

文章编号: 0529-6579 (2000) 03-0087-04

HSV1-tk 基因的部分 DNA 序列分析^{*}

刘彦文, 钟女奇, 都同功, 黄 冰, 陈系古

(中山医科大学实验动物中心, 广东 广州 510089)

摘 要: 采用 PCR 技术从商品质粒 pHSV106 扩增出 HSV1-tk 基因 (1 128 bp), PCR 产物用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切后定向克隆至真核表达载体 pcDNA3, 然后以重组质粒 pcTK 为模板, tk 基因的 5' 端引物为 DNA 测序引物进行部分 DNA 序列分析. 部分 DNA 序列分析证明 PCR 产物为 HSV1-tk 基因正确无误. 成功筛选到 HSV1-tk 基因的真核表达载体 pcTK, 并为利用 tk 基因在实验动物体内进行自杀性基因治疗的研究和转基因动物打靶载体的构建奠定了工作基础.

关键词: HSV1-tk; 基因治疗; 转基因动物; 克隆

中图分类号: R375.75 **文献标识码:** A

tk 基因(thymidine kinase gene, tk)是编码脱氧胸苷激酶(thymidine kinase, TK)的基因. 1 型疱疹病毒(HSV1)的 tk 基因可催化核苷类似物如 Ganciclovir (甘昔洛韦, GCV)、Acyclovir (阿昔洛韦, ACV) 磷酸化, 但 GCVTP 和 ACVTP 不是 DNA 合成的底物, 可抑制细胞 DNA 的合成, 故可杀死细胞. 目前, HSV1-tk 基因的这一特点已被广泛用于自杀型基因治疗的研究和转基因动物打靶载体的构建^[1~3]. 为此, 本文以携带 HSV1-tk 基因的商品质粒 HSV106 为模板, 用 PCR 技术扩增出 HSV1-tk 基因, 经部分 DNA 序列测定分析, 并将其克隆至真核表达载体 pcDNA3, 构建了 HSV1-tk 基因的真核表达载体 pcTK, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材 料

质粒、菌株和工具酶. 克隆载体质粒为 pcDNA3, 受体菌株为大肠杆菌 TG1. 携带 HSV1-tk 基因的商品质粒 HSV106 (GIBCO/BRL) 由梁振东博士提供. 工具酶均为 Promega 公司产品.

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 HSV1-tk 基因的 DNA 序列^[4] 设计一对引物 P1 和 P2, 为便于克隆, P1 (位于 4~29 bp 区) 引入 *Bam*HI 酶切位点, P2 引入 *Eco*RI 酶切位点, 并将 HSV1-tk 的终止密码子 TGA 改为 TAA. 引物由生工 (Sangon) 公司合成, 聚丙烯酰胺凝

* 基金项目: 广东省重点攻关课题资助项目(522203045); 广东省博士启动基金资助项目(984058)

收稿日期: 1999-08-20; 作者简介: 刘彦文 (1965~), 男, 讲师; 通讯联系人: 陈系古.

胶电泳（PAGE）纯化。引物序列如下：

P1 5'-AAGGATCCATGGCTTCGTACCCCTG-3'；

P2 5'-TGTCTCCTTCTTAGAATTCGTTAGCCT-3'。

1.2.2 HSV 106 质粒 DNA 提取 参照文献 [7] 采用小量碱法提取。

1.2.3 目的基因片段的 PCR 扩增 反应条件：94℃变性 1 min，60℃退火 1 min，72℃延伸 2 min，循环 35 次，最后一次 72℃延伸 5 min。扩增产物用 $\rho=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 目的基因的纯化、克隆及鉴定 参照文献 [7]。

1.2.5 目的基因的部分 DNA 序列分析 用碱法提取的重组质粒 DNA 作为模板，以 PCR 反应的 5'端引物为 DNA 测序引物，用 PERKIN ELMER 公司提供的 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 试剂盒进行反应，在 ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer 全自动 DNA 序列分析仪上进行 HSV 1-tk 基因部分 DNA 序列分析。

2 结 果

2.1 目的基因 PCR 扩增

图 1 示 HSV1-tk 基因 PCR 产物经 $\rho=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳结果，用 P1 和 P2 扩增 HSV106 质粒 DNA，产生的条带位于对照分子的 1 543 bp 与 994 bp 之间，与预期的 1 128 bp 大小相近。用此对引物重复多次进行 PCR 扩增均显示特异性条带，提示设计的引物是合理的。

