

CD 真核表达载体的构建及在 HEK293 细胞中的表达

张巨峰¹ 韦芳¹ 李惠明¹ 黄陈² 于慧¹ 裴玮¹ 黄倩¹

(1 上海交通大学附属第一人民医院中心实验室 上海 200080 2 上海交通大学附属第一人民医院普外科 上海 200080)

摘要 目的:构建含自杀基因胞嘧啶脱氨酶(CD)的真核表达载体 pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z-CD,并进行哺乳动物细胞 HEK293 转染研究。方法:以本实验室保存的含 CD 基因全长的质粒为模版,用 PCR 方法扩增 CD 基因阅读框序列,并定向克隆到带有 HAtag 的 pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z 载体上,使目的基因与 HAtag 在同一阅读框。重组体质粒经 EcoRI 和 BamHI 双酶切鉴定,并对插入的 CD 基因片段进行测序,将鉴定好的阳性重组质粒 pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z-CD 用脂质体介导转染 HEK293,提取细胞蛋白,western blot 检测 CD 基因的表达情况。结果:阳性重组质粒 pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z-CD 经 EcoRI 和 BamHI 双酶切后,获得约为 5.5kb 片段和 1.3kb 插入片段,序列分析表明插入的片段与 GenBank 发布的序列一致,western blot 检测到 CD 基因的表达。结论:成功构建了含自杀基因 CD 的真核表达质粒。

关键词:自杀基因;CD 基因;载体构建;基因表达

中图分类号:R34 **文献标识码:**A

A Study on Construction of Plasmid pcDNA3.1/HA-myc-His(-) Z-CD and Transfection into HEK293 Cell

ZHANG Ju-feng¹, WEI Fang¹, LI Hui-ming¹, HUANG Chen², YU Hui¹, QIU Wei¹, HUANG Qian¹

(1 Experimental Center, Affiliated 1st People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080

2 general surgery, Affiliated 1st People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

ABSTRACT Objective: To construct a recombinant plasmid containing the suicide gene CD and study the expression of CD gene in HEK293 cell. **Methods:** A fragment containing full-length coding region of CD was subcloned into HA-tagged vector pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z to construct recombinant plasmid pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z-CD. CD was identified by enzyme digestion of EcoRI/BamHI and sequence, then the positive recombinant plasmid was transfected into HEK293 cells using a routine lipofectamine method. After 48h, total protein was extracted and the expression of the CD gene in transfected HEK293 cells was identified by western blot. **Results:** A fragment of 5.5kb and inserted fragment of 1.3kb were got by cutting positive recombinant plasmid of pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z-CD with EcoRI/BamHI. Automatic DNA sequence analysis demonstrated that sequence of the recombinant plasmid pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z-CD was totally the same with that published in GenBank. The expression of CD gene was detected by western blot. **Conclusion:** pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z-CD was successfully constructed.

Key words: Suicide gene; CD gene; Vector construction; Gene expression

目前自杀基因疗法是肿瘤基因治疗的一个热点,此类基因转入哺乳动物肿瘤细胞后,产生的酶能将无毒或毒性极低的药物前体转化成细胞毒性代谢产物,从而杀伤肿瘤细胞。胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶系统(CD/5-FC)是研究最多的自杀基因治疗系统之一,CD 是真菌、细菌等原核生物中具有特殊功能的酶类,在哺乳动物细胞中缺乏,可将 5-氟胞嘧啶(5-FC)脱氨生成 5-氟尿嘧啶(5-FU),5-FU 作为化疗药物已经广泛用于治疗消化道肿瘤、胶质瘤、乳癌、肺癌等^[1-5]。

本实验以 pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z 质粒为基础,构建携带 CD 基因的真核表达载体,并监测其在哺乳动物细胞 HEK293 中的表达。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

- 基金项目:国家高技术研究发展计划“973”项目资助(NO.2004CB518800)

作者简介:张巨峰,(1973.2-),男,博士研究生,讲师,主要研究方向:肿瘤基因治疗

通讯作者:黄倩,博士生导师,教授,E-mail:huangqi@online.sh.cn

(收稿日期:2006-07-20 接受日期:2006-08-26)

