

单纯疱疹病毒胸苷激酶与绿色荧光蛋白基因 真核共表达质粒的构建

曾曙光¹, 吴世卿¹, 张积仁^{2*}, 章锦才¹, 刘启才³, 艾伟健¹

(1. 南方医科大学附属口腔医院//广东省口腔医院, 广东 广州 510280;

2. 南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广东 广州 510282; 3. 广州医学院实验医学研究中心, 广东 广州 510182)

摘要:【目的】构建含有人巨细胞病毒(CMV)调控表达的单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因真核表达质粒 pCMV-TK-IRES-EGFP。【方法】设计 HSV-tk cDNA 的特异引物, PCR 扩增获得 HSV-tk 基因序列, 将 PCR 产物进行 T 载体克隆获得重组质粒 pMD18T-TK, 测序分析选定序列正确的克隆提取质粒, 用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*H I 分别酶切 pMD18T-TK 和 pCMV-IRES-EGFP 质粒, 将 HSV-tk 基因定向亚克隆至 pCMV-IRES-EGFP 载体, 酶切鉴定, 构建获得含 EGFP 和 HSV-tk 基因的重组质粒, Lipofectin 介导转染小鼠黑色素瘤 B16 细胞并检测其表达情况。【结果】酶切见特异酶切图谱, 该质粒在瞬时表达时获得 EGFP 的良好表达。【结论】含 HSV-tk 和 EGFP 基因真核表达质粒 pCMV-TK-IRES-EGFP 构建成功, 为利用绿色荧光蛋白标记在后续实验中进行自杀性基因治疗的深入研究奠定了基础。

关键词: HSV-TK/EGFP 基因; 内部核糖体进入位点; 真核表达

中图分类号: R394.34 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)01-0117-05

Construction of Eukaryotic Co-expression Vector Containing Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase and Green Fluorescent Protein

ZENG Shu-guang¹, WU Shi-qing¹, ZHANG Ji-ren^{2*}, ZHANG Jin-cai¹, LIU Qi-cai³, AI Wei-jian¹

(1. Department of Oral Maxillofacial Surgery, Guangdong Provincial Stomatological Hospital//The Affiliated Stomatological Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, China;

2. Oncology Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China;

3. Experimental Medical Research Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

Abstract: 【Objective】 To construct an eukaryotic co-expression vector containing herpes simplex virus thymidine kinase and green fluorescent protein under the control of cytomegalovirus promoter. 【Methods】 The HSV-tk gene fragment was amplified by PCR using specific primers. The PCR product was cloned to pMD18T Vector. Then correct clone was selected according to DNA sequence analysis. The interested HSV-tk gene fragment was subcloned to pCMV-IRES-EGFP vector with *Sal* I and *Bam*H I double enzyme digestion. The recombinant plasmid was transfected into mice melanoma B16 cell line. Green fluorescent cells were detected by fluorescence microscopy. 【Results】 The recombinant plasmid obtained was confirmed by enzyme digestion. When it was transfected into mice melanoma B16 cell line, green fluorescent cells can be detected by fluorescence microscopy. 【Conclusion】 The eukaryotic co-expression vector pCMV-TK-IRES-EGFP has been established and verified by enzyme digestion. This research work has established a base for further investigation into suicide gene therapy in vitro and in vivo using the marker of green fluorescent protein.

Key words: HSV-TK/EGFP gene; internal ribosome entrysite; eukaryotic expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(1): 117-120, inside back cover]

收稿日期: 2008-04-06

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B030301190); 广东省医学科研基金(A2007109)

作者简介: 曾曙光, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 南方医科大学 2006 级在职博士研究生, 电话: 13662375681, E-mail: sunrise@tom.com;

* 通讯作者: 张积仁, 主任, 教授, 主任医师, 博士生导师, 电话: 020-61643200, E-mail: zhangjiren@126.com

自杀基因治疗是肿瘤基因治疗的手段之一,单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk)自杀基因治疗目前被认为是最有前景的基因治疗方法。临床 I 期实验表明 HSV-tk/GCV 系统具有良好的肿瘤杀伤效果^[1],但治疗效果与自杀基因能否被高效、选择性地导入肿瘤细胞有关,本研究利用 pIRES-EGFP 载体构建人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子调控表达的 HSV-tk 和 EGFP 基因双顺反子真核表达载体 pCMV-TK-IRES-EGFP,为利用绿色荧光蛋白标记在后续实验中进行自杀性基因治疗的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、载体、细胞和菌株

pMD18-T Vector 为日本 TaKaRa 公司产品, pCMV-IRES-EGFP 质粒购自美国 Invitrogen 公司,携带 HSV-tk 基因的质粒 pcDNA3-TK 质粒由广州医学院实验医学研究中心刘启才博士惠赠,小鼠黑色素瘤细胞株 B16 细胞购自中国科学院上海细胞库;质粒受体菌 TG1 菌株由本室保存。