2.2 目的基因的克隆、筛选与鉴定

将初筛到的阳性菌落扩增，抽提质粒 DNA，用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定，并以重组子 DNA 为模板，用 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。图 2 示其中 1 个重组子用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后产生 2 条带，大小分别约为 5 400 bp 和 1 128 bp，PCR 扩增也显示出特异性扩增条带（1 128 bp），证明该重组子确为带有 HSV1-tk 基因片段的重组克隆。



图 1 HSV1-tk 基因 PCR 扩增产物的 $\rho=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳



图 2 重组子 ptk 的双酶切鉴定和 PCR 验证（ $\rho=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳）

Fig 1 PCR product of HSV1-tk electrophoresed in $\rho=1\%$ agarose gel
1 PCR 相对分子质量标准
2 HSV106 质粒 DNA 为模板的 PCR 扩增

Fig 2 Recombinant ptk was verified with double restriction enzyme and PCR
1 PCR 相对分子质量标准；2 ptk 质粒 DNA 为模板用 P1 和 P2 扩增，产生约 1 128 bp 特异条带；3 ptk 用 *Bam*H I + *Eco*R I 双酶切；4 ptk 用 *Bam*H I 单酶切；5 pcDNA3 空载体用 *Bam*H I + *Eco*R I 双酶切；6 λ DNA 经 *Hind* III 单酶切。

2.3 PCR 扩增的 HSV1-tk 基因的部分 DNA 序列分析

PCR 产物 (pctk) 的序列分析结果见表 1, 与文献报道的 HSV1-tk 基因 DNA 序列的比较见表 1.

表 1 PCR 产物 (pctk) 序列与文献 [6] 比较¹⁾
Tah 1 Sequence comparison of pctk and HSV1-tk

pctk	- CATCTCCCGGGCAAACGTCGCGCGCCAGGTCGCATATCGTCGGTATGGAGCCGGGG -55
HSV1-tk	- CATCTCCCGGGCAAACGTCGCGCGCCAGGTCGCAGATCGTCGGTATGGAGACTGGG -55
pctk	- GTGGTGACGTGGGTCTGGACCAITCCCGGAGGTAAGTTGCAGCAGGGCGTCCCGGC -110
HSV1-tk	- GTGGTGACGTGGGTCTGGACCAITCCCGGAGGTAAGTTGCAGCAGGGCGTCCCGGC -110
pctk	- AGCCGGCGGGCGATTGCTCGTAATCCAGGATAAAGACGTGCATGGAACGGAGGCG -165
HSV1-tk	- AGCCGGCGGGCGATTGCTCGTAATCCAGGATAAAGACGTGCATGGGACGGAGGCG -166
pctk	- TTTGGCCAAGACGTCCAAGGCCAGGCAACACGTTATACAGGTCCCGTTGGGG -220
HSV1-tk	- TTTGGCCAAGACGTCCAAGGCCAGGCAACACGTTATACAGGTCCCGTTGGGG -220
pctk	- GCCAGCAACTCGGGGGCCCCGAAACAGGGTAAATAACGTGTCCCCGATATGGGGTC -275
HSV1-tk	- GCCAGCAACTCGGGCCCCCGAAACAGGGTAAATAACGTGTCCCCGATATGGGGTC -275
pctk	- GTGGGCCCGCGTTGCTCTGGGGCTCGGCACCCTGGGGCGGCACGGCCGTCCCCGA -330
HSV1-tk	- GTGGGCCCGCGTTGCTCTGGGGCTCGGCACCCTGGGGAGGCACGGCCGTCCCCGA -330
pctk	- AAGCTGTCCCGAGTCTCCCGCCACGACCCGCGCACTGCTGATACCGCACCGTA -385
HSV1-tk	- AAGCTGTCCCAATCCTCCACACGACCCGCGCCCTGCAGATACCGCACCGTA -385
pctk	- TTGGCAAGTAGCCCGTAAACGCGGCGAATCGCAGCCAGCATAGCCAGGTCCAGCC -440
HSV1-tk	- TTGGCAAGCAGCCCGTAAACGCGGCGAATCGCGGCGAGCATAGCCAGGTCAAGCC -440
pctk	- GCTCGCCGGGGCGCTGGCGTTTGGCCAGGCGGTCGATGTGCTGTCTCCGGAAG -495
HSV1-tk	- GCTCGCCGGGGCGCTGGCGTTTGGCCAGGCGGTCGATGTGCTGTCTCCGGAAG -495
pctk	- GGCCCCAAGCAGATGTTGGTGCCGGGCAAGCTCGCCGGGATGAGGGCCACGAAC -550
HSV1-tk	- GGCCCCAAGCAGATGTTGGTGCGGGCAAGGTCGGCGGGATGAGGGCCACGAAC -550
pctk	- GCCAGCACGGCCTGGGGGGTCATGCTGCCCATAGGATACCGCGGGCCGGGTAGC -605
HSV1-tk	- GCCAGCACGGCCTGGGGGGTCATGCTGCCCATAGGATACCGCGGGCCGGGTAGC -605
pctk	- ACAGGAGGGCGGCGAT -621
HSV1-tk	- ACAGGAGGGCGGCGAT -621

