

PNP 表达质粒的构建及鉴定

蔡晓坤, 刘址忠, 林菊生*, 马 昕, 梁扩寰

The Construction and Identification of a Vector Containing PNP Suicide Gene

CAI Xiao-kun, LIU Zhi-zhong, LIN Ju-sheng*, MA Xin, L IANG Kuo-huan

Liver Disease Institute, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (* Corresponding Author)

Abstract :Objective To construct and identify a novel expression vector harboring PNP gene. **Methods** Inserting PNP gene into pcDNA 3.0, an expression vector containing PNP gene driven by the CMV promoter, pcDNA 3.0/ PNP was constructed by using recombinant DNA techniques. The recombinant was analyzed and identified by restriction enzyme, PCR and sequencing. The expression vector carrying PNP gene was transfected into three tumor cell lines by liposome-mediated method. The expressions of PNP gene in all cell lines were detected by RT-PCR method. **Results** The target fragment was cloned into the corresponding vector. The expressions of PNP gene in different tumor cell lines were positive. **Conclusion** The expression vector containing PNP gene under the control of a CMV promoter, is an novel effective expression vector for tumor gene therapy.

Key words: PNP/ Mep-dR suicide gene system; Tumor; Gene therapy

摘要: 目的 构建并鉴定一种新型的 PNP 自杀基因表达载体。方法 将 PNP 基因插入到 pcDNA 3.0 中, 构建 PNP 基因表达载体 pcDNA 3.0/ PNP; 通过酶切、PCR 及测序鉴定重组体。采用脂质体介导法将 pcDNA 3.0/ PNP 转染三种肿瘤细胞株, RT-PCR 检测 PNP 基因在各细胞株中的表达。结果 目的片段均成功插入相应的载体中, CMV 启动子调控下的 PNP 基因在不同的肿瘤细胞株中实现了表达。结论 CMV 启动子调控的 PNP 基因表达载体是肿瘤基因治疗中一种新型、高效的治疗载体。

关键词: PNP/ Mep-dR 系统; 肿瘤; 基因治疗

中图分类号: R73-35⁺ 4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)07-0414-03

0 引言

肿瘤自杀基因研究面临的一大难题是如何提高基因表达产物的旁观者效应。PNP/ Mep-dR 系统是目前已知的旁观者效应最为强大的自杀基因/ 前药系统^[1]。本研究利用该系统构建并鉴定了一种由 CMV 启动子调控的 PNP 基因表达载体 pcDNA 3.0/ PNP; 同时分析了它在肝癌基因治疗中的应用前景。

1 材料及方法

1.1 材料 真核表达载体 pcDNA 3.0 购自 Invitrogen 公司, 携 PNP 基因质粒 p Tyr-PNP-2 美国 Pittsburgh 大学 David Barlett 教授惠赠。大肠杆菌 DH5⁺ 菌株由本所保存。AFP 阳性及阴性人肝癌细胞株 Hep G2 和 SMMC7721, 人宫颈癌细胞株 Hela 购自中国典型培养物保藏中心。实验中所使

用的各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、高保真 Taq 酶、逆转录酶、DNA 片段回收试剂盒以及质粒纯化试剂盒均购自 Takara 公司。胎牛血清、DMEM 培养基购自 GIBCO/BRL 公司, 总 RNA 提取试剂盒 Trizol、脂质体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。PNP 引物按照 Genebank 所公布序列加以设计, 引物中含相应酶切位点, 在 PNP 基因上游引物的起始密码子前掺入了 Kozak 序列(方框内所示)^[2]: PNP 基因上游引物 5'-GTCGACGAA GCTT ACCA TGGCTACCCACACA TTA-3', 下游引物 5'-GTTGTGGA TCCTCACTCTTA TCGCCCA G CA GAAC-3'。

1.2 载体构建 感受态的制备, 目的基因的酶切、回收和连接, 重组体的转化, 内切酶图谱分析, 均按分子克隆^[3]所述方法进行。pcDNA 3.0/ PNP 的构建: 以 p Tyr-PNP-2 为模板, PNP 引物扩增 PNP 基因。所获的 PNP 基因片段经 EcoR 和 Xho 酶切后回收约 720bp 的片段, 用相同的酶酶切 pcDNA 3.0, 回收 5.4 kb 片段, 按载体比目的基因为 1 比 5 的比例混合, T4DNA 连接酶 16^U 连接过夜, 转化大

收稿日期: 2004-04-14; 修回日期: 2004-09-27

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助
(30330680)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科肝病所(*通讯作者)

