DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.024
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

文章编号:1000-5404(2002)07-0807-03

论著

大鼠MMP-13重组腺病毒载体的构建

刘 南,宋 波,金锡御,熊恩庆 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 构建大鼠MMP13重组腺病毒载体。方法 将MMP13 cDNA目的片段插入腺病毒柯氏质粒中,再将此质粒与腺病毒DNA末端蛋白复合物共转染293细胞,通过同源重组构建MMP13-重组腺病毒载体。结果 MMP13-重组腺病毒载体经PCR鉴定正确,包装纯化后,检测病毒滴度为4×10^9 PFU/ml。结论 成功地构建了Rat MMP13-重组腺病毒载体,为下一步行MMP-13转基因治疗低顺应性膀胱的研究提供了条件。

关键词:腺病毒;载体;MMP-13
中图法分类号:R373.1;R394-3 文献标识码:A

Construction of rat MMP-13 recombinant adenovirus vector

LIU Nan, SONG Bo, JING Xi-yu, XIONG En-qing (Center of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct rat MMP-13 recombinant adenovirus vector. Methods The target fragment of MMP-13 cDNA was inserted into plasmid PAxCAwt to generate the shuttle plasmid PAxCAwt-13 and co-transferred into 293 cells with adenovirus gene DNA-terminal protein complex (TPC) through homologous recombination to construct the Ad-MMP-13. Results The positive clones of the combinants were screened by PCR and the concentration of viral liquids containing MMP-13 gene was 4×10^9 PFU/ml. Conclusion Rat MMP-13 recombinant adenovirus vector has been constructed and can be used for further research.

Key words: adenovirus; vector; MMP-13

基因治疗常用的病毒载体是腺病毒载体和逆转录病毒载体,腺病毒载体具有宿主细胞范围广、高转移效率、高滴度、高表达等优点,是目前体内基因治疗研究中应用最为广泛的载体[1,2]。我们将大鼠基质金属蛋白酶-13(Matrix metalloproteinase 13, MMP13)cDNA插入带有腺病毒全长基因组的PAxCAwt柯氏质粒中,再将此质粒与腺病毒DNA末端蛋白复合物(DNA terminal protein complex, DNA-TPC)共转染293细胞,成功构建了MMP13-重组腺病毒载体。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 腺病毒载体系统 为E_1和E_3区缺失的复制缺陷5型腺病毒载体,包括带有腺病毒全长基因组的PAxCAwt柯氏质粒(44 741 bp)和腺病毒DNA末端蛋白复合物。该腺病毒表达载体试剂盒购自TaKaRa公司。

1.1.2 质粒 质粒PRColl-SK,含Rat MMP-13(Collagenase)阅读框架cDNA的质粒由美国的Prof Lynn Matrisian惠赠(Department of cell Biology, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA)。

1.1.3 细菌和细胞株 DH5α为本院烧伤研究所保存,293细胞株购自上海细胞所。

1.1.4 其他试剂 λ噬菌体包装试剂盒购自Pharmcia公司,质粒DNA大量提取试剂盒购自Pharmcia公司,其他如质粒提取试剂盒、转染试剂盒和各种酶购自宝灵曼公司。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970739)
作者简介:刘 南(1967-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事尿动力学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754000-73086
收稿日期:2002-04-11;修回日期:2002-06-10

1.2 方法

1.2.1 重组体腺病毒质粒载体的构建 用*Xha*Ⅰ和*Hind*Ⅲ双酶切PRColl-SK质粒,琼脂糖凝胶电泳回收MMP13 cDNA片段,用DNA平端连接试剂盒使DNA末端补平。取1.5 μg PAxCAwt柯氏质粒,用*Swa*Ⅰ酶切,把MMP13 cDNA片断和切下的PAxCAwt质粒DNA混合,加入5 μl DNA Dissolution Buffer和5 μl连接液,25 ℃ 2 h。酚-氯仿抽提后用λ-包装蛋白包装,感染DH5α细菌,涂布加有氨苄西林的LB平板,37 ℃过夜,挑取菌落培养抽提质粒。

