



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101654685 B

(45) 授权公告日 2013.02.27

(21) 申请号 200910041661.8

(22) 申请日 2009.08.05

(73) 专利权人 广州医学院第二附属医院

地址 510260 广东省广州市海珠区昌岗东路  
250号

(72) 发明人 陈敏生 倪晓彬 何晓青 刘世明  
罗承锋

(74) 专利代理机构 广州广信知识产权代理有限公司 44261

代理人 张文雄

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

(56) 对比文件

US 20030072744 A1, 2003.04.17,

CN 1566343 A, 2005.01.19, 全文.

CN 101319229 A, 2008.12.10, 全文.

郝蕾等. “hPDGF2A /hBD2 双基因共表达腺病毒载体的构建及表达”. 《第三军医大学学报》. 2007, 第29卷(第10期), 859-862页.

周磊等. “血管内皮生长因子165及血管生成素-1减小大鼠心肌梗死面积的研究”. 《中华心血管病杂志》. 2003, 第31卷(第10期), 767-772页.

周磊等. “血管内皮生长因子165及血管生成素-1减小大鼠心肌梗死面积的研究”. 《中华心血管病杂志》. 2003, 第31卷(第10期), 767-772页.

Kaliberov S et al. Enhanced apoptosis following treatment with TRA-8 anti-human DR5 monoclonal antibody and overexpression of exogenous Bax in human glioma cells”. 《Gene Ther.》. 2004, 第11卷(第8期), 658-667页.

审查员 董桂灵

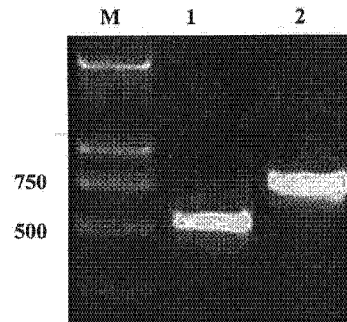
权利要求书 1页 说明书 13页 附图 5页

(54) 发明名称

人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体及其构建方法

(57) 摘要

本发明涉及一种人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体及其构建方法,其特征是利用 IRES 片段连接 hBcl-2、hVEGF<sub>165</sub> 基因,以 AdEasy 系统为基础利用细菌内同源重组机制重组构建 hBcl-2 和 hVEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体。本发明将具有抗凋亡能力的 Bcl-2 基因和目前促血管生成作用最强的细胞因子 VEGF<sub>165</sub> 基因重组在同一载体上共表达,在解决了移植细胞在低氧、炎症的条件下生存率低的问题的同时发挥 VEGF<sub>165</sub> 的促血管生成作用,本发明将在心肌梗死的基因治疗和细胞移植研究领域发挥重要作用,具有广阔的应用前景。



M: DL2000; 1: 584bp 的 hVEGF<sub>165</sub> 片段; 2: 734bp 的 hBcl-2 片段

1. 人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体,其特征是:

- 1) 所述重组载体包括人 Bcl-2 基因和人 VEGF<sub>165</sub> 基因,其中 Bcl-2 基因序列如序列表 SEQ ID No :1 所述 ;VEGF<sub>165</sub> 基因序列如序列表 SEQ ID No :2 所述 ;
- 2) 所述重组载体利用 IRES 片段连接人 Bcl-2、人 VEGF<sub>165</sub> 基因 ;
- 3) 所述人 Bcl-2 基因和人 VEGF<sub>165</sub> 基因由 A549 肺癌细胞株制备得到。

2. 根据权利要求 1 所述的人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体,其特征是:所述载体是腺病毒载体。

3. 根据权利要求 1 所述的人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体的构建方法,其特征是:包括以下几个步骤:

- 1) 获得人 Bcl-2、人 VEGF<sub>165</sub> 基因 ;
- 2) 构建重组腺病毒穿梭载体 ;
- 3) 构建携带人 Bcl-2 基因、IRES 片段和人 VEGF<sub>165</sub> 的重组腺病毒载体质粒 ;
- 4) 脂质体转染法介导重组腺病毒载体质粒在 HEK293 细胞中的包装。

4. 根据权利要求 3 所述的人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体的构建方法,其特征是:根据 Genbank 中基因序列设计合成扩增 人 Bcl-2 和 人 VEGF<sub>165</sub> 的 PCR 引物 ;

其中扩增 人 Bcl-2 的 PCR 引物序列是 :

正 向 5' G A A G A T C T A T G G C G C A C G C T G G G A G A A 引 入 B g 1  
II 位点,反向 5' A C G C G T C G A C T C A C T T G T G G C T B C A G A T A G G C A C C 引入 Sa1 I 位点 ;

扩增 人 VEGF<sub>165</sub> 的 PCR 引物序列是 :

正向 5' G C T C T A G A A T G A A C T T T C T G C T G T C T T G G G T G C 引入 Xba I 位点,反向 5' C C G G A T A T C G C T C  
A C C G C C T C G G C T T G T C A C A T 引入 EcoRV 位点。

## 人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体及其构建方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及了一种双基因共表达重组载体及其构建方法,特别是涉及一种人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体及其构建方法。属于生物基因治疗领域。

### 背景技术

[0002] 心肌梗死 (Myocardium infarction, MI) 是在冠状动脉病变基础上发生冠状动脉血供急剧减少或中断,造成相应的心肌严重而持久地缺血导致心肌坏死。心肌细胞是终末分化细胞,心肌损伤后不能通过细胞再生而修复,而是形成纤维化瘢痕。目前临床上对 MI 的治疗方法主要是药物治疗、冠状动脉介入治疗和冠状动脉旁路手术,这三大方法虽然能使部分病人闭塞的血管再通并恢复血流灌注,一定程度上挽救濒死的心肌,减缓心肌重构和心衰进程,减轻患者症状,降低病死率。但由于这些疗法无法使梗死的心肌再生,使得远期预后仍不理想。心脏移植则由于存在供体缺乏、免疫排斥和费用昂贵等缺陷使其在临床上难以推广。因此,临床上需要一种新的治疗该疾病的有效手段。

[0003] 基因治疗或对干细胞基因修饰后移植治疗是当今研究心肌梗死治疗方法的热点,已进入临床研究的是抗凋亡基因或促血管生成基因等单基因的治疗方法。中国发明专利 CN200810302770.6 中涉及一种重组双基因腺病毒载体,其特点是在一个载体上重组了两种不同的基因,虽然其在疗效方面效果要比用单基因治疗效果好,但是这两种基因分别是 bFGF 蛋白的基因和 PDGF-B 蛋白的基因,同属于促进血管生成的因子,其效果只能是在促进血管生成上增加,而且此专利是采用两个启动因子,容易产生两个启动子间相互抑制导致一条基因表达抑制另一条基因表达的弊端。

[0004] 研究中发现, Bcl-2 基因家族是目前已知的最重要的调控细胞凋亡的基因家族。Bcl-2 基因及其编码的蛋白质能在不影响细胞周期和分化的情况下抑制细胞凋亡、延长细胞寿命。血管内皮细胞生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前发现的促血管生成作用最强的细胞因子。有研究表明,单独应用 Bcl-2 基因或 VEGF 基因对心肌梗死有明显的治疗效果,但仍不理想,有进一步提升的空间。在多数细胞中 Bcl-2 基因和 VEGF 基因之间存在着互相上调的级联关系,在生物学功能上能够形成协同作用。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的之一,是为了构建一种人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体,为联合基因治疗心肌梗死的研究奠定基础。

[0006] 本发明的目的之二,是为了提供一种上述重组载体的构建方法。

[0007] 本发明的目的之一,主要通过以下技术方案实现:

[0008] 人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体,其特征是:所述重组载体包括人 Bcl-2 基因 (hBcl-2) 和人 VEGF<sub>165</sub> 基因 (hVEGF<sub>165</sub>);

[0009] 其中, hBcl-2 基因序列如序列表 SEQ ID No:1 所述; hVEGF<sub>165</sub> 基因序列如序列表 SEQ ID No:2 所述;利用 IRES 片段连接 hBcl-2、hVEGF<sub>165</sub> 基因,以 AdEasy 系统为基础利用细

菌内同源重组机制重组构建本发明 hBcl-2 和 hVEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体。

[0010] 本发明所用载体是腺病毒载体,腺病毒载体宿主范围广、转染效率和基因表达水平高、安全性较好,是基因治疗的优良载体,是心肌梗死基因治疗较为理想的载体。也可以使用其他腺相关病毒、慢病毒和质粒等其他载体。

[0011] 本发明的目的之二,主要通过以下技术方案实现:

[0012] 人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体的构建方法,其特征是:主要包括以下几个步骤:

