

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0138-04

人骨形成蛋白-2 基因腺病毒表达载体构建方法的优化

王磊¹, 曲迅², 魏奉才³, 冯进波², 刘少华³, 孙善珍¹, 杨美香²(1. 山东大学口腔医学院, 济南 250012; 2. 山东大学齐鲁医院临床基础研究所, 济南 250012; 3. 山东大学齐鲁医院口腔科, 济南 250012)

[摘要] **目的:** 探索采用体外连接技术替代同源重组方法构建 Ad-BMP-2, 优化腺病毒载体构建方法。**方法:** 将 BMP-2 基因连接到辅助载体 pShuttle2 后, 以限制性内切酶 *Pi-Sce I* 及 *I-Ceu I* 酶切, 获得含启动子 *Pcmvie* 的 BMP-2 基因片段, 然后将其连接到经同样双酶切的 Adeno-X 载体上, 获得含 BMP-2 基因的重组腺病毒载体 Ad-BMP-2。将其以限制性内切酶 *Pac I* 酶切线性化后, 转染 HEK293 细胞, 包装重组腺病毒颗粒, 并采用 PCR 方法对重组腺病毒进行鉴定。**结果:** 重组载体 pShuttle2-BMP-2 及 Adeno-BMP-2 均采用酶法切及 PCR 鉴定, 鉴定结果均与理论相符。将包装后的重组腺病毒以 PCR 鉴定, 以 1% 琼脂糖电泳见 1.2 kb 及 287 bp 有带, 与 MBP-2 及腺病毒扩增片段大小相符。**结论:** 与传统的同源重组方法相比, 体外连接技术方法简单、快捷, 并且此方法不需噬斑纯化、筛选方法简便, 提高了腺病毒载体构建的效率; 同时, Ad-BMP-2 的构建成功为后续进行 BMP-2 基因的治疗研究奠定了坚实的基础。

[关键词] 腺病毒; 骨形成蛋白-2; 基因重组; 体外连接技术

[中图分类号] Q78; R730.59 [文献标识码] A

Construction of Recombinant Adenoviral Vector Carrying the Human BMP-2 Gene with the Technology of *in vitro* Ligation

Wang Lei¹, Qu Xun², Wei Feng-cai³, Feng Jin-bo², Sun Shan-Zhen¹, Liu Shao-hua³, YANG Mei-xiang²(1. The Stomatology School, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Basic Research Institute of Clinic Medicine, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 3. The Department of Stomatology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To provide an efficient protocol for constructing recombinant adenovirus, an *in vitro* ligation was used instead of homologous recombination. **Methods:** Gene BMP-2 was ligated into pShuttle 2 vector (pShuttle 2-BMP-2) and then fragment containing BMP-2 gene and promoter *pcmvie* excised by *Pi-Sce I* and *I-Ceu I* endonuclease. The fragment was further combined with adenovirus vector (Adeno-X-BMP-2), which was finally linearized with *Pac I* and transferred to HEK293 to package adenovirus particles. **Results:** Both PCR assay and restriction analysis showed that the recombinant vectors pShuttle2-BMP-2 and Adeno-X-BMP-2 contains the target BMP-2 gene. The packaged adenovirus was also identified by PCR assay with specific primers for BMP-2. **Conclusions:** The BMP-2 incorporated recombinant adenovirus was obtained and this laid a foundation for further study on BMP-2 mediated gene therapy. The *in vitro* ligation method described here for constructing recombinant adenovirus was more efficient than traditional homologous recombination.

[Key words] adenovirus; BMP-2; gene recombination; *in vitro* ligation

* 骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 最初是因其具有诱导未分化间充质细胞向成骨细胞、成软骨细胞分化, 促进新骨形成的作用^[1-2]而被发现的, 随着研究的深入, 发现 BMPs 家族不仅具有诱导成骨功能, 还发现其具有调控胚胎发生发育、营养神经及调控某些肿瘤的发生与生长的作用^[3-5]。由于其所具有

的广泛的生物学活性特别是在骨缺损及肿瘤治疗等方面

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271349)

[作者简介] 王磊(1978-), 男, 山东德州人, 研究生, 主要从事口腔肿瘤方面的研究, 现工作于齐鲁医院口腔科

[通讯作者] 魏奉才, 博士生导师, E-mail: lshabcba@sdu.edu.cn

面所显示的良好应用前景,人们将关注点集中在利用 BMP 进行基因治疗的研究中,初步研究结果已显示了诱人前景。纵观当前研究,利用基因载体特别是腺病毒载体进行基因治疗是常用方法之一。但目前腺病毒载体构建大多是以同源重组方式,其缺点是质粒共转染效率低,同源基因重组效率更低,因而导致成功率小,且包装形成的重组腺病毒克隆需要经过多轮筛选与鉴定,过程繁琐复杂。本研究的目的是探索利用体外连接技术优化载体构建方法,简化载体构建过程,为后续基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

