

构建人热休克蛋白70基因重组腺病毒载体及鉴定☆

韩世伟, 张忠涛, 王宇

Construction and identification of a recombinant adenovirus vector containing human heat shock protein 70 gene

Han Shi-wei, Zhang Zhong-tao, Wang Yu

Department of
General Surgery,
Beijing Friendship
Hospital, Capital
University of Medical
Sciences, Beijing
100050, China

Han Shi-wei☆,
Studying for
doctorate,
Department of
General Surgery,
Beijing Friendship
Hospital, Capital
University of Medical
Sciences, Beijing
100050, China
cco1985@
yahoo.com.cn

Correspondence to:
Zhang Zhong-tao,
Doctor, Professor,
Doctoral supervisor,
Chief physician,
Department of
General Surgery,
Beijing Friendship
Hospital, Capital
University of Medical
Sciences, Beijing
100050, China
zhangzht@
medmail.com.cn

Received: 2010-06-04
Accepted: 2010-07-26

Abstract

BACKGROUND: Adenovirus vectors have been widely used as a low high effectiveness and low toxicity gene vector, however, little is known about a recombinant adenovirus vector containing human heat shock protein 70 (Hsp70) gene.

OBJECTIVE: To construct a recombinant adenovirus vector containing human Hsp70 gene and to express the gene efficiently in eukaryotic cells.

METHODS: The recombinant adenovirus vector carrying Hsp70 gene was constructed with AdMax system and then transferred human embryonic kidney 293 (HEK293) cells to produce recombinant adenovirus. The exogenous gene expression was detected by Western blot and the viral titer was tested.

RESULTS AND CONCLUSION: The significant cytopathic effects were observed in transfected HEK293 cells, and then the recombinant virus was harvested and purified. The expression of green fluorescence protein could be observed by fluorescence microscope and the expression of Hsp70 could be detected by Western blot. The viral titer was 1×10^{11} efu/mL. Recombinant adenovirus vector was constructed successfully and packed in HEK293 cells.

Han SW, Zhang ZT, Wang Y. Construction and identification of a recombinant adenovirus vector containing human heat shock protein 70 gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Linchuang Kangfu. 2010;14(37): 6922-6926.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 腺病毒载体作为低毒高效的基因载体已被广泛应用, 但是人热休克蛋白 70 基因腺病毒载体较为少见。

目的: 构建重组人热休克蛋白 70 基因的腺病毒载体, 鉴定外源基因在真核细胞中的良好表达。

方法: 采用 AdMax 腺病毒系统将外源基因人热休克蛋白 70 基因重组入腺病毒载体中, 转染人胚肾 293 细胞并重组包装出毒, 检测外源基因的表达和病毒滴度。

结果与结论: 观察转染后的人胚肾 293 细胞出现明显细胞病变效应后, 收获并纯化重组病毒; 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况良好, Western blot 检测人热休克蛋白 70 蛋白表达良好, 收获病毒的滴度为 1×10^{11} efu/mL, 证明实验已成功构建携带人热休克蛋白 70 基因的重组腺病毒载体。

关键词: 热休克蛋白 70; 腺病毒载体; 基因载体; 基因重组; 基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.20.10.37.019

韩世伟, 张忠涛, 王宇. 构建人热休克蛋白 70 基因重组腺病毒载体及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(37):6922-6926. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在基因转移技术方面, 已有有转染磷酸钙共沉淀法、脂质体转染法、电穿孔法、基因枪法、超声波法、受体介导法等非病毒载体介导的和病毒载体介导的基因转移等, 其中将病毒作为传递目的基因的载体是目前研究应用最为广泛的方法^[1-2]。各种病毒中腺病毒在进入细胞后不能整合到宿主基因组中, 因此没有激活原癌基因和使功能基因失活的危险, 而且介导基因转移效率高、安全性好、感染细胞谱广、病毒滴度高、易浓缩和贮存等优点而可能成为基因治疗和临床试验的常用载体^[3]。

