

人神经生长因子基因真核细胞表达载体的构建与鉴定^①

王传恩¹ 阮奕文¹ 姚志彬¹ 谢瑶¹ 郭辉玉²

(中山医科大学 1 脑研究室 2 微生物学教研室; 广州, 510089)

摘要 目的: 构建携带人神经生长因子(hNGF)基因的真核细胞表达载体, 为应用 NGF 进行老年性痴呆(AD)等疾病基因治疗打基础。方法: 应用基因重组技术将 hNGF cDNA 克隆到逆转录病毒载体 pLXSN 中, 用限制性内切酶酶切分析重组质粒 pLNGFSN 中 hNGF 基因的插入方向, 用 PCR、斑点杂交和 Southern 杂交对重组质粒 pLNGFSN 作进一步鉴定。结果: hNGF cDNA 已正确地克隆到逆转录病毒载体 pLXSN 中, 而构建成重组逆转录病毒载体 pLNGFSN。结论: 真核细胞表达载体 pLNGFSN 的成功构建, 为进一步开展 NGF 基因治疗 AD 等中枢神经系统疾病奠定了基础。

关键词 神经生长因子/生物合成; 遗传载体; 重组; 遗传; 基因疗法; 痴呆, 老年性/治疗

中图分类号 R 394.3

Construction and Identification of Eukaryotic Cell Expression Vector Carrying Human Nerve Growth Factor Gene

Wang Chuan'en¹ Ruan Yiwen¹ Yao Zhibin¹ Xie Yao¹ Guo Huiyu²

(1 Department of Brain Research 2 Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To construct eukaryotic cell expression vector carrying human nerve growth factor complementary DNA (hNGF cDNA) for gene therapy. **Methods:** Through genetic recombination technique, hNGF cDNA was inserted into polylinker site of retroviral vector pLXSN. The recombinant plasmid pLNGFSN was verified with restriction analysis, PCR, Dot blot hybridization and Southern blot hybridization. **Results:** hNGF cDNA was cloned correctly into retroviral vector pLXSN. Recombinant retroviral vector pLNGFSN was constructed. **Conclusion:** The eukaryotic cell expression vector pLNGFSN was constructed successfully for gene therapy of Alzheimer's and other central nervous system diseases.

Subject headings nerve growth factor/biothesis; genetic vectors; recombination, genetic; gene therapy; dementia, senile/therapy

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是神经系统最为重要的生物活性分子之一, 是目前防治老年性痴呆症(Alzheimer's disease, AD)等多种神经退变性疾病的最有前途的一种神经营养因子^{1,2}。但 NGF 属生物大分子, 不能直接通过血脑屏障, 其应用受到了限制。人们曾用脑室埋管或脑室内植入缓释囊等方法以解决给药途径问题, 但都有一些无法克服的缺陷。用基因治疗方法来解决 NGF 治疗 AD 等疾病的给药途径问题是目前最有希望的方

案³。其主要策略是利用基因重组和转移技术使神经细胞或非神经细胞获得 NGF 合成分泌能力, 通过内生 NGF 保护变性的神经元并改善其学习记忆能力。作者拟用分子生物学及细胞生物学技术将人 NGF(hNGF)基因转移到神经前体细胞或非神经细胞中, 然后用于移植治疗实验性 AD, 为 AD 基因治疗这一新思路进行尝试。本文报告第一部分工作, 即人 NGF 基因真核细胞表达载体的构建及其鉴定。

