维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0559－04

未知基因 KH 开放阅读框架真核表达载体的构建及其对 K562 细胞增殖的影响

何於娟[1]，张　彦[1]，刘小珊[2]，马凌娣[1]，欧一衡[3]，蒋纪恺[1]

(1.重庆医科大学基础医学院临床生化教研室,重庆　400016;2.重庆医科大学临床学院血液科,重庆　400016;
3.重庆市永川市人民医院,重庆 永川　402160)

【摘　要】目的:构建未知基因 KH 的开放阅读框架(open reading frame,ORF)的真核表达体系,初步探讨未知基因 KH 的功能。方法:采用 DNA 重组技术将 KH 基因片段的开放阅读框架(KH－ORF)亚克隆于表达载体 pCl－neo Mammalian Expression Vector,重组为 pCI－neo－KH－ORF 真核表达体系,脂质体转染 K562 细胞,RT－PCR 检测目的基因 KH 的表达。采用体外培养技术,通过 pCI－neo－KH－ORF 质粒转染 K562 细胞前后的生长曲线和乳酸脱氢酶活性测定观察 KH－ORF 对 K562 细胞增殖速度的影响。结果:KH－ORF 在 K562 细胞中获得表达,对细胞增殖速度有明显影响。结论:KH－ORF 表达产物可能是一个与 K562 细胞增殖有关的功能蛋白质,KH 基因可能是一个具有生物学功能的白血病未知基因。

【关键词】KH 基因;开放阅读框架;真核表达;K562 细胞;增殖
【中国图书分类法分类号】Q781　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－11－28

Construction of eukaryotic expression vector of open reading frame of unknown KH gene and its effect on proliferation of K562 cell

HE Yujuan, et al

(*Department of Clinical Biochemistry, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the eukaryotic expression vector of open reading frame of KH gene(KH－ORF), an unknown gene obtained from K562 cells, and investigate its function. *Methods*: The KH－ORF cDNA was cleaved from plasmid expression vector cut with the same restriction endonucleases. pCI－KH－ORF, the pGEM－T－easy－KH－ORF with EcoRI and SalI and subcloned into the pCl－neo mammalian recombinant expression plasmid, was transfected into K562 cells with liposome and screened by G418. KH－ORF expression was tested by RT－PCR. The effect of expression product on cell proliferation was tested by growth－curve and LDH detection. *Results*: KH－ORF was expressed in K562 cells. The effects of increased proliferation were significant. *Conclusion*: The product of KH－ORF may be a functional protein that is related to the proliferation of K562 cells, and KH gene may be a functional unknown leukemia gene.

【Key words】KH gene; Open reading frame; Eukaryotic expression; K562 cells; Proliferation

为研究苦参碱诱导 K562 细胞分化的分子机制,运用能检出低丰度表达基因的差异显示逆转录 PCR 技术(DDRT－PCR),进行苦参碱作用 K562 细胞后的早期 mRNA 的差异显示[1]。结果发现在苦参碱作用 K562 细胞后,有一些蛋白质或蛋白酶的基因在 RNA 水平有表达量的改变,这种改变可能与细胞的增殖与分化有关，同时发现并克隆了 1 个 668bp 未知基因差示 cDNA 片段(为苦参碱诱导后表达受抑基因),GenBank 的登录编号为 BM077298、dbEST ID 10245338(网址为 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html,我们暂命名为 KH 基因)。通过 Northern blot 分析发现该基因的表达序列全长在 1.35Kb 左右,去掉 mRNA 的多聚尾 200～300bp 估计该基因全长在 1000 左右,实际上我们已获得片段全长的 60% 序列,而且其中存在可编码蛋白的开放阅读框架[2,3]。在进行此未知片段全长克隆的同时,为了解该基因可能

作者介绍:何於娟(1972－　),女,博士,副教授,
主要研究方向:白血病逆转的分子机制。

基金项目:国家自然科学基金项目(No:39670881;30171150)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

存在的功能,利用DNA重组技术构建了KH基因片段的开放阅读框架(KH－ORF)的真核表达载体pCI－neo－KH－ORF,脂质体转染K562细胞,RT－PCR检测目的基因的表达,通过台盼蓝拒染法检测转染前后K562细胞生长曲线,以及转染前后K562细胞的乳酸脱氢酶活性测定了解KH基因ORF对K562细胞增殖速度的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胰化蛋白胨与酵母提取物为Oxide产品;限制性内切酶EcoRⅠ与SalⅠ为Takara产品;T4 DNA连接酶为Promega产品;DNA标准品(GeneRuler™ 1kb DNA Ladder)为MBI产品;质粒提取试剂盒与DNA小量胶回收试剂盒为Takara产品;脂质体转染试剂DOTAP为Clontech产品;RPMI－1640培养基为美国GIBCO产品;苦参碱由本实验室自备;乳酸脱氢酶活性测定试剂盒为北京中生生物工程高技术公司产品;其它为进口或国产分析纯试剂。

