

假阳性或假阴性结果的产生。尤其在量效关系中应该选取呈现线性关系剂量范围内敏感度最大的剂量(即减少或增加给药都会使效应指标有统计学改变)。本实验为下一步研究 HED 配伍应选用的给药时间和给药剂量提供了参考。

References:

- [1] Bowyer J F, Hopkins K J, Jakab R, *et al.* L-Ephedrine-induced neurodegeneration in the parietal cortex and thalamus of the rat is dependent on hyperthermia and can be altered by the process of *in vivo* brain microdialysis [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 125(1-3): 156-166.
- [2] Paul J W, Dennis K M, Christina L L, *et al.* Effect of (-)-ephedrine on locomotion, feeding, and nucleus accumbens dopamine in rats [J]. *Psychopharmacology*, 1998, 135: 133-140.
- [3] Richard B W, Lawrence D F, Lance M W, *et al.* The effect on ephedrine prodrugs on locomotor activity in rats [J]. *Gen Pharmac*, 1996, 27(1): 109-111.
- [4] Dennis K M, Jack R N, Paul J W. Sensitization of anorexia and locomotion induced by chronic administration of ephedrine in rats [J]. *Life Sci*, 1999, 65(5): 501-511.
- [5] Wei F H, Luo J B, Chen F L, *et al.* Influence of compatibility on cinnamaldehyde in Mahuang Decoction by GC-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(6): 635-638.
- [6] Wang P, Zhang L T, Shi X M, *et al.* The influence of Xin-nao Yizhi prescription on IAAS in hippocampi, cortex and striate body of brain of SAM-P/10 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(4): 24-27.

抗癫痫肽重组腺伴病毒载体的构建及鉴定

王宗仁¹, 邵中军^{2,3}, 李晶华¹, 行利¹, 马静¹, 龙钢¹, 张磊², 赵艳玲¹

(1. 第四军医大学附属西京医院 中医科, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学 流行病学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 复旦大学公共卫生学院 流行病教研室, 上海 200023)

摘要:目的 为了研究蝎毒癫痫肽对癫痫模型的治疗作用, 构建并产生重组腺伴病毒(AAV)载体。方法 将AEP外源性核酸片段插入AAV-shufler质粒pSSHG-Neo的KpnI-BamHI位点构建AAV。用腺病毒辅助质粒pFG140、包装质粒pAAV/Ad及构建的pSSHG-AEP三质粒磷酸钙共沉淀法在肾胚胎293细胞系中同源重组包装rAAV。使用地高辛标记的斑点杂交方法测定重组病毒滴度。结果 成功构建了重组病毒质粒pSSHG/AEP, 经蔗糖梯度离心法获得rAAV组分, 梯度稀释测得滴度为 1.46×10^{12} PFU/mL。结论 成功地制备了AEP重组腺伴病毒(rAAV/AEP)载体, 为癫痫基因治疗实验奠定了基础。

关键词: 抗癫痫肽; 腺伴病毒载体; 构建

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)12-1844-03

Construction and identification of recombinant adeno-associated virus transducing antiepilepsy peptide gene

WANG Zong-ren¹, SHAO Zhong-jun², LI Jing-hua¹, HANG Li¹, MA Jing¹, LONG Yin¹, ZHANG Lei², ZHAO Yan-ling¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Epidemiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200023, China)

Key words: antiepilepsy peptide; adeno-associated virus (AAV); construction

中医采用全蝎治疗脑病已有近千年的历史^[1]。本草记载全蝎具有镇痉、熄风的作用。抗癫痫肽(antiepilepsy peptide, AEP)是从东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 中分离出的一种多肽, 由61个氨基酸残基组成, 相对分子质量为8300, 属于蝎毒长

链神经毒素。近年研究显示其能降低实验动物癫痫的发生率、延长癫痫发作的潜伏期、缩短癫痫发作的持续时间^[2,3], 而且能抑制癫痫的反复发作^[4,5]。本研究拟利用其生物学作用, 为进一步尝试癫痫的基因治疗奠定基础。

