文章编号:1000-5404(2005)15-1607-03

技术方法

肝癌相关新基因 BC047440 反义真核表达载体构建及鉴定

Construction and identification of antisense eukaryotic expression vector of novel gene BC047440 associated with hepatocellular carcinoma

周建波,李 靖,赵弘智,郑 璐,梁 平,杨彤翰,黄小兵 (第三军医大学新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

提 要:目的 构建肝癌相关新基因 BC047440 反义真核表达载体。**方法** 提取人肝癌组织总 RNA,逆转录酶-多聚酶链式反应(RT-PCR)扩增 BC047440 基因 cDNA 序列,经与 pMD18-T simple 载体连接,筛选、克隆、抽提质粒和双酶切后,将纯化的 BC047440 基因 cDNA 序列反向插入真核表达载体 pcDNA3.1(+)中,筛选、克隆、抽提质粒,从而构建 BC047440 基因反义真核表达载体 pcDNA3.1(+)BC047440AS。**结果** 经 RT-PCR 获得 826 bp 含限制性内切酶位点的 cDNA 片段,T 载体克隆后经 PCR 扩增目的片段、测序,确定该片段为 BC047440 基因 cDNA,进而构建反义真核表达载体 pcDNA3.1(+)BC047440AS,并经 PCR 扩增目的片段,测序确证。**结论** 成功构建了 BC047440 基因反义真核表达载体 pcDNA3.1(+) BC047440AS,为进一步研究该基因功能奠定了基础。

通过抑制消减杂交法(suppression subtractive hybridization,SSH)对肝癌组织与癌旁肝组织间差异表达基因进行分离、鉴定,我们发现了 1 条新的肝癌相关基因 cDNA 片断(EST)[1],长 447 bp,经 GenBank 检索,90% 与已知基因无同源性。进一步采用 RACE 技术,克隆出该基因的全长 cDNA 序列[2]。经 GenBank 检索,与近期登录的基因 BC047440 同源。但该基因是从大脑组织中获得[3],而且国内外少见该基因功能研究的报道。在此基础上,本研究从原发性肝癌组织中克隆了 BC047440 基因的全长 cDNA 序列,并构建了其反义 RNA 真核表达载体,为进一步研究该基因功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人肝癌组织 来自第三军医大学新桥医院肝细胞型肝癌手术切除标本,均经病理证实。

1.1.2 主要试剂 SV Total RNA Isolation System 总 RNA 抽提试剂盒购自 Promega 公司;TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver. 1.1、感受态大肠杆菌 JM109 购自大连宝生物公司;E.Z.N.A Gel Extration Kit 凝胶回收试剂盒、E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I 质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司。

1.1.3 质粒载体 pMD18-T simple TA 载体购自大连宝生物公司;pcDNA3.1(+)真核表达载体购自 Invitrogene 公司。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170424)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170424)
作者简介:周建波(1974-),男,湖北省襄樊市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肝癌基因方面的研究。电话:(023)68774606
通讯作者:李 靖,电话:(023)68774906,E-mail:xqyylijing@tom.com
收稿日期:2005-01-11;**修回日期**:2005-02-25

1.2 方法

1.2.1 肝癌组织总 RNA 的提取 肝癌组织总 RNA 提取使用 Promega 公司总 RNA 抽提试剂盒,参照试剂盒说明进行。

1.2.2 BC047440 基因 cDNA 序列克隆 RT-PCR 引物根据 GenBank 中 BC047440 基因 cDNA 序列,用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对引物,扩增 BC047440 基因 60~868 bp 的 cDNA 片段,该基因的编码序列(codon sequence, CDS)为 179~781 bp[3]。在上、下游引物 5′端分别引入 *Eco*R Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ限制性内切酶位点,引物由宝生物公司合成。上游引物:5′-CGGAATTCCGTGGCGAAAGTGCGGTTGTGGATG-3′(33 bases),下游引物:5′-CCCAAGCTTGCCTGTGAGTGAAGTGCCTCTCAGAG-3′(35 bases),下划线的碱基为限制性内切酶位点。以肝癌组织总 RNA 为模板,使用 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1 反转录合成第 1 链 cDNA,逆转录反应体系:$MgCl_2$(25 mmol/L) 4 μl,5×第 1 链缓冲液 2 μl, RNase Free dH_2O 8.5 μl,dNTP Mixture (各 10 mmol/L) 2 μl, RNase Inhibitor(40 U/μl) 0.5 μl, AMV Reverse Transcriptase (5 U/μl) 1 μl, Random9mers (50 pmol/μl) 1 μl,总 RNA (1 μg/μl) 1 μl;反应条件:30 ℃ 10 min, 42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min。PCR 反应体系:在逆转录反应体系中加入 $MgCl_2$(25 mmol/L) 6 μl, 10×LA PCR BufferII (Mg^{2+} Free) 8 μl,灭菌蒸馏水 63.5 μl, TaKaRa LA *Taq* (5 U/μl) 0.5 μl,上游引物(20 μmol/L)1 μl,下游引物(20 μmol/L)1 μl;反应条件:94 ℃ 2 min 1 个循环;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min 35 个循环;72 ℃ 6.5 min。

