

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0214-05

NT4-p53(N15)-Ant 融合基因重组腺病毒的构建与鉴定

宋丽萍¹, 李跃萍², 邱曙东², 杨广笑³, 王全颖³(1. 西安交通大学第一附属医院放疗科, 西安 710061; 2. 西安交通大学医学院人体解剖与组织胚胎学系, 西安 710061; 3. 西安华广生物工程公司, 西安 710025)

[摘要] **目的:**构建编码融合基因 *NT4-p53(N15)-Ant* 的重组腺病毒表达载体,为进一步基因治疗的实验研究奠定基础。**方法:**利用 PCR 体系延伸互为模板的引物,通过 T 载体克隆法获得 *p53(N15)-Ant* 基因克隆,酶切后连入 pBV220/NT4 质粒,再将融合基因 *NT4-p53(N15)-Ant* 亚克隆至腺病毒的穿梭质粒内,与辅助质粒 PJM17 共同转染 HEK-293 细胞,通过同源重组获得重组腺病毒 Ad. NT4-p53(N15)-Ant,收集病毒上清,大量扩增并测定其滴度,用 RT-PCR 检测目的基因在 293 细胞的表达情况。MTT 比色法观察重组病毒对 HepG2 细胞存活率的影响。**结果:**克隆出 *p53(N15)-Ant* 基因,经酶切及测序证实结果正确;得到高滴度的(1×10^{11} pfu/ml)重组腺病毒表达载体;反转录聚合酶链反应证实感染 Ad. NT4-p53(N15)-Ant 的 293 细胞中有目的基因的表达。Ad. NT4-p53(N15)-Ant 对 HepG2 细胞有强烈的杀伤作用,与 Ad. GFP 比较,NT4 p53(N15)Ant 重组腺病毒处理组 HepG2 细胞的存活率明显降低。**结论:**通过分子克隆体外重组技术成功制备了 NT4-p53(N15)-Ant 复制缺陷型重组腺病毒,为下一步的肿瘤基因治疗奠定了基础。

[关键词] *NT4-p53(N15)-Ant*; 重组腺病毒; 肿瘤; 基因治疗

[中图分类号] R73-3 **[文献标识码]** A

Construction and identification of recombinant adenovirus vector harboring fusion gene *NT4-p53(N15)-Ant*

SONG Li-ping¹, LI Yue-ping², QIU Shu-dong², YANG Guang-xiao³, WANG Quan-ying³(1. Department of Radiation Therapy, The First Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an JiaoTong University, Xi'an 710061, China; 2. Department of Anatomy and Histology & Embryology, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; 3. Xi'an Huaguang Bio-engineering Company, Xi'an 710025)

[Abstract] **Objective:** To construct a recombinant adenovirus vector harboring fusion gene *NT4-p53(N15)-Ant*, laying a foundation for gene therapy research of malignant tumors. **Methods:** The *p53(N15)-Ant* gene was obtained by T-vector method and was inserted in pBV220/NT4 vector after digested with restriction enzyme. The fusion gene of *NT4-p53(N15)-Ant* was subcloned into the shuttle plasmid of adenovirus; the products were cotransferred into HEK-293 cell line with helper plasmid PJM17. The recombinant adenovirus was produced by homologous recombination of above 2 plasmids in HEK-293 cells and its titer was measured by plaque-forming. The expression of Ad. NT4p53Ant in transfected 293 cells was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) procedure. The effect of Ad. NT4p53Ant on HepG2 cell line was measured by a colorimetric 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. **Results:** The *p53(N15)-Ant* gene was confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. High titer of recombinant adenovirus was obtained by homologous recombination in HEK-293 cells (1×10^{11} pfu/ml). The expression of *NT4-p53(N15)-Ant* gene in 293 cells was confirmed by RT-PCR. Ad. NT4p53Ant had strong killing effect on HepG2 cells. Compared with Ad. GFP, Ad. NT4p53Ant significantly decreased the survival rate of HepG2 cells. **Conclusion:** The recombinant adenovirus vector encoding gene *NT4-p53(N15)-Ant* has been successfully constructed in this experiment by molecular cloning and *in vitro* recombination techniques, laying a foundation for further research of gene

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471942),陕西省科技攻关项目(2004k11-G3)

[作者简介] 宋丽萍(1963-),女,西安市人,博士,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究

[通讯作者] 宋丽萍, E-Mail: xaslp@126.com

therapy of cancer.

