳低电压过夜, 见 2 条带分开后, 将它们切下, 再用 0.8%琼脂糖凝胶电泳回收 3.7 kb 条带。图 3 示构建 *lacZ* 穿梭质粒的酶切鉴定, 重组质粒较腺病毒穿梭质粒滞后, 线性化后分子量符合理论值。筛选出的阳性克隆子在含有 X-gal 和诱导剂存在的情况下, 使生色底物 X-gal 呈现蓝色, 在含 X-gal 的氨苄平板上显示蓝色菌落。说明阳性克隆子在诱导剂存在的情况下能表达β-半乳糖苷酶, 即得到 *lacZ* 的腺病毒穿梭质粒, 命名为 pAdCMVlacZ。



M: λDNA/*Hind* III marker; 1: pCMVβ; 2: pCMVβ/*Sma* I; 3: pCMVβ/*Sma* I + *Hind* III

图 2　pCMVβ 限制性酶切图

Fig 2　pCMVβ digested with restriction enzymes



M: λDNA/*Hind* III marker; 1: pAdCMV; 2: pAdCMVLacZ; 3: pAdCMV/*Hind* III; 4: pAdCMVLacZ/*Hind* III

图 3　酶切鉴定 pAdCMVlacZ

Fig 3　Recombinant pAdCMVLacZ digested with restriction enzymes

3　讨论

3.1　关于腺病毒穿梭质粒 pAdCMVlacZ

本实验中用于构建的腺病毒穿梭质粒 pAdCMV 含人第五型腺病毒基因组左侧的 0～16 mu(基因图距单位), 其中 E1 区的 1.3～9.2 mu 被删除, 由此造成 E1 区的缺损, 在缺失区插入 CMV、多克隆位点、Poly A 合成区等。多克隆位点处可插入不同的目的基因, 而构建成含外源基因的腺病毒穿梭质粒, 当它与腺病毒包装质粒共转染 293 细胞后, 能发生同源重组形成含外源基因的复制缺陷型腺病毒, 外源基因在启动子 CMV 的启动下进行表达。因此, 在构建腺病毒作为转移外源基因的载体时, 必须首先构建腺病毒穿梭质粒。由于 pCMVβ 中 *lacZ* cDNA(3.7 kb)含有表达β-半乳糖苷酶的与诱导有关的元件, 故当它被克隆到穿梭质粒中后, 在大肠杆菌中在有诱导剂存在的情况下能表达β-半乳糖苷酶, 在含有 X-gal 和诱导剂存在的情况下, 使生色底物 X-gal 呈现蓝色, 这也成为构建成功的标志。

3.2　目的基因的酶切和回收

由于质粒 pCMVβ 中载体和目的基因的大小很接近 3.46 kb 和 3.7 kb, 用普通电泳方法回收困难, 将琼脂糖凝胶浓度加大, 同时电压减小, 延长电泳时间后, 可见两条分开的条带, 但因相距很近, 仍不能用常规方法回收目的片段。所以, 将 2 条带切下后, 放入 0.8%琼脂糖凝胶上预先挖的孔中, 用凝胶将周围缝隙封好, 加大电压电泳, 20 min 后, 成功地回收了 3.7 kb 的 *LacZ* cDNA 条带。由于凝胶的浓度与所分辨的 DNA 大小有密切的关系, 所以我们通过增加凝胶的浓度, 使目的基因和载体分开, 但由于凝胶的浓度与电泳速度有关, 随着凝胶的浓度的增加, 速度减慢, 所以又不能只在高浓度的琼脂糖凝胶中电泳回收目的基因, 当两条带分开后, 再将它们同时切下, 放在 0.8%的琼脂糖凝胶中电泳, 此时回收 DNA 片段方法与常规一样。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3.3 目的基因与腺病毒穿梭质粒的连接

在分子克隆过程中，当需进行某个目的基因亚克隆时，由于酶切位点的限制，不能找到粘性末端的限制性内切酶，此时只能用平端酶，由于平端连接比较困难，常规连接失败率较高，必须将 T_4 DNA 连接酶浓度提高，同时将连接时间延长后方能成功。如在我们实验中：目的基因 *lacZ* cDNA 是用 *Hind* Ⅲ和 *Sma* Ⅰ从质粒 pCMVβ 中切下的，*Sma* Ⅰ是平端酶；用于与之连接的载体是用 *Hind* Ⅲ和 *Eco*RⅤ线性化的，*Eco*RⅤ也是平端酶，这样目的片段与载体之间有一端是平端连接，常规方法连接几次均不能成功，当 T_4 DNA 连接酶浓度增大，连接时间延长后，成功得到 pAdCMVlacZ 的连接产物，经转化感受态细胞进行扩增后，酶切鉴定符合理论分析。

参考文献：

[1] Rosenfeld MA, Yoshimura K, Traphell B C. *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to airway epithelium [J]. Cell, 1992, 68(1): 143－155.

