

大肠杆菌-长双歧杆菌穿梭载体的构建及 PTEN 在长双歧杆菌中的表达

侯 鑫,刘俊娥

(内蒙古大学生命科学学院 呼和浩特 010021)

摘 要:长双歧杆菌可特异地定植于实体瘤低氧区,可用做肿瘤靶向性基因治疗的载体,而构建大肠杆菌-长双歧杆菌穿梭质粒则被证明是外源基因在长双歧杆菌中稳定表达的有效途径。为了构建能在长双歧杆菌中稳定表达外源基因的穿梭质粒并检测携带抑癌基因的工程菌对小鼠实体瘤的抑制效果,利用软件设计并合成了 48 条部分序列相互重叠的引物,通过 PCR 合成了长双歧杆菌质粒 pMB1 序列及长双歧杆菌 HU 启动子区序列,插入克隆载体 pMD18-T,构建穿梭载体 pMB-HU,该载体可在大肠杆菌 DH5 α 及长双歧杆菌 LI7 中稳定复制。PTEN 基因编码具有蛋白质和酯类双重特异性磷酸酶活性的抑癌因子。将 PTEN 基因 cDNA 序列插入载体 pMB-HU 中 HU 启动子下游,构建重组质粒 pMB-HU-PTEN,电击转化长双歧杆菌后,Western blot 检测表明,表达产物中存在 55kDa 的 PTEN 蛋白特异条带。抑癌试验表明:与对照组相比,携带 PTEN 基因的长双歧杆菌可显著抑制小鼠实体瘤的生长。上述结果为以长双歧杆菌为载体的实体瘤靶向性基因治疗研究奠定了基础。

关键词:大肠杆菌-长双歧杆菌穿梭载体;HU 启动子;pMB1;PTEN 基因;实体瘤靶向性;基因治疗

中图分类号:Q78 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2006)03-0347-06

实体瘤的靶向治疗是肿瘤基因治疗中遇到的难题,近年的研究表明:双歧杆菌可特异地在实体瘤的低氧区内定植和繁殖,具有良好的肿瘤靶向性^[1,2]。由于双歧杆菌是人类肠道内的正常益生菌群,该菌是人体肠道内的生物学屏障,不仅可以合成多种维生素、控制内毒素血症、抑制腐败细菌在肠道中腐化、抗感染及预防腹泻等,而且具有一定的抗肿瘤和预防癌变的功能,对维持人体健康具有重要作用,因此利用基因工程技术改造双歧杆菌使其应用于实体瘤靶向治疗的研究成为热点。国外学者已经从各种双歧杆菌中分离到多个质粒^[3~6],但文献报道中应用于双歧杆菌基因工程研究的多为 pMB1^[4,7]和 pTB6^[8],国内学者用大肠杆菌表达载体构建的双歧杆菌基因工程菌株虽已表达了外源基因^[9,10],但质粒复制和基因表达的稳定性难以保证。目前,合成寡核苷酸引物的成本下降,利用多条相互重叠的引物通过 PCR 法合成全基因已有成功的报道^[11]。为了获得在双歧杆菌基因工程研究和生产中具有长期、广泛应用价值的表达载体,同时避开从双歧杆菌中分离、鉴定、分析和改造质粒的繁琐过程,本研究通过 PCR 法合成已完成序列分析的双歧杆菌质粒

pMB1(GenBank 登记号:X84655)^[4],与大肠杆菌克隆载体 pMD18-T 连接,并加入 HU 启动子^[12],构建了大肠杆菌-长双歧杆菌穿梭载体。据报道 HU 启动子可使双歧杆菌中编码自身类组蛋白的基因高效表达^[12]。

PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10)基因是 1997 年克隆得到的定位于人类染色体 10q23.3 的抑癌基因,编码 403 个氨基酸,蛋白大小约 55kDa。PTEN 蛋白是具有蛋白质和酯类双重特异性磷酸酶活性的抑癌因子^[13],具有多种生物学功能:可催化第二信使分子 3',4',5'-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)去磷酸化,从而拮抗 Akt/PKB 信号传导通路,诱导细胞周期停滞^[14];可增加 p53 蛋白的稳定性^[15],能与细胞外基质发生相互作用而抑制细胞的迁移^[16]并可抑制实体瘤内微血管的形成^[17]。本研究将已在大肠杆菌中成功表达的 PTEN 基因^[18,19]构建到上述表达载体中并在双歧杆菌中获得表达,证实了该载体可以有效表达外源基因,且携带 PTEN 基因的长双歧杆菌可显著抑制小鼠实体瘤的生长,为该系统在肿瘤靶向性基因治疗中的应用打下了良好的基础。