1.2 试剂与仪器

TaKaRa Taq™ PCR Kit, primeSTAR HS DNA Polymerase, DNA A-tailing kit, pMD18-T Vector kit 为日本 TaKaRa 公司产品。QIAprep Spin Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 为德国 QIAGEN 公司产品。限制性内切酶 *Sal* I、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶及小牛肠碱性磷酸酶为英国 NEB 公司产品。DMEM(低糖)细胞培养基、RPMI 1640 培养基和 FBS 购自 GIBCO 公司;细胞转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;低温高速离心机(Sigma, 15 300 r/min, $r = 6.6$ cm, 美国),温度梯度 PCR 仪(Biometra Gradient, 德国),凝胶成像分析系统(UVP, 英国),紫外透射交联仪(UVP TL-2000, 英国),细菌摇床(Thermo 420, 美国),生化培养箱(LBH-250CC, 上海一恒科技有限公司),低温水浴箱(Heto CB8-30E, 丹麦),核酸蛋白定量仪(Eppendorf, 德国),水平电泳系统(BIO-RAD, 美国),BNA-3210 型二氧化碳培养箱(ESPEC, 日本),荧光倒置显微镜(Olympus, 日本),荧光显微镜(Leica, 德国)。

1.3 引物设计与合成

登陆 Genbank 查询 HSV-tk 基因 mRNA 序列,应用引物设计软件 DNA club 设计扩增 HSV-tk 基因全长 cDNA 的特异引物,并加入酶切位点, HSV-tk(Genbank No.J02224.)引物序列: Forward, 5'-CCGGCCCGCGGCCTTGTAGAAGCGCGTA3'; Reverse, 5'-CCGGCCCGCCTTCCGGTATTGTC TCCTTCG-3'。将上述设计的引物序列提交给大连宝生物工程有限公司,委托进行引物寡核苷酸链合成,扩增基因长度为 1 192 bp。

1.4 HSV-tk 基因的 PCR 扩增

以 pcDNA3-tk 质粒,采用设计的引物,应用 prime STAR HS DNA Polymerase 进行 PCR 扩增,按下体系建立 PCR 反应:5 × buffer 10 μL, 2.5 mmol/L dNTP Mix 4 μL, 5 μmol/L primer(sense + antisense) 3 μL, 质粒 DNA (10 ng/μL) 2 μL, HS DNA Polymerase (2.5 u/μL) 0.5 μL, 双蒸水 30.5 μL 共 50 μL。PCR 反应条件:先 94 °C 变性 3 min, 再 98 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 2 min × 32 个循环,最后 72 °C 10 min; 8 °C 保存。PCR 结束后,产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外投射仪观察结果。PCR 产物电泳后切胶回收,以确定扩增产物大小。

1.5 DNA A-tailing 反应

按下体系进行 PCR 产物 3' 加 A 尾反应:10 × A-tailing buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP Mixture 4 μL, A-tailing Enzyme 0.5 μL, 平末端 PCR product (42 ng/μL) 25 μL, 双蒸水 15.5 μL 共 50 μL。反应条件:先 72 °C, 20 min, 冰上放置 2 min。

1.6 A-tailing DNA 与 T 载体的连接与转化

参照日本 TaKaRa 公司 pMD 18-T Vector 产品说明书建立反应体系,挑选阳性克隆,送 TaKaRa 公司进行序列测定,选定序列正确的克隆提取质粒。

1.7 真核载体的构建与鉴定

用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*H I 分别酶切 pMD18T-TK 和 pCMV-IRES-EGFP 质粒, QIAquick Gel Extraction Kit 回收 1 192 bp 的 HSV-tk 基因片断和 5 300 bp 的载体片断并进行连接,测量各自的浓度分别为:15 ng/μL 和 25 ng/μL;按 T4 DNA 连接酶连接反应的要求进行连接,连接产物转化大肠杆菌 TG1,最后铺 1.5% kana 抗性琼脂平板,挑选抗性菌落摇菌, QIAprep Spin Miniprep