[2] Dijkhuizen P A, Pasterkamp R J, Hermens W T, *et al*. Adenoviral vector-mediated gene delivery to injured rat peripheral nerve [J]. J Neurotrauma, 1998, 15(6): 387－397.

[3] Shinoura N, Satou R, Yashida Y, *et al*. Adenovirus-mediated transfer of Bcl-xl protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis [J]. Exp Cell Res, 2000, 254(1): 221－231.

[4] Matsuoka N, Yukawa H, Ishii K, *et al*. Adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-xl prevents cell death in primary neuronal culture of the rat [J]. Neurosci Lett, 1999, 270: 177－180.

[5] Nielsen L L, Gurnani M, Syed L, *et al*. Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated gene therapy for cancer efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(1): 68－694.

[6] Kremer E J, Perricaudet M. Adenovirus and adenovirus-associated virus mediated gene transfer [J]. British Med Bull, 1995, 51(1): 31－44.

[7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南 [M]. 第2版. 北京：科学出版社, 1993. 34－340.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)08-0668-02

原发性胃肠道恶性淋巴瘤 64 例临床分析

Diagnosis and treatment of 64 cases of primary malignant lymphoma in gastrointestinal tract

张艳玲，梁 后杰 （第三军医大学附属西南医院肿瘤科，重庆 400038）

胃肠道是结外恶性淋巴瘤（Primary malignant lymphoma in gastrointestinal tract，PMLGT）最常累及部位，因其缺乏特异临床表现，误诊率较高[1]。为进一步加深认识，现将我院64例PMLGT的临床资料报告如下。

1 临床资料

选择1985至2000年收治的经病理学证实的PMLGT 64例，全部符合Dawson[2]标准。男44例，女20例，男女比为2.2∶1；年龄8～71岁，平均39.5岁；高发年龄18～45岁，占75%（48/64）。首发症状、体征与常见消化道疾病相似。其临床分期按Ann Arbor分期标准Ⅰ$_E$33例（51.56%）、Ⅱ$_E$14例（21.88%）、Ⅲ$_E$12例（18.75%）、Ⅳ 5例（7.81%）；以回盲部发病居多，占37.5%，病理分型以非霍奇金病B细胞型居多，占81.25%。本组误诊率为67.18%（43/64）。64例均行手术治疗，62例术后补充放疗和化疗，2例未行放、化疗。全部病例随访1～10年。生存5年以上者38例，最长者8年半，未满5年仍在继续追访者7例。术后未行放、化疗2例均于术后近期死亡。失访6例。放疗采用^{60}Co或直线加速器外照射。化疗者均使用CHOP或COPP方案。

2 讨论

PMLGT的发病年龄多为青壮年，以男性为高；好发部位顺序为回盲部及回肠、胃、结肠。PMLGT存在显著的地理病理学差异[3]，欧美主要累及胃，以MALT淋巴瘤最常见；我国部分地区多见于肠道，以地中海淋巴瘤最常见。

2.1 原发性胃肠道恶性淋巴瘤误诊原因

①发病率低。②缺乏特异性临床表现。③X线征象与癌、溃疡酷似。④小肠PMLGT仍缺乏特异性检查手段。⑤内镜及病理活检率低。⑥接诊医师对本病认识不足。⑦病理科医师满足于良、恶性病变的鉴别，缺乏对本病的警惕性。

2.2 提高诊断率的措施

（1）熟悉本病临床特点。（2）熟悉X线特点：肠壁僵硬、狭窄、蠕动受限，单发或多发的圆形或不规则型充盈缺损，呈“鹅卵石样”改变，这点对小肠及内镜不能深入窥视者尤为重要。（3）熟悉内镜特点：① 病变质地较癌灶柔软，缺乏韧性；②局限

作者简介：张艳玲（1966－），女，云南省昆明市人，硕士，主治医师，主要从事消化道肿瘤的基础与临床方面的研究，发表论文13篇。电话：(023)6875000－73133

收稿日期：2002-05-22；修回日期：2002-09-29

（下转672页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net