热休克蛋白 70(heat shock protein-70, Hsp70)是一组高度保守的蛋白, 作为一种重要

的应激蛋白, HSP70可参与应激状态下细胞内蛋白的正确折叠、移位以及降解等, 从而维持细胞的正常形态及功能, 保证细胞的稳定性^[4]。但目前研究中人热休克蛋白70基因的腺病毒载体还较为少见。因此, 研究拟构建可高效表达的人Hsp70的重组腺病毒载体^[5], 并通过转染人胚肾(human embryonic kidney, HEK)293细胞并重组包装出毒, 检测外源基因的表达和病毒滴度, 从而为进一步探讨Hsp70对细胞的保护作用及对肿瘤免疫的效应提供实验基础。

1 材料和方法

设计: 载体构建, 体外实验。

时间及地点: 2009-06/12在首都医科大学

附属友谊医院中心实验室完成。

材料: HEK293细胞和大肠杆菌菌株DH5 α 由中南大学湘雅细胞中心惠赠。AdMax腺病毒包装系统由加拿大microbix公司提供。

主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|----------------------------|-----------------------|
| 质粒 pDC315-EGFP | 本原正阳公司 |
| 质粒 pOTB7/Hsp70 | 美国 Open Biosystems 公司 |
| 限制性核酸内切酶 Age I | 英国 NEB 公司 |
| 质粒提取试剂盒 | 美国 Promega 公司 |
| 腺病毒纯化试剂盒 | 北京赛百奥科技有限公司 |
| dNTP | 日本 Takara 公司 |
| Taq 聚合酶 | 上海 SinoBio 公司 |
| DNA marker | 立陶宛 Fermentas 公司 |
| In-Fusion [™] 交换酶 | 日本 clontech 公司 |
| 脂质体 Lipofectamine 2000, | 美国 Invitrogen 公司 |
| 小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 | |
| 小鼠抗人绿色荧光蛋白(GFP)、 | 美国 Santa-Cruz 公司 |
| 山羊抗小鼠 IgG 单克隆抗体 | |
| DMEM 培养基 | 美国 Gibco 公司 |
| 胎牛血清 | 中国杭州四季青公司 |

实验方法:

腺病毒骨架质粒的获取: 用质粒抽提试剂盒从AdMax腺病毒包装系统中提出质粒DNA, 一部分用于实验, 另一部分参照以往文献的方法^[6], 由大肠杆菌感受态细胞DH5 α 继续扩增, 以备今后使用。提取出的质粒DNA溶于无菌的TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中, 用紫外分光光度计测定260 nm和280 nm波长下的吸光度, 保证所提取质粒DNA的A₂₆₀/A₂₈₀在1.8~2.0之间, 以保证提取质粒DNA的纯度^[7]。

HEK293细胞的培养: 转染前24 h, 处于对数生长期的HEK293细胞用0.25%胰蛋白酶消化, 以含体积分数10%FBS的DMEM 培养基调整细胞密度为30%~40%, 重新接种于6 cm 细胞培养皿, 37 °C、体积分数5%CO₂培养箱内培养。待细胞密度达到50%~60%时即可用于转染。细胞状态对于病毒包装至关重要, 因此需要保证良好的细胞状态和较少的传代次数^[8]。转染前2 h将细胞培养基更换为无血清DMEM培养基。

穿梭质粒pDC315-EGFP-Hsp70的构建: 根据Genebank(登录号NM_005345)中对Hsp70基因的序列编码, 设计Hsp70上下游引物分别为F: GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG GCC AAA GCC GCG GCG ATC; R: TCA CCA TGG TGG CGA CCG GAT CTA

