

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.02.002

反义重组腺病毒质粒 pAdxsi-GFP-hVEGF 的构建与鉴定

张英杰 陈 剑 孙彦春

(济宁医学院附属第一人民医院, 山东 济宁 272011)

摘 要 **目的** 构建反义重组腺病毒质粒 pAdxsi-GFP-hVEGF。**方法** 从人外周血细胞中提取总 RNA, RT-PCR 法反转录合成 cDNA 文库。设计带有酶切位点的引物, 调取 VEGF 目的基因, 插入 pShuttle-GFP-CMV 穿梭载体。经鉴定序列正确后, 将 VEGF 目的基因构建至亚克隆重组腺病毒质粒 pAdxsi 中。**结果** 成功构建反义重组腺病毒质粒 pAdxsi-GFP-hVEGF, 经酶切鉴定, 目的基因分子量与预计的相同, 测序插入载体部位正确。**结论** 反义重组腺病毒质粒 pAdxsi-GFP-hVEGF 构建正确、稳定, 为进一步抑制人 VEGF 基因的表达和体内外实验打下了良好的基础。

关键词 腺病毒; 反义核酸; 血管内皮生长因子; 质粒

中图分类号: R373 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)04-081-05

Construction and identification of the Adenoviral vector pAdxsi-GFP-hVEGF

ZHANG Ying-jie, CHEN Jian, SUN Yan-chun

(The First People's Hospital Affiliated of Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To construct the Adenoviral vector pAdxsi-GFP-hVEGF. **Methods** Total RNA was isolated from blood cells and cDNA was constructed by RT-PCR, a pair of primers were synthesized with restriction site to get human VEGF cDNA fragments, and VEGF fragments were inserted into the shuttle vector pShuttle-GFP-CMV. After the sequence was confirmed, the human VEGF fragments were subcloned into Adenoviral vector pAdxsi-GFP-hVEGF. **Results** Adenoviral vector pAdxsi-GFP-hVEGF was successfully constructed, and the molecular weight of the target gene equaled the expected, and sequencing results indicated that Adenoviral vector pAdxsi-GFP-hVEGF contained correct recombinant. **Conclusion** Adenoviral vector pAdxsi-GFP-hVEGF is correct and stable, and it will be useful for further research of VEGF inhibition both in vivo and in vitro.

Key words: adenovirus; antisense; VEGF; plasmids

血管生成是恶性肿瘤的侵袭、生长、转移的关键因素, 血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 可以与血管内皮细胞的相应受体相结合, 诱导血管生成^[1]。由于肿瘤的生长和转移对新生血管的依赖性, 抑制 VEGF 的表达将使肿瘤细胞进入正常分化轨道或导致肿瘤细胞的凋亡。VEGF 成为阻断肿瘤血管生成, 进行基因治疗的理想靶位^[2]。

腺病毒是基因治疗领域有效的工具^[3]。具有宿主细胞广泛、感染靶细胞效率高、制备和转导方便等优点, 而且由于其 DNA 不整合到宿主细胞染色体中, 无潜在的致癌危险, 所以腺病毒载体在基因转移和基因治疗的研究中得到了广泛的应用^[2,3]。本实验利用复制缺陷型腺病毒作为抑制

VEGF 基因的载体, 构建了产生反义 VEGF 基因的重组腺病毒质粒 pAdxsi-GFP-hVEGF, 为下一步进行 VEGF 基因治疗及关于 VEGF 的基础研究提供良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

pShuttle-GFP-CMV(-) 和 pAdxsi 质粒, 血管内皮生长因子的抑制序列, 购自北京诺赛基因组研究中心有限公司。限制性内切酶均购自 New England Biolabs 公司; T4 DNA 连接酶、M-MLV 逆转录酶购自 MBI (Fermentas) 公司; CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal) 酶购自 promega 公司; pfx DNA polymerase 购自 invitrogen 公司;

RNA 提取试剂和 PCR 试剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司;引物合成于上海生工生物工程技术服务有限公司;质粒小/中量提取纯化试剂盒、DNA 纯化试剂盒(柱离心型)、DNA 凝胶回收与纯化试剂盒(柱离心型)均购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司;1kb DNA ladder 购自鼎国生物公司。