[0013] 1) 获得 hBcl-2、hVEGF<sub>165</sub> 基因;(2) 构建重组腺病毒穿梭载体 pAd-Track-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub>; (3) 重组构建携带 hBcl-2 基因、IRES 片段和 hVEGF<sub>165</sub> 的腺病毒载体质粒 pAd-Easy-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub>; (4) 脂质体转染法介导重组腺病毒载体质粒在 HEK293 细胞中的包装。

[0014] 本发明的目的之二,还可以通过以下技术方案实现:

[0015] 本发明的目的之二的一种实施方案是:步骤 1) 可以通过 RT-PCR 获得 hBcl-2、hVEGF<sub>165</sub> 基因;根据 Genbank 中基因序列设计合成扩增 hBcl-2 和 hVEGF<sub>165</sub> 的 PCR 引物;

[0016] 其中扩增 hBcl-2 的 PCR 引物序列是:

[0017] 正向 5' GAAGATCTATGGCGCACGCTGGGAGAA 引入 BglIII 位点,反向 5' ACGCGTCGACTCAC TTGTGGCTBCAGATAGGCACC 引入 SalI 位点;

[0018] 扩增 hVEGF<sub>165</sub> 的 PCR 引物序列是:

[0019] 正向 5' GCTCTAGAATGAACCTTTCTGCTGTCTGGGTGC 引入 XbaI 位点,反向 5' CCGGATATC GCTCACCGCCTCGGCTTGTCACAT 引入 EcoRV 位点。

[0020] 本发明的目的之二的一种实施方案是:步骤 (2) 主要包括将人 Bcl-2 基因、IRES 片段和人 VEGF<sub>165</sub> 依次定向装载入腺病毒穿梭载体质粒。

[0021] 本发明的目的之二的一种实施方案是:步骤 (3) 是以 AdEasy 系统为基础,将线性化去磷酸化的重组穿梭载体质粒 pAd-Track-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 与骨架质粒 pAd-Easy-1 利用细菌内同源重组机制重组。

[0022] 本发明具有的有益效果如下:

[0023] 1、本发明将具有抗凋亡能力的 Bcl-2 基因和目前促血管生成作用最强的细胞因子 VEGF<sub>165</sub> 基因重组在同一载体上共表达,在解决了移植细胞在低氧、炎症的条件下生存率低的问题的同时发挥 VEGF<sub>165</sub> 的促血管生成作用,并利用 Bcl-2 和 VEGF<sub>165</sub> 的相互上调作用,使单一作用效应放大,两者在生物学功能上形成协同效应,进而促进心梗后心脏的血管再生、心肌细胞修复,加快心功能的恢复。本发明将在心肌梗死的基因治疗和细胞移植研究领域发挥重要作用,具有广阔的应用前景。

[0024] 2、本发明是在同一载体上搭载抗凋亡基因 Bcl-2 和促血管生成基因 VEGF<sub>165</sub>,通过 IRES 片段的连接来实现两个基因的共表达。本发明利用 IRES 片段连接 hBcl-2、hVEGF<sub>165</sub> 基因实现双基因共表达,避免了应用双启动子存在启动子间相互抑制的现象可能导致的基因表达抑制的弊端。

[0025] 附图说明

[0026] 图 1 为腺病毒载体构建示意图。

[0027] 图 2 为腺病毒穿梭载体质粒图谱。

[0028] 图 3 为 hBcl-2 和 hVEGF<sub>165</sub> 的 PCR 产物电泳图。图中, M :DL2000 ;1 :734bp 的 hBcl-2 片段 ;2 :595bp 的 hVEGF<sub>165</sub> 片段。

[0029] 图 4 为 pMD19T-hBcl-2 质粒酶切鉴定图。图中, M :DL2000 ;1 :pMD19T-hBcl-2 质粒 BglIII、SalI 双酶切产物。

[0030] 图 5 为 pMD19T-hBcl-2 质粒基因测序图。

[0031] 图 6 为 pMD19T-hVEGF<sub>165</sub> 质粒酶切鉴定图。图中, M :DL2000 ;1 :pMD19T-hVEGF<sub>165</sub> 质粒 XbaI、EcoRV 双酶切产物。

[0032] 图 7 为 pMD19T-hVEGF<sub>165</sub> 质粒基因测序图。

[0033] 图 8 为穿梭载体质粒 pAd-Track-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 酶切鉴定图。图中, M :DL15000marker 1 :BglIII\SalI 双酶切得到 722bp 的片段 ;2 :XbaI\EcoRV 双酶切得到 584bp 的片段 ;3 :XhoI\XbaI 双酶切 641bp 的片段 ;4 :BglIII\EcoRV 双酶切得到 2Kb 左右的片段。

[0034] 图 9 为重组腺病毒载体质粒的酶切鉴定图。图中, M :1kb ladder Marker ;1 :重组腺病毒载体质粒 PacI 单酶切产物。

[0035] 图 10 为重组腺病毒 DNA 的 PCR 鉴定。图中, M :DL2000 ;1 :584bp 的 hVEGF<sub>165</sub> 片段 ;2 :734bp 的 hBcl-2 片段。

[0036] 图 11 腺病毒包装扩增过程中 HEK293 细胞形态变化和同视野 GFP 的表达。图中,

[0037] A :转染后 2 小时的 HEK293 (×100) B :转染后 2 小时 GFP 的表达 (×100)

[0038] C :转染后第 3 天的 HEK293 细胞 (×100) D :转染后第 3 天 GFP 的表达 (×100)

[0039] E :第二轮扩增第 7 天的 HEK293 细胞 (×100) F :第二轮扩增第 7 天 GFP 的表达 (×100)

[0040] G :第二轮扩增第 10 天的 HEK293 细胞 (×200) H :第二轮扩增第 10 天 GFP 的表达 (×200)

## 具体实施方式

[0041] 以下通过实施例来描述本发明,应该指出的是,所列举的实施例不应理解为对本发明的限制。

[0042] 具体实施例 1

[0043] 图 1 ~ 11 构成本发明的具体实施例 1。

[0044] 人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体,包括人 Bcl-2 基因和人 VEGF<sub>165</sub> 基因 ;其中,人 Bcl-2 基因序列如序列 SEQ ID No :1 所述 ;人 VEGF<sub>165</sub> 基因序列如序列 SEQ ID No :2 所述 ;所述载体是腺病毒载体,也可以使用其他腺相关病毒、慢病毒和质粒等其他载体。

[0045] 所述人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组腺病毒载体的构建过程如图 1 所示,其构建方法具体如下 :

[0046] 1、主要实验试剂与设备 :

[0047] 生化试剂 :DNA Marker (日本 Takara), 胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉 (日本 Oxoid), 琼脂糖 (西班牙 Biowest), 卡那霉素、氨苄青霉素 (美国 Amresco) Trizol 试剂 (美国 Invitrogen)。

[0048] 工具酶和试剂盒 :逆转录反应试剂盒、Lipofectamine2000 (美国 Invitrogen)、质

粒小提试剂盒、胶回收试剂盒（德国 Qiagen），去内毒素中量质粒提取试剂盒（德国 MN），PCR 引物、LA Taq 酶试剂盒、pMD19T 载体试剂盒（日本 Takara），T4 连接酶、碱性磷酸酶及限制性内切酶 BglII、SalI、XbaI、EcoRV、XhoI、XbaI、PacI、PmeI（美国 NEB），DMEM 细胞培养液、Opti-MEM1 细胞培养液、胎牛血清（美国 GIBCO），腺病毒沉淀法纯化试剂盒（美国 GENMED）。

[0049] 质粒、菌株和细胞株：A549 肺癌细胞株、pIRES 质粒、AdEasy 系统（pAd-Track-CMV 质粒、含 pAd-Easy-1 质粒的大肠杆菌 BJ5183、HEK293 细胞）、大肠杆菌 DH5  $\alpha$ （广州医学院实验医学研究中心保存）。

[0050] 主要仪器与设备：FORMA3111 水套 CO<sub>2</sub> 培养箱（美国 Thermo）、实时荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-rad）、超净工作台（苏州净化设备厂）、倒置式荧光生物显微镜（德国 Leica）、凝胶成像系统（美国 Bio-rad）、核酸蛋白定量仪（美国 Nano Drop）、振荡培养箱（美国 Thermo）、多功能细胞电穿孔仪（德国 Eppendorf）。

[0051] 2、实验内容

[0052] 2. 1hBcl-2、hVEGF<sub>165</sub> 基因的获得

[0053] 2. 1. 1 复苏、培养、传代 A549 细胞

[0054] 取出液氮中保存的 A549 细胞，迅速放入 37℃ 的恒温水浴中，并剧烈摇晃，使其尽快融化，超净工作台内将细胞液转移至 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min，用含 10% FBS 的 DMEM 培养液重悬浮，并转移至 T-25 细胞培养瓶中，补充培养液至 5mL，置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养，次日更换培养液，继续培养，观察生长情况。待细胞长至丰度约 80% 时弃去旧培养液，加入 1mL 37℃ 预热的胰蛋白酶消化液（0. 25%）消化细胞，倒置显微镜下观察细胞形态，待大部分细胞变圆、细胞之间不再连接成片时倒去消化液，加入新鲜的培养液，用滴管将细胞吹打成单细胞悬液，按 1 : 3 比例接种传代，继续培养。