[**Key words**] NT4-p53(N15)-Ant; recombinant adenovirus; carcinoma; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(3): 214-218]

随着人们对 p53 结构、功能及代谢研究的深入,发现 MDM2 作为 p53 的主要负调控因子,可与 p53 结合从而抑制其对下游基因的转录功能,并通过泛素依赖的蛋白酶体途径使 p53 降解,因此干扰 P53-MDM2 结合成为研究的热点^[1-3]。Kanovsky 和 Do 等^[4-5]分别发现来源于人 P53 氨基端 MDM2 结合区 12~26 位氨基酸的 P53 短肽异源融合一种由 17 个氨基酸构成的蛋白质转导结构-Ant(黑腹果蝇触角肽 antenapedia)后,可直接引起胰腺癌、乳腺癌细胞坏死,具有比野生型 p53 更强的抗肿瘤作用,而对正常细胞没有毒性,这在传统的基因治疗中少见。本研究拟构建神经生长因子 4(NT4)信号肽引导的可分泌表达 p53(N15)Ant 的重组腺病毒高效表达载体 Ad-NT4p53(N15)Ant,为下一步进行重组腺病毒载体抗肿瘤的基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆载体 pGEM-T-Easy 质粒(50 ng/μl)购自 Promega 公司。限制性内切酶 *Nae* I, *Bam*H I, *Eco*R I, Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, M-MuLV 反转录酶等试剂购自华美生物工程公司。pBV220-NT4 质粒,腺病毒穿梭质粒 pACCMV. plpA 及辅助包装质粒 pJM17, 大肠杆菌 DH5α 及 293 细胞系, HepG2 人肝癌细胞系均由西安华广生物工程公司提供。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 提供的编码 P53 12~26 位氨基酸的已知基因序列及果蝇穿膜肽 43~58 位氨基酸寡肽基因序列,应用 DNASIS 计算机软件设计下列引物,为方便克隆在上游和下游引物的 5'端分别引入 *Nae* I 和 *Bam*H I 酶切位点。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成, PAGE 纯化。P1: 5'-GGCCGGC CCACCTCTGAGTCAGGAAACATTCTCAGACCTATGGA AGCTTCTTAAGAAG-3', P2: 5'-G GGATCCTCATTCG CGCTGTACCTTTACCCAGAAGTATTCCGGCGCATCTTC CACTTCTTAAG-3'。

1.3 cDNA 克隆及序列分析

利用 PCR 体系延伸互为模板的引物,反应条件为:94℃ 变性 60 s, 40℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 循环 30 次, 72℃ 延伸 10 min。p53(N15)Ant 基因片段连接入 pGEM-T 载体,送上海生工生物工程公司测序。取 5 μl PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将连

接产物转化入感受态细菌 *E. coli* DH5α 菌株,用碱裂解法提取质粒,限制性内切酶酶切分析法筛选 pGEM-T/阳性克隆。

1.4 pBV220/NT4p53(N15)Ant 载体构建

碱裂解法大量制备重组质粒 pGEM-T/p53(N15)Ant,用限制性内切酶 *Nae* I 彻底消化后再用 *Bam*H I 消化,切取 p53(N15)Ant 用 T4DNA 连接酶连入带有相同末端的已线性化 pBV220-NT4 载体。用连接反应产物转化制备好的感受态细菌 *E. coli* DH5α 菌株,随机挑选单个菌落,接种于含有氨苄西林的 LB 培养基内,37℃ 增殖培养后,碱裂解法少量提取质粒,用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 联合酶切,筛选出含有约 339 bp 左右的重组质粒 pBV220/NT4p53(N15)Ant。

1.5 腺病毒穿梭质粒 pACCMV. plpA/NT4 p53(N15)Ant 的构建

*Eco*R I 和 *Bam*H I 联合酶切腺病毒穿梭质粒 pACCMV. plpA 和 pBV220/NT4p53(N15)Ant,低熔点凝胶回收 NT4p53(N15)Ant 和线性化的 pACCMV. plpA, T4DNA 连接酶连接,转化 DH5α 感受态细菌,挑选转化的菌落,提取质粒, *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切筛选并鉴定阳性克隆。

