

蛋氨酸酶基因重组腺病毒载体构建

任晓丽¹⁾, 赵瑜¹⁾, 陈南芳²⁾, 田长富¹⁾

(1) 昆明医科大学生物医学工程研究中心 基因与蛋白质工程研究室, 云南 昆明 650500; 2) 唐山康复医疗中心, 河北 唐山 063000)

[摘要] **目的** 构建蛋氨酸酶基因重组腺病毒载体. **方法** 运用 Cre-LoxP 重组酶系统, 通过 DNA 重组技术, 将 L-蛋氨酸- γ 裂解酶基因 (L-Methionine γ -Lyase Gene) 与供体载体 pDNR-CMV 重组, 获得含有 Metase 重组基因的供体载体 pDNR-Metase-CMV. 将 pDNR-Metase-CMV 片段与真核腺病毒载体 PLP-Ade-X-CMV 进行重组, 获得 pLP-Ade-Metase-CMV 重组分子. **结果** 获得了重组腺病毒载体 pLP-Ade-Metase-CMV, 并证实该重组腺病毒载体中有 Metase Gene. **结论** 采用 LoxP/Cre 体外重组法成功地构建了含蛋氨酸酶基因的真核表达重组腺病毒载体.

[关键词] 肿瘤; 蛋氨酸酶; 重组腺病毒

[中图分类号] R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2013)06-0009-04

Construction of L-Methionine γ -Lyase Gene Recombinant Adenovirus Vector

REN Xiao-li¹⁾, ZHAO Yu¹⁾, CHEN Nan-fang²⁾, TIAN Chang-fu¹⁾

(1) Gene and Protein Engineering Department, Biomedical Engineering Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Tangshan Rehabilitation Medical Center, Hebei Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective** To construct L-methionine γ -lyase gene recombinant adenovirus vector. **Methods** Using Cre-LoxP recombination system and recombinant DNA technology, L-methionine γ -lyase Gene was connected to the pDNR-CMV donor vector, and the pDNR-Metase-CMV recombinant vector containing Metase was generated. Then, the eukaryotic adenovirus vector PLP-Ade-Metase-CMV was constructed from recombinant pDNR-Metase-CMV fragment and eukaryotic vector PLP-Ade-X-CMV in vitro. **Results** The recombinant adenovirus vector was obtained, and the Metase gene was confirmed to be contained. **Conclusion** The recombinant adenovirus vector containing L-methionine γ -lyase gene could be constructed by using LoxP/Cre in vitro recombination.

[Key words] Tumour; L-Methionine γ -lyase gene; Recombinant adenovirus

肿瘤的死亡率高, 严重的威胁着人们的身体健康, 目前临床传统的治疗方法手术切除、放射治疗、化疗药物治疗, 这些方法对肿瘤的早期可获较满意的疗效, 但对晚期并伴有局部扩散并未改变患者的生存期和生活质量, 据报道, 经手术、放化疗等治疗后 5 a 存活率不足 15%^[1]. 经研究发现, 肿瘤细胞对蛋氨酸有依赖性, 而 L-蛋氨酸

- γ 裂解酶可以消除蛋氨酸, 从而抑制肿瘤细胞的生长^[2]. 笔者将天然蛋氨酸酶基因引入重组病毒载体, 进一步导入肿瘤细胞达到抑制肿瘤细胞生长的目的.

1 材料和方法

1.1 材料

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (307660287); 云南省科技厅重点基金资助项目 (2009CC022)

[作者简介] 任晓丽 (1986~), 女, 河北张家口市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤基因研究工作.

