

小鼠端粒酶蛋白亚单位重组腺病毒载体的构建及鉴定

姜楠¹, 陆敏强¹, 李华¹, 蔡常洁¹, 杨扬¹, 许赤¹, 冯炼强², 陈规划¹

(中山大学 1. 附属第三医院肝脏移植中心//器官移植研究所, 广东 广州 510630;

2. 中山医学院免疫学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】构建小鼠端粒酶蛋白亚单位(mouse telomerase reverse transcriptase, mTERT)基因重组腺病毒载体, 为下一步研究其体外表达和动物实验研究提供基础。【方法】从肝癌细胞中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增 mTERT 的基因编码区序列, 将序列定向克隆至真核表达载体 pAC, 将此表达质粒与腺病毒重组质粒 pJM17 共同转染 293 细胞, 经同源重组产生重组腺病毒载体 Ad-mTERT, 纯化后的重组腺病毒载体 Ad-mTERT 在 293 细胞大量扩增并通过氯化铯密度梯度离心法纯化, 测定病毒滴度。【结果】PCR 及酶切证实: mTERT DNA 正确克隆到穿梭质粒 pAC 中, 带 mTERT DNA 的表达盒成功重组到腺病毒载体基因组 E1A 缺失区, 并在 293 细胞中成功包装出具有感染活性的重组腺病毒 Ad-mTERT。【结论】成功构建了小鼠 TERT 基因重组腺病毒载体, 为研究其用于肿瘤的基因治疗奠定基础。

关键词: 小鼠端粒酶蛋白亚单位; 重组腺病毒载体

中图分类号: R363

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0011-04

Construction and Identification of Mouse Telomerase Reverse Transcriptase Recombinant Adenovirus Vector

JIANG Nan¹, LU Min-qiang¹, LI Hua¹, CAI Chang-jie¹, YANG Yang¹, XU Chi¹,
FENG Lian-qiang², CHEN Gui-hua¹

(1. The Organ Transplantation Research Institute and Liver Transplantation Center //Department of Liver Transplantation Center, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

2. Department of Immunology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To construct the recombinant adenovirus vector expressing the mouse telomerase reverse transcriptase (mTERT) and provide the basis for further experiments in vivo and in vitro. 【Methods】 The cDNA of mTERT was amplified by RT-PCR. After purified, the gene fragment was cloned into a vector pAC. Recombinant adenovirus plasmid pAC-mTERT was co-transfected with pJM17 into 293 packaging cells and replication-deficient recombinant adenovirus Ad-mTERT by homologous recombination. The Ad-mTERT recombinant adenovirus was efficiently duplicated in 293 cells and was purified by CsCl density centrifugation and titer was measured. 【Results】 The recombinant plasmid was identified by PCR and digest with restriction enzyme. The recombinant adenovirus carrying mTERT gene was identified by PCR amplification. 【Conclusion】 The mouse TERT recombinant adenovirus vector was successfully constructed. The study lays foundation for tumor gene therapy by mTERT.

Key words: mouse telomerase reverse transcriptase; recombinant adenovirus vector

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):11-14]

端粒酶是目前所发现的恶性肿瘤最广谱的分子标记, 是进行肿瘤基因治疗的理想靶点。从理论上讲, 针对端粒酶的肿瘤基因治疗比单纯针对某

个癌基因或抑癌基因的治疗具有更广阔的应用前景。近来, 有学者提出更优越的新策略, 即以肿瘤组织端粒酶激活为目标, 以端粒酶蛋白亚单位(TERT)

收稿日期: 2005-07-27

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)基金资助项目(2003CB515507)

作者简介: 姜楠(1975 年-), 男, 山西太原人, 博士生, 主要从事肝脏移植的临床工作及基础研究; 陈规划, 教授, 导师, 通讯作者。E-

mail:njiang163@163.com

调控其它抗肿瘤基因,从而达到靶向肿瘤细胞并破坏肿瘤细胞的目的^[1]。为研究 mTERT 的生物学性能和其在肿瘤基因治疗中的作用,利用腺病毒载体感染效率高、宿主范围广及安全性较好等特点,构建表达小鼠端粒酶蛋白亚单位的重组腺病毒载体,为 mTERT 基因的研究提供有效的生物表达体系。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株与质粒载体

小鼠肝癌细胞株 H22 购自武汉大学典型培养物保存中心;大肠杆菌 *E.coli* JM109、293 细胞为本室保存;PUC-19 载体试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;腺病毒载体 pAC、pJM17 购自加拿大 Microbix Biosystems 公司。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶 Hind III、EcoR I、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 提取试剂盒、 λ -Hind III、 λ -Eco T14 DNA marker 等均购自大连 TaKaRa 公司;Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;RPMI-1640 为美国 GIBCO 公司产品;其它试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.3 小鼠 TERT 基因全长 cDNA 的克隆