1.2 细胞

人脑胶质瘤细胞 U251 为本实验室保存;感受态大肠杆菌 DH5 α 为自制。

1.3 目的基因 hVEGF 的提取

1.3.1 总 RNA 的提取 常规分离并收集人外周血单个核细胞,加入预冷的 TRIzol 试剂 1ml, 4℃ 静置孵育 15min,加入 0.2ml 冰预冷的氯仿,剧烈振荡管 15s。4℃ 静置孵育 3min 后 12000rpm, 4℃ 离心 15min 使核酸蛋白充分分离。取 RNA 上清层,加入 0.5ml 异丙醇,颠倒混匀,4℃ 孵育 10min。12000rpm, 4℃ 离心 10min。弃上清,加入等体积 75% DEPC-乙醇漂洗沉淀。7500rpm, 4℃ 离心 5min 后弃上清, 10min 内使 RNA 快速晾干。50 μ l 的 DEPC 水重溶 RNA 沉淀, 60℃ 孵育 10min,使沉淀充分溶解。用紫外分光光度仪对其进行定性定量分析后, -80℃ 保存 RNA 备用。

1.3.2 逆转录反应 逆转录在 20 μ l 反应体系中进行:取总 RNA 1 μ g, Oligo(dT)10 引物 0.5 μ g, 加入去离子水至 11 μ l。70℃ 水浴 5min, 冰上冷却。加入逆转录反应缓冲液 4 μ l, dNTP 20nmol, RNA 酶抑制剂 20U, 37℃ 水浴 5min。加入 M-MLV 逆转录酶 200U, 42℃ 反应 1h。产物在 70℃ 变性 10min 后, 保存于 4℃。

1.3.3 反义 hVEGF 引物的设计和基因的扩增与回收 根据 hVEGF 的序列(NM_001025366) 设计上游引物 VEGF-F: 5' GGAATTCGCCGC-CAGCCATGAACCTTCTGCTGTCTTG 3', 下游引物 VEGF-R: 5' CCGGATCCTCACCGCCTCG-GCTTGTAC 3' (引物 5' 端分别加入 EcoR I 和 BamH I 酶切位点)。取 1 μ l 人外周血 cDNA 作为模板, 用高保真酶(pfx DNA polymerase) 扩增 hVEGF 目的基因。PCR 反应体系为 50 μ l, 含 10 $\times$ pfx Amplification Buffer 5 μ l, dNTP 200 μ mol/L, VEGF-F, 1 μ mol/L, VEGF-R, 1 μ mol/L, 50mM MgSO₄ 1 μ l, 模板 1 μ l, pfx DNA polymerase(invitrogen, 2.5U/ μ l) 0.6 μ l。循环参数为: 94℃ 1min, 55℃ 30s, 72℃ 40s, 30 个循环,

最后 72℃ 延伸 10min。PCR 反应结束后加样至 1% 的琼脂糖凝胶, 电泳, 在紫外灯下切下目的片段, 用 DNA 凝胶回收与纯化试剂盒(柱离心型)回收。

1.4 重组穿梭载体构建和鉴定

1.4.1 重组穿梭载体构建 将回收后的 PCR 片段和穿梭载体 pShuttle-GFP-CMV 进行 BamH I/EcoR I 双酶切处理, 得到含有相应粘性末端(BamH I/EcoR I)的片段。酶切结束后, 用 DNA 纯化试剂盒(柱离心型)回收相应片段。将处理好的载体片段和插入片段用 T4 DNA 连接酶进行连接。

1.4.2 重组穿梭载体质粒鉴定 取 3 μ l 连接产物转化化学感受态细胞 DH5 α 菌株, 涂布到卡那抗性固体培养基平皿, 挑取 4 个单克隆菌落, 接种到卡那抗性液体培养基中, 摇床中 37℃, 300rpm 振荡培养过夜, 少量提取穿梭质粒, 用 BamH I/EcoR I 双酶切, 酶切完成后加样至 1% 的琼脂糖凝胶, 电泳鉴定得到的阳性克隆再进行测序鉴定。