1.2 KH－ORF引物

用于扩增KH－ORF的引物由Primer Premium 5.0计算机软件分析设计,Takara公司合成。上游引物与下游引物的5'端除2～4个保护碱基外,分别引入了EcoRⅠ与SalⅠ两个限制性内切酶位点(下划线标示),此KH－ORF的PCR产物大小为225bp。

上游引物:5'－AggATTCATggAggATC－3'(18base)

下游引物:5'－gAAggTCSACTCATCggCTT－3'(20base)

1.3 质粒、工程菌株和细胞

包含225bp KH－ORF的pGEM－T－easy－KH－ORF克隆质粒(3243bp)自建。表达质粒pCl－neo Mammalian Expression Vector(5472bp)购自Promega公司。受体工程菌为BL21(DE3)plysS购自Promega公司。K562细胞由本室自备。

1.4 细胞培养

采用含10%小牛血清,青、链霉素的RPMI－1640培养基,在37℃、饱和湿度、5% CO_2 孵箱中常规培养,每3～4天换液传代培养。转染前1天收集对数生长期细胞,调整细胞浓度至(1～3)×10^5/ml常规培养。

1.5 重组表达质粒(pCI－neo－KH－ORF)的构建

克隆质粒pGEM－T－easy－KH－ORF经EcoRⅠ与SalⅠ双酶切后,采用小量胶回收试剂盒回收纯化含目的基因KH－ORF的225bp片段。同一条件下,表达质粒pCl－neo Mammalian Expression Vector也经EcoRⅠ与SalⅠ双酶切后,与上述目的基因连接。连接产物热休克法转化入BL21(DE3)plysS菌,氨苄青抗性筛选转化子。

1.6 重组表达质粒的鉴定

重组表达质粒经小量质粒提取试剂盒提取后,(1)采用限制性内切酶EcoRⅠ与SalⅠ酶切鉴定插入片段;(2)分别以重组表达质粒pCI－neo－KH－ORF与重组克隆质粒pGEM－T－easy－KH－ORF为模板,PCR扩增此225bp ORF片段,根据二质粒的大小差异,经琼脂糖电泳鉴定,以证明此片段重组于表达质粒中;(3)为避免假阳性,将酶切与PCR鉴定的pCI－neo－KH－ORF重组质粒寄到上海生工公司测序确证。

1.7 脂质体转染法转染K562细胞及抗性克隆的筛选

将pCI－neo－KH－ORF质粒与pCI－neo空质粒分别转染于K562细胞,主要步骤如下:转染前1天细胞传代,调整细胞浓度至(1～3)×10^5/ml常规培养,次日用新鲜培养基洗涤细胞3次,经250g离心10min弃上清,加新鲜培养基常规培养1～5h后弃去培养基,换新鲜配制的含质粒的稀释转染试剂(2.5μg质粒＋15μl DOTAP试剂＋70μl HBS溶液＋1～2ml新鲜培养基),温和混匀,37℃培养3～10h后,换含400μg/ml G418的RPMI－1640培养基选择培养,3～5天换液1次,约3周见抗性克隆细胞生长后,将培养基的G418浓度改为200μg/ml稳定培养,增殖抗性克隆细胞。

1.8 转染K562细胞的RT－PCR鉴定

采用TRIZOL试剂分别提取K562细胞、转染空质粒pCl－nco vector的抗性K562细胞(简称K562/pCI－neo细胞)与转染重组质粒pCI－neo－KH－ORF vector的抗性K562细胞(简称K562/pCI－KH－ORF细胞)的总RNA,纯化去DNA后经oligo$(dT)_{18}$引物逆转录合成cDNA,采用KH基因ORF的上、下游引物PCR扩增ORF片段,2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.9 生长曲线测定

观察转染前后K562细胞的增殖速度。分别收集对数生长期的K562/pCI－neo细胞、K562/pCI－KH－ORF细胞与K562细胞,调整细胞浓度为1×10^5个/ml后,常规培养,每天收集细胞。0.4%台盼蓝拒染法每天计数活细胞1次,连续计数5天,观察三种细胞的增殖速度。台盼蓝拒染法原理为:死亡细胞的细胞膜受损,台盼蓝能够进入细胞内使死亡细胞呈兰色,而活细胞由于胞膜完整,染液不能进入胞内,故细胞不着色。

