论著

文章编号:1000-5404(2007)11-0996-03

人 iASPP 全长 CDS 的分段扩增、克隆及鉴定

陈 杰[1],辛海明[1],蔡 云[1],侯 露[1],王 刚[1],刘 利[1],卢 欣[2],钟 山[2],刘泽军[1] ([1]第三军医大学西南医院国际合作实验室,重庆 400038;[2] Ludwig Institute for Cancer Research, University College London Branch, London W1W 7BS, UK)

提 要:目的 最初报道的 iASPP 长度为 351 个氨基酸,但最近发现 iASPP 的全长应为 828 个氨基酸,为了探讨全长 iASPP 的功能,我们采取 3 分段扩增的策略克隆全长 iASPP 基因。**方法** 从 HL-60 细胞中提取总 RNA、DNA, RT-PCR 分段扩增目的基因,克隆至 pMD19-T simple 载体,测序,并亚克隆至 pCDNA3.1 载体。**结果** 重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-iASPP 经测序,与 GenBank 上登陆的人 iASPP cDNA(gi:60457962)序列完全一致。**结论** 成功构建了 iASPP 真核表达载体。

关键词: iASPP; 分段扩增; 克隆; p53

中图法分类号: R394-33; R394.3 **文献标识码**: A

Cloning and identification of human iASPP full-length CDS region

CHEN Jie[1], XIN Hai-ming[1], CAI Yun[1], HOU Lu[1], WANG Gang[1], LIU Li[1], LU Xin[2], ZHONG Shan[2], LIU Ze-jun[1] ([1]Laboratory of International Cooperation, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China, [2]Ludwig Institute for Cancer Research, University College London Branch, London W1W 7BS, UK)

Abstract: Objective iASPP was originally reported as long as 351 amino acids. Now, it is clear that the full-length of iASPP is as long as 828 amino acids. To investigate the function of full-length iASPP, we use three-step PCR technique to clone the full-length CDS of iASPP. Methods The total RNA was extracted from HL-60 and cDNA was amplified by RT-PCR. Then the amplified PCR product was digested and inserted into pMD19-T simple vector and subcloned into pCDNA3.1 vector. Results The gene sequence of iASPP was consistent with that reported (gi:60457962) in GenBank with cDNA sequencing. Conclusion The recombinant eukaryotic expression vector containing CDS region of iASPP has been constructed successfully.

Key words: iASPP; PCR; clone; p53

p53 凋亡刺激蛋白家族的抑制成员(inhibitory member of the ASPP family, iASPP)是最近发现的能特异抑制 p53 抑癌功能的蛋白[1]。现已在多种肿瘤细胞中显示 iASPP 过高表达的现象[1-5],提示抑制 iASPP 的高表达有可能成为恢复 p53 抑癌功能的新策略。最初报道的 iASPP 长度为 351 个氨基酸,但最近发现 iASPP 的全长应为 828 个氨基酸[6],原来报道的短 iASPP 可能是全长 iASPP 的变种或截短形式。为了避免名称的混乱,将原来的短 iASPP 称为 iASPP/RAI (早期 iASPP 曾被鉴定为 Rel-associated inhibitor, RAI),将全长 iASPP 称为 iASPP。由于过去对 iASPP 的研究都是基于 iASPP/RAI 序列进行的工作,而全长 iASPP 才是体内的主要存在形式(在 GenBank 中,以前的短的序列已经被长的新序列所代替),因此对以前的研究结果需要重新审视。

基金项目:国家自然科学基金(30428013,30470675)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30428013, 30470675)

作者简介:陈 杰(1976-),男,云南省洱源县人,硕士研究生,主治医师,主要从事表观遗传信号方面的研究。电话:13896074697, E-mail: cj07@21cn.com

通讯作者:刘泽军,电话:(023)68765945, E-mail:zejunliu@hotmail.com

收稿日期:2006-11-07;修回日期:2006-12-01

为了对全长 iASPP 进行系统的研究,我们首先对全长 iASPP 基因进行 PCR 扩增、克隆、鉴定,构建 iASPP 真核表达载体,为进一步深入研究 iASPP 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HL-60 细胞株和 pcDNA 3.1(+)质粒为本室保存,逆转录酶 M-MLV、胶回收试剂、DNA 提取试剂盒 *LA Taq* 酶、DNA 连接酶等为宝生物公司产品,总 RNA 提取试剂盒为 Geneaid 产品。RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品。DNA 和质粒的测序均在宝生物大连公司进行。