[通讯作者] 田长富. E-mail: tiancf@21cn.com

限制性内切酶, T4 连接酶, 工程菌 DH5 α , Taq DNA 聚合酶, DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司

1.2 方法

1.2.1 蛋氨酸酶基因质粒的来源及鉴定 L- 蛋氨酸 - γ 裂解酶基因放在 pMD19-T 载体中 (pMD19-T-Metase), 此基因质粒本实验室已构建好^[3], 引物检索 GenBank, 用 Primer premier 5.0 软件设计 PCR 引物为: Sec-F 5' TCCTGCGTCGA - CCACCATGAGCCGCCGCTGC 3' 32bp Sec-R 5' T-GGACGAAGCTTTCAAAGATCGCGAGGGCTCA - A3' 34 bp 对 pMD19-T-Metase 质粒作 PCR、酶切鉴定, 并送至上海生工测序。

1.2.2 PDNR-CMV 供体载体与 Metase 重组 本实验选用 Cre-LoxP 重组酶系统, 因为 PDNR-CMV 载体上有两个 LoxP 位点, 可以将目的基因插入 2 个 LoxP 位点之间, 同时 pLP-Ade-X- CMV 载体上有 1 个 LoxP 位点, 通过应用 LoxP/Cre 系统中 Cre Recombinase (NEB), 可以将 PDNR-CMV 载体上 2 个 LoxP 位点插入到 pLP-Ade-X- CMV 载体上 LoxP 位点处, 从而引入目的基因^[4]. PDNR-CMV 载体上有单一酶切位点 EcoRI 和 Hind III, 并且位于 2 个 LoxP 位点之间. 用 EcoRI, Hind III 酶切 pDNR-CMV 载体, 使载体线性, 并纯化定量; pMD19-T-Metase 质粒扩增, 酶切 Metase 基因片段, 纯化定量. 利用 T4 DNA 连接酶, 将线性纯化后的 pDNR-CMV 载体与纯化后的 Metase 基因混合反应, 构建出 pDNR-Metase-CMV 重组分子。

1.2.3 pLP-Ade-X-CMV 受体载体与 pDNR - Metase-CMV 质粒重组 pLP-Ade-X-CMV 腺病毒载体具有宿主细胞广泛、可感染静止及分裂期细胞、繁殖滴度高、性质稳定、包装容量大及整合等优点, 同时因为有 LoxP 位点, 通过中间载体 PDNR-CMV 引入 Metase 基因. pLP-Ade-X-CMV 受体载体与 pDNR-Metase-CMV 质粒 2 个环状 DNA 分子无需线性化, 加入 Cre Recombinase (NEB) 通过 LoxP/Cre 系统反应, 构建出 pLP-Ade-Metase-CMV 重组质粒。

2 结果

2.1 蛋氨酸酶基因质粒鉴定

L- 蛋氨酸 - γ 裂解酶基因 ORF 全长为 1197 bp, 加上引物共长 1231 bp. 以 pMD19-T-Metase 质粒为模板, 以 Sec-F、Sec-R 为引物进行 PCR 扩增, 扩增的基因片段与理论的 1231bp 相符, 电泳结果见图 1. 同时以上质粒分别经限制性内切酶

KpnI、SalI 单酶切, EcoRI、XbaI 双酶切, 酶切结果与理论值一致, 电泳结果见图 2. 并送至上海生工测序, 与 GenBank 对比正确。

2.2 pDNR-Metase-CMV 重组载体鉴定

以 Sec-F、Sec-R 为引物, pDNR-Metase-CMV 重组载体为模板, PCR 扩增, 扩增的基因片段与理论的 1 231 bp 相符, 电泳结果见图 3. 用 EcoRI、Hind III 对重组质粒进行单酶切和双酶切, 结果与理论值相符, 电泳结果见图 4. 并送至上海生工测序, 与 GenBank 对比正确。