含人 BMP-2 全长 cDNA 的质粒 pSP65-BMP-2 由中国军事医学科学院岳文提供。腺病毒质粒 Adeno-X、辅助载体 pShuttle2、HEK293 细胞购自 BD 公司; pMD18-T 载体购自大连宝生物公司; 宿主菌 JM109、DH5 α 由山东大学齐鲁医院临床基础研究所提供。

1.2 试剂

限制性内切酶 Xba I 及 Kpn I 购自大连宝生物公司; 限制性内切酶 PI-Sce I, I-Ceu I 及 Pac I 购自 BD 公司; 腺病毒引物购自 BD 公司; T4DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司; DNA 提取回收试剂盒购自大连宝生物公司。

1.3 引物设计

BMP-2 引物: 上游: 5'-TAATCTAGAATGGTGGC-CGGGACCCGCTG-3'; 下游: 5'-TTGGTACCCTAGCGA-CACCCACAACCCTC-3'

1.4 PCR 扩增 BMP-2 基因及 pMD 18-T-BMP-2 重组载体构建

以 pSP65-BMP-2 为模板, PCR 扩增 BMP-2 基因片断, PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min 后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 经 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。将扩增 PCR 产物连于 pMD 18-T 载体后转化感受态 DH5 α , 氨苄抗性法培养, 挑取半个菌落以 BMP-2 引物 PCR 筛选阳性菌落, 限制性内切酶 Xba I 及 Kpn I 酶切。将 PCR 及酶切鉴定正确的单克隆质粒送大连宝生物公司测序。

1.5 重组载体 pShuttle2-BMP-2 的构建

pMD 18-T-BMP-2 及 pShuttle2 分别经限制性内切酶 Xba I 及 Kpn I 双酶切, 1% 低熔点琼脂糖回收 BMP-2 基因片断及 pShuttle 2 大片段并以 T4DNA 连接酶连接, 转化感受态 JM109, 卡那霉素抗性法培养, 挑取半个菌落, 以 BMP-2 基因引物 PCR 筛选阳性菌落, PCR 条件同上。限制性内切酶 Xba I 及 Kpn I 酶切 2 次鉴

定筛选出含 BMP-2 基因的阳性质粒。

1.6 重组腺病毒 Adeno-X-BMP-2 的构建

将 pShuttle2-BMP-2 以限制性内切酶 PI-Sce I 及 I-Ceu I 双酶切回收 2 282 bp 含 Bmp-2 片段, 将其与同样经限制性内切酶 PI-Sce I 及 I-Ceu I 双酶切的 Adeno-X, 以 T4DNA 连接酶连接, 转化感受态 JM109, 氨苄青霉素抗性法培养, 挑取半个菌落分别以腺病毒引物及 BMP-2 引物, PCR 检测。BMP-2 PCR 条件同上, 腺病毒 PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C 2 min 后, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 2 min 经 30 个循环后 68 $^{\circ}$ C 3 min。以 1% 琼脂糖电泳, 挑选 PCR 阳性菌落, 并以限制性内切酶 PI-Sce I 及 I-Ceu I 双酶切以 1% 琼脂糖电泳 2 次鉴定, 筛选阳性质粒。

1.7 重组腺病毒酶切纯化及转染

将 293 细胞接种于 6 孔培养板, 密度约 2×10^6 个/孔, 培养至 293 细胞 70% 汇合。将重组腺病毒质粒以限制性内切酶 Pac I 酶切, 将其细菌成分切下并纯化, 酶切产物以脂质体包装转染 293 细胞。293 细胞出现变大变圆的细胞病变后, 以反复冻融方法提取重组腺病毒。为提高病毒滴度, 可将回收重组病毒再次感染 293 细胞, 培养回收即可。

2 结果

2.1 pMD 18-T-BMP-2 质粒酶切及 PCR 鉴定

采用 1% 琼脂糖电泳, PCR 见 1.2 kb 处有带, 与 BMP-2 大小符合; 限制性内切酶 Xba I 及 Kpn I 酶切见 1.2 kb 及 2.7 kb 处各有一条带, 与 BMP-2 及 pMD 18-T 载体大小符合(图 1)。

