DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.024

参考文献:

[1] Habano W, Sugai T, Nakamura S I, *et al*. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma[J]. Gastroenterology, 2000, 118(5): 835-841.

[2] Bianchi N O, Bianchi M S, Richard S M. Mitochondrial genome instability in human cancers[J]. Mutat Ras, 2001, 488(1): 9-23.

[3] Richard S M, Bailliet G, Paez G L, *et al*. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4231-4237.

[4] Zhou X P, Hoang J M, Li Y J, *et al*. Determination of thereplication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1998, 21(2): 101-107.

[5] 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 等. 胃癌微卫星不稳定性与移码突变的关系[J]. 中华消化杂志, 1999, 19(6): 385-387.

[6] Nakashima H, Mori M, Masaki K, *et al*. Microsatellite instabillityin Japanese esophageal carcinoma[J]. Int J Cancer, 1995, 64(4): 286-289.

[7] Ogasawara S, Maesawa C, Tamura G. Frequent mricrosatellite alterations on chromosome 3P in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 1995, 55(11): 891.

[8] 陈国安, 孙 燕, 李申德, 等. 肺癌组织中微卫星DNA的改变[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(3): 166-168.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)17-1572-02

人TNFRI cDNA的克隆及酵母表达载体的构建

Cloning of human TNFRI cDNA and construction of yeast expression vector

代佳平, 毛琼国, 王 燕, 梁 红, 刘 昕 (第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室, 重庆 400038)

本实验利用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)以人单核淋巴细胞系U937细胞总RNA为模板, 扩增出人TNFRI型受体胞外区约224个氨基酸残基的cDNA序列, 将此片段为模板, 采用剿式PCR技术扩增出编码TNFRI胞外区约180个氨基酸的DNA序列, 将其克隆于载体PDM18-T进行序列测定, 随后构建于新型酵母表达载体PGBKT7-DNA-BD, 为进一步通过酵母双杂交获得拮抗TNFRI的具有生物学活性的多肽奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

U937由本教研室提供, 质粒PDM18-T以及连接酶为宝生物公司产品, PGBKT7-BD购自Clontech, RPMI 1640培养基, TripureRNA抽提试剂, dNTP, DNA回收试剂盒均为Roche公司产品, PCR引物由上海基康公司合成, AMV、*Taq*酶、*Sal*Ⅰ、*Eco*RⅠ内切酶购自Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 U937细胞的培养 在含10%小牛血清的1640培养液中, 37 ℃, 5%CO条件下培养。

1.2.2 细胞总RNA的提取 采用Tripure试剂提取总RNA, 操作按说明书进行。

1.2.3 RT-PCR扩增 编码人TNFRI的cDNA上游引物: 5′GGGGATCCATGGGCCTCTCCACCGTGCCTG, 下游: 5′GGTCTAGACTAGAGCTTGGACTTCCACCGTTG逆转录cDNA反应遵照如下操作进行, RNA 2 μg、下游引物混合物2 μl、ddH_2O 12 μl 65 ℃ 10 min, 再加入AMV 2 μl、5× buffer 8 μl、RNA酶抑制剂0.5 μl、dNTP 4 μl、ddH_2O 5.5 μl, 经42 ℃反应1 h、99 ℃ 5 min。PCR反应体系: 取cDNA 10 μl、上下游引物混合物2 μl、dNTP 2 μl、10× buffer 5 μl、25 mmol/L MgCl 1.5 μl、*Taq*酶1 μl/5 U、ddH_2O 12.5 μl, 经94 ℃变性10 min, 然后94 ℃ 40 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 1 mim, 30个循环, 最后72 ℃延伸10 mim。经琼脂糖电泳证实PCR产物为712 bp目的片段。