1.6 重组腺病毒的包装与鉴定及滴度测定

采用磷酸钙沉淀法两质粒共转染 HEK-293 细胞获取重组腺病毒。转染 10 d 后,质粒在细胞内同源重组构建出活重组腺病毒,毒斑出现,反复冻融含病毒栓子的培养基,提取病毒,收集含病毒的上清液感染 80% 成片的 293 细胞,48 h 后进行 RT-PCR 鉴定。取毒种 0.2 ml,10 倍稀释,依次将毒种稀释至 1×10^{-11} ,吸附 1 h 后,弃液体培养基换固体培养基培养,7 d 后数斑,计算滴度。

1.7 重组腺病毒对 HepG2 细胞存活率的影响

将 HepG2 细胞以每孔 8 000 个细胞的量接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200 μl,培养 24 h 后分不处理组与处理组,处理组加入 10 MOI 的 Ad. GFP 或重组病毒,病毒作用 5 h 后更换新鲜正常培养液,在病毒作用后的 24、48、72、96 h 分别终止培养(以上每组各设 3 个复孔)。加入 MTT 试剂(5 mg/ml)20 μl, 37℃ 孵育 4 h,将含 MTT 的培养液移去,加入二甲基亚砜 150 μl,摇匀 15 min,使反应产物充分溶解。在测定波长为 570 nm 的酶标仪上测定光密度 *D* 值。肿瘤细胞存活率(SR)的计算式:SR = 处理组 *D*/对照组 *D* × 100%。

2 结果

2.1 重组质粒 pBV220/NT4p53(N15)Ant 的构建

利用 PCR 体系延伸互为模板的引物,所得产物和 PCR 分子量标准参照物相比较,在琼脂糖凝胶电泳上获得约 96 bp 的全长 p53(N15)Ant 基因片段(图 1)。阳性重组质粒 pGEM-T/p53(N15)Ant 克隆的 DNA 测序结果与 GenBank 提供的已知序列比较,所克隆的 p53(N15)Ant 基因从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAG 全长共 102 bp,序列完全相同。p53(N15)Ant 插入 pBV220-NT4 载体,转化 *E. coli*,挑取克隆,进行 PCR 及酶切鉴定(图 2)。

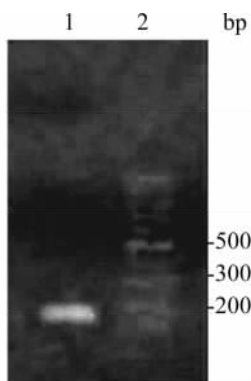


图 1 p53(N15)Ant PCR 产物酶切鉴定

Fig.1 Identification of PCR product of p53(N15)Ant

1:PCR product of p53(N15)Ant; 2:100 bp DNA ladder

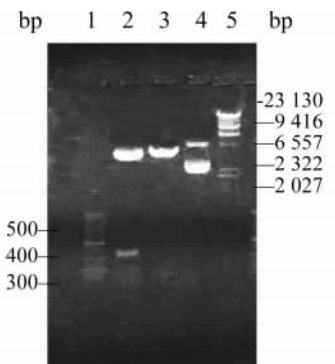


图 2 pBV220/NT4p53(N15)Ant 重组质粒酶切鉴定
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pBV220/NT4p53(N15)Ant by restrictive enzyme digestion

1: 100 bp DNA ladder;2: Digested with *Hind* III;3: Digested with *Eco*RI;4: Negative control;5: lambdaDNA/*Hind* III marker

2.2 重组腺病毒穿梭质粒 pACCMV. plpA/ NT4p53(N15)Ant 的构建与鉴定

NT4p53(N15)Ant 插入 pACCMV. plpA 载体(图 3),转化 *E. coli*,挑取克隆,进行 PCR 及酶切鉴定,重组

质粒 pACCMV. plpA/ NT4 p53(N15)Ant 的大小为 9 133 bp。用经限制性内切酶 *Eco*RI 与 *Bam*HI 联合酶切后得到 8 800 bp 和 345 bp 两个片段(图 4)。

