

pDC316-HGFK1 病毒穿梭载体的构建及鉴定

Construction and Identification of pDC316-HGFK1 Plasmid

ZHU Yu, ZHU Min, ZHANG Fa-biao, et al.

朱昱, 朱敏, 张法标, 杜学峰, 方哲平

(台州医院, 浙江 临海 317000)

摘要: [目的] 构建携带人 *HGFK1* 基因的病毒穿梭载体 pDC316-HGFK1。[方法] 通过 RT-PCR 方法从人新鲜胎盘组织中扩增出 *HGFK1* 基因, 构建 pDC316-HGFK1 病毒穿梭载体, 经 PCR、酶切、测序等方法进行鉴定。[结果] 酶切、PCR 及测序证实 pDC316-HGFK1 载体序列正确。[结论] 成功构建 pDC316-HGFK1 病毒穿梭载体, 可为后续病毒包装及对肝癌细胞的生物学影响研究奠定基础。

关键词: 基因; *HGFK1*; 载体构建; 病毒

中图分类号: R73-36*2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)07-0516-04

HGFK1 (the kringle 1 domain of human hepatocyte growth factor) 是肝细胞生长因子(HGF)中第一个环状结构域(K1)的基因表达产物, 由 Xin 等^[1]在 2000 年首次被克隆于 HGF 的 α 链, 是一个由 79 个氨基酸构成的球形结构。越来越多的研究表明, HGFK1 通过 EGF/EGFR 途径, 抑制肿瘤血管生成、阻止肿瘤远处转移及拮抗 HGF 的功能, 并有效地延长了实验动物的生存期^[2]。我们通过构建 HGFK1 病毒穿梭载体, 为今后腺病毒载体的包装及进一步实验研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆载体 pGEM-Teasy、M-MLV 逆转录酶 (美国 Promega 公司), 腺病毒表达载体 pDC316 (本元正阳基因技术有限公司), T4 DNA 连接酶和 Taq DNA 聚合酶 (美国 Fermentas 公司), dNTP、限制性内切酶 *Sma* I 和 *Hind* III (美国 Fermentas 公司), DNA Marker DL100 (上海捷瑞生物工程有限公司), RNA 提取试剂 Trizol (美国 Invitrogen 公司), 引物 (上海基康生物公司合成), 大肠杆菌菌株 DH5a (温州医学院

附属台州医院中心实验室保存)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

取新鲜人胎盘组织约 0.2g, 加入 500ml Trizol, 充分混匀, 并提取 RNA。沉淀经充分干燥后溶于 50 μ l 经 DEPC 处理的水中, 紫外分光光度计测定波长 260nm 和 280nm 的吸光度比值。

1.2.2 RT-PCR

取 1.0 μ g 人胎盘组织总 RNA, 以 oligo(dT)18 为引物, M-MLV 逆转录酶反转录合成第 1 链 cDNA。

1.2.3 *HGFK1* 基因的克隆

根据 *HGFK1* 基因的序列设计分别含有 *Sam* I 或 *Hind* III 限制性酶切位点的引物, 引物: 上游 5'-CCCCGGAGGATTCTTTCACCCAGGC-3', 下游 5'-CCTGAAAGATATCCCGACAAGAAGCTT-3'。扩增片段长度约为 827bp。以 cDNA 为模板, PCR 扩增 *HGFK1* 基因, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 降温 10min。扩增产物包含了 *HGFK1* 基因 cDNA 的编码序列及部分非编码区。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。自凝胶中回收 *HGFK1* 基因与 pGEM-Teasy 载体按摩尔比 8:1 的比例混合, 16 $^{\circ}$ C 条件下用 T4 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5a。挑取单菌落, 行菌落 PCR 验证, 挑选阳性菌落, 提取质粒 DNA, 用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定,

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y2007048); 浙江省科技计划项目(2009C33SA800006)