1) 相同的碱基用符号“|”表示, 同源程度为 96.8%

3 讨 论

目前已有大量的研究工作利用重组逆转录病毒和重组腺病毒将 HSV1-tk 基因转导至肿瘤细胞, 并联合 GCV 和 ACV 药物促使肿瘤细胞自杀^[3,4], 在肿瘤细胞的基因治疗领域展现了美好的应用前景. 除此之外, HSV1-tk 基因也被应用于转基因动物研究领域. 利用 HSV1-tk 基因组成定向打靶载体的负选择系统可使外源基因定向精确地通过同源重组整合于靶细胞染色体上^[5].

质粒 HSV106 携带有 HSV1 病毒的 *Bam*HI 酶切 P 片段, HSV1 的 tk 基因即位于该片段中. 遗憾的是该片段全长 3.4 kb, 而 HSV1-tk 基因的阅读框大约只有 1.2 kb, 其 5'端和 3'端大量的非编码序列, 给 HSV1-tk 基因的应用带来不便. 所以根据已发表的 HSV1-tk 基因的 DNA 序列设计一对引物将 HSV1-tk 基因扩增出来, 两端加上酶切位点, 并将其 5'端

和 3' 端的非编码序列除去, 目的为该基因在本室的基因治疗和转基因动物研究工作中的应用提供便利。

用我们自行合成的一对引物, 以质粒 HSV106 为模板进行 PCR 反应, 扩增出的 DNA 片段大小在 1 543 bp 和 994 bp 之间, 与预期的 1 128 pb 大小相当。然后我们又将该 PCR 产物定向连接到真核表达载体 pcDNA3, 并挑选出阳性克隆。为进一步验证该 PCR 产物, 我们又以阳性克隆的质粒 DNA 为模板, 以 PCR 反应的 3' 端引物为测序引物进行部分 DNA 序列分析, 测序结果与 HSV1-tk 基因的已知序列进行比较, 发现二者同源程度为 96.8%, 显示我们的实验结果完全正确。至于其中的 21 处点突变是由 PCR 反应的误配引起, 还是由于机器测序的错误, 尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] MCKNIGHT S L. The nucleotide sequence and transcript map of the Herpes simplex thymidine kinase gene[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 5949.
- [2] MCKNIGHT S L, GVIS E R, KINGSBURY R, et al. Analysis of transcriptional regulatory signals of the HSV thymidine kinase gene: Identification of an upstream control region[J]. Cell, 1981, 25(2): 385~398.
- [3] MOOLTEN F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy[J]. Cancer Research, 1986, 46: 5276~5281.
- [4] MOOLTEN F L, WAGNER M J, SHARP J A, et al. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1990, 82(4): 297~300.
- [5] JOYNER A L. Gene targeting: a practical approach[M]. London: Oxford University Press, 1993. 1~50.
- [6] WAGNER M J, WELLS J M. Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(3): 1441~1555.
- [7] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Partial DNA Sequence Analysis of the HSV1-tk Gene

LIU Yan-wen^{*}, ZHONG Nu-qi, DU Tong-gong, HUANG Bing, CHEN Xi-gu

Abstract: The gene coding for HSV1-tk (1 128 bp) was amplified using PCR technique. The PCR product was digested with *Bam*H I and *Eco*R I and cloned into the plasmid pcDNA3 at the *Bam*H I and *Eco*R I sites. The recombinant plasmid ptk was identified by restriction analysis and partial DNA sequence analysis. The results show that HSV1-tk gene was successfully amplified and was correctly cloned into the *Bam*H I and *Eco*R I site of plasmid pcDNA3.

Keywords: HSV1-tk; gene therapy; transgenic animal; clone

^{*} Animal Center of Sunyatsen University of Medical Science, Guangzhou 510089, China