基金项目:内蒙古教育厅重点研究项目(NJ02005)

作者简介:侯鑫(1976-),男,山东郓城人,讲师,博士研究生,研究方向为肿瘤基因治疗。Tel:86-471-4991483;Fax:86-471-4992442;E-mail:houxin2005@263.net

收稿日期:2005-08-12,接受日期:2005-09-14,修回日期:2005-11-24

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由本室保存, 含 PTEN cDNA 的质粒 pMD-PTEN^[18] 及含有 PTEN 原核表达载体的工程菌 BL21(DE3) pET-PTEN 为本室构建和保存, 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) L17 由本室分离、鉴定并保存, 克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌 DH5 α 采用常规液体和固体 LB 培养基培养。长双歧杆菌采用改良 MRS 培养基, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂)。

1.1.2 酶和试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Pyrobest* DNA 聚合酶、 λ DNA/*Eco*T 14 Marker、dNTP 和胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司, 质粒提取试剂盒 QIAprep Spin 为 Qiagen 公司产品, 溶菌酶、蛋白质分子量标记为上海 Sangon 公司产品, PTEN 多克隆抗体(兔源)购自福州迈新公司, HRP 标记羊抗兔二抗购自 Novagen 公司, 氨苄青霉素为 Amresco 公司产品, 硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品, 其它试剂为国产分析纯。实验动物 6~8 周龄昆明鼠由内蒙古大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(蒙)2002-0001, 肝癌实体瘤小鼠由内蒙古医学院实验动物中心提供, 实验用实体瘤小鼠由本室制作。引物合成与 DNA 测序由上海 Sangon 公司完成。

1.2 寡聚核苷酸引物的设计及合成

拟合成的 DNA 片段命名为 MH, 全长 1881bp, 包括 3 部分: 第一部分为质粒 pMB1 序列, 共 1742bp, 去掉了不影响其复制的第 1~105 个碱基^[41]; 第二部分为长双歧杆菌中 *hupX* (类组蛋白) 基因起始密码子及其上游的 113bp 序列, 其中包含 HU 启动子^[12]; 第三部分为方便载体构建和验证的 4 个酶切位点及 2 个附加碱基, 其序列为 5'-CATATGGAATTCGGATCCCTCGAGCG-3' (26bp)。共设计和合成了 48 条引物, 引物长 45~61nt, 相邻两条引物间重叠约 15~21nt, 参照 Oligo 6.0 软件分析结果, 尽量避免引物二聚体和发夹结构, 引物序列见表 1。

1.3 MH 的 PCR 合成及大肠杆菌-长双歧杆菌穿梭质粒 pMB-HU 的构建

MH 的合成按以下方案进行: 先利用引物 1~引物 16 进行 PCR 扩增, 合成 650bp 的片段 MH1, 反应体系 (50 μ L) 如下: 10 \times *Pyrobest* Buffer 5 μ L; dNTP (10mmol/L each) 1 μ L; 引物 1 和引物 16 (10 μ mol/L) 各 1 μ L; 引物 2 和引物 15 (5 μ mol/L) 各 1 μ L; 引物 3 和引

物 14 (2.5 μ mol/L) 各 1 μ L; 引物 4~引物 13 (1.25 μ mol/L) 各 1 μ L; *Pyrobest* DNA 聚合酶 (5U/ μ L) 1 μ L; 补加 27 μ L ddH₂O。同理利用引物 17~引物 32 及引物 33~引物 48 分别进行 PCR, 合成 664bp 的片段 MH2 和 612bp 的片段 MH3, 反应体系同上。PCR 反应条件都为 94 $^{\circ}$ C 40s, 50 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

将上述 3 种 PCR 产物电泳后切胶回收纯化, 分别与克隆载体 pMD18-T 连接, 经酶切、PCR 初步检测后, 各挑取 3 个克隆测序。序列完全正确的质粒分别命名为 pMD-MH1、pMD-MH2 和 pMD-MH3。