收稿日期: 2005-03-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671764)

作者简介: 王宗仁(1954—), 男, 河南灵宝人, 主任医师, 教授, 博士生导师, 发表文章60余篇, 获陕西省科技进步二等奖和军队科技进步二等奖各一项, 主要研究方向为分子药理学和心血管疾病的中药防治。

Tel: (029) 82376992 E-mail: zongren@fmmu.edu.cn

1 材料

2 型腺伴病毒载体 pSSHG-Neo、293 细胞系、腺伴病毒包装辅助质粒 pAAV/Ad、腺病毒质粒 pFG140 和大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由西安华广生物工程公司提供。限制性内切酶 (EcoRI, KpnI 和 BamHI)、T4 DNA 连接酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 购自西安华美生物工程公司。

2 方法

2.1 AEP 目的基因的获取: 异硫氰酸胍一步法提取 AEP RNA。取全蝎 (东亚钳蝎 *B. martensii* Karsch, 笔者亲自鉴定) 2 只, 75% 乙醇浸泡消毒处理, 剪取尾钳, 放入研钵中, 制备组织匀浆; 加入 2 mol/L 乙酸钠 100 μ L 和等体积的水饱和酚、200 μ L 氯仿-异戊醇, 12 000 r/min 离心 10 min, 取水相, 异丙醇沉淀。12 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 乙醇洗涤, 干燥处理, 二乙基焦磷酸胺 (DEPC) 处理的水溶液溶解, 备用。

2.2 RT-PCR 扩增 AEP 基因: 取胚总 RNA 3 μ g, 按 AMV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒中说明合成 cDNA 第 1 链。反应体系为 5 $\times$ 反应缓冲液 4 μ L; 10 mmol/L dNTP 4 μ L; 20 U/ μ L 核糖核酸酶抑制剂 1 μ L; 200 U/ μ L AMV 逆转录酶 1 μ L; 加无核酸酶去离子水至总体积 25 μ L。37 $^{\circ}$ C、5 min, 42 $^{\circ}$ C、1 h, 70 $^{\circ}$ C 灭活 10 min, 以所获 cDNA 为模板, 用 Taq DNA 聚合酶扩增 AEP 基因全序列, 长度为 287 bp。PCR 引物设计为: 正向引物: 5'-GCGAATTCATGAACTATTTCTTTTACTAG; 负向引物: 5'-GCGGATCCTTACTTTTTTCCACCG-CATG。

PCR 扩增反应体系为: AEP cDNA 模板 2 μ L; 10 $\times$ 反应缓冲液 2.5 μ L; 20 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L; 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L; 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L; TaqDNA 聚合酶 0.51 μ L, 加去离子水至总体积 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C、1 min, 94 $^{\circ}$ C、40 s, 55 $^{\circ}$ C、40 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 30 次循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

2.3 PCR 产物克隆: PCR 产物 18 ng 与 pGMT-easy vector 载体 50 ng 混合, 于 10 μ L 体系 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 得连接产物 pGMT/AEP。取适量上述连接反应液转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含氨苄青霉素、IPTG 及 X-gal 的 LB 平板进行蓝白筛选。

2.4 阳性重组克隆的筛选: 挑取白色菌落 3 个, 转入含适量氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。用碱裂解法少量制备质粒 pGEM-T/AEP, 重组质粒用 Hind III 和 BamHI 双酶切鉴定。同时用蓝色

菌落质粒酶切作阴性对照, 测序鉴定。

2.5 包装病毒: 大量制备的 pSSHG/AEP、辅助质粒和腺病毒质粒 pFG140 应用磷酸钙共沉淀法介导 3 质粒共转染 80% 融合的 293 细胞。加入 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 72 h。

