基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0645-03

尤文肉瘤 EWS-FLI1 基因原核表达质粒的构建及鉴定

陈文昭[1],黄 路[2],黄山虎[1],曹 凯[1],舒 勇[1],韩智敏[1],安 洪[3]
(1.南昌大学第一附属医院骨科,南昌 330006;2.江西省妇幼保健院儿保科,南昌 330006;3.重庆医科大学第一附属医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建尤文肉瘤 EWS-FLI1 基因原核表达质粒。方法:从人尤文肉瘤 A673 细胞中提取总 RNA,以 RT-PCR 法扩增 EWS-FLI1 基因序列,目的基因两侧引入 *Sac* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切位点,克隆至 pMD18-T 载体中,转化大肠杆菌 JM109,筛选阳性克隆作 PCR 鉴定、酶切鉴定及测序鉴定。再将 EWS-FLI1 基因亚克隆至原核表达载体 pQE30 中,构建重组原核表达质粒 pQE30-EWS-FLI1,酶切及测序鉴定。所构建的重组质粒转化 JM109,IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE 电泳后转印到 NC 膜上,进行 Western blot 鉴定。结果:PCR 结果显示扩增片段大小约为 1.5 kb,双酶切鉴定目的基因片段大小约为 1.5 kb,阳性克隆测序结果显示目的基因序列与预期相同。所构建重组质粒在大肠杆菌中表达出与预期大小相符的 54 kD 蛋白,经鉴定系 EWS-FLI1 蛋白。结论:成功构建了 pQE30-EWS-FLI1,并进行了原核表达,为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

【关键词】EWS-FLI1 融合基因;尤文肉瘤;原核表达质粒
【中国图书分类法分类号】R738.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-16

The construction and identification of prokaryotic expression vector pQE30-EWS-FLI1

CHEN Wen-Zhao, et al
(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Nanchang University*)

【Abstract】*Objective*: To construct Ewing's sarcoma EWS-FLI1 gene prokaryotic expression vector. *Methods*: The target gene of EWS-FLI1 was obtained by RT-PCR method after the total RNA was extracted from Ewing's sarcoma A673 cells. The site sequences of restrictive endonuclease *Sac* Ⅰ and *Hind* Ⅲ were introduced into the upstream and downstream of target gene respectively. The target gene fragment were cloned into pMD18-T and transformed into *E.Coli* JM109. Screened positive clones were confirmed by PCR, restrictive endonuclease digestion and DNA sequencing. The EWS-FLI1 gene was sequentially subcloned into prokaryotic expression vector pQE30, and the recombinant plasmid pQE30-EWS-FLI1 was confirmed by restrictive endonuclease digestion and DNA sequencing. The proteins, expressed in E. coli JM109 transformed with EWS-FLI1recombinant plasmid under IPTG induction, were characterized by SDS-PAGE and Western-blot. *Results*: PCR result indicated that an amplified DNA fragment was in size of 1.5 kb. Restrictive endonuclease digestion analysis indicated that the target gene was in size of 1.5 kb. DNA sequencing analysis demonstrated that sequence of target gene accorded with anticipated one. The EWS-FLI1 with a molecular weight of 54 kD was highly expressed in pQE30-EWS-FLI1. Western blot proved that the expressed product had the antigenicity of EWS-FLI1. *Conclusion*: The recombinant prokaryotic expression vector pQE30-EWS-FLI1 is constructed successfully, which will contribute to the further research of EWS-FLI1.

【Key words】EWS-FLI1fusion gene; Ewings sarcoma; Prokaryotic expression vector

尤文肉瘤(Ewing's sarcoma,EWS)是一种高度恶性骨肿瘤,其发病率在儿童及青少年原发恶性骨肿瘤中仅次于骨肉瘤[1]。原发瘤患者的死亡率达 50%[2,3],已发生转移的患者生存率低于 20%[4],死亡患者几乎全部归因于转移[5],目前发现,95 %的尤文肉瘤家族具有特异的染色体易位 *t* (11;22)(q24;q12),重排的 22 号染色体上 FLI1 基因的 5'端与 EWS 基因的 3'端相结合,产生 1 个新的融合基因,编码的融合蛋白 EWS-FLI1 是尤文肉瘤发生、发展的关键[1],同时也是治疗尤文肉瘤理想的特异性靶点[5,6]。本实验构建 pQE30-EWS-FLI1 原核表达质粒,为后继实验奠定基础。