肠杆菌 DH5⁺, 酶切鉴定筛选出正确插入 PNP 基因的重组载体 pcDNA 3.0/ PNP。

1.3 重组体的 PCR 鉴定 以 pcDNA3.0/ PNP 为模板, pTyr-PNP-2 为阳性对照, 行 PCR 反应, 扩增 PNP 基因, 条件同前。

1.4 测序及序列分析 将酶切及 PCR 鉴定正确的 pcDNA 3.0/ PNP 单菌落由上海博亚生物技术公司测序。

1.5 细胞培养、DNA 转染 三株细胞均于含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 并在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下生长。用质粒纯化试剂盒提取 pcDNA 3.0/ PNP, 其含量和纯度按分子克隆所述进行。转染的前一天, 两株细胞以 2 × 10⁵/孔接种于 24 孔板, 加入 500 μL 无抗生素的培养液, 使转染时细胞达到 80% 融合。各孔细胞均设 4 个复孔。DNA 转染: 按 Invitrogen 公司说明书进行。

1.6 RT-PCR 检测 PNP 基因在细胞中的表达 转染后 48 小时, 用 Trizol 抽提各孔细胞的总 RNA, 以 Oligo(dT) 为引物合成 cDNA。然后以 cDNA 为模板, 用 PNP 基因上下游引物行 PCR。

2 结果

2.1 重组载体的酶切鉴定 用 Bgl I、Not I、Xho I

分别酶切 pcDNA 3.0/ PNP 和对照质粒 pcDNA 3.0, 结果见图 1, 表明 PNP 基因已正确插入 pcDNA 3.0 中。

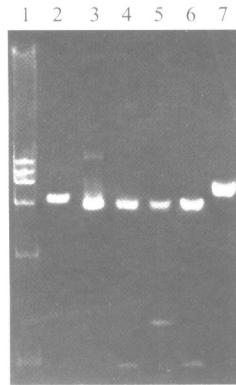


图 1 PNP 基因表达载体 pc DNA3.0/ PNP 的酶切图谱

注:1. DL15000 Marker 2. pcDNA3.0 Not

3. pc DNA3.0/ PNP Not 4. pcDNA3.0 Bgl / Xho

5. pcDNA3.0/ PNP Bgl / Xho 6. pcDNA3.0 Not / Bgl

7. pcDNA3.0/ PNP Not / Bgl

2.2 重组载体的 PCR 鉴定 以 pcDNA 3.0/ PNP 为模板扩增 PNP 基因, 结果(如图 2)所示, 说明 PNP 基因已正确插入载体中。

2.3 重组载体的测序鉴定 经双向测序表明, 重组载体中已成功插入了目的片段, 且 PNP 基因起始密

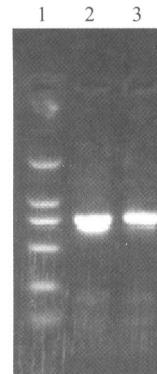


图 2 重组载体中 PNP 基因的 PCR 鉴定

注:1. DL2000 Marker 2. 阳性对照 3. pc DNA3.0/ PNP

码子前还掺入了 Kozak 序列。用 Primer 2.0 软件分析报道序列与克隆序列的差异: pcDNA 3.0/ PNP 中的 PNP 基因 DNA 序列 663 位的碱基 C 突变为 A。将克隆 PNP 基因序列翻译成为氨基酸序列, 结果显示 663 位的突变处于密码子的第三位, 不影响氨基酸序列。在 PNP 基因全长序列中无终止密码子出现, 可以翻译成为连续的氨基酸, 基因可以表达。

2.4 目的基因的表达 RT-PCR 的产物各取 3 μL 行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果(如图 3~5)显示: CMV 启动子调控下的 PNP 基因在三株肿瘤细胞中均顺利实现表达。

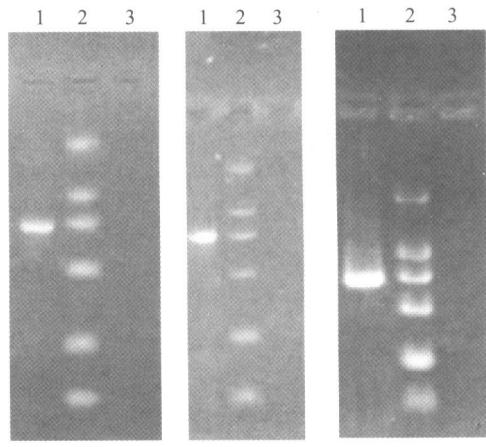


图 3 PNP 基因在 HepG2 细胞株的表达

图 4 PNP 基因在 SMMC7721 细胞株中的表达

图 5 PNP 基因在 HeLa 细胞株的表达

注:1. pc DNA3.0/ PNP 2. DL2000 Marker 3. 阴性对照

3 讨论

基因治疗作为治疗肿瘤的一种新途径一直是研究的热点, 自杀基因疗法是其中重要途径之一^[4]。运用该疗法治疗肿瘤时, 系统杀伤效应的强弱是决定其疗效的一个关键性因素。目前应用最为广泛的自杀基因系统是单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)