轻轻地颠倒混匀, 不要振荡。混合后, 在室温下温育20 min, 以便形成DNA与

CCT CCT CAA TGG TG, 引物内含有Age I 酶切位点(下划线部分)及保护性碱基。之后用PCR以质粒pOTB7/Hsp70^[9]为模板扩增目的基因Hsp70。反应体系为质粒pOTB7/Hsp70 1 μ L; 上下游引物各0.4 μ L; 5 \times Taq buffer 4 μ L; DNTPs(2.5 mmol/L) 1.6 μ L; Taq聚合酶0.2 μ L; 无菌去离子水补足使得总反应体系为20 μ L。反应条件为94 °C预变性5 min; 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 3 min, 共30个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C冷却。用限制性内切酶Age I 将质粒pDC315-EGFP酶切线性化后, 将纯化的PCR产物与线性化的pDC315-EGFP在In-Fusion交换酶作用下交换连接, 为交换组。并设置以GAPDH基因为目的基因的阳性对照组和不加入目的基因的自连对照组以及阴性对照组。交换产物转化感受态大肠杆菌DH5 α , 将重组质粒命名为pDC315-EGFP-Hsp70。

重组质粒pDC315-EGFP-Hsp70的鉴定: 在交换产物转化的长出菌表面于不同部位随机沾取7次, 分别溶于10 μ L LB培养液中, 各自混匀后作为模板; 阴性对照组使用水作为模板; 自连对照组使用自连对照转化产物作为模板; 阳性对照组使用阳性对照转化产物作为模板, 之后各组进行PCR反应。

根据预期转化结果, 设计引物分别为Hsp70-SEQF: GAT CGA GGT GAC CTT CGA C; EGFP-N-R: CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G(阳性对照组另设引物, 扩增GAPDH基因的一部分)。反应体系: 各组模板1 μ L; Hsp70-SEQF(10 μ mol/L) 0.4 μ L; EGFP-N-R(10 μ mol/L)0.4 μ L; 5 \times Taq buffer 4 μ L; DNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μ L; Taq聚合酶0.2 μ L; 无菌去离子水补足使得总反应体系为20 μ L。反应条件: 94 °C预变性2 min; 之后94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共30个循环; 最后72 °C延伸6 min, 4 °C冷却。取5 μ L PCR产物于0.1%的琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶自动成像系统分析结果并测序。

转染复合物的制备: 将穿梭质粒pDC315-EGFP-Hsp70 5 μ g和腺病毒骨架质粒5 μ g加入同一灭菌离心管中, 与DMEM混合均匀, 调整总体积为50 μ L, 在室温下温育5 min。将Lipofectamine2000试剂轻柔摇匀, 取10 μ L Lipofectamine2000试剂在另一管中与50 μ L DMEM混合, 在室温下温育5 min。把稀释后的质粒与稀释后的Lipofectamine2000进行混合,

首都医科大学附属北京友谊医院
北京市 100050

韩世伟^{*}, 男, 1985年生, 内蒙古锡林郭勒盟人, 蒙古族, 首都医科大学附属北京友谊医院在读博士, 主要从事肝胆胃肠疾病及肝移植的基础与临床研究。
cco1985@yahoo.com.cn

通讯作者: 张忠涛, 博士, 教授, 博士生导师, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科, 北京市 100050
zhangzht@medmail.com.cn

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)37-06922-05

收稿日期:2010-06-04
修回日期:2010-07-26
(20100604021/ZW·Z)

Lipofectamine2000稀释液的转染复合物。

腺病毒在293细胞中的重组和包装: 将转染复合物转移至293细胞的培养液中, 混匀, 于37 °C、体积分数5% CO₂细胞培养箱中培养。培养6~8 h后倒去含有转染复合物的培养基, 每瓶细胞加入2 mL的PBS液, 轻轻左右晃动一下培养瓶以洗涤残余的转染复合物, 然后倒去。每瓶细胞中加入含体积分数10%血清的细胞培养基5 mL, 于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱内继续培养。每天观察转染后细胞生长状况, 若细胞培养基明显变黄, 酌情补加适量的新鲜全培养液。