作者介绍:陈文昭(1985-),男,硕士,
研究方向:骨肿瘤生物治疗。
通讯作者:曹 凯,男,副教授,E-mail:osteo.caokai@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30760254)。

1 材料和方法

1.1 质粒、细胞和菌株

pMD18-T 克隆质粒、原核表达质粒 pQE30 均由本实验

室保存。人尤文肉瘤细胞 A673 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。大肠杆菌 E coli JM109 购自宝生物工程公司。

1.2 主要试剂

细胞总 RNA 提取剂 RNAiso、High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit、PrimeSTART HS DNA Polymerase、Agarose Gel DNA Purification Kit、DNA A-Tailing Kit、DNA Fragment Purification Kit、DNA Ligation Kit、限制性内切酶(*Sac* Ⅰ、*Hind* Ⅲ)、DL2000 DNA Marker、λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker 均购自宝生物工程公司,引物由宝生物工程公司合成。

1.3 克隆引物

上游引物:5'-GAGCTCATGGCGTCCACGGATTACAG-3';下游引物 5'-AAGCTTCTAGTAGTAGCTGCCTAAGTGT-3'。

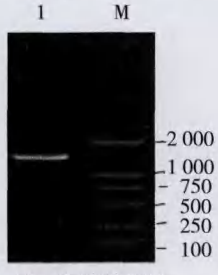
1.4 目的基因的获取及克隆测序

使用 RNAiso 从人尤文肉瘤 A673 细胞中提取 total RNA,取 1 μl 进行 1%琼脂糖凝胶电泳。按照 High Fidelity Prime Script™ RT-PCR Kit 操作说明书进行反转录实验,反应条件为:65℃ 5 min,30℃ 10 min,42℃ 30 min,95℃ 5 min;使用 Prime START HS DNA Polymerase 进行 PCR 扩增,条件为 94℃ 3 min,(98℃ 10 s,50℃ 15 s,72℃ 1min,30 个循环),72℃ 10 min。使用 Agarose Gel DNA Purification Kit 切胶回收上述 PCR 产物,DNA A-Tailing Kit 上 A 处理,DNA Fragment Purification Kit 精制,取 1 μl 进行 1%琼脂糖凝胶电泳观察。

使用 DNA Ligation Kit 中的连接酶将 PCR 产物与 pMD18-T simple 载体连接后,热转化至 E coli JM109 中,涂布平板,37℃过夜培养。挑选阳性菌落植菌,提取质粒并命名为 pMD18-EWS-FLI1。并将克隆重组质粒送宝生物公司测序。

1.5 目的基因亚克隆

使用 *Sac* Ⅰ/*Hind* Ⅲ 限制性内切酶对 pMD18-EWS-FLI1 克隆载体及 pQE30 表达载体进行双酶切。反应体系如下:质粒 10 μl、*Hind* Ⅲ(10 U/μl) 5 μl、*Sac* Ⅰ(10 U/μl) 5 μl、10× M Buffer 10 μl、dH_2O 70 μl。反应条件:37℃,4 h。然后使用 Agarose Gel DNA Purification Kit 切胶回收目的片段,取 1 μl 进行琼脂糖凝胶电泳。使用 DNA Ligation Kit 中的连接酶,将目的基因与 pQE30 连接后,热转化至 E.coli JM109 中,涂布平板,37℃过夜培养,挑选阳性菌落植菌,提取质粒并命名为 pQE30-EWS-FLI1。使用 *Sac* Ⅰ/*Hind* Ⅲ对 pQE30-EWS-FLI1 重组质粒进行双酶切鉴定,全量电泳。将 pQE30-EWS-FLI1 质粒送宝生物公司测序验证。



M. DL2 000 DNA Marker; 1. ESW-FLI1

图 1 PCR 产物电泳扩增产物约 1.5 kb,与预期相符

1.6 重组质粒的诱导表达及产物鉴定

将鉴定无误的 pQE30-EWS-FLI1/JM109 接种于 1 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中过夜培养,取 50 μl 过夜培养物转接入 5 ml 含氨苄青霉素的 LB 中,继续培养至 A 值约为 0.6,37℃加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L,取诱导 0.5、1、2、3 和 4 h 各组样品,煮沸 5 min,SDS-PAGE 检测表达产物,并用 His 单抗作 Western blot 鉴定。

