文章编号:1000-5404(2005)12-1187-03

论著

NOV 基因真核表达载体的构建及在 COS-7 细胞中的表达

李成仁,蔡文琴,苏炳银,张成岗 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 获得 NOV 基因真核表达载体并检测其在细胞中的表达。**方法** 利用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)方法,从新鲜大鼠大脑组织的总 cDNA 中扩增出1 165 bp 的 NOV 基因的 cDNA 编码区序列,然后用 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ双酶切后定向克隆入真核表达载体 pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ 质粒中,用脂质体法将载体转染入 COS-7 细胞中,用 Western blot 和免疫细胞化学方法检测其表达情况。**结果** NOV 基因 cDNA 已经正确克隆到真核表达载体 pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ 质粒中;体外转染入 COS-7 细胞中后,可见转染细胞有 NOV 蛋白的表达。**结论** 本实验所构建的重组质粒为 NOV 基因的作用研究提供了有利的分子工具。

关键词: NOV 基因;RT-PCR;基因克隆
中图法分类号: Q782; R394-33; R394.2 **文献标识码**: A

Construction of eukaryotic expression vectors of nephroblastoma overexpression gene and expression in COS-7 cells

LI Cheng-ren, CAI Wen-qin, SU Bing-yin, ZHANG Cheng-gang (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain eukaryotic expression vectors containing coding region of nephroblastoma overexpression gene (NOV) and detect its expression in COS-7 cells. **Methods** A 1 165-bp cDNA fragment was amplified from the total RNA of normal rat brain tissue by RT-PCR and cloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ. The cloned insert was identified by double digestion of the recombinant plasmid with restriction enzymes *Hind*Ⅲ and *Bam*HⅠ. The recombinant plasmid was transfected into COS-7 cells with liposome. The expression of NOV gene was detected by Western blotting and immunocytochemistry. **Results** Eukaryotic expression vectors containing 1 165-bp coding region of NOV gene was constructed. COS-7 cells transfected with the recombinant plasmid expressed high level of NOV protein in cytoplasm. **Conclusion** That eukaryotic expression vectors containing coding region of NOV gene was constructed can provide a strong molecular tool for the studies of effect of NOV gene.

Key words: nephroblastoma overepression gene; RT-PCR; gene cloning

肾母细胞瘤过度表达基因(nephroblastoma overexpression gene, NOV)是法国 Perbal 实验室的 Joliot 于 1992 年发现的一种原癌基因,其编码的 NOV 蛋白是一种胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)结合蛋白(IGF-binding proteins, IGFBPs),属于 IGFBP 家族的成员[1,2]。NOV 基因在国际上研究不久,而国内现只有我室开展了这方面的初步工作。多年的研究结果证实,NOV 基因是动物神经系统发育的一个重要调控因子,尤其值得注意的是,一些线索提示 NOV 基因与动物中枢神经系统(central nervous system, CNS)的损伤和修复之间存在一定的关系,可能参与 CNS 损伤后的再生和修复过程[3,4]。为了从分子水平上探讨 NOV 基因在 CNS 中的某些作用和对 CNS 生长、发育和损伤中的作用,首先需要获得 NOV 基因的全长 cDNA 片段和

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900078),全军医学科研"十五"计划青年基金资助项目(01Q097),重庆市科委应用基础研究资助项目(2001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39900078), the Youth Funds of "Tenth Five-Year Plan" for Medical Research of PLA (01Q097) and the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Scientific Committee of Chongqing (2001)

作者简介:李成仁(1970-),男,浙江省东阳市人,博士,讲师,主要从事神经干细胞与神经损伤方面的研究。电话:(023)68752229,E-mail:lichengren@yahoo.com
通讯作者:蔡文琴,电话:(023)68753460,E-mail:wenqin@public.cta.cq.cn

收稿日期:2004-11-02;**修回日期**:2005-02-05

能表达 NOV 基因的真核表达载体。本实验利用 RT-PCR 定向克隆技术，首先获得 NOV 全长基因，将其克隆到 pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ 真核表达载体上，然后转染入 COS-7 细胞中检测其表达情况。为进一步研究 NOV 基因的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 工程菌与质粒

大肠杆菌 JM109 由本室保存，真核表达载体 pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ 由军科院十所提供。

1.2 细胞

COS-7 细胞由本校全军免疫学研究所引进。

1.3 工具酶及试剂

限制性内切酶 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ、T4 DNA 连接酶、PCR 试剂盒、总 RNA 纯化试剂盒、M-MLV 逆转录试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒等分子生物学试剂分别购自 Promega 公司和 Roche 公司。化学试剂均为国产分析纯。NOV 多抗由 Perbal 教授提供。

1.4 引物的设计与合成

根据 Martinerie 和 Liu 等[5,6]的报道及 GenBank 内的 NOV 基因序列(No. AF171936)，设计合成 1 对引物。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

引物上游序列：5′-GCCGGATCCCCTGTAACAGCCCTAGCAGGCAGAAC-3′，该引物 GCC 为保护碱基，GGATCC 为 *Bam*HⅠ位点。引物下游序列：5′-GCCAAGCTTACAGGAAAGCAAGTCACCCCTAAGCC-3′，该引物 GCC 为保护碱基，AAGCTT 为 *Hind*Ⅲ位点。通过 PCR 扩增整个 NOV 基因的编码区，片段长度为1 165 bp。