1 材料和方法

1.1 生物材料

质粒 pBS/NGF 含有 hNGF 的 cDNA 序列基因, 由 The Salk Institute for Biological Studies 的 Gage FH 教授惠赠; 逆转录病毒载体质粒 pLXSN 由 Fred Hutchinson Cancer Research Center 的 Miller AD 教授惠赠; 大肠杆菌 JM109、DH5 α 为本室保存菌株。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho*I、*Sal*I、*Apa*I、*Eco*RI, T4DNA 连接酶, 碱性磷酸酶 CIP, Klenow DNA 聚合酶 I, Agarase, Dig DNA labeling and detection kit, 尼龙膜 (Boehringer Mannheim 公司); PCR 引物 5' \rightarrow 3' GGTCATAGCGTAATGTCGA, 3' \rightarrow 5' GCAGGTCAGGCTCTTCTCA (上海细胞生物研究所合成)。其它试剂均为分析纯以上产品。

1.3 pBS/NGF 质粒的鉴定、目的基因及探针的制备

分别用 *Hind*III 单酶切及 *Sma*I 和 *Apa*I 双酶切 pBS/NGF 质粒。酶解后, 用低熔点琼脂糖 (LMT) 电泳分离出含 hNGF 基因的片段。以 pBS/NGF 质粒为模板, 用 hNGF 特异性引物进行 PCR。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 7 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 60 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环。取 5 μ L PCR 产物 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果; 用 LMT 电泳分离 NGF 基因片段, 经 Agarase 消化回收, 按照 Dig DNA labeling and detection kit 说明书标记制备探针。

1.4 pLNGFSN 重组体的构建

DNA 重组按文献[4]方法进行。首先将 LMT 电泳分离的 0.97 kb NGF 基因, 经 Agarase 消化、回收并进行 3' 突出端的删切; pLXSN 载体用 *Xho*I 酶切, Klenow DNA 聚合酶补平, 碱性磷酸酶 CIP 去磷酸化处理; 在 T4 DNA 连接酶的作用下将 NGF 基因与 pLXSN 载体连接成 pLNGFSN; 之后, 取连接物转化 DH5 α 宿主菌, 挑取转化子, 用碱变性法快速抽提质粒 DNA, 电泳筛选片段增大者再进行鉴定。

1.5 pLNGFSN 重组体的鉴定

1.5.1 重组质粒 NGF cDNA 插入方向的鉴定 将提取的质粒 DNA, 分别用限制性内切酶 *Bam*HI、*Hpa*I、*Eco*RI 酶切, 在 pLXSN (5.874 kb) 多克隆位点上有 *Bam*HI、*Hpa*I、*Eco*RI、*Xho*I 等位点, 本研究选取 *Xho*I 为插入点。hNGF 片段 (0.97 kb) 近 3' 末端也有 1 个 *Eco*RI 酶切位点。因此, 如果 NGF 插入方向为

正向连接, 则产生 6.25 kb 和 0.59 kb 两个片段; 如果为反向连接, 则产生 6.4 kb 和 0.38 kb 两个片段。重组体用单一酶切位点的限制性内切酶 *Bam*HI 酶切分析为线性 6.84 kb 的片段, 用 *Bam*HI 和 *Hpa*I 双酶切为 5.87 kb 和 0.97 kb 两个片段。

1.5.2 PCR 鉴定重组体 分别以 pBS/NGF、pLNGFSN 及 pLXSN 质粒 DNA 为模板, 用 hNGF 特异性引物进行 PCR。琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。

1.5.3 斑点杂交鉴定重组体 将重组质粒 pLNGFSN DNA 点膜, 同时以质粒 pBS/NGF 及 pLXSN DNA 作为对照, 用 Digoxigenin 标记的 hNGF 基因为探针, 按 Digoxigenin 检测试剂盒操作进行预杂交、杂交及免疫学检测。

1.5.4 Southern 杂交鉴定重组体 用限制性内切酶 *Bam*HI、*Hpa*I、*Eco*RI 酶切重组质粒 pLNGFSN, 琼脂糖凝胶电泳, 经变性、转印及预杂交后, 以 Digoxigenin 标记的 hNGF 基因为探针, 进行杂交与免疫学检测。