1.2 方法

1.2.1 基因的扩增 由于 iASPP 的 CDS 全长为 2 487 bp,一步 PCR 扩增难度较大,因此采用分 3 段扩增的方法进行基因的扩增,表 1 为扩增所用引物序列。

将 HL-60 细胞在 RPMI1640 培养基中,37 ℃,5% CO_2 条件下培养,收集细胞,提取总 RNA, 以总 RNA 为模板合成 cDNA。再以此 cDNA 为模板,使用 TaKaRa *LA Taq* 酶,2×GC Buffer Ⅰ, F/R 为引物进行第 1 次 PCR 扩增,所得到的第 1 次 PCR 产物作为分段扩增的模板。

表 1　iASPP 分段扩增 PCR 引物序列

引物	序列
F	5′- GCTCCGGCCGGCACCATGGACAGCGAGGCATT-3′
R	5′- GGTCTGGAGGGAAGGCAGGAATGCTTGTTT-3′
1F	5′- GGCACCATGGACAGCGAGGCATT-3′
1R	5′- GTGGCGCTAGTGAGGTTGTCCTT-3
2F	5′- AGGACAACCTCACTAGCGCCAC-3′
2R	5′- CTTCGTTCACAGGGGGCCATGTCTG-3′
3F	5′- CAGACATGGCCCCCTGTGAACGAAG-3′
3R	5′- CACGAATTCCTAGACTTTACTCCTTTGAGGCT-3′
4F	5′- AACAAGCTTATGGACAGCGAGGCATTCCAGAGC-3′
4R	5′- CACGAATTCCTAGACTTTACTCCTTTGAGGCT-3′

第 1 段的扩增：以上述第 1 次 PCR 产物为模板，使用 TaKaRa *LA Taq* 酶，2 × GC Buffer Ⅰ，1F/1R 为引物，进行第 2 次 PCR 扩增，切胶回收目的片段。取 1 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。将目的片段 /（PCR-1）测序。

第 2 段的扩增：使用基因组 DNA 提取试剂盒提取 HL60 基因组 DNA，以上述基因组 DNA 为模板，使用 TaKaRa *LA Taq* 酶，2F/2R 为引物进行 PCR 扩增，切胶回收目的片段。取 1 μl 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳，将目的片段/（PCR-2）测序。

第 3 段的扩增：以上述第 1 次 PCR 产物为模板，使用 TaKaRa *LA Taq* 酶，2 × GC Buffer Ⅰ，3F/3R 为引物，进行第 2 次 PCR 扩增。切胶回收目的片段。取 1 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，将目的片段/（PCR-3）测序。

片段的拼接：以分段扩增得到的回收产物 PCR-1 DNA、PCR-2 DNA 及 PCR-3 DNA 为模板，使用 TaKaRa *LA Taq* 酶，2 × GC Buffer Ⅰ，4F/4R 为引物进行 PCR 拼接。取 5 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。切胶回收目的片段。取 1 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。将目的产物（PCR-L）测序。

1.2.2　克隆测序　　使用 DNA 连接酶，将 PCR-L 回收产物与 pMD19-T 连接后，热转化至感受态大肠杆菌 JM109 中，涂布平板过夜培养菌体。挑选菌落，提取质粒后，取 1 μl 进行琼脂糖凝胶电泳。对质粒 DNA 测序。

1.2.3　亚克隆　　将上述克隆测序中序列正确的质粒使用 *Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ 酶切，载体 pcDNA 3.1（+）也使用 *Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ 酶切，再切胶回收目的片段，得到插入片段和载体。取 1 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 DNA 连接酶，将载体与插入片段连接后，热转化至感受态大肠杆菌 JM109 中，涂布平板过夜培养菌体。挑选菌落，提取质粒后，取 1 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。将质粒 DNA 使用 *Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ 进行酶切鉴定，取 10 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，得到重组真核表达载体 pcDNA 3.1（+）/ iASPP。

2　结果

2.1　iASPP 3 个片段的扩增

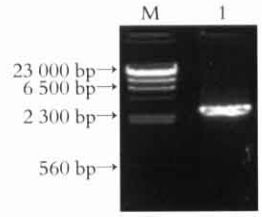
第 1 段扩增产物片段长度为 929 bp；第 2 段扩增产物片段长度为 453 bp，第 3 段扩增产物片段长度为 1 167 bp，以上片段测序后序列与目的片段完全一致。

