DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.018
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
892 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)10-0892-03

肝细胞癌候选相关基因 IDD01 原核表达载体的构建与表达

陈香宇[1],段芳龄[1],李建生[2],马 军[1],薛乐勋[3] (郑州大学:[1]消化疾病研究所,郑州 450003,[2]第一附属医院消化内科,[3]细胞生物学实验室,郑州 450052)

提 要:目的 克隆及表达肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)候选相关基因 IDD01 (Institute of Digestive Disease.01),研究其功能。方法 用 RT-PCR 方法从 HCC 标本中扩增出 IDD01 的开放读码框(open reading frame, ORF),将目的基因插入表达载体 pMAL-c2X 中,用重组质粒转化大肠杆菌(*E. coli* TB1),并在 *E. coli* TB1 中进行表达。用 SDS-PAGE 方法对表达产物进行分析。结果 扩增的 ORF 长度约为 770 bp;经酶切和测序分析,插入片段序列和阅读框架正确;SDS-PAGE 结果显示,目的基因表达产物的相对分子质量为 28×10^3,融合蛋白的量占全菌总蛋白的 30.4%。结论 成功构建 IDD01 的原核表达载体,重组质粒在 *E. coli* TB1 中能够高效表达目的基因,该重组子的构建为 IDD01 基因的功能研究奠定了重要基础。

关键词:肝细胞癌;IDD01 基因;融合表达;聚丙烯酰胺凝胶电泳
中图法分类号:Q782; R394-33; R735.7 文献标识码:A

Construction and expression of prokaryotic vector of a novel candidate gene IDD01 associated with hepatocellular carcinoma

CHEN Xiang-yu[1], DUAN Fang-ling[1], LI Jian-sheng[2], MA Jun[1], XUE Le-xun[3] ([1]Institute of Digestive Diseases, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003; [2]Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; [3]Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To construct the prokaryotic vector and to express a novel candidate gene IDD01 associated with hepatocellular carcinoma (HCC) for its functional study. **Methods** The open reading frame (ORF) of IDD01, amplified from HCC tissue by RT-PCR, was inserted into the expression vector pMAL-c2X. The recombinant vector was transformed into *E. coli* TB1, and the expression products were analyzed by SDS-PAGE. **Results** The length of PCR product was about 770 bp. The restriction enzyme digestion and sequencing conformed that the gene segment was correctly inserted into the vector. SDS-PAGE and density scanning indicated that the protein was expressed as a fusion protein with 28 KD of molecular weight and the fusion protein possessed 30.4% of the total bacterial protein. **Conclusion** The recombinant vector is constructed successfully and IDD01 can be expressed at a high level, which lays a foundation for the further research on the functions of IDD01 gene.

Key words: HCC; IDD01 gene; fusion expression; SDS-PAGE

流行病学研究显示[1,2],世界范围内,原发性肝癌的病死率居肿瘤死亡率的第二位,全世界每年约 45% 新发病例在我国大陆,我国已将其列为癌症防治的重中之重。肝癌高发的根源是肝癌发生、发展的分子机制不清。

我室采用抑制性消减杂交[3](suppression subtractive hybridization, SSH)、生物信息学和快速扩增 cDNA 末端(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆到 1 条肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)候选相关基因-IDD01 (Institute of Digestive Disease.01, IDD01)(GenBank accession number: AY541587)。

为鉴定其功能,作者构建了其原核表达载体,并进行蛋白质表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* TB1 和原核表达载体 pMAL-c2X

基金项目:河南省医学科技创新人才工程项目(200109012);郑州大学"十五""211 工程"重点学科建设项目(河南省教委办(2002)第 2 号)
Supported by the Foundation for Sci &Tech Research in Medical Sciences of Henan Province (200109012) and the "Tenth Five-year Plan" Research Foundation for the Key Constructional Project ("211 Projects") of Zhengzhou University (2002-2)

作者简介:陈香宇(1968-),男,河南省信阳新县人,博士研究生,主治医师,主要从事消化道肿瘤防治方面的研究,发表论文 23 篇,电话:(0371)6940663

收稿日期:2004-03-19;修回日期:2004-05-01

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

(New England Biolabs)。

1.1.2　主要试剂和设备　　酵母粉、胰蛋白胨(Oxoid); IPTG、X-gal、T4 DNA 连接酶(上海生工); DNA 聚合酶(Clontech); 限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ, 低分子量蛋白标准(TaKaRa); PCR 产物胶回收试剂盒(Promega)。RNA 抽提试剂盒(Qiagen), 反转录试剂盒(Clontech)。