1.5 大鼠脑组织总 RNA 制备

取大鼠脑组织 100 mg，10 mmol/L PBS 洗涤后采用 Roche 公司的总 RNA 纯化试剂盒提取组织总 RNA。

1.6 逆转录反应

采用 Promega 公司 M-MLV 逆转录试剂盒，按照产品介绍步骤将细胞总 RNA 的 mRNA 逆转录成 cDNA。

1.7 PCR 产物的扩增

采用 Promega 公司 PCR 试剂盒。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 NOV 基因的编码序列，反应条件为 95 ℃变性 60 s，56 ℃退火 50 s，72 ℃延伸 50 s，35 个循环，最后 72 ℃ 延伸 7 min，PCR 产物使用 Promega 公司片段回收试剂盒回收目的片段。

1.8 真核表达载体的构建与鉴定

PCR 产物回收后，经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切后，用 T4 DNA 连接酶克隆入预先经同样双酶切的 pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ 质粒中，连接成功的阳性重组子命名为 pcDNA3.1-NOV。将 pcDNA3.1-NOV 转化到大肠杆菌 JM109 中，培养过夜，在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上随机挑选单个菌落，摇菌培养，试剂盒小量提取质粒 DNA，然后用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切方法对重组子进行鉴定。酶切、连接、转化、阳性重组子的筛选、鉴定，均按分子克隆手册进行。

1.9 目的基因的 DNA 序列测定

扩增阳性重组质粒 pcDNA3.1-NOV，用碱裂解法提取重组质粒 DNA 作模板，采用 Promega 公司的 T7 DNA 聚合酶测序系统对目的基因的 DNA 序列进行测定。

1.10 COS-7 细胞的转染

COS-7 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养于 50 ml 培养瓶中，约 75%长满，0.25%胰酶消化后离心收集，调整细胞浓度至 1×10^7/ml。采用 Roche 公司的 DOTAP 脂质体包裹质粒转染培养细胞，按说明书操作。用含 G418 (500 μg/ml)选择培养基筛选阳性克隆。转染了 NOV 基因的 COS-7 细胞简写成 NOV/COS-7 细胞。

1.11 表达产物的检测

转染细胞经 4%多聚甲醛固定后进行免疫细胞化学染色。收集转染细胞培养上清和细胞裂解液进行 Western blot。

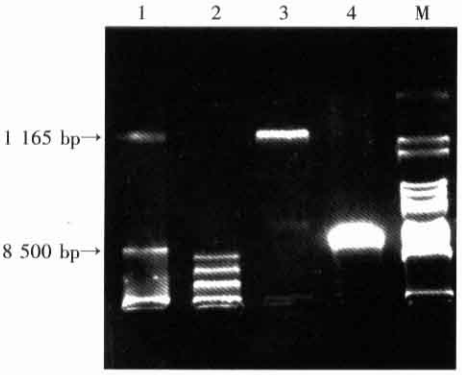
2 结果

2.1 NOV 全长基因真核表达质粒的构建

根据 NOV cDNA 的结构序列，设计合成了一对引物，然后逆转录合成大鼠脑 NOV cDNA，以此为模板进行 PCR，扩增产物经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切后，克隆到 pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ质粒的 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ位点上，以此转化大肠杆菌 JM109。

2.2 重组质粒的鉴定

按照 2.1 的克隆策略获得了含有 NOV 基因编码序列的重组真核表达载体 pcDNA3.1-NOV，扩增后提取质粒 DNA 用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切后产生 2 个条带，大小分别约为 8 500 bp 和 1 165 bp，证明重组质粒克隆入 NOV 基因片段正确，见图 1。



M: Marker; 1: pcDNA3.1-NOV digested with *Bam*HⅠ and *Hind*Ⅲ; 2: pcDNA3.1-NOV; 3: NOV cDNA; 4: pcDNA3.1/Myc-His(+)/laxZ

图 1 重组质粒的酶切分析

Fig 1 Enzymic digestion of recombinant plasmid

2.3 核苷酸序列分析结果

采用 DNA 测序仪进行分析，pcDNA3.1-NOV 质粒上克隆片段的序列正确。

2.4　细胞内表达产物的检测

NOV 免疫细胞化学结果显示，在 NOV/COS-7 细胞内可见有 NOV 阳性表达，见图 2。Western blot 结果显示，NOV/COS-7 细胞的细胞裂解液和培养上清液中均可检测到 NOV 阳性表达，而 COS-7 细胞的细胞裂解液和培养上清液中呈阴性，见图 3。

