维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2007年第16卷第4期
J Regional Anat & Operative Surg, 2007, Vol. 16, No. 4

hNaDC1基因5'侧翼区转录调控序列系列载体构建与鉴定

张剑凯[1]，杨聚荣[2]，李雪鹏[1]，何娅妮[2]　(1.广东医学院基础学院人体解剖学教研室，广东 湛江 524023；2.第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肾内科，重庆 400042)

[摘　要] **目的**　构建hNaDC1基因5'侧翼区转录调控序列系列萤火虫荧光素酶报告基因表达载体。**方法**　PCR扩增获得hNaDC1基因5'侧翼转录调控区不同长度片段：hNaDC1A(－2 232/＋136，2 368 bp)、hNaDC1B(－1 640/＋136，1 776 bp)、hNaDC1C(－1 084/＋136，1 221 bp)、hNaDC1D(－253/＋136，389 bp)、hNaDC1E(－2 232/－12，2 244 bp)，以pGL3-Basic为载体构建hNaDC1基因5'侧翼序列系列缺失质粒。重组体通过特异限制性内切酶酶切鉴定，并送样测序鉴定。**结果**　成功构建hNaDC1基因5'侧翼区转录调控元件萤火虫荧光素酶报告基因表达载体5个：pGL3-hNaDC1A～E。**结论**　为进一步研究NaDC1基因5'侧翼区转录调控元件的分布特点及转录调控元件与转录因子间的相互作用提供了基本实验条件。

[关键词] hNaDC1基因；基因表达调控；载体构建
[中图分类号] Q782　[文献标识码] A　[文章编号] 1672-5042(2007)04-0226-03

Construction and indentification of the vectors for 5' flanking regulated elements of hNaDC1 gene

ZHANG Jian-kai, YANG Ju-rong, LI Xue-peng, HE Ya-ni (Department of Anatomy, Basal Institute of Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524023, China)

Abstract: Objective　To construct the firefly luciferase report gene vectors for 5' flanking regulated elements of hNaDC1 gene. **Methods**　The DNA fragments hNaDC1A～E(－2 232/＋136) in 5' flanking region of hNaDC1 gene were amplified from the nephridial tissue by using PCR. The PCR products were directionally subcloned into pGL3-Basic vector. The recombined clones were identified by agarose gel electrophoresis after restriction endonuclease digesting and DNA sequencing. **Results**　5 expression vectors(pGL3-NaDC1A～E) for 5' flanking regulated elements of hNaDC1 gene had been constructed. **Conclusion**　These expression vectors offer the basic experimental conditions for studying the distribution characters of hNaDC1 gene 5' flanking regulations elements and the properties of interactions between the elements and regulation proteins with the help of dual luciferase report gene assay system.

Keywords: hNaDC1 gene; regulation of gene expression; construction vector

人钠离子依赖性二羧酸协同转运蛋白1(human Na^+/dicarboxylate cotransporter 1，hNaDC1)是负责转运三羧酸循环中间代谢产物琥珀酸、枸橼酸和α-酮酸等有机阴离子的低亲和力跨膜转运蛋白，主要分布于肾脏近端小管和小肠的刷状缘[1]。目前认为，钠离子依赖性二羧酸协同转运蛋白参与机体能量代谢、酸碱平衡调节以及哺乳类动物寿限的调控等重要生命活动，可能与肾结石、代谢性酸中毒和衰老等病理生理过程密切相关[2-5]。然而迄今为止，hNaDC1基因的表达调控机制尚不清楚。本研究以萤火虫荧光素酶报告基因质粒为载体构建了hNaDC1基因5'侧翼转录调控序列系列缺失质粒，为进一步研究hNaDC1基因转录调控机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　细菌菌株、质粒及主要试剂

E. coli JM109为第三军医大学野战外科研究所创伤烧伤复合伤国家重点实验室留存。萤火虫荧光素酶报告基因载体pGL3-Basic、限制性内切酶Kpn I和Hind III购自Promega公司；Pfu高保真DNA聚合酶及相关PCR试剂购自Stratagene公司；T4DNA连接酶购自TaKaRa公司；DNA纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒购自Omega公司。琼脂糖、琼脂粉、酵母提取物及胰蛋白胨为Sigma公司产品。