重组腺病毒的收获和纯化: 每天观察转染细胞的生长情况, 观察细胞病变效应。待大部分细胞出现典型的细胞病变效应, 且有50%的细胞脱壁, 低速离心收集细胞并重悬于2 mL DMEM 中, -70 °C/37 °C反复冻融、振荡3次, 于4 °C、7 000 r/min离心5 min, 收集病毒上清于-70 °C保存。如此, 收集第2代病毒, 纯化试剂盒纯化后备用。

Western blot检测外源基因的表达: 分别取20 μL、100 μL和500 μL的病毒原液, 加入到HEK293细胞中, 24~48 h后荧光显微镜观察细胞生长情况。另设不加病毒的空白细胞样本做阴性对照。之后弃去细胞培养液, PBS洗涤2次后丢弃PBS, 用预冷的细胞蛋白裂解液在冰上裂解细胞, 超声破碎细胞后离心, 取上清测蛋白浓度后调整每个样本蛋白终浓度为2 g/L后, 取相同总蛋白量加入相同体积2×上样缓冲液混匀煮沸5 min后上样, 进行SDS-PAGE(体积分数5%浓缩液, 10%分离胶)电泳, 电泳条件为30 mA, 4 h。电转移条件为400 mA湿转120 min, 将蛋白质转移至PVDF膜上。然后经5%脱脂奶粉封闭1 h, 小鼠抗人GFP单克隆抗体(1:2 000)4 °C孵育过夜, 充分洗膜, 山羊抗小鼠IgG单克隆抗体(1:5 000)稀释后孵育2 h, 充分洗膜, ECL试剂盒显色。结果与内参GAPDH作比较。

重组腺病毒的滴度测定: 病毒滴度测定采用终点稀释法。将对数生长期的HEK293细胞胰酶消化后吹打成细胞悬液, 调整细胞浓度为1×10⁸ L⁻¹, 在实验前24 h向96孔板的每一个孔加入100 μL HEK293细胞悬液, 放入细胞培养箱中培养。准备10个无菌Ep管, 在第一个Ep管中加入990 μL的完全培养液, 其余的9个管子中各加入900 μL的完全培养液。取10 μL病毒原液加入990 μL的Ep管中做1:100稀释(即10⁻²); 然后以此为起点, 再取100 μL稀释液加入900 μL的Ep管中做1:10稀释(10⁻³), 直至稀释到10⁻¹⁴。从培养箱中取出96孔板, 在显微镜下确定每孔的细胞均生长良好。吸弃旧培养液, 然后依次将10⁻⁶至10⁻¹³稀释的病毒液加入96孔板中, 每一稀释度占用一行, 每一行的第1~10孔每孔加入90 μL病毒稀释液, 而每一行的第11, 12孔均加入90 μL不含病毒的完全培养基作为对照。将96孔板继续37 °C、体积分数5% CO₂

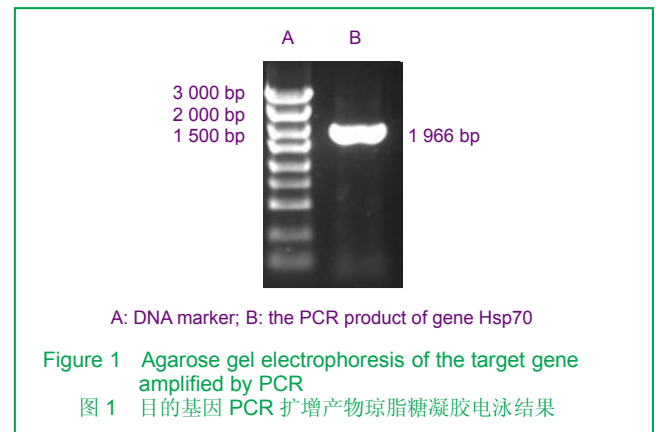
细胞培养箱中培养, 10 d后观察细胞病变现象, 并对细胞病变效应孔进行计数, 计算每一行的阳性率, 计算病毒滴度(Spearman-Karber Method): 病毒滴度=10(x+0.8) (PFU/mL)。其中, X=10⁻¹~10⁻¹⁴依次稀释度下细胞病变现象阳性率总和。结果计算中, 若稀释度为10⁻⁶的10个孔中细胞病变现象全为阳性, 则可认为稀释度为10⁻¹~10⁻⁵的每个孔细胞病变现象也都为阳性; 若稀释度为10⁻¹¹的10个孔均为阴性, 则可认为稀释度为10⁻¹²~10⁻¹⁴的各个孔细胞病变现象也均为阴性。计算时, 出现一个细胞病变现象孔即X = 0.1, 依次类推。