2 结 果

2.1 PCR 产物纯化结果

2.2 pMD18-EWS-FLI1 双酶切片段琼脂糖电泳结果

2.3 pQE30-EWS-FLI1 酶切电泳结果

2.4 pQE30-EWS-FLI1 重组原核表达质粒测序结果

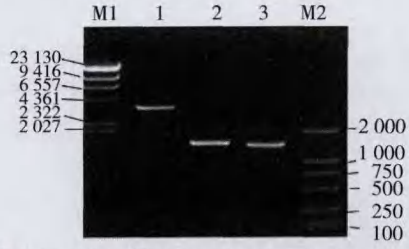
将 pQE30-EWS-FLI1 测序结果证实目的基因片段与 GeneBank 结果相同。测序结果见图 4。

2.5 pQE30-EWS-FLI1 表达产物的检测

重组 pQE30-EWS-FLI1 转化的大肠杆菌 JM109,用 IPTG 诱导表达后,经 SDS-PAGE 检测对照无明显表达,实验组 0.5、1、2、3 和 4 h 各组可见在 54 kD 处有一蛋白带,IPTG 诱导 2 h 时最多(图 5)。用 western blot 法检测可见在 54 kD 处有一与 His 单抗结合带(图 6)。

3 讨 论

EWS 由核浆比高的小圆细胞组成,归为小圆蓝色细胞肿瘤,典型特点是胞内含有糖原,胞浆呈弱嗜酸性,过碘酸希夫实验呈阳性,圆形胞核内染色质均匀分布,细胞有丝分裂不活跃。尤文肉瘤具有特异的染色体易位 $t(11;22)(q24;q12)$,重排的 22 号染色体上 EWS 基因的 3'端与 FLI1 基因的 5'端相结合,产生 1 个新的融合基因[8],编码的融合蛋白 EWS-FLI1 诱导一系列基因的异常表达导致了尤文肉瘤的发生和发展[8]。最近的研究表明,EWS-FLI1 融合基因通过抑制 DKK-1 表达及抑制 β-连环蛋白/T 细胞因子(β-catenin



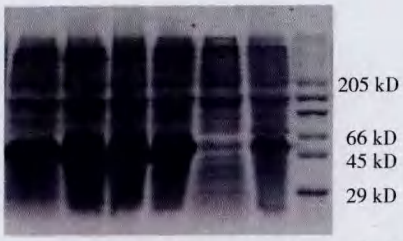
M1. λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker; 1. PQE30 Vector; 2. pMD18-EWS-FLI1 Insert; 3. pMD18-EWS-FLI1 Insert; M2. DL2000 DNA Marker

图 2 双酶切片段琼脂糖电泳结果:目的片段大小约 1.5 kb,与预期相符



M1. λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker；1. PQE30 Vector；2. pQE30-EWS-FLI1 酶切结果；3. pQE30-EWS-FLI1 酶切结果；4. EWS-FLI1 Insert；M2. DL2000 DNA Marker

图 3 pQE30-EWS-FLI1 酶切电泳结果：目的片段大小约 1.5 kb，与预期相符



1. IPTG 诱导 4 h 组；2. IPTG 诱导 3 h 组；3. IPTG 诱导 2 h 组；4. IPTG 诱导 1 h 组；5. 对照组；6. IPTG 诱导 0.5 h 组；7. Marker

图 5 pQE30-EWS-FLI1 表达产物 SDS-PAGE 电泳结果

/TCF）依赖的转录来促进尤文肉瘤的生长[9]。另外有学者通过阻止 RNA 解旋酶 A 与 EWS-FLI1 融合蛋白的结合诱导了尤文肉瘤细胞凋亡，并抑制了尤文肉瘤细胞的移植瘤生长[10]。对 EWS-FLI1 融合基因的深入研究无疑有助于了解尤文肉瘤发生和发展的机制，为尤文肉瘤的治疗奠定基础。本实验拟构建 EWS-FLI1 表达载体，为下一步的实验提供研究工具。