1.2.3 T 载体克隆 用 Omega Biotek 公司 E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I 回收纯化 RT-PCR 产物,使用 pMD18-T simple 载体连接试剂盒(TaKaRa 公司)将目的片段与 pMD18-T simple 载体连接。连接反应体系体积为:Ligation Solution I 5 μl, pMD18-T simple Vector DNA 1 μl (约 50 ng), PCR 产物 1 μl (约 50 ng), dH_2O 3 μl,置于 16 ℃反应 30 min。取 100 μl 的感受态大肠杆菌 JM109 加入试管中,再加入连接产物,冰浴

30 min，42 ℃放置45 s，立即移入冰中放置2 min，然后加入预先保存在37 ℃的LB培养基900 μl，37 ℃，震荡培养1 h(225 r/min)，最后将菌液均匀涂布在LB/AMP/IPTG/X-Gal平板培养基上，筛选白色阳性菌落[4]。挑取单菌落，以M13-47、RV-M(T载体多克隆位点上下游序列)为引物进行菌落PCR扩增目的片段，然后将阳性克隆菌落扩大培养，用E. Z. N. A Plasmid Miniprep Kit I提取重组质粒。

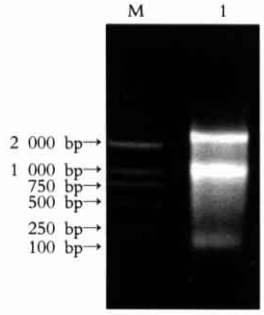
1.2.4 反义真核表达载体pcDNA3.1(+)BC047440AS的构建

用*Eco*R Ⅰ和*Hind*Ⅲ分别双酶切重组pMD18-T simple载体及pcDNA3.1(+)载体，凝胶电泳后回收目的片段。连接、转化方法同T载体克隆。涂布LB/AMP平板培养基，过夜培养。从转化平板上挑取单菌落，以T7 promoter/pcDNA3.1(+)BC047440AS下游引物为引物进行菌落PCR，然后凝胶电泳鉴定，将阳性克隆菌落扩大培养，提取重组质粒pcDNA3.1(+)BC047440AS，由宝生物公司测序。

2 结果

2.1 总RNA完整性与纯度鉴定

取2 μl总RNA进行琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果见图1，28 S亮度和18 S相当，5 S很弱，说明总RNA部分降解，但完整性较好。经核酸/蛋白分析仪检测：*D*260/280比值为1.974，表明RNA纯度符合RT-PCR要求。