[0055] 2. 1. 2 提取 A549 细胞的总 RNA

[0056] 将实验用的玻璃器皿、EP 管、枪头经 0. 1% DEPC 浸泡过夜灭活 RNA 酶，并高压灭菌。挑选生长状态良好，丰度约 80% 的细胞，按 Trizol 试剂说明书进行：首先弃去细胞培养液，加入 1mL Trizol 试剂铺盖细胞，反复摇动至细胞脱落后，移至 1. 5mL 的 EP 管中，室温温育 5min。加入 0. 2mL 氯仿，振荡 15s，静置 2min。4℃ 离心，12000g×15min，取上清，将无色水相轻轻吸出转移至另一 EP 管中。加入 0. 5mL 异丙醇，将管中液体轻轻混匀，室温静置 10min。4℃ 离心，12000g×10min，可见少许絮状沉淀，弃上清。加入 1mL 75% 乙醇，颠摇混匀，轻轻洗涤沉淀。4℃ 离心，7500g×5min，弃上清。晾干，加入 25  $\mu$  l 的 DEPC 水溶解。取 5  $\mu$  l 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。核酸蛋白定量仪定量。其余即刻保存于 -80℃ 冰箱。

[0057] 2. 1. 3 逆转录反应获得 cDNA

[0058] 按 M-MLV 逆转录反应试剂盒说明书进行，20  $\mu$  l 反应体系：

[0059] 将以下 4 种试剂加入去 RNA 酶的 PCR 管中：

[0060] oligo(dT) (500  $\mu$  g/mL) 1  $\mu$  l

[0061] 总 RNA 2  $\mu$  l

[0062] 10mM dNTP Mix 1  $\mu$  l

[0063] 无菌蒸馏水 8  $\mu$  l

[0064] 将混合物 65℃加热 5min,然后快速移至冰上,将 PCR 管简单离心往 PCR 管中加 3 种试剂:

[0065] 5×First-strand Buffer 4 μ l

[0066] 0.1M DTT 2 μ l

[0067] 40U/μ l Rnase inhibitor 1 μ l

[0068] 轻轻摇匀离心管后 37℃放置 2min,往管中加入 M-MLV RT 1 μ l (200U),轻轻摇匀,置 PCR 仪上 37℃孵育 50min,70℃、15min,所得到的 cDNA 置 -20℃保存作为下一步 PCR 的模板。

[0069] 2.1.4 PCR 获得 hBcl-2 和 hVEGF<sub>165</sub> 基因

[0070] 根据 Genbank 中基因序列设计合成扩增 hBcl-2 和 hVEGF<sub>165</sub> 的 PCR 引物,序列分别为:hBcl-2:正向 5' GAAGATCTATGGCGCACGCTGGGAGAA 引入 BglIII 位点,反向 5' ACGCGTCGACTCACTTGTGGCTBCAGATAGGCACC 引入 SaII 位点;hVEGF<sub>165</sub>:正向 5' GCTCTAGAATGAACCTTCTGCTGTCTTGGGTGC 引入 XbaI 位点,反向 5' CCGGATATCGCTCACCGCCTCGGCTTGTCACAT 引入 EcoRV 位点。

[0071] 按下列组份配制 PCR 反应液,50 μ l 反应体系:

[0072] TaKaRa LATAq (5U/μ l) 0.5 μ l

[0073] 10×LAPCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup>+Plus) 5 μ l

[0074] dNTP Mixture (各 2.5mM) 8 μ l

[0075] 模板 cDNA 0.5 μ l

[0076] 上游引物 (20 μ M) 1 μ l

[0077] 下游引物 (20 μ M) 1 μ l

[0078] 灭菌蒸馏水 34 μ l

[0079] 反应条件:

[0080] 94℃ 3min

[0081] 94℃ 30s

[0082] 58℃ (hBcl-2), 55℃ (hVEGF<sub>165</sub>) 30s 35 个循环

[0083] 72℃ 1min

[0084] 72℃ 10min

[0085] Store at 4℃

[0086] 取 10 μ l PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳 (含溴化乙啶的 2% 琼脂糖) 检测。检测结果如图 3 所示,PCR 产物琼脂糖凝胶电泳可见 734bp 的 hBcl-2 片段和 595bp 的 hVEGF<sub>165</sub> 片段。

[0087] 2.1.5 从 PCR 产物中回收纯化 DNA 片段

[0088] 应用 QIAquick™ Gel Extraction Kit 凝胶回收纯化 PCR 产物:将 40 μ l PCR 产物全部进行琼脂糖凝胶电泳 (2% 琼脂糖),紫外分析仪下用干净锋利的手术刀片切下含待回收 DNA 条带的凝胶,置 1.5mL 无色 EP 管中,称重。加入 Buffer QG (按每 100mg 凝胶加 Buffer QG 300 μ l),置 50℃水浴 10min;检查所加 Buffer 与溶解物颜色,黄色即完全溶解;将柱子放在 2mL 收集管上,将上述溶液加于柱上。4℃离心 13000g×1min;弃去收集管中液体,将吸附柱重新放入收集管中。加入 500 μ l Buffer QG 于柱上,4℃离心 13000g×1min,弃去收

集管中液体。加入 750  $\mu$ l Buffer PE 于柱上,4 $^{\circ}$ C 离心 13000g $\times$ 1min,弃去收集管中液体。4 $^{\circ}$ C 离心 13000g $\times$ 1min,弃去收集管。将柱放于一新 1.5mL EP 管中,加 50  $\mu$ l buffer EB 于柱上。放置 1min,4 $^{\circ}$ C 离心 13000g $\times$ 1min,此 EP 管中液体即为回收的 DNA 片段。取 5  $\mu$ l 回收的 DNA 电泳检测,核酸蛋白定量仪定量。

[0089] 2.1.6 氯化钙法制备感受态大肠杆菌 DH5  $\alpha$

[0090] a. 用接种环直接取冻存的大肠杆菌 DH5  $\alpha$ ,在 LB 培养基平板表面划线,于 37 $^{\circ}$ C 培养 16h;

[0091] b. 挑取一个单菌落,接种到 5mL 无抗生素的 LB 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、200rpm 振荡培养 5h;

[0092] c. 培养液全部转到 100mL LB 培养基中培养 2h-3h,到  $OD_{600} = 0.3 \sim 0.4$ ;

[0093] d. 将培养液转入 1.5mL 离心管中,在冰上放置 15-30min;

[0094] e. 4 $^{\circ}$ C 离心,4000rpm $\times$ 5min,弃上清;

[0095] f. 加入 0.8mL 预冷的 0.1mol/L  $CaCl_2$  溶液悬浮沉淀,冰上预冷 10min;

[0096] g. 4 $^{\circ}$ C 离心,4000rpm $\times$ 5min,弃上清;

[0097] h. 加入 0.2mL 预冷的 0.1mol/L  $CaCl_2$  溶液悬浮沉淀,加入预冷的甘油使总体积为 15%,分装 100  $\mu$ l/管置于 -70 $^{\circ}$ C 长期保存。

[0098] 2.1.7pMD19T-hBcl-2 质粒、pMD19T-hVEGF<sub>165</sub> 质粒的获得

[0099] 按 Takara pMD19T simple vector 试剂盒说明书进行:在微量离心管中配制下列 DNA 溶液,全量为 5  $\mu$ l:

[0100] pMD19-T Simple Vector 1  $\mu$ l

[0101] DNA(hBcl-2 或 hVEGF<sub>165</sub>) 0.1pmol

[0102] 灭菌双蒸水 up to 5  $\mu$ l

[0103] 加入 5  $\mu$ l 的 Solution I 液,16 $^{\circ}$ C 反应 30min,全量 (10  $\mu$ l) 加入至感受态 E. coli DH5  $\alpha$  (使用前中在冰中解冻) 中,冰中放置 30min,42 $^{\circ}$ C 孵育 45s 后,再在冰中放置 1min,加入 890  $\mu$ l LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 60min,取 100  $\mu$ l 涂布在含有氨苄青霉素的 LB 培养基平板,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16h,形成白色的单菌落。挑选 8 个白色菌落分别接种于 2mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、200rpm 振荡培养 12h,可见液体变浑浊。

[0104] 2.1.8 pMD19T-hBcl-2 质粒、pMD19T-hVEGF<sub>165</sub> 质粒的菌落 PCR 鉴定和测序鉴定

[0105] 取 50  $\mu$ l 菌液 1000rpm 离心 1min,弃上清,加入 30  $\mu$ l 双蒸水,煮沸 10min,1000rpm 离心 1min,取 2  $\mu$ l 上清为模板行 PCR,反应体系及反应条件同前。将菌落 PCR 鉴定阳性的菌液送大连宝生物工程有限公司测序,测序引物为 M13。