1.5 重组腺病毒载体质粒构建和鉴定

1.5.1 重组腺病毒载体质粒构建 利用 I-Ceu I 和 I-Sce I 双酶切处理 pAdxsi 载体, 并做 CIP 去磷酸化处理。用乙醇沉淀法回收线性化载体 pAdxsi; I-Ceu I + I-Sce I 双酶切处理插入片段 pShuttle-GFP-CMV-hVEGF, 酶切完成后加样至 1% 的琼脂糖凝胶, 电泳, 在紫外灯下切下目的片段, 用 DNA 凝胶回收与纯化试剂盒回收。将处理好的载体片段和插入片段用 T4 DNA 连接酶进行连接。

1.5.2 重组腺病毒载体质粒鉴定 取 3 μ L 连接产物转化化学感受态细胞 DH5 α 菌株, 涂布到卡那抗性固体培养基平皿培养过夜, 挑取 4 个单克隆菌落, 接种到卡那抗性液体培养基中, 摇床中 37℃, 300rpm 振荡培养过夜, 少量提取穿梭质粒, 用 Xho I 酶切, 酶切完成后加样至 1% 的琼脂糖凝胶, 挑选阳性克隆。电泳鉴定得到的阳性克隆再进行测序鉴定。

1.6 重组腺病毒的包装与滴度的检测

将 293 细胞接种于六孔板中, 待细胞生长至底面积的 80%~90% 时, 取重组腺病毒载体质粒 pShuttle-GFP-CMV-AS-hVEGF, 细胞转染步骤参照脂质体 Lipofectamine2000 说明书执行。转染 6h 后更换新鲜的细胞培养液, 观察细胞中毒迹象, 待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒。获取脱落底面的细胞连同培养液, 2000rpm, 离心 5min, 弃掉上清, 加入 1ml PBS, 反复冻融 3 次。

CsCl₂ 密度梯度离心法纯化重组腺病毒,测定病毒滴度以 50%组织培养感染量(TCID₅₀)表示。

2 结果

2.1 目的基因 hVEGF 的提取和鉴定

电泳鉴定提取的人外周血细胞总 RNA 无降解。利用合成的 hVEGF 的引物对得到的 cDNA 进行筛选,琼脂糖凝胶上得到约 0.6Kb 的 RT-PCR 产物,其相对分子量大小与预期片段长度相符。将电泳加样量提高至 50μI,分离并胶回收 VEGF 的目的条带。hVEGF PCR 的电泳结果如图 1。

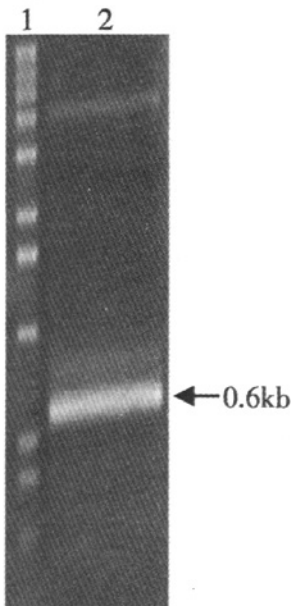


图 1 hVEGF PCR 的电泳结果
1:1kb DNA ladder(由上而下依次是:8kb,7kb,6kb,5kb,4kb,3kb,2kb,1.6kb,1kb,517bp,396bp,230bp)
2:经 PCR 电泳后得到 0.6kb 的条带为 hVEGF 扩增条带

2.2 重组穿梭质粒酶切的鉴定结果

将 hVEGF 片段进行 BamHI/EcoRI 双酶切后与 BamHI/EcoRI 双酶切线性化的载体 pShuttle-GFP-CMV 进行连接,转化,从中筛选 4 个克隆,提取质粒进行 BamHI/EcoRI 双酶切鉴定,4 个克隆在 600bp 附件均有条带,表明它们均为阳性克隆(图 2),测序结果表明,插入片段为目的基因 hVEGF。pShuttle-GFP-CMV-hVEGF 用 BamHI/EcoRI 酶切的鉴定结果见图 2。

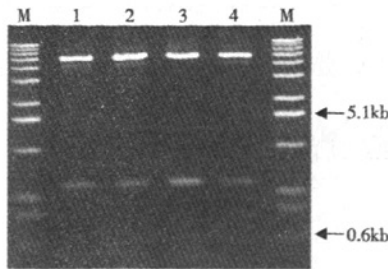


图 2 pShuttle-GFP-CMV-hVEGF 鉴定结果
M:Marker(1kb DNA ladder)由上而下依次是:8kb,7kb,6kb,5kb,4kb,3kb,2kb,1.6kb,1kb,517bp,396bp,230bp
1-4:阳性克隆 BamHI/EcoRI 双酶切鉴定结果