2.3 pLP-Ade-Metase-CMV 重组 DNA 分子鉴定

以 Sec-F、Sec-R 为引物, 以 pLP-Ade - Metase-CMV 重组 DNA 分子为模板进行 PCR 扩增, 扩增基因片段长度为 1231bp, 与理论值相符; 以 Ade 系统检测混合引物 (F1, F2, Rev) 为引物, 以 pLP-Ade-Metase-CMV 重组 DNA 分子为模板进行 PCR 扩增, 扩增基因片段如果是阳性结果为 660 bp, 如果为阴性结果小于 500 bp. 结果与理论值相符, 电泳结果见图 5. 用 XhoI (MBI)、EcoRI (MBI) 单酶切重组质粒, 根据 SimVector 2.0 软件分析 pLP-Ade-Metase-CMV 重组质粒的酶切位点. EcoRI 单酶切片段长度: 23 857 bp, 5511 bp, 4 264 bp, 3 149 bp, 68 bp (太小, 电泳图未显示); XhoI 单酶切片段长度: 14 500 bp, 9 797 bp, 8 046 bp, 2 466 bp, 1 445 bp, 5 95b p 与电泳图片正好吻合, 电泳结果见图 6. 并送至上海生工测序, 与 GenBank 对比正确。

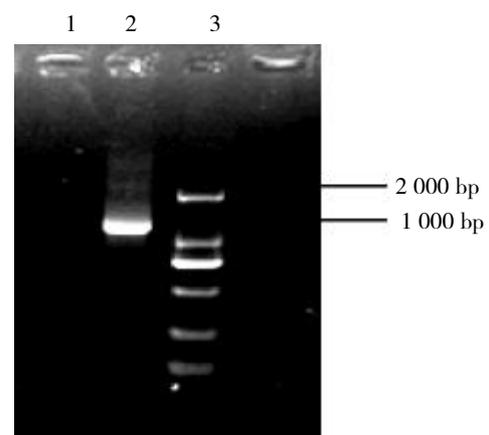


图 1 pMD19-T -Metase 质粒 PCR 鉴定电泳图谱
Fig. 1 pMD19-T -Metase Plasmid PCR product certification picture

1: 阳性对照; 2: Pmd-19-T-Pmetase 质粒 PCR 产物; 3: DNA Marker DL2000.

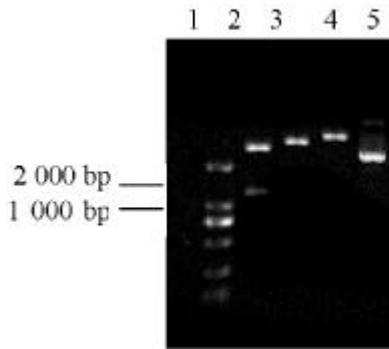


图 2 pMD19-T -Metase 质粒的限制性酶谱分析

Fig. 2 Restriction enzyme assay of pMD19-T -Metase Plasmid by EcoRI/ HindIII/ Sall /KpnI Digest

1:DNA Marker DL2000; 2:EcoRI 和 Hind III 双酶切; 3:sall 单酶切; 4:KpnI 单酶切; 5:pMD19-T -Metase 原始质粒.

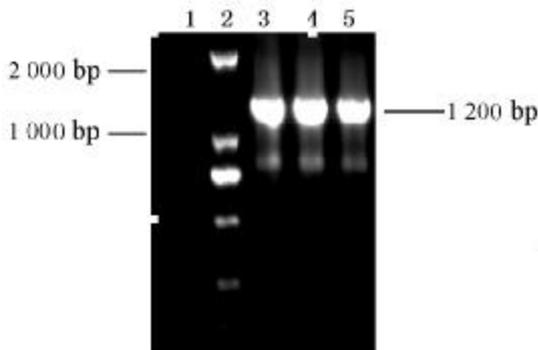


图 3 pDNR-Metase-CMV 重组载体 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 3 pDNR-Metase-CMV Plasmid PCR product certification picture

1:阴性对照; 2:DNA Marker DL2000; 3:PCR 产物样品 1# ; 4:PCR 产物样品 2# ; 5:PCR 产物样品 3#.