利用引物 1 和 16、17 和 32 及 33 和 48, 分别以 pMD-MH1、pMD-MH2 和 pMD-MH3 为模板进行 PCR, 扩增出 MH1、MH2 和 MH3 3 个片段, 切胶回收纯化后按以下体系进行 PCR: 10 \times *Pyrobest* Buffer 5 μ L; dNTP (各 10mmol/L) 1 μ L; 引物 1 和引物 16 (10 μ mol/L) 各 1 μ L; 3 种纯化产物 (2.5 μ mol/L) 各 1 μ L, *Pyrobest* DNA 聚合酶 (5U/ μ L) 1 μ L; 补加 38 μ L ddH₂O。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 60s, 52 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 3min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物切胶回收纯化, 与克隆载体 pMD18-T 连接, 经酶切、PCR 检测后, 挑取 5 个克隆测序。

1.4 穿梭质粒 pMB-HU 转化大肠杆菌和长双歧杆菌

常规 CaCl₂ 法制备感受态大肠杆菌 DH5 α , 穿梭质粒 pMB-HU 转化大肠杆菌 DH5 α 后用氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 筛选。长双歧杆菌 L17 于 MRS 液体培养基中培养至对数中期, 取 40mL 菌液, 4 $^{\circ}$ C 收集菌体, 用预冷 10% 甘油洗涤 3 次, 400 μ L 预冷 10% 甘油重悬后, 取 50 μ L (1.0 \times 10⁸ ~ 2.0 \times 10⁸ CFU) 与 5 μ L 质粒 (1.0 ~ 1.5 μ g) 混合, 移入预冷的电击杯中冰浴 5min, 用电击仪 (Bio-Rad, USA) 转化, 条件: 2.0kV, 25 μ F, 200 Ω , 脉冲间隔 4.5ms, 处理后立即加入 1mL MRS 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 5h, 涂布于含氨苄青霉素 (30 μ g/mL) 的 MRS 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 72h, 未转化的长双歧杆菌为对照。

1.5 质粒提取及质粒稳定性检测

参照试剂盒说明书, 用 QIAprep Spin 试剂盒从大肠杆菌 DH5 α 中提取质粒。从长双歧杆菌 L17 中提取质粒也使用该试剂盒, 但在重悬菌体后加入终浓度为 30mg/mL 的溶菌酶, 37 $^{\circ}$ C 保温 40min, 其余操作参照说明书进行。

穿梭质粒 pMB-HU 转化大肠杆菌和长双歧杆菌 L17 后的阳性克隆各传代 25 次, 每个阳性克隆分为 2 组, 一组不加氨苄青霉素, 另一组加氨苄青霉素。

浓度同 1.4。每组每代各取 15 个阳性克隆提取质粒,经 PCR 和酶切检查其完整性,对于长双歧杆菌 L17 每代均镜检鉴定。将 L17 中提取的质粒再次电击转化长双歧杆菌,方法同上,阳性克隆再传代 10 次,按照上述方法提取质粒并检查其完整性。