[0106] 用 BglIII、SalI 双酶切 pMD19T-hBcl-2 质粒,琼脂糖凝胶电泳见 722bp 和 2.6Kb 的特定酶切产物 (如图 4),基因测序结果 (如图 5) 通过 BLAST 比对与 Genebank 中的 hBcl-2 序列 gi|161277340| 完全相同。pMD19T-hVEGF<sub>165</sub> 质粒经 XbaI、EcoRV 双酶切,琼脂糖凝胶电泳见 584bp 和 2.6Kb 的特定酶切产物 (如图 6),基因测序结果 (如图 7) 通过 BLAST 比对与 Genebank 中的 hVEGF<sub>165</sub> 序列 gi|19909064| 完全相同。

[0107] 2.2 重组腺病毒穿梭载体质粒 pAd-Track-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 的构建

[0108] 2.2.1pMD19T-hBcl-2、pMD19T-hVEGF<sub>165</sub>、pAd-Track-CMV 三种质粒的提取按 QIAprep Spin Miniprep Kit 说明书进行:



[0109] a. 取 5  $\mu$  l 甘油保存的测序正确的 pMD19T-hBcl-2 质粒、pMD19T-hVEGF<sub>165</sub> 质粒菌液按 1 : 1000 体积比例接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基 ; AdEasy 系统 (pAd-Track-CMV) 质粒接种于含卡那霉素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜 ;

[0110] b. 室温下将菌液 10000rpm $\times$ 3min 离心, 吸掉 LB 培养基 ;

[0111] c. 加入 250  $\mu$  l P1 液重悬浮, 吹打至不能见有细菌团块, 然后转移入 EP 管 ;

[0112] d. 加入 250  $\mu$  l P2 液, 倒置摇晃 4-6 次 (不可震荡), 至完全混合, 为蓝色 ;

[0113] e. 加入 350  $\mu$  l N3 液, 马上倒置摇晃 4-6 次, 至为白色 ;

[0114] f. 13000rpm $\times$ 10min 离心, 将上清吸至柱子, 13000rpm $\times$ 60s 离心, 弃废液 ;

[0115] g. 加入 500  $\mu$  l PB 液, 然后 13000rpm $\times$ 60s 离心 ;

[0116] h. 加入 750  $\mu$  l PE 液, 13000rpm $\times$ 60s 离心, 弃废液, 再离心一次去除剩余洗液 ;

[0117] i. 置一干净的 EP 管于柱子下面, 加入 50  $\mu$  l EB 液至柱子中间, 静置 1min, 离心 1min, 分别得到三种质粒, 并用核酸蛋白定量仪定量。

[0118] 2. 2. 2 重组 pAd-Track-CMV-hBcl-2 质粒

[0119] 分别将 pAd-Track-CMV、pMD19T-hBcl-2 用 BglIII、SalI 双酶切, 50  $\mu$  l 酶切体系 :

[0120] pAd-Track-CMV            2  $\mu$  g

[0121] 或 pMD19T-hBcl-2

[0122] BglIII                    1  $\mu$  l

[0123] SalI                        1  $\mu$  l

[0124] 10 $\times$ NEB 缓冲液 3        5  $\mu$  l

[0125] 100 $\times$ BSA                0.5  $\mu$  l

[0126] 灭菌双蒸水            至 50  $\mu$  l

[0127] 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 取 5  $\mu$  l 酶切产物琼脂糖凝胶电泳凝胶鉴定, 确定酶切正确后用 QIAquick<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit 回收 9205bp 的切开的 pAd-Track-CMV 质粒片段和 726bp 的 hBcl-2 基因片段, 并用核酸蛋白定量仪定量。

[0128] 按 pAd-Track-CMV 和 hBcl-2 的摩尔数比为 1 : 10 的比例建立 20  $\mu$  l 连接体系, 使用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物全量加入感受态 E. coli DH5 $\alpha$  (使用前中在冰中解冻) 中, 冰中放置 30min, 42 $^{\circ}$ C 加热 45s 后, 再在冰中放置 1min, 加入 890  $\mu$  l LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 60min。取 100  $\mu$  l 涂布在卡那霉素 LB 培养基平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16h, 形成白色的单菌落, 挑选 8 个白色菌落分别接种于 2mL 含卡那霉素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、200rpm 摇菌 12h, 可见 LB 变浑浊, 行 hBcl-2 的菌落 PCR 鉴定 (方法同前)。将 PCR 阳性的用质粒小提试剂盒提取质粒, 用 BglIII、SalI 双酶切鉴定, 并用核酸蛋白定量仪定量。

[0129] 2. 2. 3 重组 pAd-Track-CMV-hBcl-2-hVEGF<sub>165</sub> 质粒

[0130] 分别将 pAd-Track-CMV-hBcl-2、pMD19T-hVEGF<sub>165</sub> 质粒用 XbaI、EcoRV 双酶切, 50  $\mu$  l 酶切体系 :

[0131] pAd-Track-CMV-hBcl-2        2  $\mu$  g

[0132] (或 pMD19T-hVEGF<sub>165</sub>)

[0133] XbaI                        1  $\mu$  l

[0134] EcoRV                      1  $\mu$  l

[0135] 10 $\times$ NEB 缓冲液 2        5  $\mu$  l

[0136] 100×BSA 0.5 μ l

[0137] 灭菌双蒸水 至 50 μ l

[0138] 37℃酶切过夜,取 5 μ l 酶切产物琼脂糖电泳凝胶鉴定,确定酶切正确后用 QIAquick™ Gel Extraction Kit 回收 9925bp 的切开 pAd-Track-CMV-hBcl-2 质粒片段和 584bp 的 hVEGF<sub>165</sub> 基因片段,并用核酸蛋白定量仪定量。

[0139] 按 pAd-Track-CMV-hBcl-2 和 hVEGF<sub>165</sub> 的摩尔数比为 1 : 10 的比例建立 20 μ l 连接体系,使用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 16℃连接过夜。将连接产物全量转化感受态 E. coli DH5 α, 涂布在卡那霉素 LB 培养基平板,培养后挑选 8 个白色菌落,接种于含卡那霉素的 LB 培养基,行 hVEGF<sub>165</sub> 菌落 PCR 鉴定(方法同前)。将 PCR 阳性的用质粒小提试剂盒提取质粒, XbaI、EcoRV 双酶切鉴定,并用核酸蛋白定量仪定量。

[0140] 2.2.4 重组 pAd-Track-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 质粒

[0141] 分别将 pAd-Track-CMV-hBcl-2-hVEGF<sub>165</sub>、pIRES 质粒用 XhoI、XbaI 双酶切,酶切体系:

[0142] pAd-Track-CMV-hBcl-2-hVEGF<sub>165</sub> 2 μ g

[0143] (或 pIRES)

[0144] XhoI 1 μ l

[0145] XbaI 1 μ l

[0146] 10×NEB 缓冲液 2 5 μ l

[0147] 100×BSA 0.5 μ l

[0148] 灭菌双蒸水 至 50 μ l

[0149] 37℃酶切过夜,取 5 μ l 酶切产物琼脂糖电泳凝胶鉴定,确定酶切正确后用 QIAquick™ Gel Extraction Kit 回收 10507bp 的切开 pAd-Track-CMV-hBcl-2-hVEGF<sub>165</sub> 质粒片段和 641bp 的 IRES 片段,用核酸蛋白定量仪定量。

[0150] 按 pAd-Track-CMV-hBcl-2-hVEGF<sub>165</sub> 和 IRES 的摩尔数比为 1 : 10 的比例建立 20 μ l 连接体系,使用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 16℃连接过夜。将连接产物全量转化感受态 E. coli DH5 α, 涂布在卡那霉素 LB 培养基平板,培养后挑选 8 个白色菌落,接种于含卡那霉素的 LB 培养基,行菌落 PCR 鉴定(引物为 hBcl-2 上游和 hVEGF<sub>165</sub> 下游)。将 PCR 阳性的用质粒小提试剂盒提取质粒, XhoI、XbaI 双酶切鉴定,并用核酸蛋白定量仪定量。

[0151] 2.2.5 重组穿梭载体质粒 pAd-Track-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 的酶切鉴定

[0152] 重组穿梭载体质粒 pAd-Track-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 经 BglII\SaII、XbaI\EcoRV、XhoI\XbaI、BglIII\EcoRV 四种组合的双酶切鉴定分析。结果如图 8 所示,琼脂糖凝胶电泳见与质粒图谱相符的条带。