DMEM 购自 GIBCO 公司;小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;单克隆 Anti-HA 抗体购自美国 Sigma 公司;Escherichia coli 感受态菌株 DH5a 由北京博大泰克公司提供;QIAGEN plasmid Kits 由 Qiagen 公司提供;核酸内切酶 EcoRI、BamHI 和 T4 DNA 连接酶以及 1Kb Plus DNA Ladder 由大连宝生物技术公司提供;引物由上海基康生物公司合成。

1.2 质粒和细胞株

pcDNA3.1/HA-myc-His(-)Z(在 pcDNA3.1/myc-His(-)A 多克隆酶切位点 BamHI 和 KpnI 之间插入 HAtag 序列)由上海肿瘤研究所癌基因与抑癌基因国家重点实验室提供;包含 CD 全长基因的质粒由本实验室提供;HEK293 细胞由本实验室保存。

1.3 CD 真核表达载体的构建

按 GenBank 中酵母菌 CD 基因全长 CDS 序列(注册号 1762321),用 primer Premier 5.0 软件设计一对引物,以含 CD 基因全长序列质粒(本实验室保存)为模板,在上游引物 5' 端加上 EcoRI 酶切位点,下游引物 5' 端加上 BamHI 酶切位点,引物中去除 CD 基因终止密码子 TAG。PCR 扩增的上游引物为:5' - CCG GAATTC ACCATGGGG AGG CTA ACA GTC TC - 3', 实下划线序列为 EcoRI 酶切位点,虚下划线序列所示的是 Kozak 序列;下游引物为:5' - CGC GGATCC ACG TTT GTA ATC GAT GGC TTC - 3', 实下划线序列是 BamHI 酶切位点。用 pfu 酶进行 PCR 反应:制备两个混装管编号为 MIX1 和 MIX2, MIX1 管里有 ddH₂O 21ul、10mM dNTP 1ul、上下游引物各 0.4uM、模板 DNA 1ng, 体系为 25ul。MIX2 管里有 ddH₂O 19.25ul、10xbuffer 5ul、pfu 酶 0.75ul, 体系为 25ul。MIX1 管 94℃、2min 后,把 MIX2 管混合物加入到 MIX1 管中,94℃、15s,52℃、30s,72℃、1min,10 个循环。然后在接下来的 20 个循环中,设置 PCR 仪使延伸时间每个循环增加 5s,变性、退火温度和时间不变。循环结束后,最后 72℃、7min。酚氯仿抽提 PCR 产物,异丙醇沉淀,70%乙醇洗,晾干后 ddH₂O 溶解核酸沉淀。EcoRI/BamHI 对 PCR 产物和质粒 pcDNA3.1/HA - myc - His(-)Z 进行双酶切,酶切产物用酚氯仿抽提,异丙醇沉淀,然后用 70%乙醇洗,1%琼脂糖凝胶电泳对酶切产物定量。目的基因片断与载体按摩尔数 3:1 比例混合,用 T4 DNA 连接酶在 16℃过夜连接,连接体系为 10ul。取 5ul 连接产物转化 DH5a 感受态细菌,氨苄青霉素平板筛选。牙签挑取单克隆于 2ml 的 LB(含有氨苄青霉素)培养基中以 250rpm/min 震荡过夜。用 SDS 碱裂解法小量制备质粒 DNA,用 EcoRI 和 BamHI 双酶切鉴定,并测序分析。鉴定正确的克隆命名为 pcDNA3.1/HA - myc - His(-)Z - CD。用 QIAGEN plasmid Kits 提取质粒,供进一步转染细胞用。

1.4 细胞培养及 pcDNA3.1/HA - myc - His(-)Z - CD 转染细胞

转染前一天,接种 4×10^5 个 HEK293 细胞/孔于六孔板,用含 10%小牛血清(FCS)和 100 units/ml 青霉素、100g/ml 链霉素的 DMEM(Dulbecco, s modified medium)培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24h。当细胞汇合率达到 40 - 80%时, Lipofectamine 2000 转染质粒到 HEK293 细胞中:用 buffer EC 稀释 0.4ug DNA 到体积为 150ul,加入 8ul Enhancer 后震荡 1s 进行混合,在室温(15 - 25℃)孵育 2 - 5min,离心几秒使液体沉降于管底,DNA - Enhancer 混合物中加入 25ul Effectene Transfection 试剂,震荡 10s 混合,再在室温(15 - 25℃)孵育样品 5 - 10min,以便转染复合物的形成,此间轻轻吸弃六孔板中的培养基,PBS 洗细胞一次,加入 2ml 上述 DMEM 培养基。在转染复合物的管中加入 1ml 上述 DMEM 培养基,上下吹打两次混匀,立即逐滴加入到六孔板中,轻轻晃动平板,使转染复合物均匀分布。