表 1 48 条相互重叠的寡聚核苷酸引物序列

Table 1 The sequences of 48 long oligonucleotide primers with mutual overlaps

No.	Long oligonucleotide sequences(5' - 3')
1	CITAGCCGACCGAAGGCA TCCGCTTCATGCTGCGCACITCCGCTTCGG TC
2	GTAGGCGACAGCCAGTTCGGGCTGGTTTAGGACAGAA GAAGGGTTACCGCG
3	CTTCCCAATGGGCG CCGGGGCTCAGCTCGGGAACCGGACGGGAGCGCGAGC
4	GTCCCTCGGCTCGCGAGTCTCGGAGTCTTTTCAGCCACITACCGGAGGTTGC
5	GAGTGGCTTCACCGCGAAGACAGTTCAGGAGCGCTCCGCAATGCTGACCGCG
6	CGTATGCACITCGCG CACCCTTTGCGGACITTCGGGACGTTGGGAAAAGACCG
7	ACCGGCTTTTTCGTCAGGATCTCTCGGCTGGTTCAGCCGAAGCTTCCGTCGGC
8	CTGGGAAGGACCGGACTTTTATAGACITGAACCAAGGGCG AFAACAAGTGCATC
9	TNTTGTTCACITGAC AAATAGCATGTCATGCTGATGCGAT GTCCGATGAGTTC
10	CAGCTATCTATAAG CCTCGGCTCGGAACITGCACAGCGCTGCAAGCTTCGGAC
11	ACCTTGAAGGCTGCTGGCTCGCGAAGCGGCGCTCTCTCGGACGACGACTACT
12	CGCTGCTCTGATGA GGGCGAAGTGGGCTCTCTGGCGGGCTGGGCGAGTTAC
13	CGAGCGCTCAATC CAAGCAGATGAGCGGAACCGCGCGCTGCTGTAACAAG
14	CGGACACACTCTGCTAGCAGCAGCTGATGCTGCTGGCTTGGGTTCCGCTAC
15	ACGCCAAGGGATGG CCGCTGGGACGACGAGGGCATGGCGCGAAGCTGGATCC
16	GGGCTGACCTAGCG CCTCTTGGGGCGGTTGGCGGTGGGAGTGGCGGACCCAC
17	CAGGCTACGCGGGCTGGGCTGCTACCTTTTGGCTGGCGAGAAGGATTCGGCGCTC
18	TAGACCGCGCAGAG TCCGCAACTTCAGGACCTTCGGGCTGGCTGGCTGACCG
19	CAGGAGGACTCGCGCGCTCTCTCGGAGGGGACATGGCTTATTCGGGACTTCTC
20	ATAGGCTTGAAGAC TACTCTTGGGGCTCTGAGGGCGCA CCGGACCGCTGACT
21	GGGGTGGGACATCA TCGAGTGGACACCTTCGAGCTTGA ACAGCTCTGTCAGTC
22	TCTGAGCAGCTGACG GAGGCTCTCTGCGCCCTGATGCGCGGCGGACITGACCTTC
23	CGGCTCAGCTGGAAGCGCAACGGCGCGGCGGACGCGAGGGCTGGGACGCAACT
24	CGGACCTTGGCTTGAAGTGGGAAAGCTCTTGGGGCTGGGAGGATGGGAT
25	GCTGGCTAGCGCTA CGTTGGGGCGCTCGGACGCTTTCGAGGCGACCGAGCGAG
26	CTCGGCTGCTGCTCG TAAGCGCGATATGTCAGCGAGGCT CGACCGCTCTGACT
27	CTTCCAGCACTCAAGCTCTGCTCTTCCGCAATCGCTCGACCGGGCTGAGCT
28	CTTGGGCGACTTCAAGCTCTGAGGGCTTCTGCTGAGCT GTTATCTAGCAGTGC
29	CAATGGATGCTCAC CGCAGCGCATGCTGGGGGAGCGCTG CATTCGCAAGCGC
30	CGTAAAGCTTGGCTG CGTCTGATGAGCGGATGCTGAGCG TCGTCTGCTGTTT
31	ACGAGGACAAACACCGCTGAGAACAATATCAGCAGCTC ATGAAGGAGCGACTC
32	TACTTCTCTGCTGAC CTTACATCTCTGCTGAAA CTCTCTCTCTGGGGCCACAG
33	GAGGAGGAGCGCGCGGCTGCTGCAAGTCAATGCTAAGCAATC GCGCTCTCAAGCGC
34	CGGACAGGCTGGCGCTGTAAGCTCTGAGCGCGCTTACTT CCGCGCTCAAGCT
35	CGGGACGATTTGGATGATGAACAAGCGGCTTATGGGGA AGCAGCTGGCTATA
36	TGCTCAGCGGAGTAT AGTCTACTCTCTCGGCTTATGATAC GCGGCTGGGGGCTC
37	CGGACAGCGCGGAGCATTTTCAAGATGAGCGAGGCTGGCG TGGCTCAAGCGCTC
38	ACGAGTTGGGACGATCTTCGAGGCTCTCTGCGGCTCTGCTCGCGCGGCTCTTTAG
39	GGGGGGGAGAAATC GAAGCATCTACCGGGGAGATTC CACTGTGACITGAGC
40	GTCACAAGCTGACITGGATTTTCAAGAGGCTTTGGCTTTCGGTCTGAGGCGAG
41	CGCAGCACTTCCCTGGCTTTCCTCTTCTCATCGGCTCTGGGACITC
42	CGCGAAGCGCTGAGCGCAACAGGAGGCTGGCGGCTTCGGCGCGGCTTCGG
43	CAGGGCGCGGAGGCTGGGGCTGGGATGCTATTA CAATCGCTTACGCTTC
44	GTTAGCCAGATCGAAC GAATGGAAGCTAAACTACTACA CTTTTCGGAATTTT
45	GAATAAGCTTATAAA ACGGGGCTTTTTCGCAACAACATGGCGTACT
46	CTTCTGACGGATCA TAGTAACATGCTTT GACCTGATGCTTTTC
47	CATGACTAAGCAAAG TCGTTTTCGGCTGACCGCAAGAAGGATCC
48	CTGGGCTTCTGACG AAATAGCATTAACCTTAAGCTTACGGAGCTTCGC