将小鼠肝癌细胞株 H22 置于含体积分数 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养基培养,取对数生长期的细胞,用 Trizol 试剂从小鼠肝癌细胞中提取总 RNA,根据 GenBank 中已报道的小鼠端粒酶蛋白亚单位 cDNA 的基因序列设计合成小鼠 TERT 引物。上游引物: F1, 5'-CCG GAA TTC ATG ACC CGC GCT CCT CGT TGC CCC GC-3'; F2, 5'-CAT TOC TAC TCA GCA ACC TCC AGC CTA AC-3'; 下游引物: R1, 5'-ACG CAG CAC AAA GGC CCG CCA GGT CCT G-3'; R2, 5'-ACG CGT CGA TTT AGT CCA AAA TGG TCT GAA AGT C-3', 通过 PCR 扩增出 TERT 3 369 cDNA 片段。将 TERT cDNA 与测序质粒 pUC19 连接,得到重组测序质粒 pUC19-mTERT 克隆,提取质粒并作酶切鉴定,筛选携带 TERT cDNA 的重组测序质粒 pUC19-mTERT,由 TaKaRa 公司测序。

1.4 目的片段 mTERT 插入 pAC 载体

将带有 EcoR 和 Hind III 酶切位点的 pUC19-mTERT 双酶切,纯化回收酶切片段,同样

对 pAC 载体进行 EcoR 和 Hind III 双酶切纯化回收,完全酶切后按碱性磷酸酶 CIAP 使用说明对载体进行去磷酸化,将去磷酸化的 pAC 载体和 mTERT 片段用 T4 DNA 连接酶连接过夜,构建小鼠 TERT 真核表达载体 pAC/mTERT,将连接物转化大肠杆菌 DH5,挑选阳性克隆,少量提取质粒,将大小在 12 kb 的转化子进行 EcoR 和 Hind III 双酶切,产生两个大小为 8.8 kb 和 3.3 kb 的片段,作酶切及测序鉴定正确后命名为 pAC-mTERT。

1.5 pAC-mTERT 和 pJM17 共转染 293 细胞

用磷酸钙介导法共转染后每 3~5 d 换液 1 次,每次留原培养液的 1/3~1/4。10~14 d,将出现明显病变的细胞孔转入 6 孔板扩大培养,取其培养上清进行鉴定。从转染第 11 天开始,陆续出现发生细胞病变的孔,挑取 6 个孔进行鉴定试验。

1.6 重组腺病毒的鉴定

将上述重组腺病毒液 2 mL 感染 80% 融合的 293 细胞,待单层细胞大部分变圆但尚未脱落时收集细胞,反复冻融 3 次,取少许提取腺病毒 DNA,进行 PCR 鉴定,并以一个目的基因不同的重组病毒为阳性对照,采用纯水作为阴性对照。mTERT 正、反义引物序列分别为: 5'-ATTACCGAAGAA ATGGCCGC-3' 和 5'-CCCATTAAACACGCCATG CA-3'。50 μ L 反应体系中含有正、反义引物各 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 25 mmol/L 3 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 经鉴定正确的重组腺病毒命名为 Ad-mTERT。

1.7 重组腺病毒的扩增、纯化及滴度测定

将鉴定正确的病毒液感染 60%~80% 融合的 293 细胞,5~7 d 后收集细胞,反复冻融 3 次,收集上清反复扩增至需要病毒量,用氯化铯密度梯度超速离心法纯化,用 TICD50 法测定病毒滴度。

2 结果

2.1 mTERT 基因的获取、pUC19-mTERT 的构建及酶切鉴定

提取总 RNA,通过 PCR 扩增出 mTERT cDNA 片段,将 mTERT 基因与测序质粒 pUC19 连接。将大小在 5.9 kb 的产物用 EcoR 和 Hind III 酶切鉴定,得到约 3.3 kb 和 2.6 kb 的两个片段,将质粒送

TaKaRa 公司测序, 结果表明序列正确。取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳(图 1)。

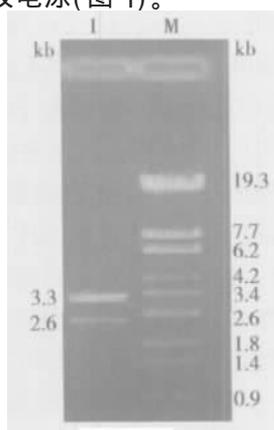


图 1 pUC19- mTERT载体 EcoR 和Hind 双酶切鉴定
Fig. 1 The identification of the pUC19- Mtert by digestion with restriction enzyme EcoR and Hind