图 1 pMD 18-T-BMP-2 质粒酶切及 PCR 鉴定琼脂糖电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis of PCR and enzyme of pMD 18-T-BMP-2

A: PCR products of pMD 18-T-BMP-2; B: 1 kb maker; C: The result of recombinant enzyme digestion with Xba I and Kpn I

2.2 pShuttle2-BMP-2 质粒酶切及 PCR 鉴定

1% 琼脂糖电泳, PCR 见 1.2 kb 处有带, 与 BMP-2 大小符合; 限制性内切酶 Xba I 及 Kpn I 酶切见 1.2 kb 及 4.1 kb 处有带, 与 BMP-2 及 pShuttle 大小符合; 限制性内切酶 PI-Sce I 及 I-Ceu I 双酶切, 以 1% 琼脂糖电泳见 2.3 kb 处有带, 与含 Pcmvie 的 BMP-2 大小符合 (图 2)。

图 2 pShuttle2-BMP-2 质粒酶切及 PCR 鉴定琼脂糖电泳结果

Fig. 2 The electrophoresis of PCR and enzyme of pShuttle2-BMP-2

A: The result of recombinant enzyme digestion with Xba I and Kpn I ; B: PCR products of pMD 18-T-BMP-2; C: 1 kb maker; D: The result of recombinant enzyme digestion with PI-Sce I and I-Ceu I

2.3 重组 Adeno-X-BMP-2 质粒酶切及 PCR 鉴定

PCR 以 1% 琼脂糖电泳见 1.2 kb 及 287 bp 处有带, 与 BMP-2 及腺病毒 PCR 扩增结果相符。限制性内切酶 Xba I 及 Kpn I 双酶切、PI-Sce I 及 I-Ceu I 双酶切, 以 1% 琼脂糖电泳见 1.2 kb 及 2.3 kb 处有带, 与 BMP-2 大小及含 Pcmvie 的 BMP-2 大小符合 (图 3)。

2.4 重组腺病毒 PCR 鉴定

以反复冻融方法提取 293 细胞中的腺病毒, 分别以 BMP-2 引物及腺病毒引物做 PCR, 以 1% 琼脂糖电泳, 见 1.2 kb 及 287 bp 处有带, 与 BMP-2 及腺病毒扩增片段相符, 证实为携带 BMP-2 基因的重组腺病毒 (图 4)。

3 讨论

近年来, 随着人类基因结构及其功能研究的深入, 人们对疾病的认识也更加深刻, 基因治疗相关方面研究也随之发展起来, 并且已有相关药品进入临床应用。因为基因治疗直面疾病的根本, 从基因水平根治疾病, 将疾病源头遏制, 因此基因治疗极有可能是在二十一世纪成为疾病预防与治疗的主要方法。而基因载体对

于基因治疗是其中必不可少的一种工具手段。腺病毒作为基因载体的一种因其感染种类广泛, 不整合宿主细胞基因, 不依赖于细胞增殖, 且较易获得高滴度病毒^[6], 因此成为基因治疗常用载体的一种。而且腺病毒载体疫苗生产较容易、成本低, 不需纯化, 无热源性问题, 与常规疫苗相比安全^[7], 因此在基因治疗方面有广阔前景。

图 3 重组 Adeno-X-BMP-2 质粒酶切及 PCR 鉴定琼脂糖电泳结果

Fig. 3 The electrophoresis of PCR and enzyme of Adeno-X-BMP-2

A: PCR products of Adeno-X-BMP-2; B: 1 kb maker; C: The result of recombinant enzyme digestion with Xba I and Kpn I ; D: The result of recombinant enzyme digestion with PI-Sce I and I-Ceu I ; E: PCR products of Adeno-X-BMP-2

本研究采用的是 E1, E3 区缺失的 5 型腺病毒载体 Adeno-X, 采用体外连接技术将目的基因 BMP-2 连接到腺病毒载体上, 而不是传统的同源重组方法。传统的同源重组效率低、筛选繁琐、实验周期长。采取酶切连接技术优化构建方法后可以使全部的构建阶段最快在 3 周内完成, 极大缩短了实验时间。虽然腺病毒去掉了复制功能区 E1 但因为其较容易获得高滴度腺病毒, 所以其感染效率依然很高, 在宿主细胞中仍可高效表达目的基因。对于引物设计方面, 本实验在 BMP-2 引物上附加设计了两酶切位点, 这样 BMP-2 可以以定向连接方式连接到辅助载体上, 避免筛选正反向问题; 并且扩增的 PCR 产物在连接到 T 载体后获得的单克隆质粒由大连宝生物公司测序证实与 GENE BANK 上 BMP-2 功能区序列相同。关于腺病毒引物的设计是基于体外连接技术, 腺病毒上游引物取自于腺病毒基因序列 PI-Sce I 酶切位点端一侧, 下游引物取自于辅