Note: underlined letters at 5' and 3' end of all primers (3' for No. 1 primer and 5' for No. 48 primer) indicate the part of mutual overlaps between primers, and the bold underlined letters at No. 16, No. 17, No. 32 and No. 33 indicate the longer mutual overlaps between primers.

1.6 表达载体 pMB-HU-PTEN 的构建

含有 PTEN 基因 cDNA 的质粒 pMD-PTEN1 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,切胶回收 1.2kb 的片段 (PTEN 基因 cDNA),与经相同酶切并纯化的质粒 pMB-HU 过夜连接,转化大肠杆菌 DH5 α 后用氨苄青霉素筛选,经 PCR、酶切、测序鉴定阳性克隆,序列正确的质粒命名为 pMB-HU-PTEN。从大肠杆菌中提取质粒转化长双歧杆菌,转化、筛选、鉴定方法同上。

1.7 PTEN 基因在长双歧杆菌中表达产物的 Western blot 检测

含表达载体 pMB-HU-PTEN 的 L17 在含氨苄青霉素 (30 μ g/mL) 的 MRS 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 36~48h, 4000r/min 离心 15min (4 $^{\circ}$ C) 收集菌体,按照文献[20]所述方法裂解菌体,经 SDS-PAGE 分离样品后,湿转法转膜,5% 脱脂奶粉过夜封闭,一抗(兔源 PTEN 蛋白多克隆抗体,1:1500)4 $^{\circ}$ C 孵育 2h,洗膜 3 次;二抗(羊抗兔 IgG,HRP 标记,1:3000)室温孵育 90min,洗膜 3 次,DAB 显色。以未转质粒和转化穿梭质粒 pMB-HU 的长双歧杆菌为阴性对照,以本室构建的含有 PTEN 原核表达载体的工程菌 BL21 (DE3) pET-PTEN 的诱导产物为阳性对照。

1.8 实体瘤小鼠制作及转 PTEN 基因长双歧杆菌抑癌效果检测

取肿瘤生长旺盛的肝癌荷瘤小鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下取出瘤块,仔细切碎组织,制成单细胞悬液,每只小鼠右前肢皮下注射癌细胞悬液 0.5mL (浓度约 2×10^7 /mL),小鼠第 5~7d 成瘤。于第 10d 将小鼠随机分为 3 组,每组 20 只。阴性对照组小鼠尾静脉注射 0.4mL PBS 溶液,第 10d、15d、20d 各注射 1 次。实验组分为 L17 和 L17/pMB-HU-PTEN 组,将经 PBS 洗涤 3 次的 L17 和 L17/pMB-HU-PTEN 以 PBS 调节活菌浓度为 2.0×10^9 /mL,每只小鼠尾静脉注射 0.4mL,注射时间同阴性对照组。第 21d 颈椎脱臼处死小鼠,解剖剥离瘤块,称瘤重。按公式计算抑瘤率:抑瘤率 = (对照组瘤重 - 实验组瘤重) / 对照组瘤重 $\times 100\%$ 统计学处理采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 穿梭质粒 pMB-HU 的构建及转化大肠杆菌和长双歧杆菌

首先通过 PCR 合成 3 个片段 MH1、MH2 和 MH3,其大小分别为 650bp、664bp 和 612bp,克隆后筛选出阳性质粒 pMD-MH1、pMD-MH2 和 pMD-MH3;第二轮 PCR 合成了全长 1881bp 的序列,其中含双歧

杆菌质粒 pMB1、HU 启动子及设计的酶切位点,经纯化后与克隆载体 pMD 18-T 连接。测序结果表明,5 个克隆中有 2 个序列完全正确的阳性克隆,其中 1 个为合成序列的正向插入,命名为 pMB-HU。以上操作均以大肠杆菌 DH5 α 为宿主,氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 筛选。提取质粒 pMB-HU 后,电击转化长双歧杆菌 L17,在氨苄青霉素工作浓度为 30 μ g/mL 时可有效筛选出阳性克隆,未转化质粒的对照组长双歧杆菌在含有氨苄青霉素 (30 μ g/mL) 的 MRS 培养基上培养 72h 未见菌落形成。