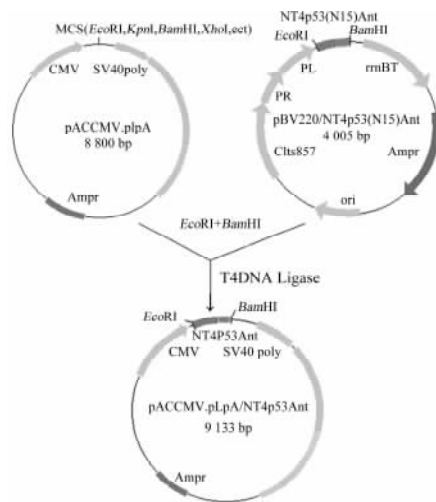


图 3 pACCMV. plpA/ NT4p53(N15)Ant 构建示意图

Fig. 3 Construction of pACCMV. plpA/ NT4p53(N15)Ant

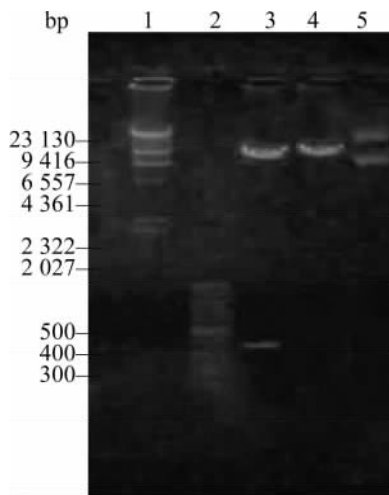


图 4 pACCMV. plpA/ NT4p53(N15)Ant 重组质粒的酶切鉴定图

Fig.4 Identification of recombinant plasmid pACCMV. plpA/NT4p53(N15)Ant by restrictive enzyme digestion

1:lambdaDNA/*Hind* III marker; 2: 100 bp Ladder; 3: Digested with *Eco*RI + *Bam*HI; 4: Digested with *Eco*RI; 5: Negative control

2.3 NT4p53(N15)Ant 重组腺病毒包装与滴度测定

将构建好的重组 pACCMV. plpA/ NT4p53(N15)Ant 质粒与腺病毒的另一包装质粒 pJMI7(40 kb)应用磷酸钙-DNA 共沉法共转染 80% 融合的 293 细胞,包装得到 NT4-p53(N15)Ant 重组腺病毒。将所获得的病毒液对数比稀释后,再次感染培养于固体培养基的

293 细胞, 1 周后数斑测定滴度为 1×10^{11} pfu/ml。用收获的毒种感染 293 细胞, 至 MOI 为 10 时, 加 PBS 液细胞冰融, 离心取上清 -20°C 保存备用。

2.4 RT-PCR 鉴定目的基因的表达

提取 293 细胞总 RNA, RT-PCR 证实有目的基因 NT4-p53(N15)-Ant 的表达(图 5)。

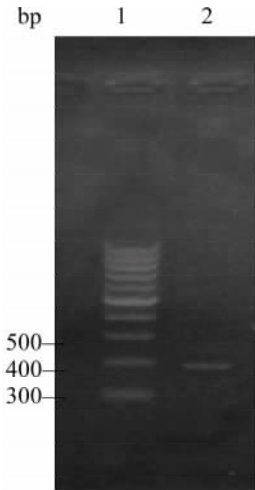


图 5 RT-PCR 法鉴定 Ad. NT4p53(N15)Ant 重组病毒在 293 细胞中的表达

Fig. 5 Identification of Ad. NT4p53(N15)Ant by RT-PCR
1: 100 bp DNA ladder; 2: PCR product of NT4p53(N15)Ant

2.5 MTT 比色法测定重组腺病毒对肿瘤细胞的杀伤作用

Ad. GFP 和 NT4 p53(N15)Ant 重组腺病毒分别感染 HepG2 细胞。随着作用时间的延长, NT4 p53(N15)Ant 重组腺病毒处理组比 Ad. GFP 组的 HepG2 细胞的存活率明显降低, 说明 NT4p53(N15)Ant 重组腺病毒对肿瘤细胞有杀伤作用。

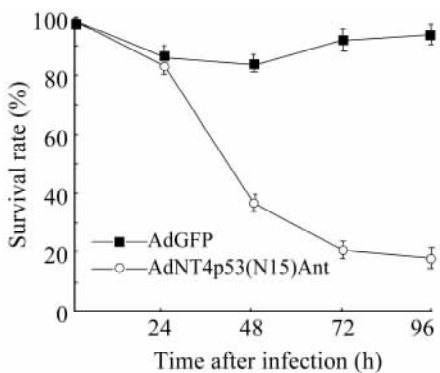


图 6 Ad. GFP 与 Ad. NT4p53(N15)Ant 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig. 6 Survival rates of HepG2 after infection of Ad. GFP or Ad. NT4p53(N15)Ant