[0153] 2.3 重组腺病毒载体质粒的构建和鉴定

[0154] 2.3.1 含有骨架质粒 pAd-Easy-1 的 BJ5183 电穿孔感受态细菌的制备

[0155] 在含氨苄青霉素 LB 平板上划线培养 BJ5183(含有 pAd-Easy-1 质粒)。挑取单个菌落接种 3ml LB 液体培养基,37℃、200rpm 振荡培养过夜。次日,将过夜培养物按 2% 体积接种 100ml LB 液体培养基,37℃、200rpm 振荡培养,至 OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.6。将培养物冰浴 30min,4000rpm 离心 10min 收获菌体。弃去所有上清,用等体积、冰浴冷的 WB 溶液(WB = 10% 甘油,90% 双蒸水,高压灭菌)重悬细菌,4℃、4000rpm,离心 30min。重复上一步骤 2

次。弃去大部分 WB,使剩余体积为原始培养物的 0.5%),重悬,即制备得到含 pAd-Easy-1 的 BJ5183 电转化感受态细胞。每管分装 50  $\mu$  l, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

[0156] 2.3.2 线性化去磷酸化重组穿梭载体质粒

[0157] 将重组穿梭载体质粒用 PmeI 单酶切线性化,50  $\mu$  l 酶切体系:

[0158] pAd-Track-CMV-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 2  $\mu$  g

[0159] 10 $\times$ NEB 缓冲液 4 5  $\mu$  l

[0160] 100 $\times$ BSA 0.5  $\mu$  l

[0161] PmeI 1  $\mu$  l

[0162] 灭菌双蒸水 至 50  $\mu$  l

[0163] 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜,将酶切产物用 CIAP 酶去磷酸化,50  $\mu$  l 反应体系:

[0164] 酶切产物 43  $\mu$  l

[0165] 10 $\times$ CIAP buffer 5  $\mu$  l

[0166] CIAP 2  $\mu$  l

[0167] 50 $^{\circ}$ C 反应 30min,苯酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1) 抽取两次,氯仿/异戊醇 (24 : 1) 抽取一次,添加 5  $\mu$  l 的 3M 的 NaOAc,添加 125  $\mu$  l (2.5 倍) 的冷乙醇,在 -20 $^{\circ}$ C 下保冷 1h,离心分离回收沉淀,用 200  $\mu$  l 70% 的冷乙醇洗净,干燥后用 20  $\mu$  l 的灭菌蒸馏水溶解。用相同方法制备线性化的不带治疗基因的穿梭载体质粒 pAd-Track-CMV-GFP。

[0168] 2.3.3 穿梭载体质粒与骨架质粒的细菌内同源重组

[0169] 取出一管储于 -80 $^{\circ}$ C 的电穿孔感受态 BJ5183 在冰上融化。取 0.4  $\mu$  g 线性化去磷酸化的穿梭载体质粒在 1700V、5ms 条件下电穿孔转化,加入 900  $\mu$  l 不含抗生素的 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 摇菌 1h 后接种含 50mg/L 卡那霉素的 LB 平板,放置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 24h。挑选体积最小的十个白色菌落,接种于 5mL 含卡那霉素 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜。菌落 PCR 初筛 (方法同前)。质粒小提试剂盒提取 PCR 阳性菌液的质粒,测浓度。将候选的阳性质粒用 PacI 初步酶切鉴定,20  $\mu$  l 酶切体系:

[0170] 质粒 1  $\mu$  g

[0171] 10 $\times$ NEB 缓冲液 4 2  $\mu$  l

[0172] 100 $\times$ BSA 0.2  $\mu$  l

[0173] PacI 0.5  $\mu$  l

[0174] 灭菌双蒸水 至 20  $\mu$  l

[0175] 将全量酶切产物琼脂糖凝胶电泳观察。将阳性质粒用氯化钙法转化感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$  扩增 (方法同前)。用去内毒素中量质粒提取试剂盒提取质粒,根据说明书进行:

[0176] a. 取白色菌落,接种于 5mL 的氨苄抗性 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、300rpm 振荡培养 8h;

[0177] b. 取 2mL 菌液按 1 : 100 比例接种于 200mL 的氨苄抗性 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、300rpm 振荡培养 16h;

[0178] c. 紫外分光光度计测菌液 OD 值,通过  $V[m1] = 800/OD_{600}$  计算最适体积;

[0179] d. 4 $^{\circ}$ C、6000g $\times$ 15min 离心,弃上清;

[0180] e. 6mL RES-EF buffer 重悬浮,用移液器吹匀;

[0181] f. 加入 16mL LYS-EF,轻柔摇晃 5 次,室温放置 5min;

- [0182] g. 取出树脂过滤柱, 15mL EQU-EF buffer 湿润柱子 ;
- [0183] h. 加入 16mL NEU-EF buffer, 立即轻柔颠倒 10 次, 摇匀, 冰上放置 5min ;
- [0184] i. 混合液倒进过滤柱, 液体随重力流尽, 5mL FIL-EF buffer 清洗柱子, 流尽后向过滤柱添加 35mL ENDO-EF buffer 清洗, 流尽后添加 15mL WASH-EFbuffer ;
- [0185] j. 流尽后添加 5mL ELU-EF buffer 溶解质粒 DNA, 用 15mL 的离心管收集 ;
- [0186] k. 加入 3.5mL 的异丙醇沉淀质粒 DNA, 充分混合后放置 2min, 4 °C 离心 6000g×30min ;
- [0187] l. 加入 2mL 的 70% 乙醇清洗沉淀, 室温下离心 6000g×5min, 移液器小心吸尽上清, 室温干燥 15min ;
- [0188] m. 100 μ l 去内毒素水重溶沉淀, 进一步 PacI 酶切鉴定 ;
- [0189] 经 PacI 酶切后琼脂糖凝胶电泳, 可观察到一条约 30Kb 的大片段和一条约 4.5Kb 的小片段 (如图 9), 提示穿梭载体质粒和骨架质粒 pAd-Easy-1 在右臂与左臂区发生重组, 重组腺病毒载体质粒构建成功。
- [0190] 得到重组腺病毒载体质粒 (pAd-Easy-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 质粒), 利用核酸蛋白定量仪定量。用相同方法制备不携带治疗基因的对照腺病毒载体质粒 pAd-Easy-GFP。
- [0191] 2.4 重组腺病毒载体质粒在 HEK293 细胞中的包装
- [0192] 2.4.1 转染前 pAd-Easy-hBcl-2-IRES-hVEGF<sub>165</sub> 质粒的准备
- [0193] PacI 酶切质粒, 50 μ l 酶切体系 :
- |  |          |
|--|----------|
| [0194] pAd-Easy-hBcl-2-IRES-hVEGF <sub>165</sub> | 3 μ g    |
| [0195] 10×NEB 缓冲液 4                              | 5 μ l    |
| [0196] 100×BSA                                   | 0.5 μ l  |
| [0197] PacI                                      | 2 μ l    |
| [0198] 灭菌双蒸水                                     | 至 50 μ l |
- [0199] 37°C 酶切过夜, 取 1 μ l 稀释 5 倍后琼脂糖凝胶电泳确定酶切是否完全, 乙醇沉淀法纯化线性化的质粒 (方法同前), 重溶于 20 μ l 灭菌双蒸水。
- [0200] 2.4.2 包装细胞 HEK293 细胞的准备
- [0201] 取出液氮中保存的 HEK293 细胞, 迅速放入 37°C 的恒温水浴中, 并剧烈摇晃, 使其尽快融化, 超净工作台内将细胞液转移至 15mL 离心管中, 1000rpm 离心 5min, 细胞培养液重悬浮, 并转移至 T-25 细胞培养瓶中, 补充培养液至 5mL, 置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养, 次日更换培养液, 继续培养, 观察生长情况。待细胞长至丰度约 80% 时弃去旧培养液, 加入 0.5mL 37°C 预热的胰蛋白酶消化液 (0.25%) 消化细胞, 倒置显微镜下观察细胞形态, 待大部分细胞变圆、细胞之间不再连接成片时倒去消化液, 加入新鲜的培养液, 用滴管将已经消化细胞吹打成单细胞悬液, 按 1 : 3 比例接种传代, 培养至有数瓶细胞, 挑选状态好、融合度为 50% -70% 的细胞准备 转染。
- [0202] 转染 3 天后在显微镜下观察细胞形态未有明显变化, 荧光显微镜观察到散在的 GFP 表达, 此后可见 GFP 有扩散趋势 ; 第二轮扩增的第 7 天可见大部分细胞变圆、飘起、透光度增加等典型的 CPE 改变 ; 第 10 天几乎全部细胞飘起、葡萄串样的 CPE 改变 (如图 11)。
- [0203] 2.4.3 脂质体转染 HEK293 细胞, 观察荧光的表达和细胞状况
- [0204] 按照 Lipofectamine2000 转染试剂说明书进行转染 :

[0205] a. 将 3  $\mu$ g 线性化的质粒和 15  $\mu$ l 脂质体混合于 500  $\mu$ l 的 Opti-MEMI 培养基, 混合物室温下放置 30min ;