2.2 穿梭质粒 pMB-HU 的稳定性

将穿梭质粒 pMB-HU 转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选出的 15 个阳性克隆传代 25 次并提取质粒,经 PCR 和酶切鉴定结果表明,加氨苄青霉素传代的克隆中,质粒可稳定复制和传代,序列未发生明显突变。未加氨苄青霉素传代的克隆中,每次采用同样的菌量提取质粒,未见杂带或弥散背景出现,质粒的得率在相邻两代之间未见明显差异,但第 25 代提取的质粒得率略小于第 1 代;PCR 和酶切鉴定表明,质粒序列无明显改变。用同样的检测证实在加氨苄青霉素的培养基中,重组质粒 pMB-HU 在长双歧杆菌 L17 中可稳定复制,但同样条件下提取质粒的得率低于 DH5 α ,提示该宿主中质粒拷贝数可能较低。在未加氨苄青霉素的培养基中,转化后的 L17 经传代 25 次以后提取质粒,仍可见清晰均一的条带,质粒大小不变,未见明显序列突变,第 25 代的质粒得率亦略小于第 1 代。将 L17 中提取的质粒再次电击转化长双歧杆菌,阳性克隆在含有和不含氨苄青霉素的培养基中再传代 10 次后提取质粒进行检测,发现质粒仍能稳定复制,质粒得率无明显变化。

2.3 表达载体 pMB-HU-PTEN 的构建

质粒 pMD-PTEN 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后与质粒 pMB-HU 连接,筛选出的阳性克隆中插入片段为 PTEN 基因 cDNA,共 1212bp,序列与已发表的 PTEN 基因序列 (GenBank 登记号:U93051) 相同,命名为 pMB-HU-PTEN。提取该质粒后用电击法转化长双歧杆菌 L17,筛选出阳性克隆。

2.4 PTEN 基因表达产物的 Western blot 检测

将含有质粒 pMB-HU-PTEN 的长双歧杆菌培养 48h 后,裂解菌体,对总蛋白进行 Western blot 检测,获得 1 条分子量大小约为 55kDa 的特异性条带,与 PTEN 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达产物大小相同,而在未转化质粒及转化质粒 pMB-HU 的 L17 菌中未检测到特异条带 (图 1),证实 PTEN 基因

可在长双歧杆菌 L17 中获得表达。含质粒 pMB-HU-PTEN 的 L17 经 5 次传代后进行 Western blot 检测仍能获得特异性条带 (图 1),表明该质粒在 L17 中能稳定复制并可持续表达外源基因。

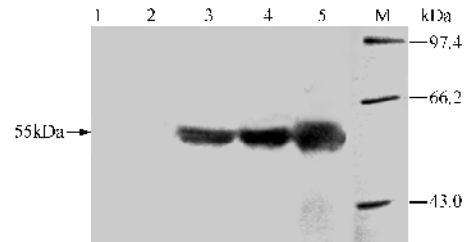


图 1 pMB-HU-PTEN 在双歧杆菌 L17 中诱导产物的 Western blot 检测

Fig.1 Western blot analysis of expressed recombinant protein in L17/pMB-HU-PTEN. 1. Total protein of L17 cultured 48h 2. Total protein of L17/pMB-HU cultured 48h; 3. Total protein of L17/pMB-HU-PTEN cultured 48h 4. Total protein of L17/pMB-HU-PTEN cultured 48h after 5 generations; 5. Total protein of BL21 (DE3) pET-PTEN induced 4h by IPTG; M. Protein molecular weight marker.