由于 EWS 与 FLI1 融合的位点存在变异，故导致产生不同的 EWS-FLI1 融合型，但最普遍的融合型为一型[11]，而A673 细胞的 EWS-FLI1 融合基因为一型[12]，因此从 A673 细胞中获得的 EWS-FLI1 目的基因符合实验需要。A673 细胞总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果显示提取的 RNA 质量高，PCR 结果显示扩增片段大小约为 1.5 kb，阳性克隆测序结果显示获得的目的基因 EWS-FLI1 序列与文献报道[13]及 GenBank 结果相同。将 pMD18-EWS-FLI1 双酶切获得的目的基因片段大小约为 1.5 kb，符合预期。亚克隆后重组原核表达质粒 pQE30-EWS-FLI1 双酶切获得的目的基因片段大小约为 1.5 kb，符合预期，测序结果再次证实目的基因片段与 GeneBank 结果相同。pQE30-EWS-FLI1 转化 JM109，IPTG 诱导后，表达产物经 SDS-PAGE 电泳显示在 54 kD 处有一高表达蛋白条带，Western blot 鉴定表达产物为 EWS-FLI1 蛋白。

为下一步融合蛋白表达实验，我们选用了 pQE30 原核表达载体作为蛋白表达载体。pQE 系列质粒作为一种常用的原核表达载体，其有如下特点：pQE30 属于 PDS 质粒家族，带有大肠杆菌 T5 启动子和转录终止信号，能够编码 6 个组氨酸残基，外源基因经多克隆位点插入后，表达的蛋白带有 1

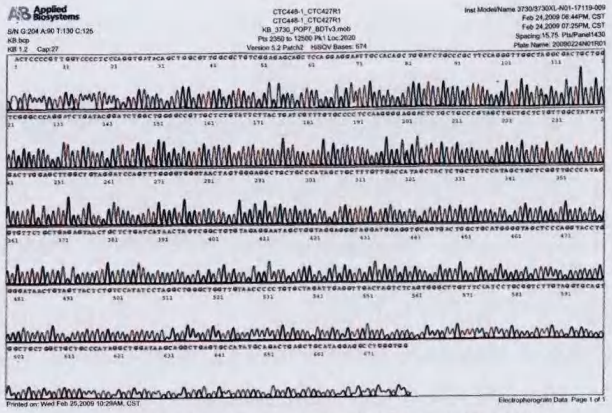
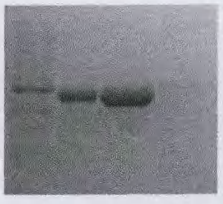


图 4 pQE30-EWS-FLI1 重组原核表达质粒测序结果



1. Marker；2. IPTG 诱导 0.5 h 组；3. IPTG 诱导 2 h 组；4. 对照组

图 6 His 单抗的 western blot 鉴定

个六聚组氨酸接头。六聚组氨酸接头对表达的蛋白的活性及结构影响非常小，但是对表达蛋白的纯化具有非常重要的作用。通过金属离子的螯合作用，带 6 个组氨酸的重组蛋白就可以连接到 Ni2 NTA 琼脂柱上，经过洗涤和洗脱即可获得高纯度的重组蛋白。即使在蛋白变性的情况下也可一步完成纯化过程，简化了基因工程下游的纯化操作。此外，pQE30 载体序列含有大量的酶切位点，为外源基因的插入及重组质粒的鉴定提供了便利的条件。

本实验成功构建重组原核表达质粒 pQE30-EWS-FLI1，为下一步实验奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Rodriguez-Galindo C, Spunt S L, Pappo A S. Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future[J]. Med Pediatr Oncol, 2003, 40: 276-287.

[2] Grier H E, Krailo M D, Tarbell N J, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone[J]. N Engl J Med, 2003, 348: 694-701.

[3] Meyers P A, Krailo M D, Ladanyi M, et al. High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis[J]. J Clin Oncol, 2001, 19: 2812-2820.

[4] Barker L M, Pendergrass T W, Sanders J E, Hawkins DS. Survival after recurrence of Ewing's sarcoma family of tumors[J]. J Clin Oncol, 2005, 23: 4354-4362.