2.3 重组腺病毒质粒的鉴定

构建成功的 pShuttle-GFP-CMV-hVEGF 经 I-CeuI 和 I-SceI 双酶切处理,得到约 3.5kb 片段。回收后与去磷酸线性化的 pAdxsi 载体连接,经转化后,用 XhoI 酶切来筛选阳性克隆。XhoI 酶切筛选出的阳性克隆有以下 7 条带组成(图 3A):14K/11.8K/3.2K/2.66K/2.47K/1.45K/0.6K,而与之相对应的没有重组的腺病毒空载体由以下 6 条带组成(图 3B):14kb,11.8kb,4.0kb,2.47kb,1.45kb,0.6kb。阳性克隆 pAdxsi-GFP-hVEGF 的 XhoI 酶切鉴定结果和 pAdxsi 空载体 XhoI 酶切鉴定结果见图 3。测序结果与重组后腺病毒载体的序列分析结果相一致。阳性克隆 pAdxsi-GFP-hVEGF 的测序结果见图 4。

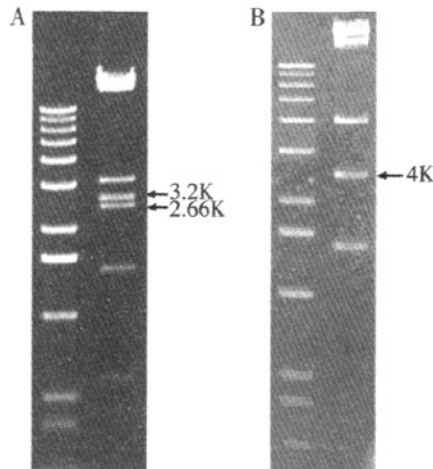


图 3 重组腺病毒质粒 pAdxsi-GFP-hVEGF 阳性克隆的鉴定
A. pAdxsi-GFP-hVEGF 重组子 XhoI 酶切鉴定结果,从上到下依次为 14K/11.8K/3.2K/2.66K/2.47K/1.45K/0.6K
B. pAdxsi 空载体 XhoI 酶切结果,从上到下依次为 14K/11.8K/4K/2.47K/1.45K/0.6K,DNA 标准为 1kb DNA ladder

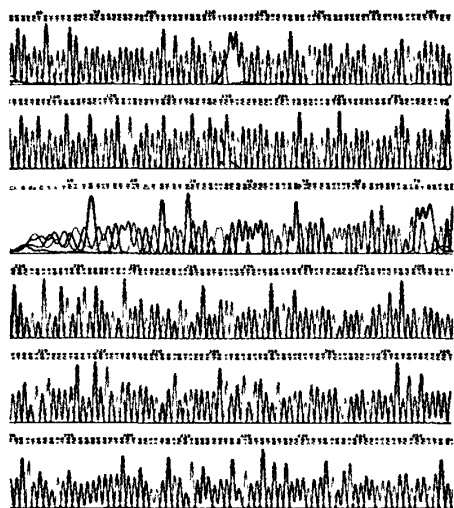


图4 阳性克隆 pAdxsi-GFP-hVEGF 的测序结果

2.4 重组腺病毒的滴度

重组腺病毒质粒 pAdxsi-GFP-AS-hVEGF 转染至人胚肾 HEK293 细胞中包装后扩增,常规氯化铯密度梯度离心法纯化,TCID₅₀ 法滴度测定结果为: 2×10^{10} pfu/ml。