主要观察指标: 重组腺病毒载体感染真核细胞后的细胞病变效应; 不同浓度病毒液感染HEK293细胞后GFP及外源基因的表达; 重组腺病毒滴度。

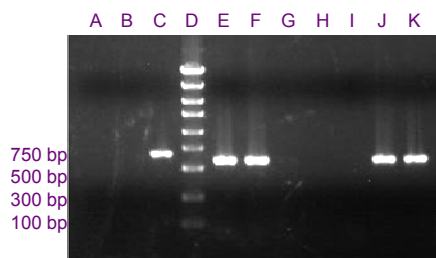
设计、实施、评估者: 实验设计为第一作者, 实验实施为第一作者, 评估为第二、三作者。

2 结果

2.1 目的基因Hsp70扩增结果 用PCR法从质粒pOTB7/Hsp70上扩增的产物, 经琼脂糖凝胶电泳, 在约1 966 bp处得到特异性条带, 与理论预计值相符, 见图1, 测序后与Genebank报道的人Hsp70基因编码序列一致。



2.2 pDC315-EGFP-Hsp70阳性克隆的鉴定 交换组、阴性对照组、阳性对照组和自连对照组各组PCR反应所得产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示阴性对照组和自连对照组无特征性条带泳出; 阳性对照组在约700 bp左右有特异性条带; 7个交换组中, 4组跑出特异性条带, 位置约为584 bp处, 另有3组无特征性条带泳出, 见图2。测序结果与Genebank中给出的Hsp70编码序列结果(1 921/1 924)相似度达99%, 其中有3处同义突变, 分别为待测基因304~306位的ATT同义突变为ATC; 待测基因1 139~1 141位的CAG 同义突变为CAA; 待测基因1 792~1 794位的GTG 同义突变为GTT。



A: negative control group; B: self-conjunction group; C: positive control group; D: DNA marker; E-K: exchange groups

Figure 2 Identification of the positive clones
图2 阳性克隆鉴定琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 转染复合物转染293细胞 经紫外分光光度计检测,提取质粒的 A_{260}/A_{280} 为1.803 1。转染复合物转染293细胞48 h后,细胞开始能够观察到GFP的表达,到第3天时,GFP表达达到峰值,灰度视野中可见到细胞变圆;随着时间增加,携带GFP细胞量减少,视野中荧光逐渐减弱;第9天细胞轻摇即脱落,绿色荧光细胞只有零星几个出现,见图3。