1.10 乳酸脱氢酶(LDH)活性测定

收集对数生长期的K562/pCI－neo细胞、K562/pCI－KH－ORF细胞与K562细胞,调整细胞浓度为1×10^5个/ml后,常规培养,每天收集细胞。生理盐水洗涤2次,再用蒸馏水低渗破碎细胞,用LDH试剂盒测定其活性,考马司亮蓝G－250法测定其蛋白质含量,计算细胞的LDH比活性。连续测定5天。

2 结 果

维普资讯 http://www.cqvip.com

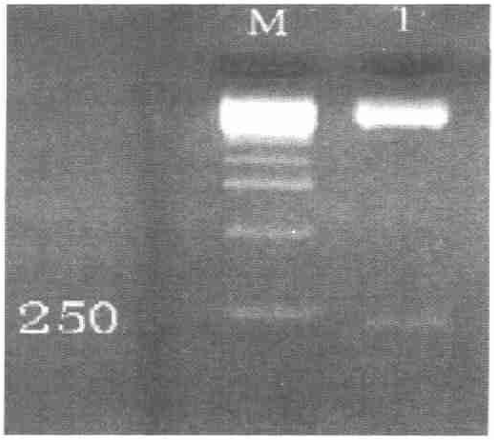


图 1a pCI－neo－KH－ORF 的双酶切鉴定

M:DNA 标准品 1:EcoR Ⅰ与 Sal Ⅰ双酶切 pCI－neo－KH－ORF

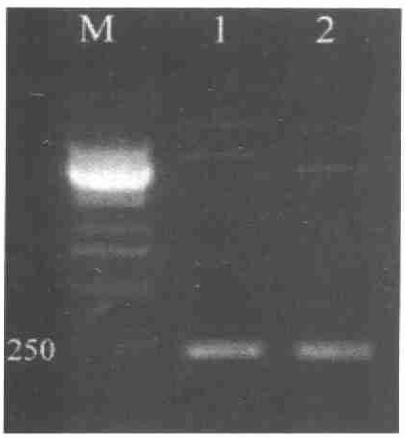


图 1b pCI－neo－KH－ORF 与重组 pGEM－T－easy－KH－ORF 的 PCR 鉴定

M:DNA 标准品 1:pCI－neo－KH－ORF 2. pGEM－T－Easy－KH－ORF



图 2 RT－PCR 分析 KH－ORF 在 K562 细胞的表达

M:DNA 标准品（80，100，200，300，400，500，600，700，800，900，1000bp） 1－5:K562/pCI－KH－ORF 细胞 6. K562/pCI－neo 细胞 7. K562 细胞

2.1 表达载体的构建

225bp 的 KH－ORF 片段经定向亚克隆后，对重组表达质粒进行双酶切鉴定，结果可见一条略小于 250bp 的酶切条带，如图 1a。pGEM－T－easy－KH－ORF 克隆质粒大小为 3243bp，pCI－neo－KH－ORF 大小为 5697bp，以两个大小不同的均含目的片段的质粒为模板，PCR 扩增此 225bp KH－ORF 片段，经琼脂糖电泳鉴定，获得了相同的扩增产物，证明此片段确实重组于表达质粒中，如图 1b。经上海生工测序结果证实，确实获得了含 225bp 的 pCI－neo－KH－ORF 表达质粒（测序结果略）。

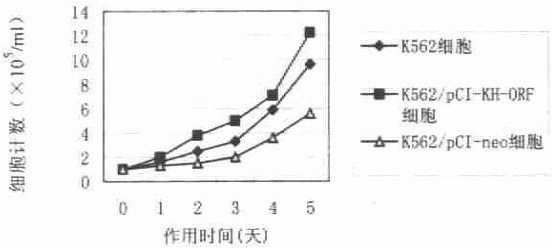


图 3 转染后 K562 细胞的生长曲线

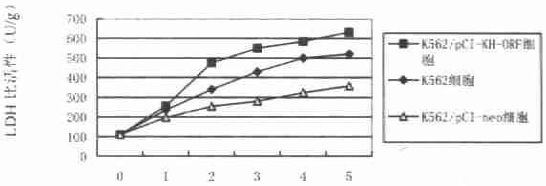


图 4 转染后 K562 细胞的 LDH 比活性变化

2.2 pCI－neo－KH－ORF 转染 K562 细胞的 RT－PCR 鉴定

2%琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示，可见从 K562/pCI－KH－ORF 细胞中扩增出大小为 225bp 的特异条带，高丰度表达（图 2 泳道 1～5），K562/pCI－neo 细胞与 K562 细胞也扩增出特异条带，低丰度表达，均属内源性表达（图 2 泳道 6、7）。表明 pCI－neo－KH－ORF 已成功转染 K562 细胞。