3 讨论

肿瘤血管不仅为肿瘤细胞的生长输送营养,并且也是肿瘤细胞播散的主要途径。切断肿瘤血供,则有望达到抑制肿瘤生长、发展和转移的目的^[4]。VEGF 是血管内皮细胞有丝分裂特异性诱导剂。VEGF 结合至内皮细胞的 VEGF 受体(VEGFR)细胞外区的 Ig 结构域上,引起 VEGFR 细胞内激酶区特定酪氨酸残基的磷酸化而活化^[5]。另外,VEGF 也是一种有效的血管通透剂,可使血管周围的基质成分发生改变,为肿瘤细胞的迁移提供条件。VEGF 对肿瘤和低氧、缺血性疾病关系密切。低氧、低血糖是 VEGF 表达强有力的诱导因子^[6]。低氧可能诱导 VEGF 的表达,在肿瘤组织的缺氧区域中,不但恶性细胞,而且基质细胞均可过量表达 VEGF。以 VEGF 及其受体 VEGFR 为靶点,使 VEGF 的表达减少将抑制肿瘤血管的生成^[7]。

为了有效地抑制 VEGF 的表达,我们选择反义 RNA 技术,通过碱基互补与靶 RNA 配对结合,封闭或抑制靶基因的表达。反义 RNA(Antisense RNA)是一类能与特异 mRNA 互补的小分子量、可扩散的 DNA 转录物,它能够从翻译水平、转录水平和核酸复制水平上高度特异地抑制靶基因表达。其作用原理有:1)与前 mRNA 结合,影响

mRNA 的成熟和在胞浆内转运;2)与相应的靶 RNA 结合从而激活 RNase,加速靶 RNA 的降解;3)直接与起始密码子 AUG 结合而阻止转录的启动;4)互补作用于 SD 编码区的反义 RNA 可阻止核糖体在 mRNA 上的移动^[8-10]。

为了提高目的基因的转染效率,对 VEGF 基因达到有效的抑制,我们采用了腺病毒作为运载工具。腺病毒的宿主范围广,可感染一系列哺乳动物细胞,因此在大多哺乳动物细胞和组织中均可用来表达重组蛋白,而且既能感染处于分裂增殖期的细胞,又能感染静止期的细胞。而且缺陷型重组腺病毒载体由于不整合入细胞染色体基因组,从而具有毒性低和安全性高的优点,另外还具有病毒滴度高和装载容量大等特点,因此,我们选择腺病毒载体 pAdxsi 作为抑制 VEGF 的基因工程载体^[11]。除此之外,我们所构建的 pAdxsi-GFP-hVEGF 又具有一些独特的优点:腺病毒载体 pAdxsi-GFP-hVEGF 中带有绿色荧光蛋白基因,可以通过 GFP 的表达确定该病毒载体对树突细胞的转染效率。通过添加酶切位点避免了同源重组方案的重组效率低以及非特异重组等缺点。

总之,我们设计并且构建了穿梭质粒 pShuttle-GFP-CMV-hVEGF,通过亚克隆成功构建了能够产生反义 VEGF 基因的重组腺病毒载体 pAdxsi-GFP-hVEGF,为进一步抑制人 VEGF 基因的表达和体内外实验打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] Thurston G, Kitajewski J. VEGF and Delta-Notch; interacting signalling pathways in tumour angiogenesis[J]. Br J Cancer, 2008, 99(8): 1204-1209.
- [2] Corvol P. VEGF, anti-VEGF and diseases[J]. Bull Acad Natl Med, 2008, 192(2): 289-300.
- [3] Ghosh SS, Gopinath, Ramesh A. Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2006, 133(1): 9-29.
- [4] Mei J, Gao Y, Zhang L, et al. VEGF-siRNA silencing induces apoptosis, inhibits proliferation and suppresses vasculogenic mimicry in osteosarcoma in vitro[J]. Exp Oncol, 2008, 30(1): 29-34.
- [5] Cai J, Jiang W, Ahmed A, et al. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation is regulated by interaction between VEGFR-2, SH-PTP1 and eNOS[J]. Microvasc Res, 2006, 71(1): 20-31.
- [6] Wu XZ. New strategy of antiangiogenic therapy for hepatocellular carcinoma[J]. Neoplasma, 2008, 55(6): 472-481.