[5] Hu-Lieskovan S, Heidel J D, Bartlett D W, et al. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0648-04

抑癌基因 PTEN 随增龄在大鼠肾脏组织的表达

陈俊香[1],蔡广研[2],陈香美[2],卓 莉[1],马 强[2],师锁柱[2],刘伏友[1]
(1.中南大学湘雅二医院肾内科,长沙 410011;2.中国人民解放军总医院肾内科,北京 100853)

【摘 要】目的:研究与张力蛋白同源、第 10 号染色体缺失的磷酸酶基因(Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10,PTEN)随增龄在大鼠肾组织内表达的变化,并探讨其在肾脏衰老中的作用。方法:分别留取 3、12、24 月龄 Wistar 大鼠肾组织(n=6),石蜡切片 CD34 免疫组化染色观察肾组织微血管生成;western blot 和免疫组化染色检测大鼠肾组织 PTEN 表达。结果:western blot 显示,随增龄大鼠肾组织蛋白表达水平逐渐升高,24 月龄大鼠表达水平显著高于 3,12 月龄大鼠(P<0.05);免疫组化显示 PTEN 在大鼠肾小球和肾小管均有表达,24 月龄大鼠肾小球和肾小管阳性面积百分比均显著高于 3、12 月龄大鼠(P<0.05)。随增龄大鼠肾组织内出现微血管生成障碍,24 月龄大鼠肾小球毛细血管和管周毛细血管密度均显著低于 3、12 月龄大鼠(P<0.05);相关分析显示,二者与大鼠肾组织 PTEN 蛋白表达水平均呈负相关(r=-0.761 和 -0.613,P<0.05)。结论:随增龄大鼠肾组织 PTEN 蛋白表达呈现上升趋势,可能通过影响血管生成参与肾脏衰老过程。

【关键词】PTEN;肾脏;衰老
【中国图书分类法分类号】R572.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-26

Alteration of the expression of PTEN in rats with aging

CHEN Jun-xiang, et al
(*Department of Nephrology, the Second Xiangya Hospital, Central South University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the alteration of the expression of PTEN in rats with aging. *Methods*: Wistar rats were divided into 3 groups: 3-month-old group, 12-month-old group and 24-month-old group (n=6). Immunohistochemistry of CD34 was employed to detecte angiogenesis in the kidneys with aging. The protein expression of PTEN was examined by Western Blot. Immunohistochemistry was also employed to detect the expression of PTEN in the kidneys with aging. *Results*: (1)Compared with 3-month-old rats and 12-month-old rats, the level of PTEN protein expression in kidneys of 24-month-old rats was higher than that of 3-month-old rats and 12month-old rats, as examined by Western Blot (P<0.05); (2) With aging, the positive percentages of PTEN expression in the kidneys were increased, as detected by Immunohistochemistry(P<0.05); (3) With aging, impaired angiogenesis was found in renal tissues of Wistar rats. At the age of 24 months, the glomerular

作者介绍:陈俊香(1974-),女,主治医师,博士,研究方向:肾脏衰老和肾小球疾病。
通讯作者:蔡广研,男,副教授,E-mail:caiguangyan@sina.com。
基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2007CB507400);国家自然科学基金(编号:30070288,30270505)。

interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic ewing's sarcoma[J].Cancer Res,2005, 65(19):8984-8992.

[6] Chansky H A,Barahmand-Pour F,Mei Q,et al.Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro[J].J Orthop Res,2004,22:910-917.

[7] Riggi N,Cironi L, Suva M L,et al. Sarcomas:genetics,signalling, and cellular origins. Part 1:The fellowship of TET[J]. J Pathol,2007,213: 4-20.

[8] Riggi N,Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma [J].Cancer Lett,2007,254(1):1-10.

[9] Navarro D,Agra N,Pestaña A, et al. The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes beta-catenin/TCF-mediated transcription [J].Carcinogenesis, 2010,31(3):394-401.

[10] Erkizan H V,Kong Y,Merchant M,et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma[J].Nat Med,2009,15(7):750-756.

[11] Tirado O M,Mateo-Lozano S,Villar J,et al. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells[J].Cancer Res,2006,66 (20):9937-9947.

[12] Staege M S,Gorelov V,Bulankin A,et al.Stable transgenic expression of IL-2 and HSV1-tk by single and fusion tumor cell lines bearing EWS/FLI-1 chimeric genes[J].Pediatr Hematol Oncol,2003,20(2):119 -140.

[13] Meyer-Wentrup F, Richter G, Burdach S. Identification of an immunogenic EWS-FLI1-derived HLA-DR-restricted T helper cell epitope[J]. Pediatr Hematol Oncol,2005,22(4):297-308.

(责任编辑:冉明会)