2.3 生长曲线

通过台盼蓝拒染法每天计数活细胞 1 次，连续计数 5 天，初步观察转染前后 K562 细胞的增殖速度。由图 3 可见，K562/pCI－KH－ORF 细胞生长旺盛，增殖速度快于 K562 细胞，更快于 K562/pCI

维普资讯 http://www.cqvip.com

－neo 细胞。

2.4 LDH 比活性测定

结果显示随细胞增殖，LDH 比活性相应上升，K562/pCI－KH－ORF 细胞组 LDH 比活性高于 K562 细胞组，K562/pCI－neo 细胞组 LDH 比活性最低(图 4)。

3 讨 论

无论是人类基因组计划还是后基因组计划，基因信息与基因结构的获得都不是最终目的，基因功能的研究只有通过基因表达为蛋白质才最终得以实施。同样，以迅猛发展的生物信息学的各种数学算法对基因结构与功能做出的任何最佳预测，都只能称之为预测。要获得真正意义上的执行生命活动的蛋白质的结构与功能信息，还应从基因表达做起[4]。基因表达的中心法则是：DNA→RNA→蛋白质，即要表达的基因 DNA 序列转录形成 mRNA，mRNA 再经翻译、加工合成此基因编码的蛋白质，从而行使其生物功能。因此，在尚未获得 KH 全长基因时，要初步探测 KH 基因的功能，前提是将其 ORF 亚克隆至表达载体上，通过表达蛋白质的生物学行为，来了解其生物学功能。

一些真核蛋白质在原核宿主中的表达尽管行之有效且成本低廉，但往往因折叠的方式不正确，或因折叠的效率低下，结果比活性都很低。此外，要通过克隆化基因生产名副其实的真核生物活性蛋白，往往要进行翻译后加工，而这些加工原核生物很难进行[5]。因此，为稳定表达有活性的蛋白质以研究其生物学功能，必然要构建真核表达体系。

采用脂质体转染技术将 pCI－neo－KH－ORF 质粒与 pCI－neo 空质粒分别转染于 K562 细胞，获得了稳定传代的 K562/pCI－KH－ORF 细胞与 K562/pCI－neo 细胞。通过生长曲线测定发现 K562/pCI－KH－ORF 细胞生长旺盛，增殖速度快于 K562 细胞，更快于 K562/pCI－neo 细胞。LDH 是细胞无氧酵解的关键酶，在肿瘤细胞中无氧酵解代谢相当旺盛。有文献报道[6]，白血病患者血清 LDH 活性明显高于正常人，其升高主要来源于白血病细胞，且酶活性变化与疗效明显相关，可将 LDH 活性变化作为白血病细胞增殖的指标之一。本实验直接测定细胞浆内 LDH 活性，发现 LDH 比活性测定结果与生长曲线测定结果基本一致。由于 KH 基因是 K562 细胞中自身表达的基因，苦参碱诱导后表达受抑，现将其 ORF 重组质粒转染于 K562 细胞中大量表达后细胞增殖速度明显加快，结果提示：KH－ORF 表达产物可能是一个与 K562 细胞增殖有关的功能蛋白质，由此推测 KH 基因可能具有促进 K562 细胞增殖的功能，是一个具有生物学功能的白血病未知基因。它是否是引起 K562 细胞无限增殖的调控基因尚有待进一步研究。此结果的获得激发了我们尽快得到 KH 基因全长以明确其结构和功能的兴趣。

参 考 文 献

[1] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992; 257(5072): 967－971.

[2] 何於娟，蒋纪恺，张 彦，等. 未知基因 KH 与公共生物信息资源的比较与分析[J]. 四川医学，2004;(1):2－4.

[3] Bailey LC, Searls DB, Overton GC. Analysis of EST－driven gene annotation in human genomic sequence[J]. Genome Res, 1998; 8(4): 362－376.

[4] 贺 林. 解码生命—人类基因组计划和后基因组计划[M]. 科学出版社，2000; 339－344.

[5] 李育阳. 基因表达技术[M]. 科学出版社，2001; 12－15.

[6] 柴忆欢，朱玲利，朱杏民，等. 白血病血清乳酸脱氢酶测定的临床意义[J]. 苏州医学院学报，1992; 12(3): 220.