[0206] b. 等待的时候在超净工作台内弃去 HEK293 细胞的培养液, 加入 4mL 的无血清 DMEM 培养液洗净残余的血清, 吸去 DMEM, 添加 2.5mL Opti-MEMI 培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中放置 10min ;

[0207] c. 将混合物加入细胞培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 ;

[0208] d. 6h 后添加 8mL 的无血清的 DMEM 培养液。

[0209] 转染后每天观察细胞变化, 10d-20d 后用无菌细胞刮子刮下细胞, 转移至 15mL 离心管, 4 $^{\circ}$ C 离心 500g $\times$ 10min, 留下 2mL 上清, 移液器吹打重悬浮细胞, -80 $^{\circ}$ C 放置 30min, 37 $^{\circ}$ C 迅速融解, 反复冻融四次裂解细胞以释放病毒, 4 $^{\circ}$ C 离心 500g $\times$ 10min 去除细胞碎片, 将上清 -20 $^{\circ}$ C 保存。取一半体积的腺病毒接种于长至 90% 融合度的 HEK293 细胞, 用含 2% 血清的 DMEM 培养液继续培养, 每日观察 GFP 和细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) : 即细胞变圆、透亮度增加、飘起、呈葡萄串状等。如培养 7d 后未出现 CPE 则按上述办法收获病毒继续接种于 HEK293 细胞。如仍未出现 CPE, 则重新进行转染。

[0210] 2.4.4 获取重组腺病毒载体

[0211] 继续接种病毒原液于 HEK293 细胞直至 3d 内能出现明显 CPE, 收获细胞, 取 10% 混合液反复冻融用于继续接种扩增病毒, 其余则保存于 -80 $^{\circ}$ C 作为原代重组腺病毒载体备用。以相同方法制备对照腺病毒 Ad-GFP。

[0212] 2.4.5 重组腺病毒载体 DNA 的 PCR 鉴定

[0213] 分别取重组腺病毒载体 Ad-hBcl-2-hVEGF<sub>165</sub> 上清 50  $\mu$ l 于 EP 管中, 加入 20mg/mL 蛋白酶 K 2  $\mu$ l, 置于 56 $^{\circ}$ C 反应 1h, 沸水浴 10min, 离心 13000rpm $\times$ 10min 后, 取 2  $\mu$ l 为 DNA 模板行 hBcl-2 和 hVEGF<sub>165</sub> 的 PCR 反应 (引物、反应体系和反应条件同前), 以 Ad-GFP 病毒上清为阴性对照。

[0214] 成功提取重组腺病毒的 DNA, 以其为模板的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳可见 734bp 的 hBcl-2 片段和 595bp 的 hVEGF<sub>165</sub> 片段 (图 11), 证明重组腺病毒的 DNA 中带有 hBcl-2 序列和 hVEGF<sub>165</sub> 序列。

[0215] 2.5 重组腺病毒载体的扩增和纯化

[0216] 按照 GENMED 少量腺病毒沉淀法纯化试剂盒说明书进行 :

[0217] a. 将 HEK293 细胞接种于 5 个 T-75 的细胞培养瓶培养, 直至达到 90% 的细胞融合时倒去培养液, 并用无血清的 DMEM 洗去残存的血清 ;

[0218] b. 取一管保存的病毒原液分 5 份加入 5 瓶 HEK293 细胞, 十字形缓慢摇晃培养瓶使病毒原液分布均匀, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2h, 每个培养瓶再加入 15mL 含 2% 血清的 DMEM 培养液后继续培养 ;

[0219] c. 感染后 72h 或直至出现 CPE 和 50% 的细胞脱落时用无菌细胞刮子刮下所有培养瓶的细胞, 连同培养液合并转移至 50mL 离心管, 4 $^{\circ}$ C 离心 500g $\times$ 10min, 小心弃去上清 ;

[0220] d. 加入 1mL GENMED 裂解液, 涡旋振荡 30s, 室温下放置 5min ;

[0221] e. 加入 100  $\mu$ l GENMED 沉淀液, 涡旋振荡 60s, 移取 500  $\mu$ l 混合液到 GENMED 过滤柱 ;

[0222] f. 4 $^{\circ}$ C 离心 500g $\times$ 2min, 弃去过滤柱 ;

[0223] g. 继续移取剩余的 500  $\mu$ l 混合液到新的过滤柱, 4 $^{\circ}$ C 离心 500g $\times$ 2min, 弃去过滤柱;

[0224] h. 分别加入 100  $\mu$ l GENMED 保存液, 混匀, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

## [0225] 2.5 重组腺病毒载体的滴度测定

[0226] 将 HEK293 细胞接种于 96 孔培养板中, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养至细胞融合度为 80%; 将待测腺病毒原液用维持液 (含 2% FBS 的 DMEM) 作 1 : 10 倍比稀释; 弃去 96 孔板中的培养液, 接种稀释好的病毒液, 每个稀释度接种 6 个孔, 100  $\mu$ l/孔; 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24h; 在荧光显微镜下计数每个孔中的荧光数, 一个发光的细胞为一个表达单位, 按下列公式计算病毒滴度: 病毒滴度 (pfu/mL) = GFP 阳性细胞数  $\times$  病毒稀释倍数 / 0.1mL。

[0227] 经四轮扩增和最终纯化后重组腺病毒载体滴度为 5 $\times$ 10<sup>9</sup>pfu/mL。

## [0228] 序列表

[0229] <110> 广州医学院第二附属医院

[0230] <120> 人 Bcl-2 和人 VEGF<sub>165</sub> 双基因共表达重组载体及其构建方法

[0231] <160>1

[0232] <210>1

[0233] <211>720

[0234] <212>DNA

[0235] <213>人工序列

[0236] <220>

[0237] <223> 人 Bcl-2 基因, 利用该基因和人 VEGF<sub>165</sub> 基因共表达构建重组腺病毒载体, 应用在心肌梗死的基因治疗和细胞移植研究领域。

[0238] <400>1

[0239] atggcgcacg ctgggagaac ggggtacgat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat 60

[0240] tataagctgt cgcagagggg ctacgagtg gatgcgggag atgtgggcgc cgcgcccccg 120

[0241] ggggccgccc ccgcaccggg catcttctcc tcccagcccc ggcacacgcc ccattccagcc 180

[0242] gcatcccggg acccggtcgc caggacctcg ccgctgcaga ccccggctgc ccccggcgcc 240

[0243] gccgcggggc ctgcgctcag cccggtgcc cctgtggtcc acctgacct ccgccaggcc 300

[0244] ggcgacgact tctcccgcgc ctaccgccc gacttcgcc agatgtccag ccagctgcac 360

[0245] ctgacgccct tcaccgcgcg gggacgcttt gccacggtgg tggaggagct cttcaggggac 420

[0246] ggggtgaact gggggaggat tgtggccttc tttgagtcc gtggggatcat gtgtgtggag 480

[0247] agcgtcaacc gggagatgtc gccctggtg gacaacatcg ccctgtggat gactgagtac 540

[0248] ctgaaccggc acctgcacac ctggatccag gataacggag gctgggatgc ctttgtggaa 600

[0249] ctgtacggcc ccagcatgcg gcctctgttt gatttctcct ggctgtctct gaagactctg 660

[0250] ctcagtttgg ccctggtggg agcttgcatc accctgggtg cctatctgag ccacaagtga 720

[0251] <210>2

[0252] <211>576

[0253] <212>DNA

[0254] <213>人工序列

[0255] <220>

[0256] <223> 人 VEGF<sub>165</sub> 基因, 利用该基因和人 Bcl-2 基因共表达构建重组腺病毒载体, 应用在心肌梗死的基因治疗和细胞移植研究领域。

[0257] <400>2

[0258] atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgctt tgctgctcta cctccacat 60

[0259] gccaaagtgt cccaggctgc acctatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120

[0260] gtgaagttca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac 180

[0261] atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240

[0262] atgcatgacg ggggctgctg caatgacgag ggccctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc 300

[0263] aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctaccaag gccagcacat aggagagatg 360

[0264] agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420

[0265] aatccctgtg ggcccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg 480