3 讨论

p53 基因的突变, 是肿瘤中最常见的遗传学改变。某些人类肿瘤中虽然没有 p53 基因突变, 但有 p53 功能缺失, 说明该基因的异常很可能是人类肿瘤产生的主要因素。因此 p53 基因是肿瘤最广谱的治疗靶点。由于 p53 基因在体内易发生降解、突变, 近年来发现 MDM2 基因可使 p53 泛素化降解, 而且可直接抑制 p53 的转录激活作用, 是 p53 的主要负调节因子。实验证实了一些抑制 MDM2-P53 结合的短肽有抗肿瘤活性, 但却不易通过细胞膜, 而且很快降解, 作用有限。P53(N15)Ant 肽可直接导致肿瘤细胞坏死, 机制可能是其 α 螺旋构象与 MDM2 结合, 抑制了 P53 蛋白的泛素化降解; 也有研究发现此融合肽形成 S 螺旋结构^[6]。然而由于该融合肽生物半衰期短, 易降解, 生物利用度低, 对在体肿瘤难以达到有效剂量浓度, 且价格昂贵。

使用真核表达载体和重组病毒直接表达活性肽, 同样受到转导效率的限制和表达细胞的自杀死亡, 难达到有效治疗实体瘤的目的。采用基因工程, 将编码目的蛋白的基因序列融合到编码信号肽的 DNA 中可实现外源蛋白的分泌表达, 可防止宿主细胞对表达产物的降解并能恢复表达产物天然构象, 还可以使目的蛋白分泌出胞, 杀伤比邻的未转染的肿瘤细胞, 扩大治疗效应。而目前对较短的生物活性肽进行分泌表达的研究有限, 主要由于信号肽和目的短肽要保证连接后的序列与肽酶识别的氨基酸序列不变, 才能被肽酶正确切割, 使目的肽发挥应有的作用。

本实验室前期已成功地应用神经营养因子(NT4)所含的信号肽和前导肽序列实现了原核细胞的分泌表达^[7]。本研究中应用非对称互为引物 PCR 技术和 T-载体克隆法克隆 p53(N15)Ant 基因片段, DNA 测序结果与文献提供的已知序列完全相同。并利用神经营养因子 4(NT4)所含的信号肽序列中肽酶裂解点前天然的 Nae I 酶切位点, 与目的短肽 P53(N15)Ant 连接, 成功构建了神经生长因子 4(NT4)信号肽引导的可分泌表达 P53(N15)Ant 的重组腺病毒高效表达载体(Ad-NT4P53(N15)Ant), 并且证明对肝癌 HepG2 细胞有杀伤活性, 说明了目的短肽被正确切割并发挥了生物活性。克服了野生型 p53 基因在体内易降解、半衰期短, 不易进入肿瘤细胞核及腺病毒转导效率有限等问题, 为生物活性短肽的基因治疗奠定了基础。拟进一步研究其对肝癌细胞的杀伤作用和旁观者效应及对正常细胞的影响, 并研究对 H22 小鼠肝癌移植瘤的治疗作用。

[参考文献]

[1] Lindsay MA. Peptide-mediated cell delivery: Application in pro-

tein target validation[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2002, 2(5): 587-594.

[2] Schon O, Friedler A, Freund S, *et al.* Binding of p53-derived ligands to MDM2 induces a variety of long range conformational changes[J]. *J Mol Biol*, 2004, 336(1): 197-202.

[3] Issaeva N, Friedler A, Bozko P, *et al.* Rescue of mutants of the tumor suppressor p53 in cancer cells by a designed peptide[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13303-13307.

[4] Kanovsky M, Raffo A, Drew L, *et al.* Peptides from the amino terminal mdm2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(22): 12438-12443.

[5] Do TN, Rosal RV, Drew L, *et al.* Preferential induction of necrosis

in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site[J]. *Oncogene*, 2003, 22(10): 1431-1444.

[6] Rosal R, Brandt-Rauf P, Pincus MR, *et al.* The role of alpha-helical structure in p53 peptides as a determinant for their mechanism of cell death: Necrosis versus apoptosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 653-660.