1.2　PCR引物设计与合成

根据转录因子预测软件MatInspector 5.0和TRANSFAC 4.0数据库预测结果(结果已另文发表)，设计hNaDC1基因5'侧翼调控区序列相应的上、下游PCR引物，共5对。引物由上海生工公司合成。所有5'端引物均加Kpn I酶切位点，所有3'端引物均加Hind III酶切位点。引物序列及扩增片段大小见表1。

[作者简介] 张剑凯(1973－)，男，河南省沈丘县人，讲师，硕士，主要从事解剖临床应用与基础方面的研究。电话：(0769)8493136，E-mail：zhangjiankai2002@163.com

[收稿日期] 2007-03-30　[修回日期] 2007-04-28

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 hNaDC1基因5'侧翼不同长度片段引物序列信息

基因片段	引物	引物序列
hNaDC1A	Aup	5' GGGTACCAGAGGGTCTCAGTAAAACAT 3'
(-2 232/+136)	Alow	5' GAAAGCTTGCACGAAGAACACGATC 3'
hNaDC1B	Bup	5' CAGGTACCTCTCGGTGGCATAACAG 3'
(-1 084/+136)	Alow	5' GAAAGCTTGCACGAAGAACACGATC 3'
hNaDC1C	Cup	5' GGGTACCTCAGGATACCCATAATGC 3'
(-202/+136)	Alow	5' GAAAGCTTGCACGAAGAACACGATC 3'
hNaDC1D	Dup	5' GGGTACCAGAGGGTCTCAGTAAAACAT 3'
(-45/+136)	Alow	5' GAAAGCTTGCACGAAGAACACGATC 3'
hNaDC1E	Aup	5' CGGGTACCTCAGCAGCCTCCAAG 3'
(-2 232/-12)	Elow	5' GGAAGCTTAGATGCAGCCAAGCAG 3'

1.3 PCR扩增

按常规酚抽提方法提取人肾组织基因组DNA,以此作为模板,添加相应引物,采用Pfu高保真DNA聚合酶扩增相应DNA片段,PCR条件为:94 ℃变性45 s,58 ℃退火1 min,72 ℃延伸5 min,30循环;最后72 ℃延伸8 min。PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色并照相予以鉴定。

1.4 pGL3-hNaDC1A~E表达载体的构建与鉴定

pGL3-Basic空白载体和PCR产物均用Kpn I、Hind III双酶切,回收pGL3-Basic大片段和PCR产物,采用T4DNA连接酶将pGL3-Basic片段分别与hNaDC1A~E各片段连接,转化DH5α感受态细菌。碱裂解法提取质粒,Kpn I、Hind III双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色并照相予以鉴定重组子。重组子依次命名为pGL3-hNaDC1A~E。送样宝生物公司(大连)测序。

2 结果

2.1 hNaDC1基因5'侧翼区序列的PCR扩增

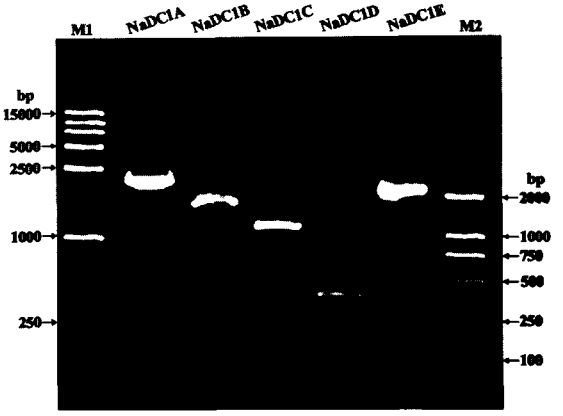
采用PCR法从人肾组织中扩增不同长度的hNaDC1基因5'侧翼转录调控区序列hNaDC1A~E,琼脂糖凝胶电泳显示获得的PCR产物的大小与设计长度一致(图1)。