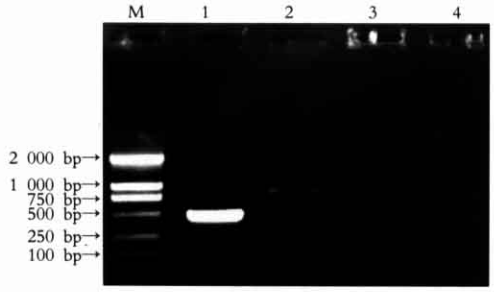


M：DL2000 DNA marker；1：总RNA

图1 总RNA凝胶电泳鉴定

2.2 RT-PCR产物鉴定

经琼脂糖凝胶电泳，结果图2，在DNA marker 800 bp附近，即750～1 000 bp有明亮条带，与预期目的片段大小一致。阳性对照为462 bp。

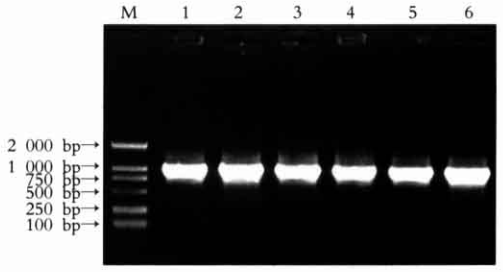


M：DL2000 DNA marker；1：阳性对照；2：PCR产物；3：阴性对照；4：空白对照

图2 RT-PCR产物凝胶电泳

2.3 T载体克隆鉴定

T载体克隆后，菌落PCR扩增的目的片段约880 bp，琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果见图3，表明所挑选的6个单菌落均为阳性克隆。提取质粒DNA送宝生物公司测序，结果与GenBank上BC047440基因cDNA比较，除4个碱基不同外，其余全部符合。

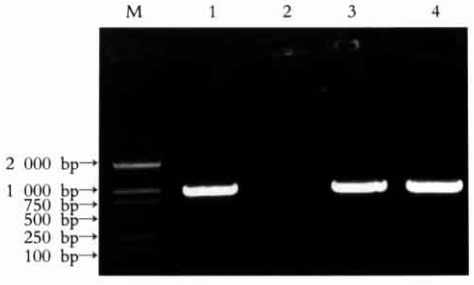


M：DL2000 DNA marker；1～6：PCR产物

图3 重组T载体目的片断PCR产物凝胶电泳

2.4 反义真核表达载体pcDNA3.1(+)BC047440AS鉴定

pcDNA3.1(+)BC047440AS重组质粒菌落PCR扩增的目的片段约870 bp，与预期大小一致，结果见图4。测序结果与GenBank上BC047440基因cDNA比较，除4个碱基不同外，其余均相同，而且目的片段的模板链的5′末端连接在pcDNA3.1(+)多克隆位点的上游，结果表明BC047440基因cDNA片段反向插入pcDNA3.1(+)载体。



M：DL2000 DNA marker；1～4：PCR产物

图4 pcDNA3.1(+)-BC047440载体目的片断PCR产物凝胶电泳

3 讨论

人原发性肝癌作为最常见的恶性肿瘤之一，对人类的健康和生存危害极大。对肝癌发生机制的研究一直是国内外学者关注的热点，近年来，在基因水平上研究肝癌的发病机制及其应用取得了一定进展，某些与人肝癌的发生、发展有关的癌基因、抑癌基因相继被发现[5～8]。然而，它们最初并非直接通过研究肝癌所得到。我们对肝癌组织与癌旁肝组织间差异表达基因进行分离、鉴定，发现了1条肝癌相关新基因，经检索

GenBank，发现与近期登录的基因 BC047440 同源。但此基因是从大脑组织中分离获得，功能未知。本研究从原发性肝癌组织中克隆的目的基因经测序与 BC047440 基因有 4 个碱基不同，其中 3 个在编码区，分别为 310 bp 处的 A 突变为 C，528 bp 处的 A 突变为 G，690 bp 处的 A 突变为 G；另外 1 个在编码区外，为 690 bp 处的 A 突变为 G。由于从人肝癌组织中克隆该基因的报道尚少见，所以基因突变的原因有待进一步研究。

本研究采用的反义真核表达载体构建方法效率及准确率较高。T 载体克隆时，插入片段可正向或反向与 T 载体连接，然而将 *Eco*R Ⅰ 限制性内切酶位点插入目的片段的上游，将 *Hind* Ⅲ限制性内切酶位点插入目的片段的下游，刚好与 pcDNA3.1(+)载体多克隆位点内这两种内切酶的位点反向。然后重组 T 载体，双酶切，不用鉴别插入方向，直接将纯化的目的片段与用相同酶双酶切的 pcDNA3.1(+)载体相连结，即可成功构建反义载体。而且，本实验用的 T 载体不含多克隆酶切位点，不会对一步步的酶切反应造成干扰。使用 T 载体不但可以提高测序的成功率，还可以提高酶切反应的成功率。本实验采用的 pcDNA3.1(+)载体是一种集克隆和表达功能于一体的高效表达载体，连接和转化效率非常高，可直接转染真核细胞，利用载体上的真核细胞启动子序列进行表达，使之特别适用于基因克隆及表达的研究。这种载体的缺点是，载体上没有 LacZ 基因，不能在培养基上利用 X-gal 进行蓝白菌斑筛选，但本实验采用的菌落 PCR 可以快速简便地鉴定阳性克隆菌落，再加上测序鉴定，可以准确地鉴定碱基序列和插入方向。