[0266] tgtaaagtgt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac 540

[0267] gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cggatga 576

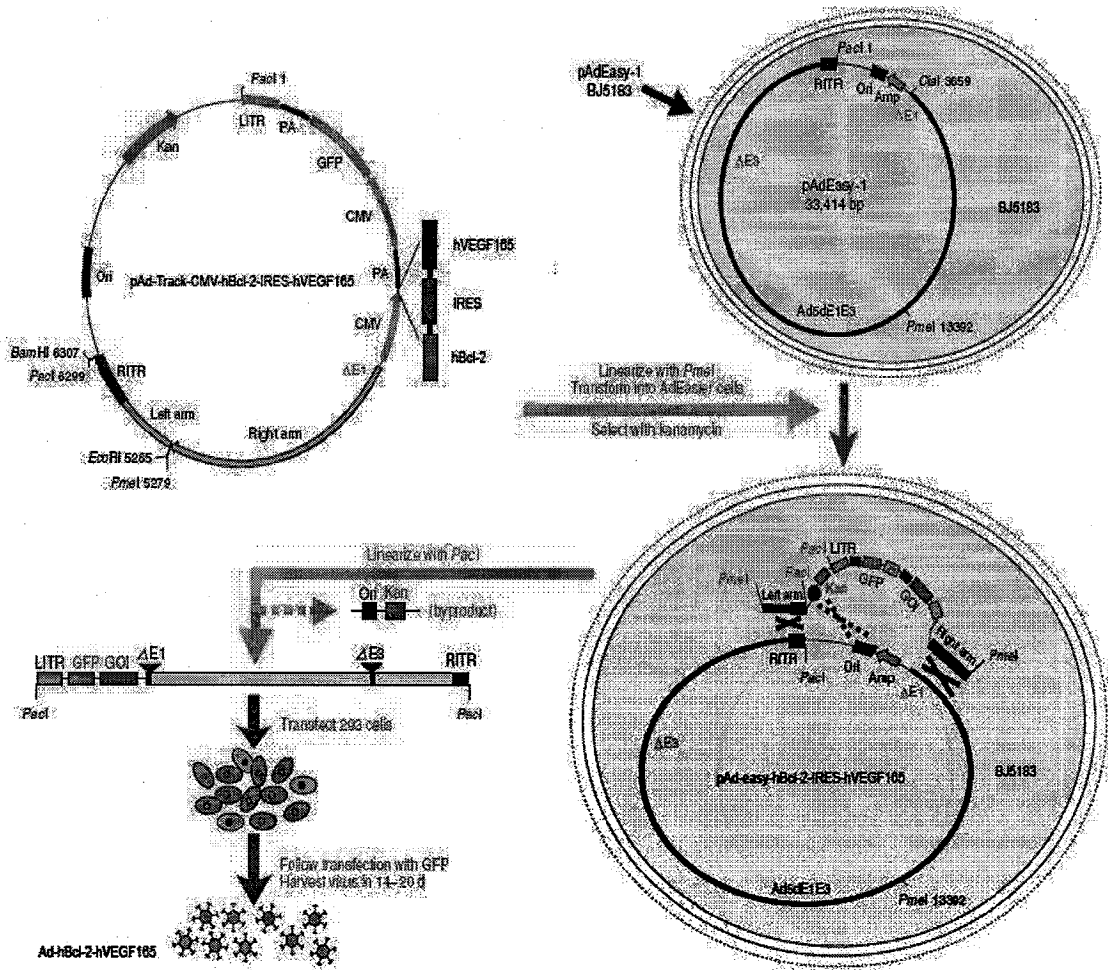


图 1

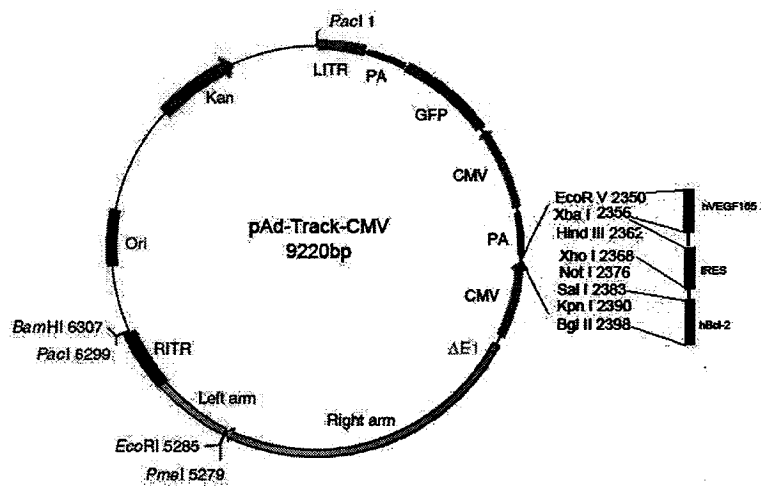


图 2



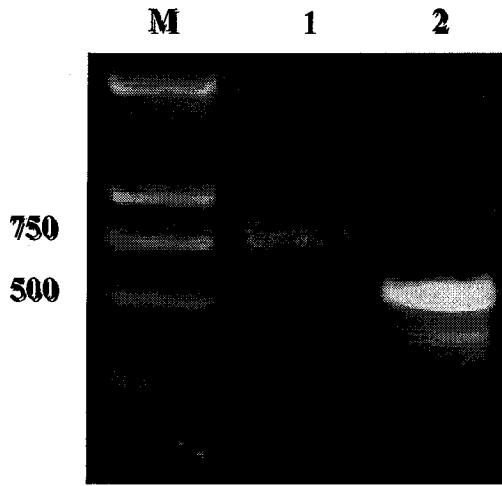


图 3

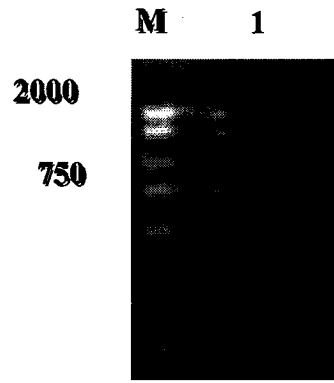