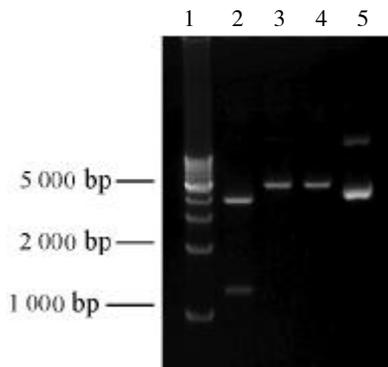


图 4 pDNR-Metase -CMV 酶切凝胶电泳

Fig. 4 Restriction enzyme assay of pDNR-Metase - CMV Plasmid by EcoRI/XbaI Digest

1:1Kb Marker; 2:pDNR-metase-CMV 质粒 EcoRI/ Hind III 双酶切; 3:pDNR-metase-CMV 质粒 EcoRI 单酶切; 4: pDNR-metase-CMV 质粒 Hind III 单酶切; 5: pDNR-metase-CMV 原始质粒.

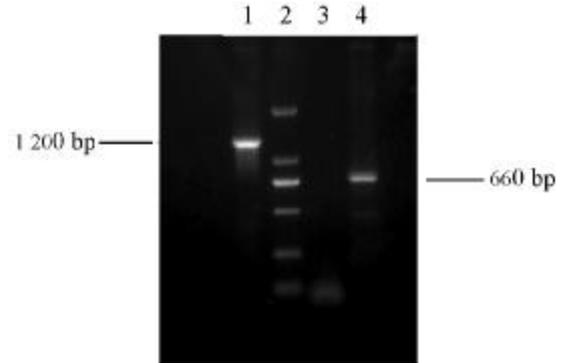


图 5 PLP-Ade-Metase-CMV 质粒 PCR 鉴定

Fig. 5 PLP-Ade-Metase-CMV Plasmid PCR product certification picture

1:PLP-Ade-Metase-CMV PCR 条带 (引物为 Sec-F、Sec-R); 2:DNA Marker DL2000 ; 3: 阴性对照; 4: PLP-Ade-Metase-CMV PCR 条带(引物为 F1,F2,Rev)

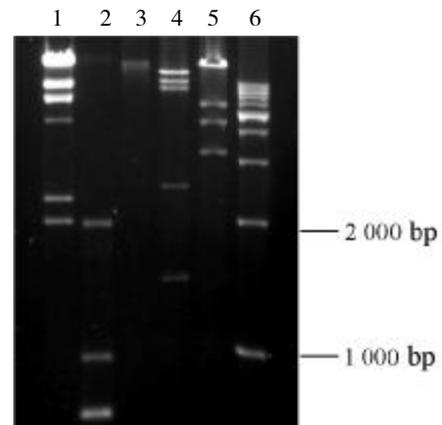


图 6 PLP-Ade-Metase-CMV 质粒酶切鉴定

Fig. 6 Restriction enzyme assay of PLP-Ade - Metase-CMV Plasmid by EcoRI/XbaI Digest

1:λ -HindIII Marker; 2:DNA Marker DL2000; 3: PLP-Ade-Metase-CMV 质粒; 4:XhoI 单酶切; 5:EcoRI 单酶切; 6:1 kb Marker

3 讨论

蛋氨酸是人体的必需氨基酸, 多种的肿瘤细胞系和原发肿瘤都对蛋氨酸有依赖性. 相反, 正常的细胞对外源的蛋氨酸缺乏具有抵抗能力. 因此许多的研究者试图找到一种能有效的治疗方法, 通过减少体内血浆和肿瘤中的蛋氨酸从而抑制肿瘤的生长. 现在饮食和药理疗法已被应用, 无蛋氨酸的饮食和全胃肠外营养致使许多动物肿瘤消退, 相应的应用蛋氨酸酶可以消除蛋氨酸, 这种酶能明显的降低蛋氨酸, 还可以抑制肿瘤的生长^[9]. 利用病毒具有与细胞表面受体结合并将其基因组导入宿主 (下转第 20 页)