1.2.2 重组质粒及插入方向鉴定 ① PCR法:为了鉴定MMP-13 cDNA与质粒PAxCAwt上的promoter为正向连接的重组体,特设计一对引物如下:以提取的质粒DNA为模板,上游PAxCAwt F1901 5′CAGATGCTCAAGGGGCTTCA3′,下游为MMP-13 cDNA上的引物,5′ATTCTTTTCTAGTGACTTGT3′产物为963 bp,引物设计和合成均由大连宝生物公司完成。扩增条件为94 ℃ 1 min,98 ℃ 10 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30个循环。② 酶切法:用PCR扩增及*Swa*Ⅰ酶切后琼脂糖电泳判断是否为重组质粒,凡是PCR阳性及*Swa*Ⅰ酶切未被切断的为重组阳性克隆。进一步用*Sal*Ⅰ酶切,琼脂糖凝胶电泳回收6~7 kb大小的片段,自连后转染DH(5α)感受态菌,LB培养挑取阳性克隆,抽提质粒后用*BamH*Ⅰ和*Sph*Ⅰ双酶切琼脂糖凝胶电泳,片段为1 800 bp的为正向插入。挑取正向插入克隆扩增质粒待用。

1.2.3 重组体腺病毒的包装、扩增和纯化 重组体腺病毒质粒DNA与DNA-TPC采用磷酸钙介导转染293细胞,待有明显的病毒克隆斑或蚀斑形成后,将293细胞自培养瓶内刮下,液氮/+37 ℃反复冻融4次裂解细胞,离心取含病毒的上清,分别感染293细胞和Hela细胞,挑选对Hela细胞无致死作用而293细胞全死亡的克隆,依法再次提取病毒上清,重新感染293细胞大量扩增病毒。

1.2.4 PCR法对重组体腺病毒载体Ad-MMP13的鉴定 引

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

物设计及反应条件同重组柯氏粒及插入方向鉴定。

1.2.5 MMP-13 重组腺病毒载体滴度的测定 按腺病毒表达载体试剂盒说明书进行测定。腺病毒载体滴度＝稀释倍数×稀释度$^{(CPE阳性细胞孔数-4)/8}$＝$10^6\times 3^{(CPE阳性细胞孔数-4)/8}$(PFU/ml)

2 结果

2.1 MMP13-腺病毒重组质粒及插入方向鉴定

挑取 7 个阳性菌落进行培养，抽提质粒，用 PCR 扩增后电泳，见图 1。结果，其中 5 个克隆 PCR 呈阳性。进一步用 *Swa* Ⅰ酶切，4 个克隆呈阳性。

2.2 重组质粒插入方向鉴定

用 *Sal* Ⅰ酶切，琼脂糖凝胶电泳回收 6 000～7 000 bp 大小的片段，自连后转染 DH(5α)菌，经 LB 培养基培养后挑取阳性克隆，抽提质粒后用 *BamH* Ⅰ和 *Sph* Ⅰ双酶切电泳，片段为 1 800 bp 的为正向插入阳性克隆，见图 2。

2.3 腺病毒重组体的包装过程

转染 293 细胞 7～14 d 时细胞变圆、脱落，形成感染噬斑样改变，随后细胞成片脱落，即细胞病性(CPE)改变。

2.4 腺病毒重组体的鉴定

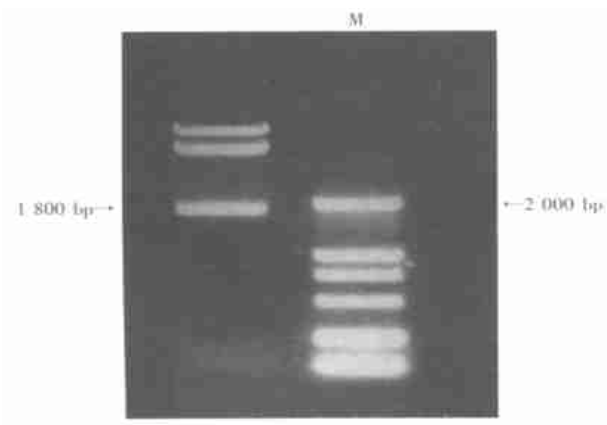
腺病毒重组质粒与 DNA-TPC 共转染 293 细胞后，挑出阳性克隆，制备细胞 DNA 行 PCR 扩增后电泳，见图 3。其中 7 个克隆中 6 个 PCR 呈阳性，扩增出预期大小的合适条带。