[7] 杨宇, 吴江, 杨欣, 等. NT4-NAP 融合基因原核表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达[J]. *中华神经科杂志*, 2004, 37(3): 260-261.

[收稿日期] 2006-02-27 [修回日期] 2006-05-21

[本文编辑] 郁晓路

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0218-01

· 研究简报 ·

PTEN 基因第 5、7、8 外显子的克隆、探针制备及其在子宫内膜癌中的应用 Cloning 5, 7, 8 exons of *PTEN* gene and preparing the probe and its application on endometrium cancer

杨华¹, 胡静¹, 侯巧芳², 刘雪花³(1. 西安交通大学第二医院妇产科, 西安 710004; 2. 西安交通大学法医学系, 西安 710049; 3. 上海市南汇区中心医院妇产科, 上海 201300)

子宫内膜癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一, 近年来发病率明显上升。其中 I 型子宫内膜癌为雌激素依赖型, 占子宫内膜癌的 80% 以上。研究表明, *PTEN* 基因与 I 型子宫内膜癌密切相关, 在所有目前已明确的子宫内膜癌相关基因中 *PTEN* 基因突变率最高, 其突变位点多集中在第 5、7、8 外显子。从遗传学角度探讨 *PTEN* 基因多态性与 I 型子宫内膜癌的相关性国内外对此研究较少。因此, 本研究选择 *PTEN* 第 5、7、8 外显子作为检测对象, 应用自行制备的 *PTEN* 第 5、7、8 外显子特异性探针检测 I 型子宫内膜癌组织中这 3 种外显子的基因型, 研究抑癌基因 *PTEN* 多态性与 I 型子宫内膜癌组织的相关性, 以期为早期筛查内膜癌易感人群及为内膜癌的早诊断、早治疗及其个体化的诊治方案提供一个平台。

研究方法采用 T-A 克隆制备 *PTEN* 基因第 5、7、8 外显子特异性片段, 经随机引物地高辛标记, 制备 3 个外显子的探针。用 RFLP 技术检测 41 例 I 型子宫内膜癌组织和 45 例正常对照组织中 *PTEN* 基因第 5、7、8 外显子的基因型频率, 结果用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。

实验结果显示: (1) 通过测序证明克隆 *PTEN* 第 5、7、8 外显子成功, 斑点杂交检测标记效率, 敏感性分别达 0.3 pg/μl、0.1 pg/μl、0.1 pg/μl。(2) 外显子 5 在病例组和对照组中 A₁A₂A₃ 基因型分别为 32 例和 45 例, A_xA₃ 基因型分别

为 9 例和 0 例; 外显子 7 在病例组和对照组中 B₁B₂ 基因型分别为 28 例和 45 例, B₂B₂ 基因型分别为 13 例和 0 例; 外显子 8 在病例组和对照组中 C₁C₁ 基因型分别为 26 例和 13 例, C₁C₂ 基因型分别为 7 例和 9 例, C₂ 基因型分别为 8 例和 23 例。(3) 病例组和对照组中的基因型频率分析结果显示, *PTEN* 基因外显子 5、7、8 的多态性与 I 型子宫内膜癌组织均有相关性(*P* < 0.05)。

本研究成功制备了 *PTEN* 第 5、7、8 外显子特异性探针, 此方法有较高特异性及敏感性, 操作简便、快速, 经济可行, 对早期子宫内膜癌等临床肿瘤的基因诊断及肿瘤细胞的转基因治疗具有较大的实用价值和前景。子宫内膜癌病人基因组 DNA 限制性片段与正常组之间比较, 基因型分布均具有显著性差异, 提示子宫内膜癌病人可能存在 *PTEN* 基因纯合性或杂合性缺失; 某些基因型可提示其子宫内膜癌易感性高。*PTEN* 基因第 5、7、8 外显子多态性与子宫内膜癌的相关性分析, 有助于对肿瘤易感者的早期筛查和对患者的早期基因诊断, 为进一步开展基因治疗提供理论依据。

[关键词] *PTEN* 基因; 外显子; 探针制备; 子宫内膜癌
[中图分类号] R730 [文献标识码] D

[收稿日期] 2006-03-15 [修回日期] 2006-05-30
[本文编辑] 韩丹