1.2.4 巢式PCR扩增 TNFRI胞外区上游引物: 5′AGGATTCACCCATATGCTGGTCCCTCACCTA, 下游: 5′TGGAGTGCACGAAGTTGTGCAATCGTCGACCTGC以获得片段(712 bp)为模板进行PCR反应: 模板1 μl、引物混合物4 μl、dNTP 4 μl、10× buffer 5 μl、25 mmol/L MgCl 3 μl、*Taq*酶1 μl/5 U、ddH_2O 25 μl总体积50 μl, 94 ℃变性10 mim、94 ℃ 40 s、64 ℃ 45 s、72 ℃ 1 mim 30个循环, 最后延伸72 ℃延伸℃10 mim。

1.2.5 PCR产物鉴定 取5 μl产物与1.5%琼脂糖电泳, 以*Eco*RⅠ+*Hind*Ⅲ双酶切lamdaDNAMarker作标准, 凝胶扫描仪下观察。

1.2.6 PCR产物的纯化及序列鉴定 RT-PCR产物采用DNA回收试剂盒纯化目的片断, 按操作说明书进行。巢式PCR获得片断与PDM18-T载体连接并转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆, 经*Sal*Ⅰ和*Eco*RⅠ双酶切鉴定, 挑取阳性重组子, 由上海基康公司完成序列测定。

1.2.7 TNFRI酵母双杂交表达载体的构建 将目的片段克隆于酵母表达载体PGBKT7-DNA-BD中*Sal*Ⅰ和*Eco*RⅠ双酶鉴定筛选重组子。

(下转1575页)

作者简介: 代佳平(1969-), 女, 重庆市人, 实验师。电话: (023)68753670
通信作者: 刘 昕, 电话: (023)68753670
收稿日期: 2003-08-22; 修回日期: 2004-01-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

而抑制凋亡。另 bcl-2 可能通过阻止胞浆内钙离子浓度增加来抑制凋亡。Clusterin 和 bcl-2 执行各自不同的抗凋亡功能, 在前列腺癌的发生发展过程中, 这两条抗凋亡途径可能起协同作用。本实验结果表明: Clusterin 在前列腺癌组织中的表达与 P53 表达密切相关。野生型 P53 基因诱导凋亡的作用, 对 bcl-2 基因表达有下调作用, 而对 Bax 基因进行上调。突变型 P53 则失去了诱导凋亡的功能, 而大多数肿瘤存在 P53 的高突变率。野生型 P53 基因是否也对 clusterin 基因在前列腺癌组织中的表达存在下调作用, 还有待进一步证实。

前列腺癌, 尤其是激素非依赖性前列腺癌缺乏十分有效的治疗方法。许多研究证实通过诱导凋亡有望提高其治疗效果。Mikata 等[3] 将野生型 P53 基因转染入前列腺癌 Pc3 细胞系。结果: 转染了野生型 P53 基因的肿瘤的生长被显著抑制。Gleave 等[4] 对激素非依赖性前列腺癌的小鼠模型去势后, 将 bcl-2 反义核苷酸导入小鼠模型, 结果 bcl-2 表达明显降低, PSA 水平明显下降, 瘤体缩小。Miyake 等[5] 检测反义 clusterin 寡聚多核苷酸处理过的 Shionogi 肿瘤模型, 发现肿瘤出现更快的凋亡, 雄激素非依赖性的出现明显推迟, 故认为 clusterin 是一种抗凋亡基因可加速雄激素非依赖性的进展。Gleave 等[6] 用 clusterin 反义寡核苷酸作用于雄激素非依赖性前列腺癌, 发现在动物模型中与紫彬醇有相同作用, 可提高肿瘤的凋亡率和消退率。综上, clusterin 不仅可望成为前列腺癌诊断和评估预后的指标而且有望成为前列腺癌, 尤其是激素非依赖性前列腺癌治疗的新的靶目标。

参考文献:

[1] Sintich S M, Steinberg J, Kozlowski J M, *et al*. Cytotoxic sensitivity to tumor necrosis factor-alpha in PC3 and LNCaP prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP-2 (clusterin) [J]. Prostate, 1999, 39 (2): 87—93.

[2] Steinberg J, Oyasu R, Lang S, *et al*. Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(10): 1707—1711.