1.5 Western blot 鉴定表达产物

转染 48h 后,将转染 pcDNA3.1/HA - myc - His(-)Z - tk - linker - CD 的 HEK293 细胞平板置于冰上,PBS 漂洗两遍,加入 100ul 细胞裂解液(Tris 5mM, EDTA 5mM, NP40 2%, PMSF 3mM),用自制的细刮刮,刮取细胞移入到 1.5ml EP 管中,继续冰上裂解 20min,12000rpm 离心 10min,收集上清。在上清中加入上样缓冲液并煮沸 10 分钟后,10% SDS - PAGE 分离蛋白质,

电转移到 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉封闭 1h 后,加入鼠源抗 HAtag 单克隆抗体(1:10000)。4℃孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,再加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体(1:2000),孵育 2h 后 TBST 漂洗 3 次。最后给 PVDF 膜加上 Lumi - Light Western Blotting Substrate(Roche Applied Science)溶液,X 光片曝光显影。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定

pcDNA3.1/HA - myc - His(-)Z - CD 重组质粒经 EcoRI/BamHI 双酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳分析,可以看到两条带,大小分别约为 5.5kb 和 1.3kb(图 1),与预期的大小一致。

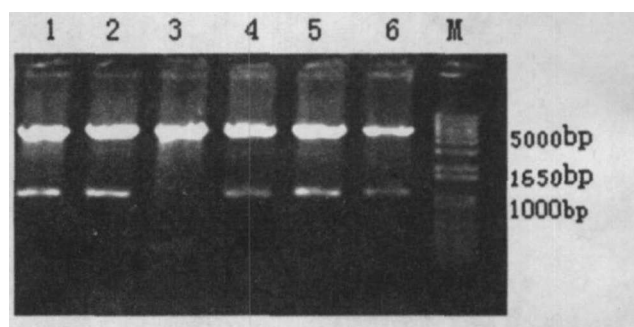


图 1 重组质粒酶切鉴定

Figure 1 Identification of recombinant plasmid by endonuclease incision
LaneM: DNA Marker; Lane1, 2, 4, 5, 6: 重组质粒 EcoRI/BamHI 酶切结果; Lane3: pcDNA3.1/HA - myc - His(-)Z 空质粒酶切结果
LaneM: DNA Marker; Lane1, 2, 4, 5, 6: The Incision Result of Recombinant Plasmid by EcoRI/BamHI

Lane3: The Incision Result of pcDNA3.1/HA - myc - His(-)Z by EcoRI/BamHI

2.2 重组质粒的测序分析

对重组质粒插入片段进行测序分析表明,插入的序列与 GenBank(注册号 1762321)一致,证实 pcDNA3.1/HA - myc - His(-)Z - CD 载体构建成功(图 2)。

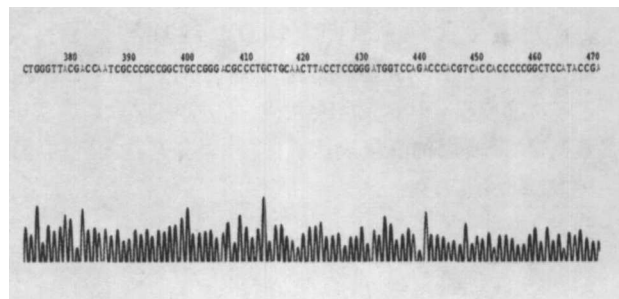


图 2 重组质粒插入片段测序分析

Figure 2 Sequencing Analysis of the Inserted Fragment from the Recombinant Plasmid

2.3 表达产物的 western blot 分析

由于没有商业化检测 CD 的抗体,构建载体时,插入的基因去掉终止密码,并与下游的 HAtag 序列处于同一阅读框。单克隆 Anti-HA 抗体对 CD-HAtag 融合蛋白进行鉴定。Western blotting 结果如图(3)所示,表明融合蛋白正确。