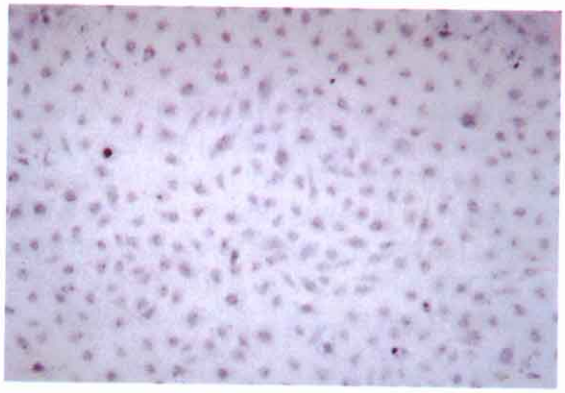
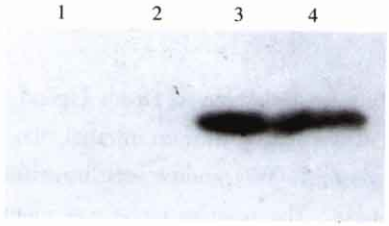


图 2　重组质粒转染 COS-7 细胞后 NOV 免疫细胞化学染色呈阳性（SABC × 200）

Fig 2　NOV positive in COS-7 cells transfected by recombinant plasmid（SABC × 200）



1：COS-7 cells lysis buffer；2：COS-7 cells conditioned medium；3：NOV/COS-7 cells lysis buffer；4：NOV/COS-7 cells conditioned medium

图 3　Western blot 分析 COS-7 细胞和 NOV/COS-7 细胞培养上清液以及裂解液中 NOV 蛋白

Fig 3　Western blot analysis of NOV protein in COS-7 cells and NOV/COS-7 cells

3　讨论

NOV 基因是新发现的原癌基因，由于在鸡肾母细胞瘤中高度表达而得名。NOV 基因高度保守，现在已经克隆出人和多种动物的 NOV 基因，人类中相应的基因称为 novH(nov in human)。现认为 NOV 蛋白是一种 IGFBP，IGFBPs 是通过调节 IGFs 与 IGF 受体的结合状态而对 IGFs 功能的发挥调控作用[2]。IGFs 具有多种生理功能，尤其是具有影响细胞增殖、分化和存活的功能，在个体生长和发育中发挥重要的作用。IGFs 在 CNS 中起重要作用，有研究表明，IGF-1 可以减少兔子脊髓缺血模型中神经元的死亡以及防止动物截瘫[7]。也有研究指出，IGF-1 能促进动物脑内神经元的生成、突起的生长以及突触的形成，可以促进 CNS 的髓鞘化[8]。一些 IGFBPs 也可以脱离 IGF 而发挥生物学作用。我室多年来的研究证实，NOV 基因是动物神经系统发育的一个重要调控因子，从低等脊椎动物到高等脊椎动物的进化过程中非常保守，尤其值得注意的是，一些线索提示 NOV 基因与动物 CNS 的损伤和修复之间存在一定的关系，可能参与 CNS 损伤后的再生和修复过程[9]。为了从分子水平上探讨 NOV 基因在 CNS 中的作用，我们自行设计合成一对引物，分别引入 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ酶切位点，并添加了保护碱基，可扩增包括目的基因的全部序列，使目的基因正确插入载体。经酶切及序列分析证实重组质粒构建正确，无缺失、插入及移码等突变，通过免疫细胞化学方法和 Western blot 方法证实，体外转染 COS-7 细胞后，NOV 基因可以在转染细胞中稳定表达 NOV 蛋白。另外，NOV 蛋白是一种分泌型的蛋白，我们不仅用 Western blot 表达在细胞中检测到有 NOV，在细胞培养上清中也可以检测到其表达。本实验为进一步研究 NOV 基因的作用打下基础。

参考文献：

[1] Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, *et al*. Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas[J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(1): 10 - 21.

[2] Kim H S, Nagalla S R, Oh Y, *et al*. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(24): 12981 - 12986.

[3] Su B Y, Cai W Q, Zhang C G, *et al*. The expression of ccn3 (nov) RNA and protein in the rat central nervous system is developmentally regulated [J]. Mol Pathol, 2001, 54(3): 184 - 191.

[4] Su B Y, Cai W Q, Zhang C G, *et al*. A developmental study of novH gene expression in human central nervous system[J]. C R Acad Sci III, 1998, 321(11): 883 - 892.

[5] Martinerie C, Huff V, Joubert I, *et al*. Structural analysis of the human nov proto-oncogene and expression in Wilms tumor[J]. Oncogene, 1994, 9 (9): 2729 - 2732.

[6] Liu C, Liu X J, Crowe P D, *et al*. Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) codes for a growth factor that induces protein tyrosine phosphorylation[J]. Gene, 1999, 238(2): 471 - 478.

[7] Nakao Y, Otani H, Yamamura T, *et al*. Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death and paraplegia in the rabbit model of spinal cord ischemia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 122(1): 136.

[8] Cannella B, Pitt D, Capello E, *et al*. Insulin-like growth factor-1 fails to enhance central nervous system myelin repair during autoimmune demyelination[J]. Am J Phatol, 2000, 157(3): 933 - 943.

[9] 苏炳银，蔡文琴，张成岗，等. NOV 基因在不同种属动物脊髓中的表达[J]. 中国神经科学杂志，1998，14(3)：237 - 241.

（编辑　薛国文）