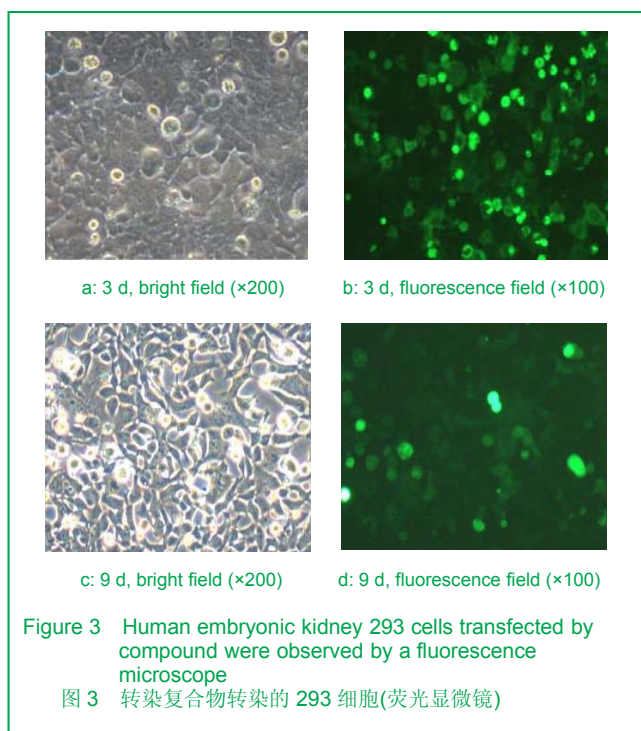


Figure 3 Human embryonic kidney 293 cells transfected by compound were observed by a fluorescence microscope
图3 转染复合物转染的293细胞(荧光显微镜)

2.4 腺病毒的收获和滴度测定 转染HEK293细胞1周后,细胞开始出现明显的细胞病变效应。正常生长的HEK293细胞生长旺盛,胞体饱满,呈多角型,贴壁能力强。而出现细胞病变效应的HEK293细胞折光性增强、细胞变圆、间隙增宽、聚集成群,呈葡萄串样改变。经测定,重组腺病毒的滴度为 1×10^{11} efu/mL。

2.5 外源基因的表达 3组相同浓度不同剂量病毒液感染HEK293细胞后,明显观察到绿色荧光蛋白表达从低剂量组到高剂量组表达逐渐增加,显示其转染效果具有浓度依赖性,如图4。

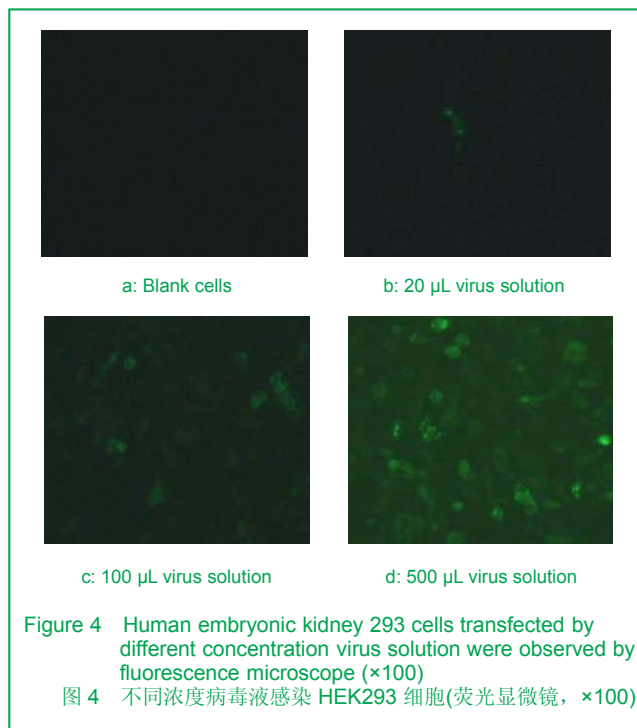


Figure 4 Human embryonic kidney 293 cells transfected by different concentration virus solution were observed by fluorescence microscope ($\times 100$)
图4 不同浓度病毒液感染HEK293细胞(荧光显微镜, $\times 100$)

Western blot检测3个浓度样本及空白细胞样本蛋白表达时,空白细胞样本及20 μ L组样本无特征性条带,100 μ L和500 μ L样本约在相对分子质量95 000处有特征性条带,如图5。根据病毒滴度公式计算出的病毒滴度为 1×10^{10} efu/mL。