通讯作者: 方哲平, 主任, 主任医师, 硕士; 台州医院肝胆外科, 浙江省临海市西门街 150 号(317000); E-mail: zlyzy@yeah.net。

收稿日期: 2012-01-09; **修回日期:** 2012-04-05

重组质粒行 DNA 序列分析。

1.2.4 腺病毒表达载体 pDC316-HGFK1 的构建

以限制性内切酶 *Sma* I 和 *Hind* III 切割重组克隆载体和质粒 pDC316, 琼脂糖凝胶电泳。回收两种目的片段用 *T*₄ DNA 连接酶连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5a。挑选单菌落行菌落 PCR 验证, 挑选阳性菌落, 提取质粒 DNA, 用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定。

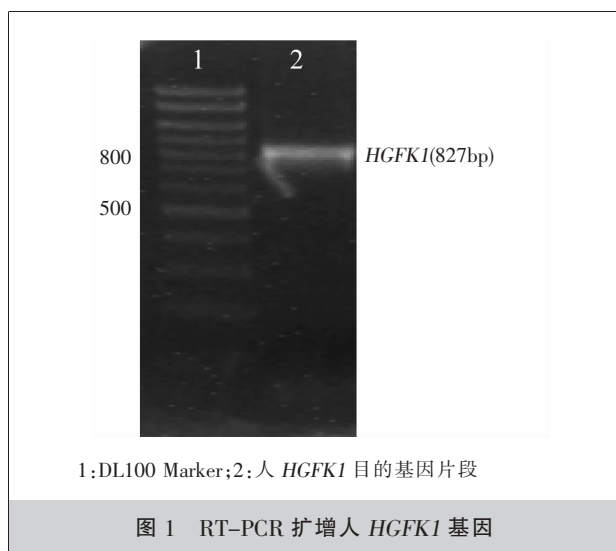
2 结果

2.1 总 RNA 的检测

经紫外分光光度计测定波长 260nm 和 280nm 吸光度比值为 1.86, 证明所提取的 RNA 纯度较好。

2.2 RT-PCR 产物鉴定

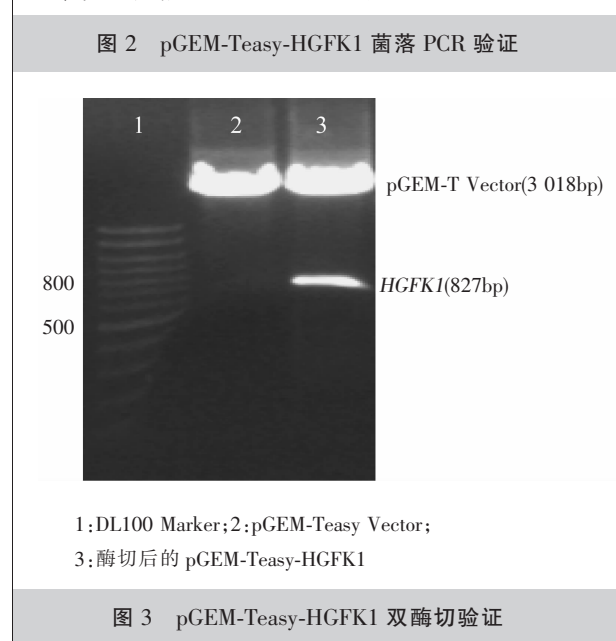
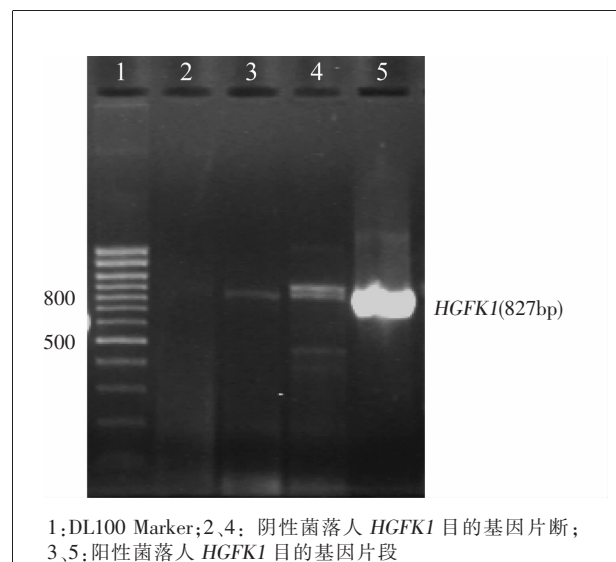
琼脂糖凝胶电泳可见约 827bp 处有一优势扩增条带, 与预期结果一致, 见图 1。