2.6 重组病毒颗粒的回收、纯化与滴度测定: 培养液中加入细胞悬液, 反复冻融, 裂解液 56 $^{\circ}$ C 灭活腺病毒, 蔗糖密度梯度离心纯化病毒颗粒。标记探针, 采用斑点杂交法观察实验结果, 确定滴度。

3 结果

3.1 目的基因的获取及鉴定: PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, PCR 产物长度在 280 bp 左右, 与基因 bank 中 AEP 片断长度一致, 初步证实为 AEP (图 1)。

3.2 PCR 产物的克隆及酶切鉴定: PCR 产物在连接酶的作用下直接克隆到 pGEM-T 载体中, 转化后挑选阳性菌落, 经 Hind III 和 BamHI 双酶切鉴定, 获得 684

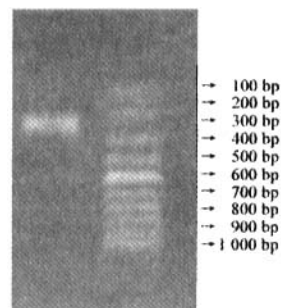
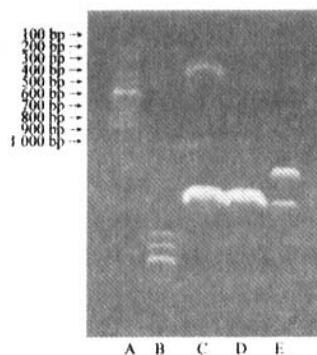


图 1 AEP PCR 产物的电泳分析

Fig. 1 Electrophoretic analysis of AEP PCR production

bp 左右条带, 证实扩增片断已插入载体中 (图 2)。



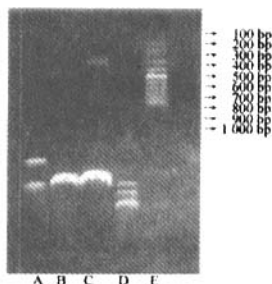
A-Marker B-lambda DNA Hind III 消化的核酸标尺, 相对分子质量分别为 23.13、9.41、6.55、4.36、2.32 和 2.02 Kb C-pGEMT-AEP 质粒 EcoI 单酶消化 D-pGEMT-AEP 质粒 BamHI 单酶消化 E-pGEMT-AEP 质粒对照

A-DNA ladder B-lambda DNA cleaved by Hind III for indicator: 23.13, 9.41, 6.55, 4.36, 2.32, and 2.02 Kb C-pGEMT-AEP cleaved by EcoI D-pGEMT-AEP cleaved by BamHI E-pGEMT-AEP

图 2 构建质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of plasmid construction

3.3 重组质粒鉴定:经过 Hind III 和 BamH I 双酶切及 PCR 鉴定,电泳显示重组质粒可以切出相应的 AEP DNA 条带,PCR 产物电泳亦显示相应片断的条带(图3)。



A-pSSHCCMV-AEP 质粒对照 B-pSSHCCMV-AEP BamH I 单酶消化 C-pSSHCCMV-AEP 质粒 EcoI 单酶消化 D-lambda DNA Hind III 消化的核酸标尺,相对分子质量分别为 23.13、9.41、6.55、4.36、2.32 和 2.02 Kb; E-Maker
A-pSSHCCMV-AEP B-pSSHCCMV-AEP cleaved by BamH I C-pSSHCCMV-AEP cleaved by EcoI D-lambda DNA cleaved by Hind III for indicator; 23.13, 9.41, 6.55, 4.36, 2.32, and 2.02 Kb E-Maker

图3 pSSHCCMV-AEP 酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid pSSHCCMV-AEP