Lane M: λ - EcoT14 DNA marker; Lane 1: Recombinant pUC19- mTERT digested by EcoR I / Hind

2.2 pAC- mTERT的构建及酶切鉴定

将从 pUC19- mTERT 质粒扩增酶切回收的 mTERT 基因片段与酶切后的 pAC 载体连接, 将大小在 12 kb 的产物进行 EcoR 和 Hind 双酶切及特异引物的 PCR 鉴定, 产生两个大小为 8.8 kb 和 3.3 kb 的片段, 说明 pAC- mTERT 构建成功, mTERT 插入正确(图 2)。

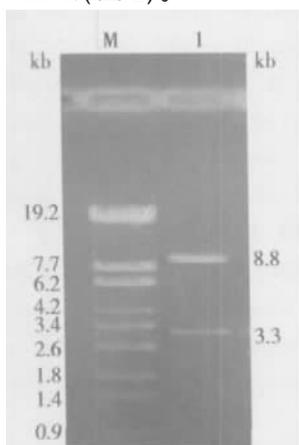


图 2 pAC- mTERT 载体 EcoR 和Hind 双酶切鉴定
Fig.2 The identification of the pAC- mTERT by digestion with restriction enzyme EcoR and Hind

Lane M: λ - EcoT14 DNA marker; Lane 1: Recombinant pAC- mTERT digested by EcoR I / Hind

2.3 重组病毒的 PCR 鉴定

选取 6 个重组病毒, 采用特异性引物进行 PCR 鉴定, 在选出的 6 个重组病毒中有 5 个含有目的基因的扩增产物(图 3)。

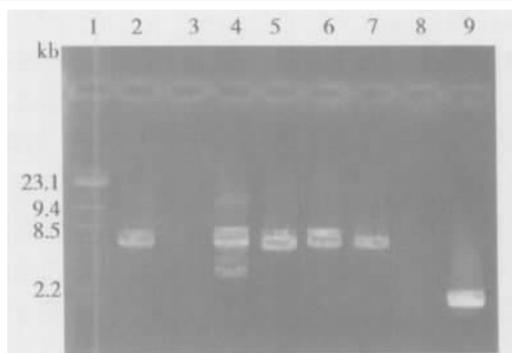


图 3 重组病毒 PCR 鉴定

Fig.3 The identification of the recombinant adenovirus vector by PCR

Lane 1: λ - Hind DNA marker; Lane 2,3,4,5,6,7: recombinant adenovirus vector 1,2,3,4,5,6; Lane 8: negative control; Lane 9: positive control

2.4 重组病毒的Hind 酶切鉴定

将重组腺病毒用Hind 酶切, 结果与预计酶切图谱相同(图 4)。

2.5 病毒滴度的测定

AdmTERT 小量扩增后测定病毒滴度为 7×10^9 IU/mL, 按需要扩增一定量后, 进行超离心纯化浓缩, 病毒滴度达到 2×10^{10} IU/mL。

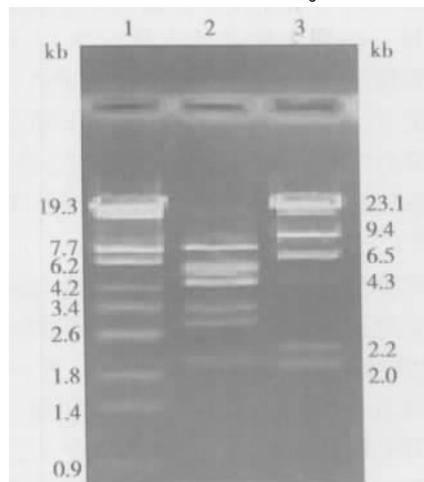


图 4 重组病毒的Hind 酶切鉴定

Fig.4 The identification of the recombinant adenovirus vector by digestion with restriction enzyme Hind

Lane 1: λ - EcoT14 DNA marker; Lane 2: Adv- mTERT digested by Hind ; Lane 3: λ - Hind DNA marker