Marker: DL-2 000 DNA marker

图 1 **MMP-13** 腺病毒重组质粒的 **PCR** 鉴定

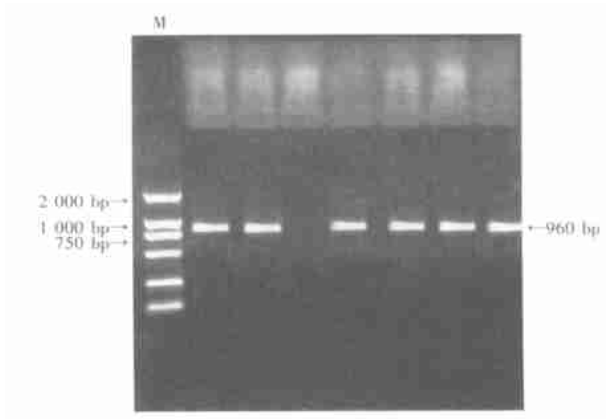
Fig 1 Identification of MMP-13 recombinant adenovirus plasmid by PCR



Marker: DL-2000 DNA marker

图 2 **MMP-13** 腺病毒重组质粒插入方向鉴定

Fig 2 Identification the inserting direction of MMP-13 recombinant adenovirus plasmid



Marker: DL-2000 DNA marker

图 3 **MMP-13** 腺病毒重组体腺病毒的 **PCR** 鉴定

Fig 3 Identification of MMP－13 recombinant adenovirus by PCR

2.5 重组体腺病毒滴度的测定

按试剂盒说明书测得腺病毒滴度为 4×10^9 PFU/ml。

3 讨论

利用病毒具有与细胞表面受体结合并将基因组导入宿主细胞的特性，将控制病毒复制的基因及部分病毒复制非必须基因去除后可制备成各种病毒载体[2]。目前已开发的病毒载体主要有逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体、单纯疱疹病毒载体等，其中以逆转录病毒载体及腺病毒载体最常见。由于逆转录病毒载体能携带外源基因整合进靶细胞的基因组，实现目的基因的长期稳定表达，因而主要用于体外的基因治疗研究。但是，由于外源基因的插入有导致基因突变的危险，因此具有潜在的遗传毒性。此外，逆转录病毒只能感染分裂繁殖的细胞，且繁殖滴度低、性质不稳定，不能满足体内基因治疗的需要。腺病毒载体具有宿主细胞广泛、可感染静止及分裂期细胞、繁殖滴度高、性质稳定、包装容量大及不整合等优点，因而使其广泛用于转基因和基因治疗的研究[3]。

作者选用日本 TaKaRa 公司新近研制的重组腺病毒表达载体的构建试剂盒，利用在质粒构建中引入特异的稀有内切酶酶切位点、在大质粒末端连接末端蛋白复合物(Terminal protein complex, TPC)等独特技术，使构建效率明显提高。

他们在 PAxCAwt 柯氏质粒（E_1、E_2 区缺失的复制缺陷 5 型腺病毒）多克隆位点中引入了质粒中唯一的稀有酶 *Swa* Ⅰ酶切位点[4]。*Swa* Ⅰ酶识别的核苷酸序列长达 8 碱基，高于一般内切酶，从而大大提高了其特异性，并且经该酶切产生的末端是平末端有利于不同外源性基因的直接插入，将该酶酶切线性化后的 PAxCAwt 柯氏质粒与目的基因 MMP13 cDNA 相连后，改变了原有的酶切位点，而此时再一次应用该酶进行酶切时，则插入了目的基因的阳性质粒不能被切开，仍

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

保持环状，有利于下一步 λ 噬菌体的包装。但是，无外源基因插入的质粒仍存在 *Swa* Ⅰ 酶切位点，而被切开线性化，使其不利于 λ 噬菌体的包装，不能导入细菌中扩增，从而使阳性克隆出现率显著提高。