基因/GCV 系统^[5]和大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(CD)基因/5'-FC^[6]系统,利用二者进行肿瘤的基因治疗研究已取得了一定的进展。但它们共同的缺陷就在于杀伤效应弱,对周围未转染自杀基因的肿瘤细胞不能产生广泛的杀伤,使大多数肝癌细胞得以存活,制约了该疗法在肿瘤治疗中的进一步应用。在本实验中,我们所采用的是一种新型的自杀基因系统——PNP/Mep-dR 系统,它是目前已知的杀伤效应最为强大的自杀基因/前药系统^[1]。该系统之所以对肿瘤细胞有如此强大的杀伤效应,主要基于两方面原因^[7]: PNP/Mep-dR 系统则能从复制、转录、翻译等多个环节杀伤肝癌细胞,不论是对分裂期还是静止期的肝癌细胞都具有强大的杀伤效应。而 TK 和 CD 等传统的自杀基因系统只能抑制 DNA 合成,杀伤处于分裂期的肝癌细胞,对于肝癌等实体肿瘤而言,瘤体中只有一部分细胞处于分裂期,所以疗效常不尽人意。前药经该系统作用后的毒性产物可以穿过脂质膜,杀伤临近细胞。

利用自杀基因治疗肿瘤时,基因的高表达对提高前药的转化和利用效率,并最终决定其疗效至关重要。为此,在构建重组体的过程中,我们选用了 pcDNA 3.0 真核表达载体,它含有的 CMV 启动子是目前最强的启动子^[8],可以调控外源基因高效表达。另外,我们在 PNP 基因前人为掺入 Kozak 序列,该序列能在翻译水平调控基因表达,使目的基因在真核细胞中的表达显著提高^[2]。

由于 PNP/Mep-dR 系统本身所具有的强大的杀伤效应及 Kozak 序列对 PNP 基因表达的显著促

进作用,pcDNA 3.0/PNP 对肿瘤细胞的杀伤效应将十分强大。总之,本研究初步建立了一个新型的自杀基因表达载体,为进一步将 PNP/Mep-dR 系统应用于肿瘤的基因治疗打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] Deharvengt S, Wack S, Uhring M, et al. Suicide gene/pro-drug therapy for pancreatic adenocarcinoma by E. coli purine nucleoside phosphorylase and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside [J]. Pancreas, 2004, 28(2): E54-64.
- [2] Song JS, Biosci. Activity of the Human Telomerase Catalytic Subunit (hTERT) Gene Promoter Could Be Increased by the SV40 Enhancer[J]. Biotechnol Biochem, 2004, 68(8): 1634-1649.
- [3] Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular cloning [M]. 3rd. New York: Cold Spring Harbor, 2001. 1-40.
- [4] Rothfels H, Paschen A, Schadendorf D, et al. Evaluation of combined gene regulatory elements for transcriptional targeting of suicide gene expression to malignant melanoma [J]. Exp Dermatol, 2003, 12(6): 799-810.
- [5] Fogar P, Greco E, Basso D, et al. Suicide gene therapy with HSV-TK in pancreatic cancer has no effect in vivo in a mouse model[J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29(9): 721-730.
- [6] Garcia-Castro J, Rio P, Lillo R, et al. Purging of leukemia-contaminated bone marrow grafts using suicide adenoviral vectors: an in vivo murine experimental model [J]. Gene Ther, 2003, 10(16): 1328-1335.
- [7] Freenab SM, Abboud CN, Whartenby KA, et al. The " bystander effect" tumour regression when a fraction of the tumor-mass is genetically modified [J]. Cancer Res, 1993, 53(21): 5274-5283.
- [8] Gross JL, Herblin WF, Dusak BA, et al. Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth in vivo [J]. J Natl Cancer Inst, 1993, 85(2): 121-131.

[编辑:贺文;校对:安凤]