(下转第 87 页)

3 讨论

神经电生理测定是识别和评价周围神经传导功能最常用、最可靠的方法之一,而神经传导速度、动作电位潜伏时、动作电位波幅等又是反映周围神经电生理功能测定中最常用的指标^[1-2]。神经传导速度,即神经电信号在周围神经干上传导的快慢程度,是神经传导功能最有代表性的指标。动作电位潜伏时,为周围神经所支配的感受器或神经干的某一位置接受一定刺激(如一定强度的电刺激),从刺激开始到神经电信号形成(即动作电位形成)的时间,其数值的大小,代表周围神经对刺激反应的灵敏性。动作电位波幅,即动作电位电信号在显示器上的波动幅度,也能在一定程度上反映周围神经的传导功能。

本研究结果表明,与低温试验前和对照组比较,研究组家兔在低温第 1 天、第 20 天组均出现 SCV、MCV 减慢,感觉神经动作电位波幅、运动神经远端波幅减小,感觉神经动作电位潜伏时、运动神经远端潜伏时延长,并均有统计学意义。提示在本研究的低温负荷下,家兔的外周神经传导功能受到了明显损伤。这种损伤的机制可能与下列因素有关。1)低温能够引起神经纤维损伤,表现为神经纤维髓脂质损伤和消失,并伴有雪旺细胞增生、胶原形成及束膜纤维化^[3]。2)低温所导致的神经损伤与脂质过氧化增强所致的神经细胞水肿和凋亡等有关^[4]。3)低温可以导致血液浓缩,表现为局部组织在低温作用下出现红细胞、血红蛋白显著升高,红细胞可变性降低且通过毛细血管时阻力增加,血小板高度凝集,白细胞黏附、活化,血液黏滞及血栓形成^[5-6]。而低温对血液流变学和血液动力学的影响,导致神经的血供异常,影响了神经的传导功能。

本研究结果还表明,在低温试验第 1 天、第 10 天、第 20 天,神经电生理指标出现异常、逐渐恢复、异常的变化过程。这种结果的可能原因在于,低温试验第 1 天,家兔突然进入一个低温环境,机体会产生针对寒冷的急性应激反应,因此各指标均出现异常,在经过一定时间的低温适应后,在试验第 10 天,各指标有一定程度的恢复,而之后随着低温负荷的加大,神经传导功能出现明显损伤,故各指标再次出现异常。这与韩运梅^[7]等研究低温对小鼠神经行为功能影响时的研究结果相似。但其中的确切机制以及低温对作业工人神经电生理的影响,尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 潘映福. 临床诱发电位学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1988. 58-105.
- [2] 陈自强. 周围神经传导速度测定在劳动卫生工作中的应用[J]. 职业医学, 1985, 12(1):42-44.
- [3] Westfall TC, Yang CL, Chen X, et al. A novel mechanism prevents the development of hypertension during chronic cold stress[J]. Auton Autacoid Pharmacol, 2005, 25(4):171-177.
- [4] Kaushik S, Kaur J. Effect of chronic cold stress on intestinal epithelial cell proliferation and inflammation in rats [J]. Stress, 2005, 8(3):191-197.
- [5] Tan Y, Gan Q, Knuepfer MM. Central alpha-adrenergic receptors and corticotropin releasing factor mediate hemodynamic responses to acute cold stress[J]. Brain Res, 2003, 968(1):122-129.
- [6] Herrera B, Desco MM, Eisenberg G, et al. Role of elastic fibers in cooling-induced relaxation[J]. Cryobiology, 2002, 44(1):54-61.
- [7] 韩运梅, 林立, 张春之, 等. 低温对小鼠学习记忆能力及脑组织 ATP 酶活力的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(3):129-131.

(收稿日期 2011-03-25)

(上接第 84 页)

- [7] Yan R, Xin X, Jin M, et al. Experimental study of anti-vascular endothelial growth factor hairpin ribozyme gene inhibiting growth of xenografted tumor of ovarian cancer cells [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2002, 37(11):683-686.
- [8] Esau CC. Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides[J]. Methods, 2008, 44(1):55-60.
- [9] Lim T, Yuan J, Zhang HM, et al. Antisense DNA and RNA agents against picornaviruses [J]. Front Biosci, 2008, 13:

4707-4725.

- [10] Rayburn ER, Zhang R. Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible [J]? Drug Discov Today, 2008, 13(11-12):513-521.
- [11] Rouard H, Leon A, Klonjowski B, et al. Adenoviral transduction of human 'clinical grade' immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity [J]. J Immunol Methods, 2000, 241(1-2):69-81.

(收稿日期 2011-01-05)