助载体 pShuttle2 序列上的 PI-Sce I 酶切位点端一侧,引物扩增区长度为 287 bp,包涵腺病毒及辅助载体序列,连接成功,PCR 即可测出,方法简单,结果可靠,而同源重组依靠同源基因序列重组,但其非同源序列相对而言所占比例较大,因而易产生重组错误及野生型腺病毒。由以上设计方案可以看出本研究独特之处在于:(1)方法简单、快捷、试验期短。酶切及连接技术是实验室常用方法,技术已十分成熟,利用体外连接技术最快可在 3 周内构建出重组腺病毒。(2)结果准确,成功率高。充分利用 PCR 的特性,只要目的基因和腺病毒连接成功,PCR 就可检验出来,即表示已准确构建成功,从根本上克服同源重组效率低下,出错率高及出现野生型腺病毒的现象。

BMP-2 与多形性腺瘤组织内的软骨形成有关^[8]。在基因水平上杨连甲检测了成釉细胞瘤中的 BMP-2,发现肿瘤 BMP-2 有个别基因改变从而导致了其表达的氨基酸改变,提示了 BMP-2 的改变可能在成釉细胞瘤的病理机制中发挥重要作用^[9]。以上说明 BMP 与某些肿瘤的发生发展有着直接或间接的关系,这也暗示着基因治疗治愈疾病可行性。Giozak^[10]研究发现以维甲酸和 BMP-2、BMP-4 联合应用协同诱导恶性胚胎瘤细胞 P19,24 h 内有 40% 瘤细胞发生凋亡,而单独使用维甲酸只有 10% ~ 15% 的瘤细胞凋亡,这提示 BMP-2 具有促进癌细胞凋亡、抑制肿瘤增殖的作用。由以上可以看出含 BMP-2 基因的复合腺病毒表达载体构建成功无疑会在骨缺损及肿瘤等基因治疗方面具有广大研究前景。

[参 考 文 献]

- [1] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, *et al.* Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities[J]. *Science*, 1988, 242(4885): 1528-1543.
- [2] Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair [J]. *Clin Orthop*, 1998, 346: 26-37.
- [3] Christ B, Schmidt C, Huang R, *et al.* Segmentation of the vertebrate body[J]. *Anat Embryol Berl*, 1998, 197(1): 1-8.
- [4] Hogn BL, Bone morphogenetic proteins in development [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6(4): 432-438.
- [5] Song Q, Mehler MF, Kessler JA. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis and growth factor dependence of cultured sympathetic progenitor cells[J]. *Dev Biol*, 1998, 196: 119-127.
- [6] Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S, *et al.* Adenovirus as an expression vector in muscle cells *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(7): 2581-2584.
- [7] McGrory WJ, Bantista DS, Graham FL. A simple technique for the rescue of early-region I mutations into infectious human adenovirus type 5[J]. *Virology*, 1998, 163(2): 614-617.
- [8] Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, *et al.* Expression of bone morphogenetic proteins in salivary pleomorphic adenomas [J]. *Virchows Arch*, 1998, 432(3): 247-253.
- [9] 岳文, 杨连甲, 朱峰, 等. BMP2 在成釉细胞瘤中的表达及成熟肽片断的基因克隆[J]. *中华口腔医学杂志*, 2000, 2(35): 98.
- [10] Glozak MA, Rogers MB. Specific induction of apoptosis in P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid and BMP-2 or BMP-4 [J]. *Dev Biol*, 1996, 179(2): 458-470.

图 4 重组腺病毒 PCR 鉴定琼脂糖电泳结果

Fig. 4 The electrophoresis of PCR of recombinant adenovirus

A: 1 kb maker; B: PCR products of recombinant adenovirus;

C: PCR products of recombinant adenovirus

随着对 BMPs 家族研究深入, BMP 研究已不仅限于成骨方面,近年来在肿瘤发生及治疗方面研究也有很大进展。在分子水平上 Kusafuka 利用免疫组化发现涎腺多形性腺瘤在软骨样组织周边和基底膜的肌上皮样细胞内有 BMP-2 的表达,提示

[收稿日期] 2003 - 12 - 20

[修回日期] 2004 - 02 - 10