[3] Mikata K, Uemura H, Ohuchi H, *et al*. Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of P53 gene: gene transfer by electroporation[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(4): 247—252.

[4] Gleave M, Tolcher A, Miyake H, *et al*. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisene Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(10): 2891—2898.

[5] Miyake H, Nelson C, Rennie P S, *et al*. Testosterone-repressed prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(1): 170—176.

[6] Gleave M E, Miyake H, Zellweger T, *et al*. Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, Clusterin/testosterone-repressed prostate message 2 to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer[J]. Urology, 2001, 58(2 Suppl 1): 39—49.

(编辑　陈聪连)

(上接 1572 页)

2　结果

RT-PCR 扩增人的 TNFRI 片段, 获得大小约 712 bp 的 DNA 片段, 因有非特异性扩增, 采用巢式 PCR 技术扩增特异性片段, 可见约 500 bp 的 DNA 片段, 将其纯化后克隆于 PDM18-T 载体测序。结果所获得序列经 GenBank 检索为 TNFRI。将目的片段克隆于 PGBKT7-DNA-BD 中经 *Sal*Ⅰ 和 *Eco*RⅠ 双酶切筛选阳性重组子最后获得 TNFI 的酵母双杂交表达载体。

3　讨论

人的 TNFRI 由 455 个氨基酸组成, 由一个疏水信号肽, 一个富含半光氨酸的细胞外区(约 182 氨基酸), 一个越膜区和一个细胞内区组成[2]。TNF-α 与细胞膜表面的 TNFRI 结合后[1], 激活膜结合的磷酸酰胆碱特异性的磷脂酶 C (PC-PLC)和酸性神经磷脂酶(asmase), asmase 进一步降解 I-KB, 从而激活 NF-KB, 调控基因的表达[3]。酵母双杂交系统是一个完整的已 GAL4 为基础的双杂合系统, 它不但可以鉴定蛋白质间的相互作用, 还有助于发现新基因, 对肽类药物的筛选也很有应用价值。酵母双杂交系统的原理主要是基于真核转录激活因子的转录激活作用是由功能相对独立的 DNA 结合结构域(binding domain, BD)和转录活化结构域(activation domain, AD)共同完成的[2], 这两个结构域通过共价或非共价连接建立的空间联系是导致结合和激活发生的关键[3,4]。根据这一特点, 如果使可能存在相互作用的两种蛋白 X 和 Y 分别以和 BD/AD 形成杂合蛋白的形式在酵母中表达并分布于细胞核中, X 与 Y 之间的相互作用就可以将 BD 和 AD 在空间结构上重新联结为一个整体而与报告基因的上游激活序列(upstream activation sequence)结合, 进而发挥激活转录的功能, 使受调控的报告基因得以表达。根据这一原理, 双杂交系统通过简便的酵母遗传分析对报告基因表型进行检测即可实现对于蛋白质间相互作用的研究。构建人的 TNFRI 受体酵母双杂交载体, 因其在酵母中表达, 很可能具有蛋白质天然构象。通过 TNF-RI 酵母双杂交表达载体的构建, 建立一个稳定的蛋白质间相互作用的方法, 为类似的研究提供了一个可靠的技术平台。

关键词: TNFRIcDNA; RT-PCR; 载体; 构建
中图法分类号: R394-33; R394.3　文献标识码: B

参考文献:

[1] 陆华中. TNF-α 与 TNF 受体超家族介导的信号传导[J]. 国外医学分子生物学分册, 1997, 19(3): 105—109.

[2] Sugana M, Tsuchida K, Toalita H, *et al*. Increased proliferation of endothelial cells with overexpression of soluble TNF-α receptor I gene[J]. Atherosclerosis, 2002. 162(5): 77—84.

[3] Knofler M, Mosl B, Bauer S, *et al*. TNF-α/TNFR in primary and immortalized first trimester cytorophoblasts[J]. Placenta, 2000, 21(6): 525—535.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net