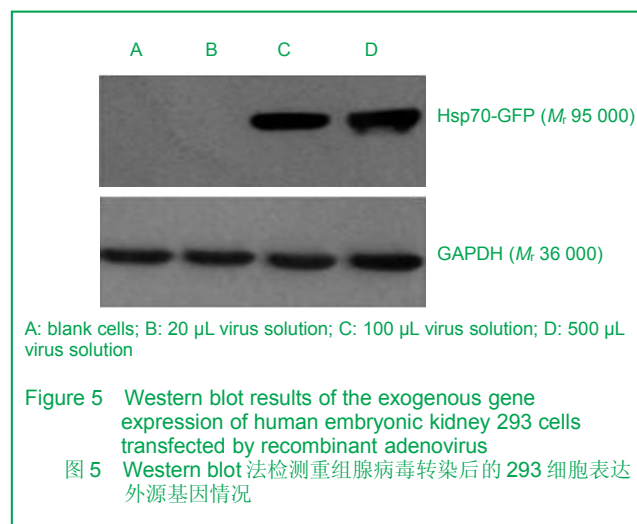


Figure 5 Western blot results of the exogenous gene expression of human embryonic kidney 293 cells transfected by recombinant adenovirus
图5 Western blot法检测重组腺病毒转染后的293细胞表达外源基因情况

3 讨论

腺病毒载体是继反转录病毒载体后的一种重要的载体,目前已成功用于多项基因治疗的临床试验^[8-10]。HEK293细胞是一种转化了E1区的人胚肾细胞系,能编码腺病毒的E1区^[11]。在HEK293细胞内产生的复制缺陷性腺病毒颗粒能感染许多类型的细胞,并表达所插入的外源基因,但不能在感染的细胞中复制。这就决定了这

种E1区缺失的腺病毒既能避免对宿主细胞的损害,又可达基因治疗的目的。另外,重组腺病毒导入细胞的目的基因并不插入到宿主细胞染色体中,故具有无激活致癌基因或插入突变的危险等特点。

实验选取的AdMax腺病毒包装系统系统操作简便、重组效率高、获得的病毒产率高、目的基因的表达水平高^[12]。实验中,DNA中若含有蛋白质、RNA等杂质,则会对实验结果造成影响。DNA在260 nm处有吸收峰,蛋白质在280nm处有吸收峰,理论上 $A_{260}/A_{280}=1.8$ 时表示DNA是纯净的, $A_{260}/A_{280}<1.8$ 时表示有蛋白质污染, $A_{260}/A_{280}>1.8$ 时表示有RNA污染^[7]。实验中连续测定5次 A_{260}/A_{280} 值后取平均值,结果为1.803 1,证明提取出的骨架质粒纯度达到要求。

在重组腺病毒制作上,实验改进了细菌内同源重组之后再在细胞内包装出毒的方式,利用脂质体法直接使穿梭质粒和腺病毒骨架质粒在包装细胞内重组包装的方法,使操作更加便捷,结果亦可靠,有利于今后规模化制作。然而在实验操作过程中发现,HEK293细胞的培养状态是制约此方法顺利进行乃至影响出毒结果的重要瓶颈。因为在实验过程中HEK293细胞对生长环境的改变比较敏感,细胞容易成团,维持稳定的温度、酸碱度对细胞正常均匀生长至关重要。而每次传代后,尤其是正常细胞,细胞的生长和增殖过程都会受到一定的影响。此方法要求HEK293细胞保持良好活力,所以要求传代次数要少,细胞的活力对病毒的重组包装直接产生影响,直接影响实验结果。

对于腺病毒的包装来说,在两三天时需要观察GFP表达,用于检查转染试验是否成功,而且转染通常在两三天时荧光达到峰值;之后进入腺病毒重组和出毒,这些是在细胞中自行完成的,这个过程在转染后需要7~20 d不等的时间,随着细胞的分裂,GFP阳性细胞也开始分化,GFP荧光液随之变弱,逐渐丢失;通常在八九天时,GFP阳性细胞已经很少。当腺病毒重组出毒后,由零星的细胞开始向四周扩增,逐渐出现一圈带有荧光的细胞,并且细胞变圆,处于死亡边缘,此时,就可以看到细胞病变效应。在细胞病变效应初期观察较为方便,在细胞病变效应后期时,只要稍微移动培养瓶,细胞均会飘落,无法看出细胞病变效应现象。