2 结果

2.1 质粒 pBS/NGF 的鉴定

质粒 pBS/NGF 经限制性内切酶 *Hind*III 酶切后, 能够产生 2.96 kb 和 1.8 kb 两个片段, 其中 1.8 kb 片段含有 hNGF cDNA 基因; 用 *Sma*I 和 *Apa*I 双酶切后, 产生 6 个片段, 其中 0.97 kb 片段含有 hNGF cDNA 基因。以 pBS/NGF 质粒 DNA 为模板, 经 PCR 扩增出长度为 0.72 kb 的 hNGF 基因, 符合理论大小 (图 1)。

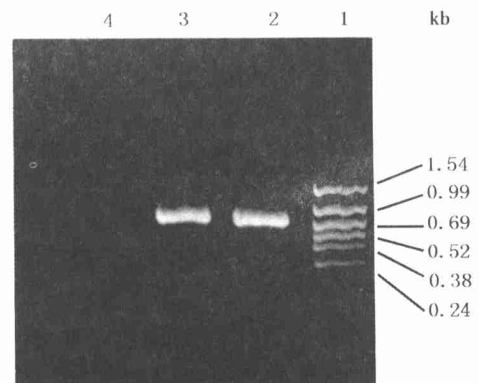


图 1 PCR 鉴定 pBS/NGF 与重组质粒 pLNGFSN
Fig. 1 Identification of pBS/NGF and recombinant plasmid pLNGFSN by PCR

Lane 1: PCR Markers; Lane 2: plasmid pBS/NGF; Lane 3: plasmid pLNGFSN; Lane 4: pLXSN

2.2 逆转录病毒表达载体的构建与鉴定

2.2.1 重组表达载体的构建 比较质粒 pBS/NGF 和真核表达质粒 pLXSN 的多克隆酶切位点, 结合 hNGF 原基因片段编码区核苷酸序列酶切位点, 选用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Apa* I 对 pBS/NGF 质粒双酶切, 用 *Xho* I 对 pLXSN 进行完全酶切, 分别电泳回收 0.97 kb 的 hNGF 原基因片段和 5.87 kb 的 pLXSN 病毒载体片段。两片段经平端处理后进行连接并转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选的阳性克隆命名为 pLNGFSN。

2.2.2 重组表达载体中目的基因插入方向 小量扩增碱裂解法提取 DNA, *Eco*RI 等限制性内切酶酶切鉴定方向, 即 *Eco*RI 限制性内切酶酶切后产生 6.25 kb 和 0.59 kb 两个片段者为单正向重组体(图 2)。

双酶切后的 0.97 kb 小片段 DNA 及 *Eco*RI 酶切后的大、小片段 DNA 均呈阳性杂交(图 4)。这进一步证明 hNGF cDNA 基因已正确克隆入 pLXSN 载体中。

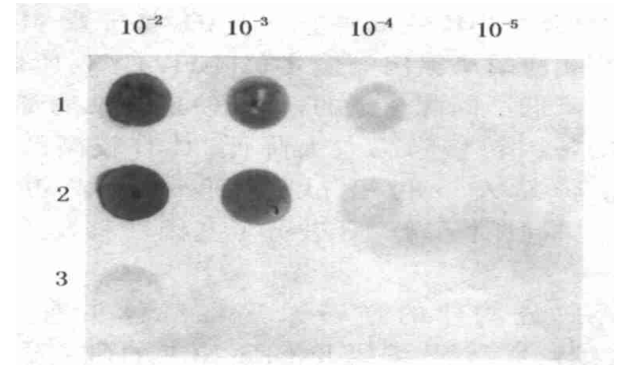


图 3 重组质粒与 hNGF 探针斑点杂交
Fig. 3 Patterns of hybridization of recombinant plasmid with hNGF cDNA probe
Row 1: pBS/NGF; Row 2: pLNGFSN; Row 3: pLXSN