3 讨论

端粒酶为核苷酸-蛋白复合物, 端粒酶由模板 RNA(RT)、端粒相关蛋白(TP1)和端粒酶蛋白亚单位(TERT)构成。TERT是酶的催化亚基, TERT只

在端粒酶阳性的肿瘤细胞和永生化细胞中表达,正常组织中其表达被抑制,而RT和TP1在端粒酶阴性的正常组织中也广泛表达,说明肿瘤细胞主要通过激活TERT而激活端粒酶^[2]。在某种意义上,TERT行为类似一原癌基因,其异常表达或激活是肿瘤形成的重要原因之一^[3],而90%以上的恶性肿瘤细胞存在hTERT高表达的端粒酶活性,这一特性使端粒酶成为肿瘤诊断和防治研究的重要靶点^[4,5]。Vonderheide等^[6]首先发现来源于hTERT的九肽与MHC-I类分子结合递呈在肿瘤细胞表面,并作为抗原特异性激活细胞毒性T细胞(CTL)导致肿瘤细胞溶解,因而初步认为hTERT是一种可被CTL特异识别的广泛表达的肿瘤相关抗原,从而开创了以端粒酶为靶点的肿瘤免疫治疗新方法。端粒酶蛋白亚单位在大多数肿瘤细胞中均异常表达,该蛋白可以被加工成为I类分子递呈,诱导特异性细胞毒活性,产生针对端粒酶表达细胞的特异而有效的抗肿瘤T淋巴细胞反应。转染端粒酶蛋白亚单位基因的树突状细胞能诱导产生抗端粒酶阳性细胞的细胞毒免疫反应,并对不同来源的肿瘤均产生保护性免疫作用。以端粒酶为基础的肿瘤免疫治疗与其他治疗方法相比有以下优势:不需要为每一位患者确定具有其自身HLA类型的来源于肿瘤抗原的免疫原性抗原决定簇;以端粒酶为靶点的治疗可以靶向90%以上的各种肿瘤,是目前最为广谱的肿瘤基因治疗方案。因此,以端粒酶为基础的肿瘤免疫治疗在肿瘤新发/复发的治疗上将具有广泛的应用价值。

本实验是在明确TERT基因表达与肿瘤发病密切相关的基础上,将mTERT克隆到腺病毒5型E1区缺失复制缺陷型腺病毒中,进一步研究TERT基因在肿瘤免疫治疗中的作用机制。腺病毒是目前用于基因转移最广泛的载体之一,与其他病毒载体不同,腺病毒载体的诸多优点决定了腺病毒载体在基因治疗领域中具有广阔的应用前景:宿主细胞范围广泛,不依赖于宿主细胞增殖而表达外源基因,既可以感染分裂细胞又可以感染非分裂细胞;容易制备高滴度病毒粒子,可达 10^{11} pfu/mL;而且在受染细胞内不发生整合,因此没有致癌和致突变的危险,并可插入大片段的外源基因^[7]。目前绝大多数编码有潜在治疗作用的基因载体是用Ad5构建,要插入大片段的外源基因,必须缺失一段腺病毒基因组。一般缺失位点有3处,即E1、E3及E4与末端反向重复序列(IRT)之间的区域,

E1区的缺失,致使病毒复制缺陷,不会引起宿主细胞的损伤或病毒扩散^[8],E1复制缺陷的Adv在普通细胞中不能复制形成病毒颗粒,293细胞是腺病毒E1转化的胚肾细胞,能够通过提供E1蛋白进行反式互补。本实验中腺病毒穿梭质粒pCA含5型腺病毒基因,其中E1区被删除,并在E1区的缺失区插入CMV、多克隆位点、Poly A合成区等。pCA与含5型腺病的质粒pJM17共转染293细胞,在293细胞内同源重组,包装成复制缺陷型腺病毒载体。本实验成功构建了小鼠TERT基因重组腺病毒载体,并在293细胞中成功包装出重组腺病毒Adv-mTERT,为进一步研究TERT的生物学性能和激发特异抗肿瘤免疫的肿瘤生物治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] POOLE J C, ANDREWS L G, TOLLEFSBOL T O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT)[J]. *Gene*, 2001, 269(1-2):1-12.
- [2] DUCREST A L, SZUTORISZ H, LINGNER J, et al. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene[J]. *Oncogene*, 2002, 21(4):541-552.
- [3] HARLEY C B. Telomerase is not an oncogene[J]. *Oncogene*, 2002, 21(4):494-502.
- [4] DOYLE L A, HIGHSMITH W E. Telomerase as a diagnostic and therapeutic target for cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2002, 2(2):217-225.
- [5] TAKEUCHI H, KANZAWA T, KONDO Y, et al. Combination of caspase transfer using the human telomerase reverse transcriptase promoter and conventional therapies for malignant glioma cells [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(1):57-63.
- [6] VONDERHEIDE R H, HAHN W C, SCHULTZE J L, et al. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes[J]. *Immunity*, 1999, 10(6):673-679.
- [7] ALDEN T D, PITTMAN D D, BERES E J, et al. Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein gene therapy[J]. *J Neurosurg*, 1999, 90(1 Suppl): 109-114.
- [8] LATTERMANN C, OXNER WM, XIAO X, et al. The adeno associated viral vector as a strategy for intradiscal gene transfer in immune competent and pre-exposed rabbits[J]. *Spine*, 2005, 30(5):497-504.

(编辑 张敏瑞)