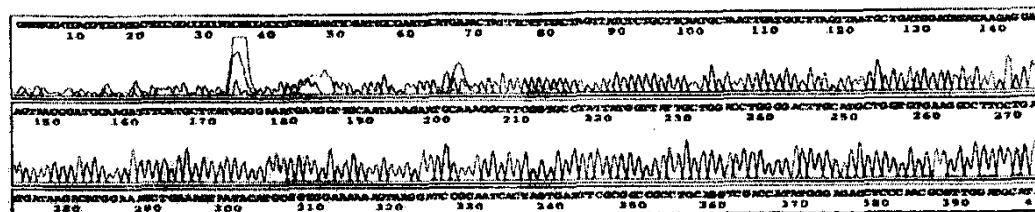


图4 AEP 目的基因片断序列分析

Fig. 4 Sequence analysis of AEP gene fragment

高、很难获得工业化的产量等多肽类药物所固有的局限,癫痫肽用于治疗类风湿性关节炎的临床实践也必将遇到严峻挑战。以重组病毒为基础的基因治疗技术为蜂毒肽的临床应用开辟了新方法。基因治疗最初应用于一些遗传性疾病,同时也为需要长期给药的慢性病等病患提供了机会^[6]。

本研究利用癫痫肽抗癫痫作用,采用现代生物工程研究中的重组病毒技术,将合成编码蜂毒肽的基因克隆到 AAV 载体中,实现基于中药组分的基因治疗。本实验为生物活性肽的临床使用寻找可行性方法,也为以肽类为主要活性物质且资源有限的中药现代化探讨新途径。

References:

[1] Sandoval M R, Lebrun I. TsTx toxin isolated from *Tityus*

3.4 AEP 目的基因片断序列测定:表达载体测序结果分析显示,与基因 bank 中的 AEP mRNA 序列完全一致,证实 AEP 基因已经定向克隆到表达载体中(图4)。

3.5 rAAV-AEP 鉴定:地高辛标记的斑点杂交结果显示,稀释 64 倍的病毒毒液与稀释 10 倍的毒液腺伴病毒穿梭质粒载体的杂交信号一致。计算病毒滴度,约在 1.46×10^{12} PFU。计算方法:质粒 pSSHG/AEP 相对分子质量 = $(7\ 060\text{ bp} + 287\text{ bp}) \times 635 = 4\ 665\ 345$ 。未稀释时质粒定量为 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$,每微克质粒中的分子个数 = 摩尔数/相对分子质量 = $6.02 \times 10^{24} \times 2/4\ 665\ 345 = 2.47 \times 10^{12}$ PFU/mL。

4 讨论

腺伴病毒 (adeon-associated virus, AAV) 近年来因其独特的优势越来越受到重视,其无潜在致病威胁,同时能稳定地表达外源基因,宿主范围广,可转染分裂期及非分裂期细胞,且转染效率高,是基因治疗的良好载体。抗癫痫肽是从东亚钳蝎中分离出的一种多肽,能降低实验动物癫痫的发生率、延长癫痫发作的潜伏期、缩短癫痫发作的持续时间。但由于受到稳定性差、体内半活期短、化学合成的成本

serrulatus scorpion venom-induced spontaneous recurrent seizures and mossy fiber sprouting [J]. *Epilepsia*, 2002, 43 (Suppl 5): 36.

[2] Wang C G, He X L, Shao F, et al. Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(8): 2480-2485.

[3] Sandoval M R, Dorce V A. Behavioural and electroencephalographic effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats [J]. *Toxicol*, 1993, 31(2): 205-212.

[4] Bonilha L, Cendes F, Ghizoni E, et al. Epilepsy due to a destructive brain lesion caused by a scorpion sting [J]. *Arch Neurol*, 2004, 61(8): 1294-1296.

[5] He X, Peng F, Zhang J, et al. Inhibitory effects of recombinant neurotoxin BmK IM on seizures induced by pentylenetetrazol in Rats [J]. *Chin Med J*, 2003, 116(12): 1898-1903.

[6] Goudet C, Chi C W, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch [J]. *Toxicol*, 2002, 40(9): 1239-1258.