用 DNA-末端蛋白复合物(DNA-TPC)可以明显提高重组腺病毒的转染效率。Ad5 腺病毒基因组在其 DNA5′末端共价结合有末端蛋白(TP)，TP 可保护病毒核酸免受外切酶攻击，在病毒感染细胞并脱壳后，可指导病毒核心颗粒入核并在附着于核基质的过程中起作用。Miyake 等首先将目的基因的表达盒用单一酶切位点 *Swa* Ⅰ 引入克隆有腺病毒全长基因组的柯氏质粒中，用柯氏质粒与 DNA-TPC 共转染 293 细胞，使重组腺病毒阳性率提高了几十倍到几百倍[5,6]。

在鉴定柯氏质粒载体中是否有目的基因插入及插入方向时，作者采用 PCR 扩增技术，在同一 PCR 体系中加入腺病毒特异引起物和 MMP13 cDNA 的特异引物，可迅速、准确地鉴定出阳性克隆。且在 PCR 粗筛后，将所得质粒用 *Sal*Ⅰ酶切后亚克隆为带有目的基因的重组质粒，进一步酶切鉴定是否有插入及插入方向。

参考文献：

[1] Vorburger S A, Hunt K K. Adenoviral gene therapy[J]. Oncologist, 2002, 7(1): 46—59.
[2] 刘 林，罗成基，粟永平. 复制缺陷型人 TPO 重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(5): 314—317.
[3] Nasz I, Adam E. Recombinant adenovirus vectors for gene therapy and clinical trials[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2001, 48(3—4): 323—348.
[4] Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, *et al*. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(3): 1 320—1 324.
[5] Yoshida Y, Sadata A, Zhang W, *et al*. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(17): 2 503—2 515.
[6] Okada T, Ramsey W J, Munir J, *et al*. Efficient directional cloning of recombinant adenovirus vector using DNA-protein complex[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(8): 1 947—1 950.

(编辑 张 宁)

文章编号：1000-5404(2002)07-0809-01

个案与短篇

老年死亡 461 例临床分析

Clinical analysis of the death of 461 old men

童一平，王 凯，蔡玉瑾 (重庆市第八人民医院老年科，重庆 400015)

1 临床资料

一般资料：查阅 1992 年 4 月—2001 年 12 月 60 岁以上的住院死亡病例 461 份。根据住院病历的出院诊断、死亡诊断确定疾病的分类，以内科学教材(第 5 版)诊断标准为依据[1]。

男女死亡病例构成：本组 461 例死亡病例，男为 298 例，占 64.64%，女为 163 例，占 35.36%，男性死亡较女性高。

内外科疾病的构成：本组 461 例死亡病例中内科 411 例，占 89.15%，外科 50 例，占 10.85%，老年死亡病例以内科为主。

基础疾病与死亡例数构成比，见表 1。

表 1 基础疾病与死亡例数构成比

基础疾病	例数	构成比(%)
呼吸系统	143	31.02
恶性肿瘤	112	24.30
脑血管	81	17.57
心血管	75	16.27
消化道	24	5.21
泌尿道	11	2.39
糖尿病	11	2.39
其他	4	0.86
合计	461	100.00

作者简介：童一平(1952—)，女，重庆市人，副主任医师，主要从事老年病临床方面的研究，发表论文 15 篇。电话：(023)63852670

收稿日期：2001-12-05；修回日期：2002-01-21

合并症与死亡病例的构成比，见表 2。

表 2 不同合并症与死亡例数的构成比

合并症	例数	构成比(%)
1 种	29	6.29
2 种	58	12.58
3 种	74	16.05
4 种	113	24.51
5 种	187	40.56
合计	461	100.00

2 讨论

从 461 例住院死亡病例看，男性为 298 人，占 64.64%，女性为 163 人，占 35.36%，男女死亡比例为 2∶1。男性的死亡比女性高，与国内外统计的结果基本相似。原因有待于进一步探讨。

按内外科住院病例来进行死亡分类，在 461 例死亡病例中内科为 411 人，占 89.15%，而外科仅为 50 人占 10.85%。老年人生理防御功能、免疫功能随年龄的增长而逐年减弱，并有不同程度的多器官功能减弱，造成手术机会减少，而出现老年人外科死亡率比内科低。

从表 1 可见呼吸系统疾病占首位，肿瘤为第 2 位，这与上海市的死因调查一致[2]。呼吸系统为首位可能与重庆市环境

(下转 812 页)

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