2.2　iASPP 各片段的拼接及克隆

3 段扩增产物拼接后的目的片段琼脂糖凝胶电泳结果见图 1，片段长度为 2 516 bp，测序后与目的片段完全一致。

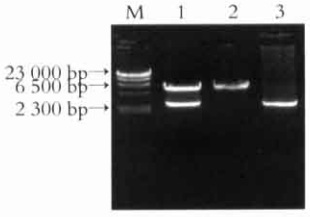
2.3　iASPP 全长 CDS 的亚克隆及酶切鉴定

将亚克隆得到的质粒 DNA 使用 *Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ 进行酶切鉴定。取 10 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。



M：λ-*Hind* Ⅲ DNA 标准；1：回收产物

图 1　3 段 PCR 产物拼接后电泳图



M：λ-*Hind* Ⅲ DNA 标准；1：质粒酶切鉴定；2：pcDNA 3.1（+）*Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ 酶切；3：iASPP CDS（约 2.5 kb）

图 2　重组质粒 pcDNA 3.1（+）/ iASPP 酶切鉴定电泳图

3　讨论

p53 凋亡刺激蛋白家族（apoptosis-stimulating protein of p53，ASPP）是近几年才被发现的能特异调节 p53 的因子[1,7,8]，这也是迄今为止找到的最完善和积极的能特异调控 p53 的基因家族。ASPP 家族由 3 个成员组成：ASPP1、ASPP2 和 iASPP。ASPP1 和 ASPP2 是 p53 蛋白的活化子（activator），能特异性的激活 p53 的促进细胞凋亡的能力。而 iASPP 正好相反，是 p53 蛋白的抑制子（inhibitor）。P53 蛋白的诱导细胞凋亡的能力能被 ASPP1 和 ASPP2 激活，也能被 iASPP 抑制[1,7-9]。由于 iASPP 基因的作用类似于癌基因的作用，因此又被称为是一种新的癌基因[1]。

当我们按照最初文献报道的序列克隆 iASPP 质粒时，测序后发现有 3 个位点与原文报道的序列不一致，第 1 个位点少 1 个 A，第 2 个位点多 1 个 C，第 3 个位点少 1 个 G[1]。将我们得到的序列与原序列相比，存在着三联体密码易位的现象（或称为移码易位），经进一步推算，按照我们得到的序列，这个基因的编码区（CDS）长度从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAG 应为 2 487 个核苷酸，而原序列的 CDS 长度只有 1 056 个核苷酸。当使用生物数据库 Blast 比对时，结果显示有许多克隆片段与我们得到的序列重叠部分是完全一致的，但没有找到在 3 个位点处与原序列相同的同源片段。最后我们将实验结果整理后通报了文献[1]的作者，经重新实验核对后，证明本实验结果是正确的。2005 年，经修改后的正确序列被重新递交到 GenBank，新递交的 iASPP 序列编码区由 2 487 个核苷酸代替了原来的 1 056 个核苷酸。

为了研究全长 iASPP 的功能，我们首先采取 RT-PCR 策略克隆全长 CDS，但 PCR 一次扩增全长没有成功，于是重新设计了分 3 段扩增的策略。第 1 段和第 3 段扩增成功，第 2 段经反复多次扩增，采用不同引物以及巢式 PCR 等手段均告失败，推测可能与这一区域异常 CG 含量或者异常二级结构有关。最后，采用了从 DNA 中钓取相应片段（第 2 段序列在相应的 DNA 中为外显子 6，不含内含子，因此扩增产物与 cDNA 完全一致），再与第 1 段和第 3 段相联接，最后终于得到了全长 CDS 序列。在两侧加入酶切位点 *Hind* Ⅲ/*Eco*R Ⅰ后，克隆至 pMD18-T simple 载体，测序，并亚克隆至 pCDNA3.1 载体，最后得到含 iASPP 全长 CDS 的真核表达质粒，为深入研究 iASPP 的生物学功能打下了基础。

参考文献：

[1] Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil N J, *et al*. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human[J]. Nat Genet, 2003, 33 (2): 162 - 167.

[2] Liu Z J, Zhang Y, Zhang X B, *et al*. Abnormal mRNA expression of ASPP members in leukemia cell lines[J]. Leukemia, 2004, 18(4): 880.

[3] Zhang X, Wang M, Zhou C, *et al*. The expression of iASPP in acute leukemias[J]. Leuk Res, 2005, 29(2): 179 - 183.

[4] Liu Z J, Lu X, Zhang Y, *et al*. Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in cancer cell lines retaining wild-type p53[J]. FEBS Lett, 2005, 579 (7): 1587 - 1590.

[5] 辛海明，刘泽军，陈 杰，等. iASPP 特异性 RNAi 表达载体的构建及其干扰效果鉴定[J]. 第三军医大学学报，2006，28(9)：900 - 902.