2.3 *HGFK1* 基因的克隆和鉴定

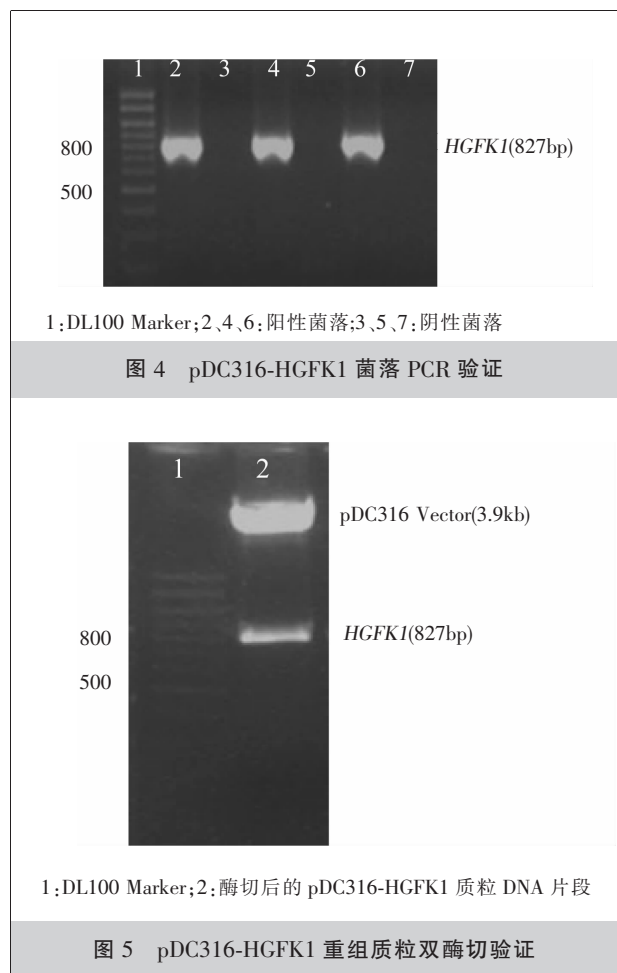
重组克隆载体转化感受态大肠杆菌 DH5a, 挑选单菌落行 PCR 验证, 经琼脂糖凝胶电泳可见约 827bp 处有一亮条带, 见图 2。选取阳性菌落, 抽提质粒, 经 *Sma* I 和 *Hind* III 双酶切, 回收酶切产物经琼脂糖凝胶电泳可见约 827bp 处有一亮条带, 证明此载体中有大小约为 827bp 的外源 DNA 片段插入, 见图 3。重组质粒进行基因测序, 序列测定结果与 Genebank 报道的 2.5kb *HGF* mRNA 的 cDNA 序列

(M29145)[长度为 2 576 bp, cds=(102, 2 288)]报道区域 (43, 860) 的序列完全相同, 表明重组于载体 *HGFK1* 基因片段序列正确。