2.5 含 PTEN 基因的长双歧杆菌 L17 的抑癌效果

用尾静脉法给荷瘤小鼠注射长双歧杆菌 L17 和工程菌 L17/pMB-HU-PTEN 后,对供试小鼠实体瘤测量结果显示,L17/pMB-HU-PTEN 组小鼠的平均瘤重显著低于 PBS 对照组 ($P < 0.01$),其抑瘤率为 57.55%,而 L17 组抑瘤率为 18.87% (表 2),以上结果表明:虽然长双歧杆菌自身具有一定的实体瘤抑制效果,但表达 PTEN 蛋白的长双歧杆菌工程菌的实体瘤抑制效果有明显提高。本室已有研究表明:大肠杆菌中表达的重组 PTEN 蛋白对小鼠实体瘤和癌细胞生长具有明显的抑制作用 (待发表资料),上述研究结果与此一致。

表 2 转基因长双歧杆菌对小鼠实体瘤的抑制作用

Groups	Average weight of tumor (g)	Inhibitory ratio (%)
PBS control group	6.20 \pm 1.89	-
L17	5.03 \pm 1.53	18.87
L17/pMB-HU-PTEN	2.76 \pm 1.37*	57.55*

* $P < 0.01$, compared with PBS control group.

3 讨论

双歧杆菌用于肿瘤的靶向性基因治疗最近受到了研究者的关注,但实现这一目标的前提是携带抑癌基因的质粒能在双歧杆菌中稳定复制,目前采取的解决方案是:利用从长双歧杆菌中分离到的质粒和大肠杆菌中成熟的载体构建含有双歧杆菌复制起始序列的穿梭质粒^[7]。但由于双歧杆菌中的质粒遗

传背景并不十分清晰,因此研究中常将质粒全序列克隆到大肠杆菌的克隆载体中^[7,8]。鉴于从双歧杆菌中分离质粒的难度较大,质粒的序列分析和关键复制元件的定位工作量大^[3-6],而 PCR 合成(或改造)基因的方法使用灵活、操作简便、耗费低,适用于合成较短的序列^[11],因此本研究设计了 48 条部分序列相互重叠的引物,经 PCR 合成了长双歧杆菌质粒 pMB1,该质粒已被成功应用于穿梭质粒的构建^[4,7]。研究证实构建的穿梭质粒 pMB-HU 可在大肠杆菌和长双歧杆菌中稳定复制,该质粒在长双歧杆菌中的拷贝数低于在大肠杆菌中的拷贝数,这可能与 pMB1 自身的复制元件有关,本文暂未做进一步讨论。

为了改善外源基因在长双歧杆菌中的表达效率,应考虑使用长双歧杆菌自身的表达元件。本研究在质粒 pMB-HU 中加入了 HU 启动子区序列,该启动子来源于长双歧杆菌自身,可使其下游编码类组蛋白的基因有效表达,已被成功应用于构建穿梭载体的研究工作中^[8]。本室已经实现了抑癌基因 PTEN 在大肠杆菌中的高效表达^[18],并获得了有一定生物学活性的重组蛋白(待发表资料)。本研究将 PTEN 基因 cDNA 序列插入 HU 启动子元件下游,获得了能稳定、有效地表达抑癌基因的长双歧杆菌菌株。虽然长双歧杆菌在实体瘤厌氧区的靶向性定植本身会对实体瘤生长产生一定的抑制效应^[9],但本文的抑癌实验表明,表达 PTEN 蛋白的长双歧杆菌对小鼠实体瘤生长具有明显的抑制作用,这不仅为外源基因在双歧杆菌中的表达作了有益的探索,而且为基于双歧杆菌的肿瘤靶向性基因治疗奠定了应用基础。