本研究选用人肝癌组织克隆 BC047440 基因，并成功构建了其反义 RNA 真核表达载体，可进一步转染真核细胞以封闭人肝癌细胞中的 BC047440 基因，观察该基因不表达或低表达的肝癌细胞恶性行为的变化，可以初步鉴定该基因在肝癌形成过程中的作用，对揭示肝癌发生机制具有重要意义。

关键词：肝癌；BC047440；反义基因；真核表达载体
中图法分类号：R394-33　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 李　靖，韩本立，黄桂君，等. 肝癌组织差异表达基因 cDNA 序列的筛选与鉴定[J]. 中华医学遗传学杂志，2003，20(1)：49－52.
[2] 赵弘智，梁　平，李　靖，等. 肝癌相关 cDNA 片段的快速克隆和表达[J]. 世界华人消化杂志，2004，12(8)：1785－1788.
[3] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, *et al*. Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(26): 16899－16903.
[4] 药立波，常智杰. 医学分子生物学实验技术[M]. 北京：人民卫生出版社，2002. 88－93.
[5] Choi J Y, Park Y M, Byun B H, *et al*. Adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy against subcutaneous HuH7 hepatoma cell line nodule of nude mice[J]. J Korean Med Sci, 1999, 14(3): 271－276.
[6] Huang J Z, Xia S S, Ye Q F, *et al*. Effects of p16 gene on biological behaviours in hepatocellular carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(1): 84－88.
[7] Zeng J Z, Wang H Y, Chen Z J, *et al*. Molecular cloning and characterization of a novel gene which is highly expressed in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2002, 21(32): 4932－4943.
[8] Sargent L M, Zhou X, Keck C L, *et al*. Nonrandom cytogenetic alterations in hepatocellular carcinoma from transgenic mice overexpressing c-Myc and transforming growth factor-alpha in the liver[J]. Am J Pathol, 1999, 154(4): 1047－1055.

（编辑　陈聪连）

（上接 1606 页）

高峰，此年龄段发病率占总数的 66.8%，70 岁以后发病率似有下降趋势。本组 871 例肺癌以男性居多，男女比例高达 5.54∶1，提示男性为肺癌的高发人群。男女的肺癌类型分布有显著不同，男性发病率最高的是鳞癌，而女性发病率最高的是腺癌。这可能与男性吸烟比例高，参加接触有毒、有害工作的机会比女性多等有关。病变以侵犯左右主支气管的所占比例较高，分别占左右侧肺癌的 35.4% 和 25.4%。表明支气管镜检查发现时已有不少患者属于晚期肺癌。左右肺总的发病率接近，而气管肿瘤发病率较低。

从病理类型看，总的发病率以鳞癌为最高，占 37.8%，其后依次是腺癌、低分化癌、小细胞癌等。与多数作者的报道类似，但与部分作者的报道有差别[1]，这可能与我们开展盲目肺活检的病例较多有关，因周围型肺癌中腺癌的发病率最高[2,3]。

支气管镜检查对肺癌的诊断有不可替代的作用，为提高诊断率，对支气管镜检查未能观察到的肿瘤，可在仔细阅片的情况下在肿瘤分布的相应支气管用活检钳探查，如活检钳伸入有阻力后可在该部位盲目活检，可显著提高支气管镜的诊断阳性率。

关键词：肺癌；支气管镜
中图法分类号：R768.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 宫　亮，杨和平，沈渝菊，等. 纤维支气管镜下肺癌分布部位及形态与病理类型关系[J]. 重庆医学，2002，31(9)：806－807.
[2] 周仲志，曾飞球，陶艳红. 周围型肺癌的纤维支气管镜检查[J]. 中国内镜杂志，2000，6(3)：47.
[3] 杨永国，宋战平，包爱华，等. 小 C 型臂引导下纤维支气管镜肺活检在诊断周围型肺癌中的应用[J]. 实用诊断与治疗杂志，2003，17(5)：382－383.

（编辑　汪勤俭）