2.4 腺病毒表达载体 pDC316-HGFK1 鉴定

将重组好的 pDC316-HGFK1 腺病毒表达载体转化感受态大肠杆菌 DH5a, 挑选单菌落行 PCR 验证, 经琼脂糖凝胶电泳可见约 827bp 处有一亮条带, 见图 4。选取阳性菌落, 抽提质粒, 经 *Sma* I 和 *Hind* III 双酶切, 回收酶切产物经琼脂糖凝胶电泳可见约 827bp 处有一亮条带, 证明此载体中有大小约为 827bp 的外源 DNA 片段插入, 见图 5。



3 讨论

治疗肿瘤的方法很多,除了手术治疗之外,主要有放射介入治疗、全身化疗、区域性化疗、免疫治疗、中医中药治疗、基因治疗等^[3]。近年来,随着分子生物学技术的发展,在肿瘤治疗方面,基因治疗逐渐成为研究重点。目前,有很多种类型肿瘤治疗相关基因被研究,比如抑癌基因、自杀基因、抗血管生成基因、炎性细胞因子、微小 RNA 基因等^[4]。

随着人们对肿瘤发生、发展、转移机制的研究不断深入,逐渐地认识到肿瘤新生血管的生成在肿瘤演进过程中具有极其重要的作用^[5]。抗血管生成治疗被认为是一种有效的抗肿瘤基因治疗方法^[6,7]。HGF/c-Met 途径促进了肿瘤的血管生成^[8]。HGF 的过表达在肿瘤血管生成的过程中扮演了十分重要的角色^[9]。作为 HGF 的天然拮抗剂, *HGFK1* 正成为当前肿瘤基因治疗研究中的新宠^[10]。有研究表明^[11,12],

HGFK1 在体内可以拮抗 HGF 诱导的细胞增殖、迁移, 而且还能抑制由 VEGF 或 bFGF 所诱导的微血管内皮细胞的增殖和迁移。Shen 等^[2]的研究显示,重组 *HGFK1* 蛋白可以体内外抑制肿瘤血管生成, *HGFK1* 的半数有效剂量为 $0.7\mu\text{g/ml}$, 作用效果强于 angiostatin 和 endostatin 重组蛋白。所以通过载体导入 *HGFK1*, 抑制血管生成从而抑制肿瘤生长及转移, 这为肿瘤治疗提供了一种新的思路。*HGFK1* 蛋白在对原发性肝癌、结肠癌、非小细胞肺癌等肿瘤的实验研究中, 都取得了令人满意的成果^[13-15]。另外, 本课题组关于 *HGFK1* 在原发性肝细胞癌表达的研究中发现, *HGFK1* 高表达患者 5 年生存率明显高于 *HGFK1* 低表达患者 ($P < 0.05$)^[16]。

本实验的最终目的是获得 *HGFK1* 基因细胞溶瘤病毒重组体感染裸鼠治疗肝细胞癌, 而 pDC316-*HGFK1* 表达载体的构建是其中的一个必需步骤。在本实验项目中, 我们没有直接构建 pDC316-*HGFK1* 载体, 而是通过先构建重组克隆载体 pGEM-Teasy-*HGFK1*, 经转染感受态细胞后, 通过 PCR、酶切等方法验证 *HGFK1* 基因 cDNA 已成功插入载体 pGEM-Teasy, 通过双向测序证实序列正确后通过扩大培养已转化的感受态细胞, 提取质粒行 *Sma* I 和 *Hind* III 双酶切, 获得足量的 *HGFK1* 基因 cDNA, 再与病毒穿梭载体 pDC316 进行连接, 这样使整个实验设计更为合理、稳定, 从而为后续工作做了铺垫。载体 pGEM-Teasy 是一种高效的克隆 PCR 产物的专用载体。因大部分耐热 DNA 聚合酶进行 PCR 反应时都有在 PCR 产物即 cDNA 的 3' 端添加一个“A”的特性, 而载体 pGEM-Teasy 插入处序列的两侧 3' 端含“T”, 因此通过“A-T”碱基配对使此载体的连接、克隆效率获明显提高。本实验中, 我们将限制性内切酶 *Sma* I、*Hind* III 分别引入到上、下游引物中, 通过先将 PCR 产物连接到 pGEM-Teasy Vector 上, 对目的基因进行双酶切、测序等鉴定; 然后用限制性内切酶双酶切下目的片段与同样双酶切的 pDC316 载体连接从而达到构建重组病毒穿梭载体的目的。