[6] Slee E A, Gillotin S, Bergamaschi D, *et al*. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization[J]. Oncogene, 2004, 23 (56): 9007 - 9016.

[7] Samuels-Lev Y, O'Connor D J, Bergamaschi D, *et al*. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53[J]. Mol Cell, 2001, 8 (4): 781 - 794.

[8] Liu Z J, Lu X, Zhong S. ASPP--Apoptotic specific regulator of p53 [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1756 (1): 77 - 80.

[9] 张 云，刘泽军，李 维，等. 肿瘤细胞中 ASPP2 mRNA 的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2003，25(23)：2103 - 2105.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)11-0998-01

右乳浸润性导管癌并发低增生性白血病 1 例

曾 敏，黄建平 （四川省仁寿市人民医院血液科，仁寿 618400）

患者，女性，49 岁，因皮肤淤斑、牙龈出血 2 周入院。2004 年 5 月，患者因发现右乳头凹陷及右乳晕区扪及包块，在四川大学华西医院就诊，病理示右乳浸润性导管癌，激素受体检测：ER(+-)，PR(++)，PS2(-)，C-erb-2(-)，Ki-67(+，约占 1%)，行右乳癌改良根治术，术后进行化疗（依托泊苷 VP-16、环磷酰胺 CTX、5-氟尿嘧啶 5-Fu 为主），第 2 次化疗后停经，化疗后常规放疗（具体不详），放疗后长期口服三苯氧胺，目前肿瘤标记物均正常。2006 年 6 月，患者无明显诱因出现皮肤淤斑、牙龈出血，肝脾不大，血常规示全血细胞减少，到四川大学华西医院住院治疗，骨髓象：有核细胞增生活跃，粒细胞系统占 47.5%，以原粒细胞为主，可见小原粒细胞，占 37.5%，其形态异常，细胞体大小不均，核仁明显，多为 1～4 个，核染色质细致，呈沙状，质染蓝色，部分细胞质中可见 Auer 氏小体，先后两次骨髓活检诊断意见为：骨髓改变为三系均大幅度减少，但红系相对增生，考虑红白血病。铁染色：细胞外铁 +++，铁粒幼细胞 0.36，碱性磷酸酶染色阳性 0.09，碱性磷酸酶积分 12。经止血输血等治疗，好转出院。现到我院治疗。入院后给予支持、抗感染、止血等对症治疗，行 DA 方案化疗无效后死亡。

讨论

据患者临床、外周血常规、骨髓象等来看，AML-M6 诊断是成立的[1]，是典型的低增生性白血病。由于目前肿瘤诊断水平的提高，肿瘤患者得以长期生存，肿瘤迭合病例报道也逐渐增多。所谓肿瘤迭合是指先后发生于机体同一器官系统的 2 个或 2 个以上的恶性肿瘤，包括实体瘤与实体瘤之间的迭合，白血病与白血病，实体瘤与白血病之间的迭合[2]。多数抗癌药为细胞毒制剂，具有毒性、致畸性、致突变性和致癌性。电离辐射有潜在致白血病和致癌作用。已有资料证明电离辐射可引起染色体异常和 DNA 损伤，最严重的损伤是 DNA 双链断裂。目前还少见三苯氧胺引起白血病的有关报道[2]。有的患者实体瘤与白血病同时发生，有学者提出它们存在着相同的病因。化疗或放疗及两者联合治疗肿瘤均可增加白血病或其他肿瘤的机会。在恶性肿瘤治疗中，应根据抗肿瘤药的毒副反应合理选药，争取最佳联合化疗方案，减少抗肿瘤治疗相关性致癌机会。同时，严格掌握化疗、放疗以及化疗联合放疗的适应证，避免滥用化疗或放疗，争取最小毒副反应、获得较好的疗效。

关键词：乳房浸润性导管癌；低增生性白血病
中图法分类号：R733.7 文献标识码：B

参考文献：

[1] 钱林生，万岁柱. 急性白血病的诊断与分型[M]//张之南，杨天楹，郝玉书. 血液病学. 北京：人民卫生出版社，2003：871.

[2] 薛 军，谢万灼，林茂芳. 慢性粒细胞白血病并发淋巴瘤 1 例[J]. 临床血液学杂志，2006，19(3)：177.

（编辑 郭建秀）

作者简介：曾 敏（1964-），男，四川省仁寿市人，副主任医师，主要从事血液病方面的研究。电话：(0838)8218712

收稿日期：2006-09-07；修回日期：2006-12-18