2.2 重组表达质粒载体的克隆与鉴定

应用DNA重组技术,将PCR产物均用Kpn I、Hind III双酶切,将纯化的hNaDC1A~E片段定向克隆到pGL3-Basic表达载体中,构建重组表达载体pGL3-hNaDC1A~E。重组质粒经Kpn I、Hind III双酶切后的琼脂糖凝胶电泳鉴定图谱见图2,可见重组表达质粒载体中外源DNA片段的大小同相应PCR产物的大小一致。测序结果显示各插入片段与GenBank公布的序列完全一致。表明已成功构建重组表达质粒载体pGL3-hNaDC1A~E。

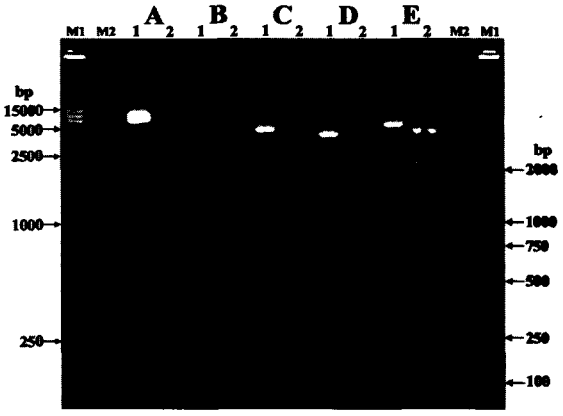
3 讨论

低亲和力钠离子依赖性二羧酸协同转运蛋白(NaDC1)在肾组织近端肾小管刷状缘的分布已经得到证实[6],包括兔、大鼠及人等不同种属的NaDC1基因相继被克隆[7-9],其具有参与机体能量代谢、酸碱平衡调节以及哺乳类动物寿限的调控等生理功能,与肾



M1:DNA marker 15 000 bp ladder; M2:DNA marker 2 000 bp ladder

图1 hNaDC1基因5'侧翼转录调控区序列PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定



M1:DNA marker 15 000 bp ladder; M2:DNA marker 2 000 bp ladder; A:pGL3-NaDC1A; B:pGL3-NaDC1B; C:pGL3-NaDC1C; D:pGL3-NaDC1D; E:pGL3-NaDC1E; 1:重组子; 2:双酶切产物

图2 重组子pGL3-hNaDC1A~E及其Kpn I、Hind III双酶切鉴定

结石、代谢性酸中毒和衰老等疾病的关系日渐受到关注。随着后基因组时代即蛋白质组时代的来临,对新基因的功能及病理生理意义的解析成为生命科学领域研究的热点。因此,研究hNaDC1基因表达的调控机制,将对进一步研究hNaDC1基因的功能及其与疾病的关系创造条件。

本研究前期采用MatInspector 5.0对hNaDC1基因的转录调控序列的预测显示,在hNaDC1基因-2 232/+136区域共有152个74种转录因子结合位点。根据预测结果,本研究克隆了具有共同3'末端的hNaDC1A~D序列,并依次相差一定数目的碱基,还克隆了具有不同5'末端的hNaDC1E序列。各相邻片段跨度之间的差距之所以如此选择,主要是为了有效控制整个操作系统的复杂性,使之始终处在既能使

维普资讯 http://www.cqvip.com

PCR产物和重组子鉴定操作方便有效，同时还要考虑今后在应用荧光素酶报告基因检测系统时能够提供尽量多的有用信息。

本研究将肾组织中克隆出的hNaDC1基因5'侧翼转录调控区不同长度DNA片段hNaDC1A～E，分别插入pGL3-Basic载体中，成功构建了一系列萤火虫荧光素酶报告基因表达载体pGL3-hNaDC1A～E。为借助于双荧光素酶报告基因检测系统研究hNaDC1基因5'侧翼区转录调控元件的分布特点，以及转录调控元件与转录调控蛋白之间相互作用的性质提供基本实验条件。

[参考文献]

[1] Pajor AM. Molecular properties of sodium/dicarboxylate cotransporters [J]. J Membr Biol, 2000, 175(1): 1-8.

[2] Pajor AM. Citrate transport by the kidney and intestine[J]. Semin Nephrol, 1999, 19(2): 195-200.

[3] Aruga S, Wehrli S, Kaissling B, et al. Chronic metabolic acidosis increases NaDC-1 mRNA and protein abundance in rat kidney[J]. Kidney Int, 2000, 58(1): 206-215.