Kit少量提取质粒。*Sal* I 和 *Bam*H I 酶切鉴定获得阳性重组质粒 pCMV-TK-IRES-EGFP。

1.8 B16 细胞的培养和传代

人黑色素瘤细胞 B16 细胞在 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中培养,待细胞融合度达 90% ~ 95%时,以 0.25%的胰蛋白酶消化传代,于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。用于 24 孔板的细胞,在转染前一天将 8×10^4 个细胞铺入 24 孔培养板中。

1.9 重组质粒 pCMV-TK-IRES-EGFP 转染 B16 细胞

24 孔培养板传代培养细胞融合至 50% ~ 70% 时,依照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒操作说明进行转染,用 50 μ L 无血清培养基稀释质粒 DNA 0.8 μ g 并混匀,室温下静置孵育 5 min。同时,用 50 μ L 无血清培养基稀释 2 μ L Lipofectamine 2000 并混匀,室温下静置孵育 5 min。随后将 DNA 与 Lipofectamine 2000 混合物混匀并在室温下再孵育 20 min。用 400 μ L 完全培养基更换原先的培养基后,将 DNA/Lipofectamine 2000 混合物加入 24 孔板,轻轻混匀,置于二氧化碳(体积分数 5%, 37 °C)培养箱中继续培养 24 ~ 48 h,荧光显微镜下观察转染效率。

2 结果

2.1 HSV-tk 基因的 PCR 产物电泳分析及测序

以 pcDNA3-TK 质粒,采用设计的引物,应用 primeSTAR HS DNA Polymerase 进行 PCR,PCR 扩增获得了 HSV-tk 大小约 1 192 bp 的基因片段(图 1)。建立 A-tailing DNA 与 pMD 18-T Vector T 载体的连接与转化体系,挑选阳性克隆,送 TaKaRa 公司进行序列测定,选定序列正确的克隆提取质粒(图 2)。

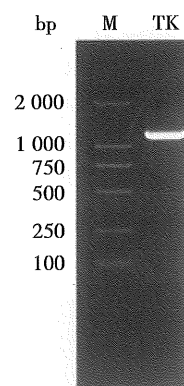


图 1 PCR 扩增获得 1 192 bp HSV-tk 基因电泳图
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of the HSV-tk gene about 1 192 bp, Mark: DL2000DNA

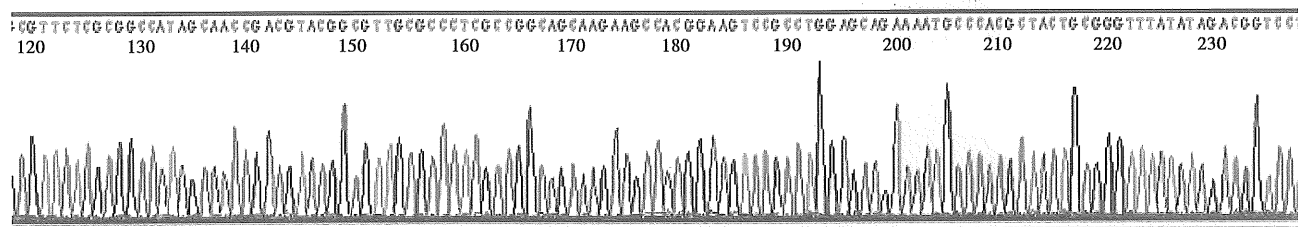


图 2 pMD 18-T-TK 重组质粒 M13-47 引物测序部分序列波形图

Fig.2 Sequence of the recombinant pMD18-T simple-TK

The red, blue, black, and green peaks stand for T, C, G, and A, respectively

2.2 限制性内切酶消化鉴定

提取序列正确的 pMD 18 T-TK 质粒和 pCMV-IRES-EGFP 质粒进行酶切,经电泳见特定的酶切图谱(图 3),回收目的 HSV-tk 基因片段和 5 300 bp 的载体片段并进行连接,连接反应后转化大肠杆菌,挑选阳性克隆,少量提取质粒,*Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定,结果证实为 HSV-tk 重组质粒 pCMV-TK-IRES-EGFP(图 4)。

2.3 细胞的转染和基因的表达观察

将重组质粒 pCMV-TK-IRES-EGFP 转染到 B16 细胞中,24 h 后于荧光倒置显微镜下蓝色激发光下观察,约 30%的细胞表达绿色荧光,48 h 后荧光显著增强了,细胞表达绿色荧光率约 60%。细胞荧光分布于整个细胞(图 5)。

3 讨论

自杀基因是来自某些病毒或细菌的基因,可

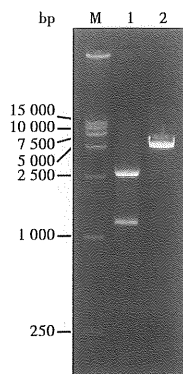


图 3 pMD 18 T-TK 和 pCMV—IRES-EGFP 质粒限制性酶切电泳图

Fig.3 Restriction analysis of plasmids for pMD 18 T-TK and pCMV-IRES-EGFP

M: DL15000 DNA mark; Lane 1 and 2: Digested products of pMD 18 T-TK and pCMV-IRES-EGFP by *Sal* I and *Bam*H I. The bands in Lane 1 and 2 are 1 192 bp (HSV-tk) and 5 300 bp (vector), respectively.