本实验采用的 pDC316 载体属于腺病毒 AdMax 系统, 与目前使用最普及的腺病毒 AdEasy 系统相比, 因为它除了具有感染效率高、瞬时表达、不与基因组整合和插入外源基因容量大等各种腺病毒系统共有的优点外^[17,18], 还有一些特点, 如 AdMax

系统只需要 2~4 周就能完成从质粒构建到重组出毒,成功率大于 98%;在真核细胞内重组出毒,保持了对腺病毒的生存压力,有助于重组腺病毒的基因组完整性;病毒产率可以明显提高。腺病毒表达载体 pDC316-HGFK1 的构建完成,为下一步体外包装成病毒颗粒及对肝癌细胞的生物学影响研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Xin L, Xu R, Zhang Q, et al. Kringle 1 of human hepatocyte growth factor inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation stimulated by basic fibroblast growth factor and causes cell apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277(1): 186-190.
- [2] Shen Z, Yang ZF, Gao Y, et al. The kringle 1 domain of hepatocyte growth factor has antiangiogenic and anti-tumor cell effects on hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2):404-414.
- [3] 吴孟超.原发性肝癌外科综合治疗的现状和展望[J]. *中华外科杂志*, 2004, 1(41):13-15.
- [4] Toucheffeu Y, Harrington KJ, Galmiche JP, et al. Gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010, 32(8): 953-968.
- [5] Guo SW, Che HM, Li WZ. Construction of lentivirus vectors carrying alpha statin gene and its secretion expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Acad J XJTU*, 2010, 22(3):168-174.
- [6] Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:727-739.
- [7] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine[J]. *Nature*, 2005, 438(7070):932-936.
- [8] Teicher BA. Antiangiogenic agents and targets: a perspective[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(1):6-12.
- [9] Hoot KE, Oka M, Han G, et al. HGF upregulation contributes to angiogenesis in mice with keratinocyte-specific Smad2 deletion [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (10):3606-3616.
- [10] 朱昱, 吕尚东, 方哲平. HGFK1 抗肿瘤血管生成研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2011, 17(6):463-465.
- [11] Kuba K, Matsumoto K, Ohnishi K, et al. Kringle 1-4 of hepatocyte growth factor inhibits proliferation and migration of human microvascular endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(3): 846-852.
- [12] Merkulova-Rainon T, England P, Ding S, et al. The N-terminal domain of hepatocyte growth factor inhibits the angiogenic behavior of endothelial cells dependently from binding to the c-met receptor [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (39):37400-37408.
- [13] 顾春荣, 郭跃武, 赵晖, 等. 腺相关病毒介导的 HGFK1 对大鼠肝细胞癌的治疗作用研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2009, 19(6):416-422.
- [14] Nie B, Shen Z, Wen JB, et al. AAV-HGFK1 and Ad-p53 cocktail therapy prolongs survival of mice with colon cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(9):2855-2865.
- [15] 周晓辉, 杨异, 高宗礼, 等. 119 例非小细胞肺癌患者 HGFK1 蛋白表达的检测及其临床意义[J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(5):353-357.
- [16] 杨健, 王伟林, 方哲平, 等. HGFK1 在原发性肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *浙江医学*, 2011, 33(3):307-308.
- [17] Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals [J]. *Stem Cells*, 1999, 17(4): 191-202.
- [18] Nielsen LL, Gurnani M, Syed J, et al. Recombinant E1-deleted adenoviruses-mediated gene therapy for cancer: efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(5):681-694.