[4] Yagisawa T, Chandhoke PS, Fan J. Metabolic risk factors in patients with first-time and recurrent stone formations as determined by comprehensive metabolic evaluation[J]. Urology, 1998, 52(5): 750-755.

[5] Rogina B, Reenan RA; Nilsen SP, et al. Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in Drosophila[J]. Science, 2000, 290(5499): 2137-2140.

[6] 何娅妮，陈香美，于志恒，等. 人钠/二羧酸协同转运蛋白1基因的融合表达及其抗体的制备[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2002, 18(3): 356-360.

[7] Pajor AM. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney[J]. Am J Physiol, 1996, 270(4 Pt 2): F642-F648.

[8] Sekine T, Cha SH, Hosoyamada M, et al. Cloning, functional characterization, and localization of a rat renal Na+/dicarboxylate transporter[J]. Am J Physiol, 1998, 275(2 Pt 2): F298-F305.

[9] Pajor AM. Sequence and functional characterization of a renal sodium/dicarboxylate cotransporter[J]. J Biol Chem, 1995, 270(11): 5779-5785.

（编辑：余汇洋）

手术室差错事故的发生原因及防范措施

马丽娟[1]，杨明利[2]，马丽嘉[2]　（1. 桦川县妇幼保健院手术室，黑龙江 桦川 154300；2. 佳木斯市结核病防治院，黑龙江 佳木斯 154002）

[关键词] 手术室；差错；防范措施

[中图分类号] R472.3　[文献标识码] B　[文章编号] 1672-5042(2007)04-0228-01

手术室是临床外科科室的中枢，相关的护理工作在很大程度上影响着手术的成败，手术室的任何差错事故都可能给患者造成严重的影响。本文将手术室常见差错事故的发生原因进行总结，提出了相应的防范措施，现报告如下。

1 手术室差错事故的发生原因

手术室常见的差错事故及其发生原因主要有：①用药及输血、输液时查对有误。多由于手术室护士疏忽大意，忙中出错，药物摆放有误或标识不清等造成。②器械准备不全，与手术所需不符，器械性能不佳、陈旧老化，术中仪器使用不当等。③接病人时出错，导致错治病人。手术室护士没有对病人进行认真核查，特别是病人术前紧张及应用镇静剂后易发生接错或入错手术间的情况。④物品清点有误。主要发生在术前、关闭体腔前后，器械、敷料、缝针等清点有误。⑤手术体位安置有误。体位安置不当导致压疮发生，约束带过紧或肢体过度外展造成神经受压，衬垫放置不当影响病人循环呼吸。⑥弄错、丢失标本。手术中取下的组织未询问医师而自行处理或丢弃，影响术后确诊，造成不可挽回的损失。

[收稿日期] 2006-12-10　[修回日期] 2007-02-18

2 手术室差错事故的防范措施

2.1 常见护理差错的防范措施

针对常见的护理差错，具体防范措施：①防止用错药物。②避免手术器械造成的影响。③防止接错患者。④防止器械和纱布遗留创口或体腔内。⑤防止弄错手术部位。⑥防止弄错、丢失标本。⑦严格遵守无菌原则，防止院内感染。

2.2 完善相关的管理制度

完善、系统的规章制度是建立质量管理体系的前提，是防止差错事故、提高工作质量的保证。首先应完善手术室的一般制度，抓好落实手术人员规则、洗手规则、清洁卫生制度、消毒隔离管理制度、接送病人制度、各类人员岗位责任制及考勤制度、奖惩措施。其次要建立健全安全管理制度，术前做到"六查"、"十二对"、"四到位"。"六查"即接病人时查（病区、床号、姓名、性别、住院号、诊断、术前准备、术前用药及过敏情况），入手术间时查，麻醉前查，消毒皮肤前查，执刀时查，关闭体腔前后查。"十二对"即对科室、床号、姓名、性别、年龄、手术间号、手术名称、手术部位、所需药品、物品药物过敏情况、灭菌器械敷料是否合格、用物是否齐全适用。"四到位"即急救药品、吸

（下转第250页）