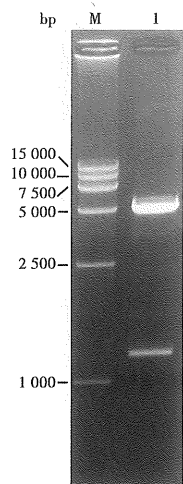


图 4 重组质粒 pCMV-TK-IRES-EGFP 的酶切鉴定电泳图
Fig.4 Identification of the recombinant plasmid pCMV-TK-IRES-EGFP by restriction analysis

M: DL15000 DNA Mark; the bands in Lane 1 are 1 192 bp and 5 300 bp, respectively.

编码特定的酶,正常哺乳动物细胞缺乏这种基因,如果将其导入靶细胞中,可使无毒性的前体药物转化为细胞毒性代谢产物干扰 DNA 合成,从而导致靶细胞死亡^[2],不少研究表明^[3],只要少量的自杀基因转染的癌细胞与未转染的癌细胞按一定比例混合后共同培养,不仅转染的癌细胞被杀死,二者相互接触后相邻的未转染的癌细胞也大量死亡,即“旁观者效应”,而几乎所有的自杀基因治疗

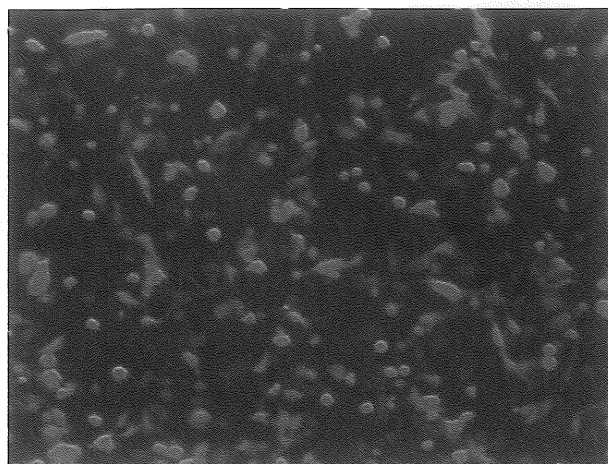


图 5 重组质粒 pCMV-TK-IRES-EGFP 转染 B16 细胞
Fig.5 The recombinant plasmid pCMV-TK-IRES-EGFP was transfected into mice melanoma B16 cell line ($\times 200$)

Green fluorescent cells can be detected by fluorescence microscopy obviously when they were transfected into mice melanoma B16 cell line after 48 hours.

系统都存在这种效应。自杀基因治疗系统的种类较多,主要包括单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶/丙氧鸟苷(HSV-tk/GCV)系统,胞嘧啶脱氢酶/5-氟胞嘧啶(CD/5-FU)系统,硝基还原酶/CB1954(NTR/CB1954)系统等。单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)基因能特异性地将核苷类似物无环鸟苷(ACV)或丙氧鸟苷(GCV)单磷酸化,进而在肿瘤细胞内代谢成三磷酸 GCV,这种高毒性的三磷酸 GCV 是细胞 DNA 聚合酶的抑制子和 DNA 合成的终结子,使分裂的肿瘤细胞被杀伤^[4]。GFP 是一类存在于包括水母等腔肠动物体内的生物发光蛋白,当受到紫外或蓝光激发时发射绿色荧光,可作为报告蛋白(reporter protein),在基因的表达与调控、蛋白质的定位、转移及相互作用等多个领域的研究中被广泛应用^[5]。目前实现两个基因在一个细胞中共表达的做法通常是利用两个内启动子,或者是采用融合基因的形式,但上述方法会出现两种基因表达上较大的差异,有时只表达一个基因,或者不能保证目的蛋白的正确折叠。本研究采用的真核表达载体 pCMV-IRES-EGFP 含有人巨细胞病毒启动子、脑心肌炎病毒的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES),IRES 连接两个开放读码框,其转录产物在翻译时,核糖体能同时进入并开始翻译 IRES 上游及下游的两个转

(下转封 3 to inside back cover)