参 考 文 献

- [1] Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, et al. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, **66**(2): 165 - 170.
- [2] Yazawa K, Fujimori M, Amano J, et al. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther*, 2000, **7**(2): 269 - 274.
- [3] O'Riordan K, Fitzgerald GF. Molecular characterisation of a 5.75-kb cryptic plasmid from *Bifidobacterium breve* NCFB 2258 and determination of mode of replication. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **174**(2): 285 - 294.
- [4] Rossi M, Brigidi P, Gonzalez Vara y Rodriguez A, et al. Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Res Microbiol*, 1996, **147**(3): 133 - 143.
- [5] Corneau N, Emond E, LaPointe G. Molecular characterization of three plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Plasmid*, 2004, **51**(2): 87 - 100.
- [6] Tanaka K, Samura K, Kano Y. Structural and functional analysis of pTB6 from *Bifidobacterium longum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69**(2): 422 - 425.
- [7] Missich R, Sgorbati B, LeBlanc DJ. Transformation of *Bifidobacterium longum* with pRM2, a constructed *Escherichia coli* - *B. longum* shuttle vector. *Plasmid*, 1994, **32**(2): 208 - 211.
- [8] Nakamura T, Sasaki T, Fujimori M, et al. Cloned cytosine deaminase gene expression of *Bifidobacterium longum* and application to enzyme/pro-drug therapy of hypoxic solid tumors. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66**(11): 2362 - 2366.
- [9] Fu GF, Li X, Hou YY, et al. *Bifidobacterium longum* as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid liver cancer. *Cancer Gene Ther*, 2005, **12**(2): 133 - 140.
- [10] 任启伟,郭志英,王立赞,等.携带重组胞嘧啶脱氨酶基因的婴儿双歧杆菌对鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞的杀伤效应研究. *济宁医学院学报*, 2004, **27**(4): 1 - 5.
- [11] Wang LC, Kang L, Hu TM, et al. Abrin-A A chain expressed as soluble form in *Escherichia coli* from a PCR-synthesized gene is catalytically and functionally active. *Biochimie*, 2004, **86**(4 - 5): 327 - 333.
- [12] Takeuchi A, Matsumura H, Kano Y. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene, *hup*, encoding the histone-like protein HU of *Bifidobacterium longum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66**(3): 598 - 603.
- [13] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science*, 1997, **275**(5308): 1943 - 1947.
- [14] Iijima M, Huang YE, Luo HR. Novel mechanism of PTEN regulation by its phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding motif is critical for chemotaxis. *J Biol Chem*, 2004, **279**(16): 16606 - 16613.
- [15] Mayo LD, Seo YR, Jackson MW, et al. Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J Biol Chem*, 2005, **280**(28): 25953 - 25959.
- [16] Tamura M, Gu J, Takimo T, et al. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res*, 1999, **59**(2): 442 - 449.
- [17] Huang J, Kontos CD. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem*, 2002, **277**(13): 10760 - 10766.
- [18] 刘俊娥,侯 鑫,扈廷茂.人野生型抑癌基因 PTEN 的逆转录 PCR 法克隆及序列分析. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2004, **35**(6): 668 - 672.
- [19] 侯 鑫,刘俊娥,扈廷茂.人抑癌基因 PTEN 的原核表达载体的构建及融合表达. *生物技术*, 2005, **15**(2): 12 - 14.
- [20] Poquet I, Ehrlich SD, Gruss A. An export-specific report designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 1998, **180**(7): 1904 - 1912.

Construction of *Escherichia coli*-*Bifidobacterium longum* shuttle vector and expression of tumor suppressor gene PTEN in *B. longum*

HOU Xin* , LIU Jun-e

(College of Life Sciences , Inner Mongolia University , Hohhot 010021 , China)

Abstract : It was reported that *Bifidobacterium longum* accumulated specifically in hypoxic solid tumors , therefore could be used as a delivery system for cancer-specific gene therapy . Furthermore , construction of *E. coli*-*B. longum* shuttle vectors was proved by other research to be an efficient way for stable gene expression in *B. longum* . To obtain a shuttle vector and analyze the inhibition on mice solid tumors by genetically engineered *B. longum* , 48 primers with mutual overlaps were designed , assisted by software package Oligo 6.0 . By PCR with the above primers , a linear plasmid was synthesized , which consists of pMB1 and HU gene promoter , both from *B. longum* . pMB-HU was constructed by cloning the synthesized linear plasmid into *E. coli* vector pMD 18-T , and was proved to be stably replicated in both *E. coli* DH5 α and *B. longum* L17 . By inserting PTEN cDNA into pMB-HU , expression vector pMB-HU-PTEN was obtained , in which PTEN gene was reported as a major tumor suppressor gene encoding a dual-specificity phosphatase . pMB-HU-PTEN was then transferred into *B. longum* L17 by electroporation . After transformation , an effective expression of PTEN in *B. longum* L17 was confirmed by Western blot , and significant inhibition on growth of mice solid tumors was also observed with the above genetically engineered *B. longum* . Those obtained results have laid foundation for tumor-targeting gene therapy with *B. longum* .

Keywords : *E. coli*-*B. longum* shuttle vector ; HU gene promoter ; pMB1 ; PTEN gene ; Tumor-targeting ; Gene therapy

Foundation item : Key Project of Inner Mongolia Bureau of education (NJ02005)

* Corresponding author . Tel : 86-471-4991483 ; Fax : 86-471-4992442 ;

E-mail : houxin2005@263.net

Received : 12 August 2005 / Accepted : 14 September 2005 / Revised : 24 November 2005