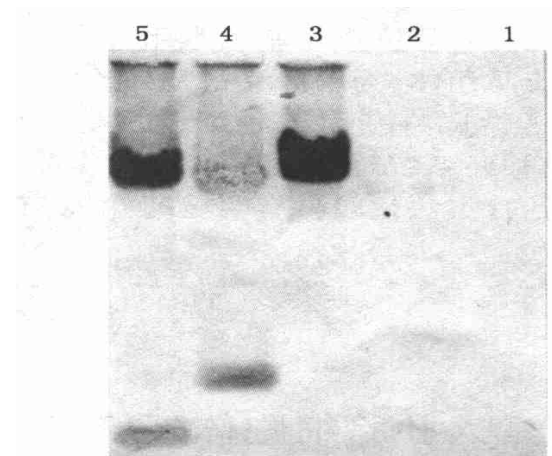


图 4 重组质粒与 hNGF 探针 Southern 杂交
Fig. 4 Patterns of Southern blot hybridization of recombinant plasmid with hNGF cDNA probe
Lane 1: λ NDA/*Hind* III markers; Lane 2: plasmid pLXSN/*Xho* I; Lane 3: recombinant plasmid/*Bam*HI; Lane 4: recombinant plasmid/*Bam*HI + *Hpa* I; Lane 5: recombinant plasmid/*Eco*RI

3 讨论

逆转录病毒载体介导的基因转移是将外源性基因导入靶细胞的有效手段。它不但能高效地将外源基因转入靶细胞, 而且能将外源基因有效地整合到宿主细胞基因中, 并随细胞分裂而传给后代, 在基因治疗中被广泛应用。本研究用的逆转录病

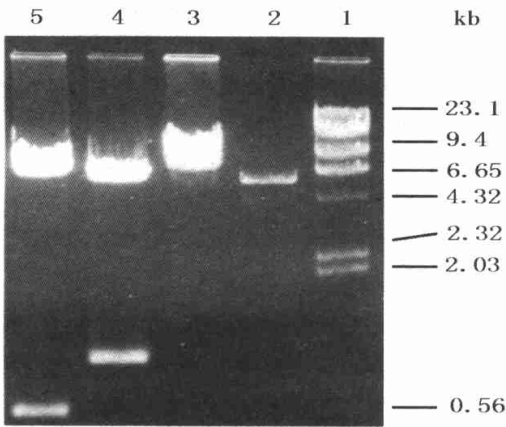


图 2 重组质粒的酶切分析
Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid

Lane 1: λ DNA / *Hind* III markers; Lane 2: plasmid pLXSN/*Xho* I; Lane 3: recombinant plasmid/*Bam*HI; Lane 4: recombinant plasmid/*Bam*HI + *Hpa* I; Lane 5: recombinant plasmid/*Eco*RI

2.2.3 PCR 鉴定 以重组表达载体 pLNGFSN 为模板, 经 PCR 扩增出长度为 0.72 kb 的 hNGF 基因, 结果见图 1。

2.2.4 斑点杂交鉴定 Digoxigenin 标记的 hNGF cDNA 探针与重组质粒 pLNGFSN 杂交呈阳性, 质粒 pBS/NGF 为阳性对照, 质粒 pLXSN 为阴性(图 3)。证明 hNGF cDNA 基因已克隆入 pLXSN 载体中。

2.2.5 Southern 杂交鉴定 Digoxigenin 标记的 hNGF cDNA 探针分别与重组质粒 pLNGFSN 经 *Bam*HI 酶切后的线性化 DNA、*Bam*HI 与 *Hpa* I

毒载体来源于 Moloney 小鼠白血病病毒 (MoMLV), 是在逆转录病毒载体 N2 基础上构建的新一代载体, 按其结构属带有内部启动子的载体, 不仅去除了 gag、pol、env 等结构基因, 而且将 gag 基因的翻译起始密码子 ATG 变成终止子 TAG, 将 5' 端 MoMLV 序列用相应的小鼠肉瘤病毒 (MoMSV) 序列所取代, 进一步降低了同源重组的概率, 使逆转录病毒载体介导的基因转移隐患大大降低, 具有较高的安全性^[5]。研究人员利用 pLXSN 载体已成功地对 ADA^[6]、凝血因子 VIII^[7] 等进行了基因转移及表达的研究。