图 4

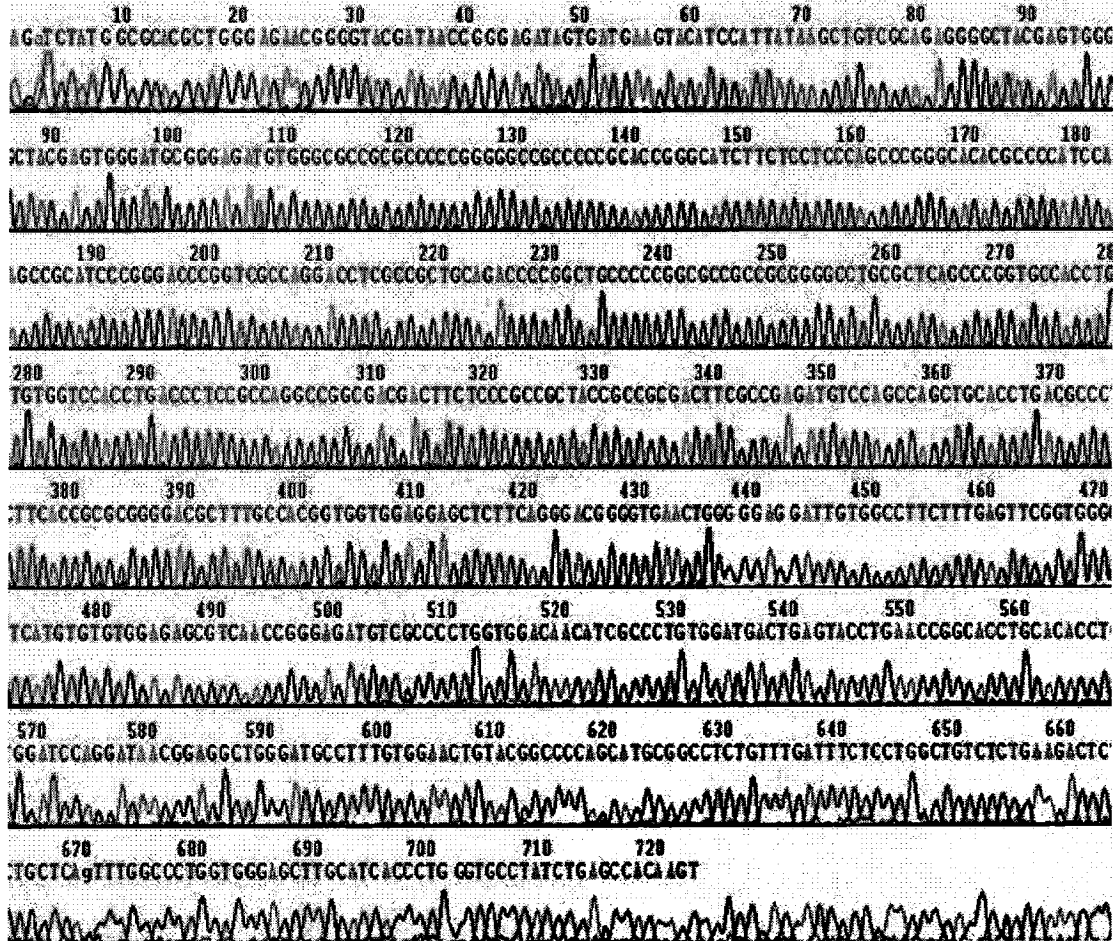


图 5

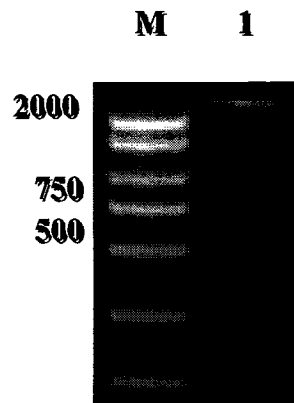


图 6

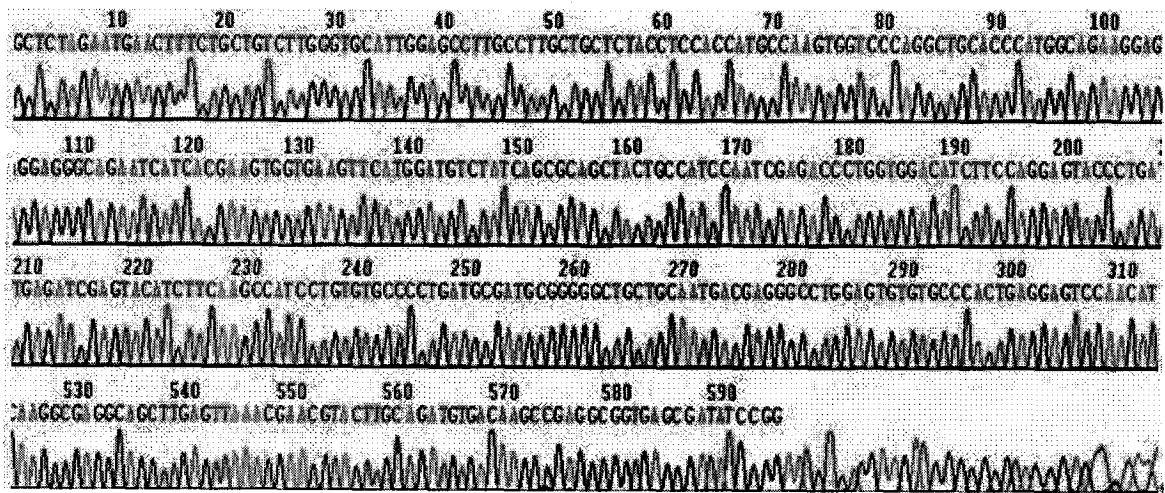


图 7

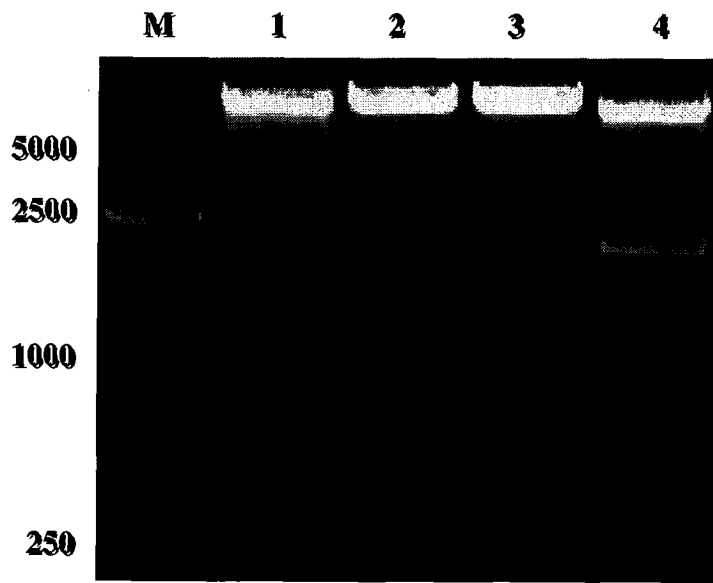


图 8

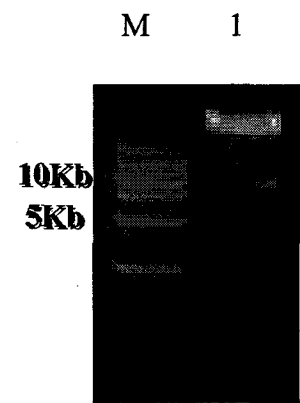


图 9

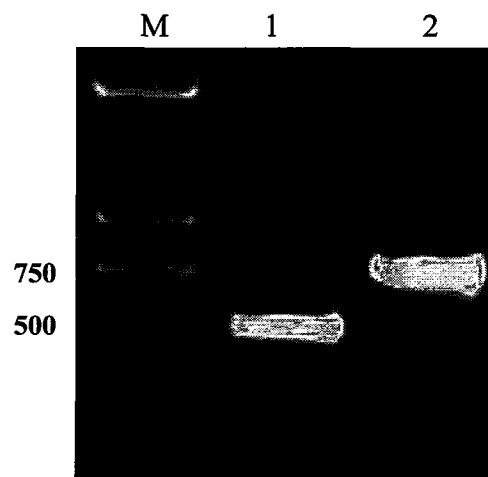


图 10

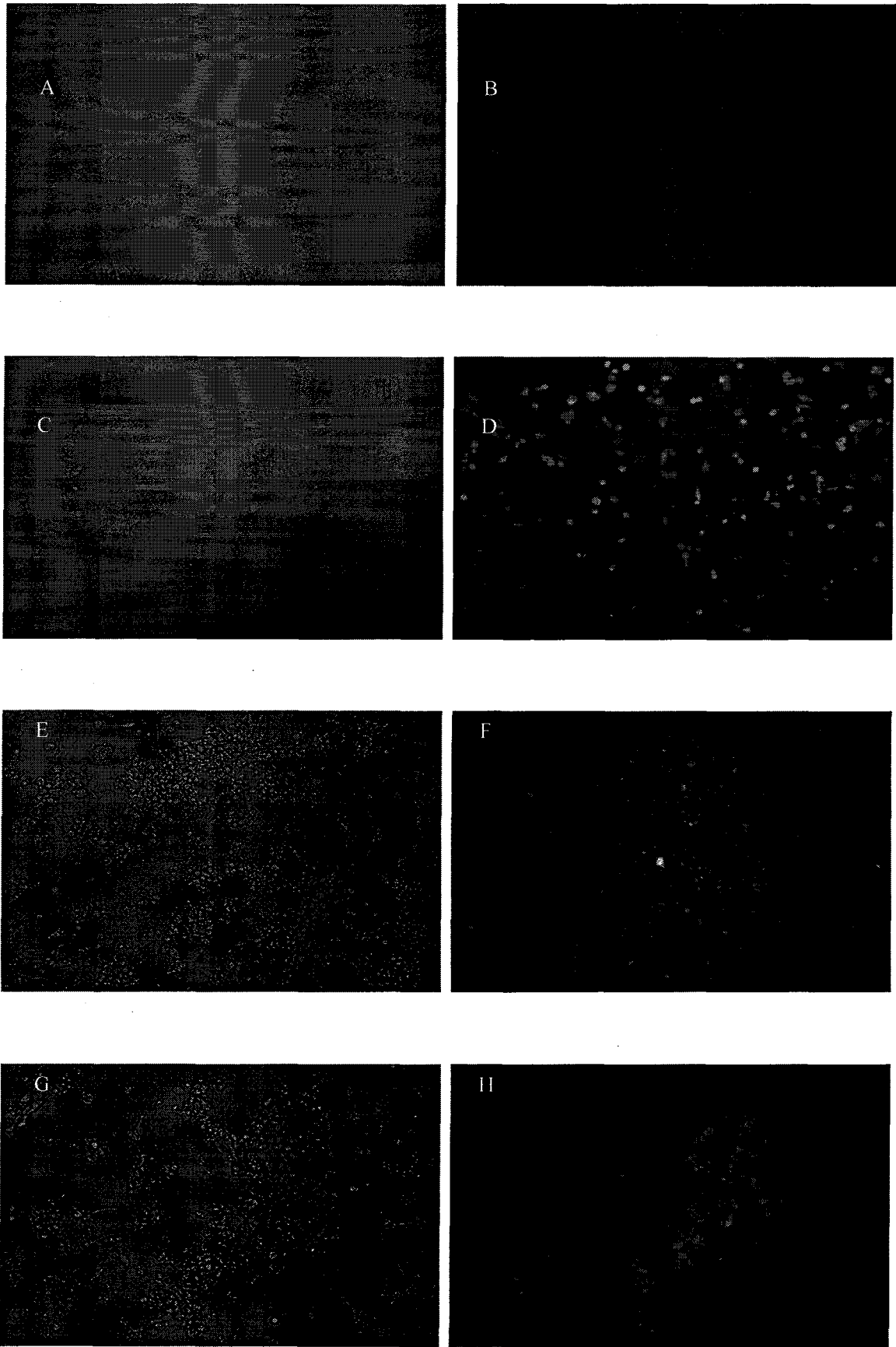


图 11