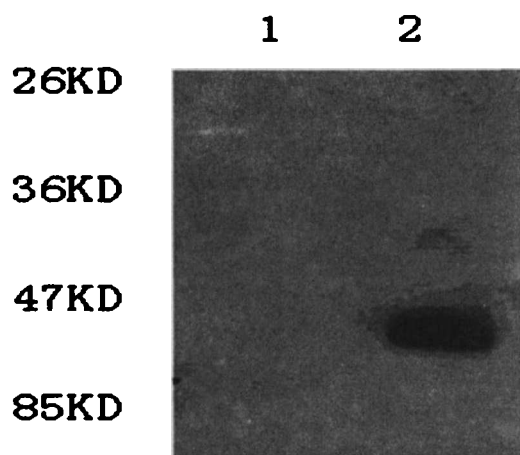


图3 western blot 检测目的基因的表达

Figure 3 Detection of the Target Gene Expression by Western Blotting

Lane1: 野生型 HEK293 细胞蛋白; Lane2: 转染了重组质粒的 HEK293 细胞蛋白

Lane1: Lysate from wt-HEK293 cells Lane2: Lysate from HEK293 cells transfected with the recombinant plasmid

3 讨论

在已经报道的动物和临床 I 期实验表明,CD/5-FC 系统可有效地抑制肿瘤的生长^[6-11]。国内对 CD 真核载体的构建做了不少的工作,但由于没有检测目的基因 CD 的商业化抗体,从而多数研究仅仅局限于检测 RNA 水平来反映目的基因的表达情况,这样并不能可信的表明所克隆的目的基因具有功能。本研究应用一个带有 HAtag 的真核载体,把去掉终止子的 CD 基因阅读框插入到 HAtag 编码序列的 N 端,并处于同一个阅读框里,这样就使 CD 和 HAtag 融合,用 Anti-HA 的抗体就能间接的从蛋白水平检测到目的基因 CD 的表达。

为了提高转录效率,在引物设计的时候,使用了 Kozak 序列。根据对载体的多克隆酶切位点分析,给上下游引物 5' 末端加上 EcoRI 和 BamHI 识别序列,可以通过酶切产生的两个粘性末端来定向克隆 PCR 产物到真核表达载体中,不仅提高片段和载体的连接效率,也方便对阳性克隆的鉴定。对目的基因 PCR 扩增时,为了提高产物的保真性,使用了 pfu DAN 聚合

酶,并在设置反应条件时,使用热启动来降低引物二聚体的量,在 PCR 后 20 个循环中使延伸时间每个循环比上个循环增加 5s,使产物的量得以大量的增加。CD-HAtag 融合蛋白真核表达载体的构建,为后续的研究打下了良好的基础。

参考文献

- [1] Bleiberg, H. Treatment of advanced colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 1989,9(4):1013-5
- [2] Gavelli A, Baque P, Brossette N, et al. Per os administration of 5-fluorocytosine is effective in the regression of CD-expressing liver metastases in rats[J]. *Int J Mol Med*, 2004,14(2):323-5
- [3] Fischer U, Steffens S, Frank S, et al. Mechanisms of thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell death in glioma cells[J]. *Oncogene*, 2005,24(7):1231-43
- [4] Anderson LM, Krotz S, Weitman SA, et al. Breast cancer-specific expression of the *Candida albicans* cytosine deaminase gene using a transcriptional targeting approach[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000,7(6):845-52
- [5] Moolten FL. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy[J]. *Cancer Gene Ther*, 1994,1(4):279-87
- [6] Kuriyama S, Kikukawa M, Masui K, et al. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy can induce efficient anti-tumor effects and protective immunity in immunocompetent mice but not in athymic nude mice[J]. *Int J Cancer*, 1999,81(4):592-7
- [7] Mullen CA, Coale MM, Lowe R, et al. Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor[J]. *Cancer Res*, 1994,54(6):1503-6
- [8] Dong Y, Wen P, Manome Y, et al. In vivo replication-deficient adenovirus vector-mediated transduction of the cytosine deaminase gene sensitizes glioma cells to 5-fluorocytosine[J]. *Hum Gene Ther*, 1996,10,7(6):713-20
- [9] Freytag SO, Stricker H, Pegg J, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate-to high-risk prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2003,63(21):7497-506
- [10] Crystal RG, Hirschowitz E, Lieberman M, et al. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the *E. coli* cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine[J]. *Hum Gene Ther*, 1997,8(8):985-1001