Western blot结果显示感染重组腺病毒的空白细胞样本中无Hsp70条带,低浓度组亦无Hsp70条带,考虑原因是因为此组表达Hsp70的量太少而未显影;中、高浓度组有明显条带,这与荧光显微镜下观察GFP表达量相符。说明重组腺病毒可以良好地将外源基因转染入真核细胞内并在真核细胞中表达。

综上所述,实验成功地构建了携带外源性Hsp70基因的5型复制缺陷型腺病毒载体,并在293细胞中包装获得稳定高效表达外源性蛋白Hsp70的腺病毒Ad-Hsp70。

4 参考文献

- [1] Gu JR, Cao XT. Beijing: Science Press. 2001. 顾健人,曹雪涛.基因治疗[M].北京:科学出版社,2001.
- [2] Zha XL, Yao LB. People's Medical Publishing House. 2003. 查锡良,药立波.医学分子生物学[M].北京:人民卫生出版社,2003.
- [3] Zheng YC, Baum BJ, Iadarola MJ, et al. Genomic integration and gene expression by amodified adenoviral vector. Nature Biotechnol. 2000;18:176-180.
- [4] Macario AJ, Brocchieri L, Shenoy AR, et al. Evolution of a protein-folding machine: genomic and evolutionary analyses reveal three lineages of the archacal hsp70(dnaK) gene. Mol Evol. 2006;63(1):74-86.
- [5] Mizuguchi H, Kay MA. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. Hum Gene Ther. 1998;9(17):2577-2583.
- [6] Sambrook J, Russell DW. Beijing: Science Press. 2003. 萨姆布鲁克,拉塞尔.分子克隆实验指南(第三版)[M].北京:科学出版社,2003.
- [7] Sharma AD, Gill PK, Singh P. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. Plant Mol Bid Rep. 2002; 20(4):415.
- [8] Ng P, Cummings DT, Eveleigh CM. The yeast recombinase FLP functions effectively in human cells for construction of adenovirus vectors. BioTechniques. 2000;29:524-528.
- [9] Zhang DY, Wu JS, Liu DJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(41):8065-8070. 张阳德,吴季霖,刘东京,等.MAGE-3-HSP70融合基因真核表达载体的构建与鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(41): 8065-8070
- [10] Jounaidi Y, Waxman DJ. Use of replication-conditional adenovirus as a helper system to enhance delivery of P450 prodrug-activation genes for cancer therapy. Cancer Res. 2004; 64(1):292-303.
- [11] Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. J Gen.Virol. 2000;81(Pt 11):2573-604.
- [12] Ng P, Cummings DT, Eveleigh CM, et al. The yeast recombinase FLP functions effectively in human cells for construction of adenovirus vectors. BioTechniques. 2000;29(3):524-528.

来自本文课题的更多信息——

利益冲突:课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: AdMax 系统可以直接使腺病毒骨架质粒和重组穿梭质粒在 HEK293 细胞中重组包装出毒,而不需要辅助细菌同源重组,简化了流程,节省时间。实验设计合理,思路清晰,为肿瘤的基因治疗提供了实验基础。

课题评估的“金标准”: PCR 技术检测靶序列, Western blot 检测外源基因的表达,终点稀释法测定重组腺病毒的滴度,这些方法可称为腺病毒载体构建中的金标准。

偏倚和不足: 虽然初步证实了重组腺病毒 AD-Hsp70 可以有效转染真核细胞并表达外源基因,但其对肿瘤细胞的转染及效应仍有待进一步研究。

提供临床借鉴的价值: 成功构建携带人 Hsp70 基因的重组腺病毒载体,可用于多项基因治疗的临床试验,为肿瘤的基因治疗奠定基础。