本研究构建的逆转录病毒载体带有 hNGF cDNA 编码区基因, 编码 hNGF。NGF 的研究是当今医学生物界的热点之一^[1, 2], 其相对分子质量为 26 ku, 由 118 个氨基酸组成的多肽, 能介导多种生物学效应, 尤其是对中枢神经系统的胆碱能神经元具有神经营养的作用, 已用于 AD 等多种疾病的治疗^[2]。但 NGF 不能通过血脑屏障, 其应用受到了极大地限制。本研究应用基因重组技术构建 hNGF 逆转录病毒重组体, 为脑内移植基因治疗奠定了基础。目前正尝试将基因工程细胞移植于脑内, 对 AD 等中枢神经系统退变性疾病进行实验治疗, 它与常规的治疗方法比较具有明显的优势: 不受血脑

屏障的限制, 可长期表达, 避免了反复给药的缺陷等。

参 考 文 献

- 1 Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 1987, 237(4819): 1154
- 2 Olson L. NGF and the treatment of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 1993, 124(1): 5
- 3 Blomer U, Naldini L, Verma IM, *et al*. Application of gene therapy to the CNS. *Human Molecular Genetics*, 1996, 5(5): 1397
- 4 Sambrook Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 53~85
- 5 Miller A D, Resman G J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*, 1989, 7(9): 980
- 6 Kaleko M, Garcia J V, Osborne W R A, *et al*. Expression of human adenosine deaminase in mice after transplantation of genetically-modified bone marrow. *Blood*, 1990, 75(8): 1733
- 7 Lynch C, Israel D I, Kaufman R J, *et al*. Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. *Human Gene Therapy*, 1993, 4(3): 259

(1998-12-31 收稿 1999-04-13 修回)

· 简 讯 ·

人胚胎细胞体外培养及定向诱导为造血细胞的研究前景诱人

中山医科大学临床医学博士后徐令, 经过在站 2 年的研究 5 月 20 日出站, 其出站的研究工作报告令人兴奋。徐博士在孙逸仙纪念医院儿科黄绍良教授、本校病理生理学教研室李树浓教授的指导下, 选择了探索性课题开展“人胚胎细胞的培养及定向诱导为造血细胞的研究”。

徐博士通过诱导小鼠胚胎干细胞, 摸索诱导胚胎细胞为造血细胞的条件, 小鼠的研究表明胚胎干细胞体外分化重演了胚胎造血。徐博士从人胚胎细胞分离和培养开始, 发现人胚胎细胞可以在人胚胎成纤维细胞上生长, 且明显优于小鼠胚胎成纤维细胞, 可以像细胞系一样长期培养、冻存、制备 1 次可以长期使用; 采用分阶段诱导小鼠胚胎干细胞分化的培养体系, 成功地将胚胎干细胞定向诱导分化为 B 淋巴细胞和浆细胞。来源于桑椹胚的胚胎细胞完全有可能建立人类的胚胎干细胞系, 人类的胚胎干细胞具有发育为人体各种细胞的潜能, 徐博士通过定向诱导发育为造血细胞, 为体外诱导胚胎干细胞分化、研究分化调控机理及提供组织器官移植的原材料打下了基础, 可以为体外研究人造血系统的发育及其机理提供很好的模型。随着研究的逐步深入还可以为治疗血液病提供新的方法, 该研究前景广阔。但胚胎干细胞应用于临床还有一段距离, “革命尚未成功, 同志仍需努力”。

本研究过程中曾在《中山医科大学学报》1998, 19(1): 77~78 以快报形式图文并茂地发表, 详细可供参阅。

(冯世容)