梯度 PCR 仪(Eppendorf), 图像分析软件 Quantity One(Bio-Rad)。

1.1.3　引物、测序　　应用 Oligo 和 Primer Premier 设计, 引物如下: 上游引物 5′-CG G GAT CC A TGG GCA ACT TCG CAC GG-3′, 下游引物 5′-CGC AAG CTT CTA CTT CCA GAG GTG AAG GC-3′。在引物中引入 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ酶切位点。引物合成和测序在上海生工公司进行。

1.2　方法

1.2.1　IDD01 开放读码框(open reading frame, ORF)扩增

1.2.1.1　HCC 标本 RNA 提取　　按说明书进行, 电泳观察其完整性, 测定浓度与纯度后保存于－80 ℃。

1.2.1.2　cDNA 合成　　按说明书进行, 保存于－20 ℃。

1.2.1.3　PCR 扩增　　反应体系 30 μl。反应条件: 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 45 s 72 ℃ 60 s, 30 个循环, 72 ℃ 5 min。

将 PCR 产物用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 低熔点琼脂糖回收目的片断。

1.2.2　pMAL-c2X 的酶切鉴定和纯化　　小量提取质粒, 用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收质粒载体。

1.2.3　重组质粒的构建　　将酶切纯化的 PCR 产物、pMAL-c2X 按 4∶1(摩尔数)进行连接, 余按文献[4]操作。

1.2.4　重组质粒的鉴定　　用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ进行酶切鉴定, 测序鉴定质粒中插入片段的序列、读码框是否正确。

1.2.5　目的基因的诱导表达　　将鉴定过的阳性克隆菌落接种到含氨苄青霉素(100 μg/ml)的 LB 液体培养基中, 37 ℃下, 190 r/min 摇菌过夜。取 10 μl 菌液加入到 5 ml 相同的 LB 液体培养基中, 37 ℃下, 250 r/min, 摇菌 80 min, 加入 IPTG (0.4 mmol/L), 诱导后 4 h 取样 1 ml。

1.2.6　表达产物的变型聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

菌液 1 ml 离心 4 000 r/min, 离心 25 min, 在沉淀中加 200 μl SDS-PAGE 样品缓冲液, 于 100 ℃水浴 25 min, 10 000× *g*, 离心 10 min, 取上清加样。采用 5%的浓缩胶和 10%的分离胶, 电泳约 4.5 h, 考马斯亮蓝 R250 染色。

2　结果

2.1　RNA 抽提、反转录和 IDD01 ORF 扩增

28S 与 18S 灰度比为 2∶1, 提示 RNA 完整性好; OD_{260}/OD_{280} 为 1.93, 证明 RNA 纯度较好, 电泳结果见图 1。

以 HCC 标本 cDNA 为模板, 进行 PCR 反应, 1%的琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 扩增产物长度约 770 bp。

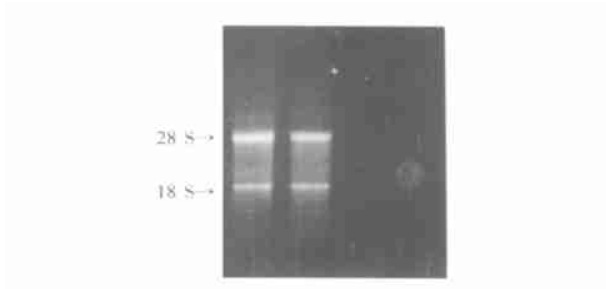
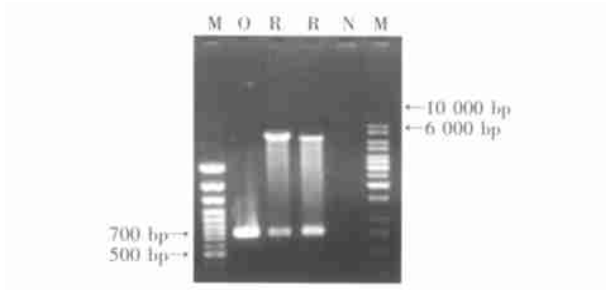


图 1　RNA 电泳结果

Fig 1　Electrophoretic results of RNA

2.2　重组载体的酶切鉴定和测序

重组质粒双酶切的产物, 与 IDD01 ORF 双酶切后的纯化产物, 同时在 1%的琼脂糖凝胶中电泳, 结果重组质粒的插入片段与 IDD01 ORF 双酶切后片段的长度相等(图 2)。测序证明插入子序列、阅读框正确。



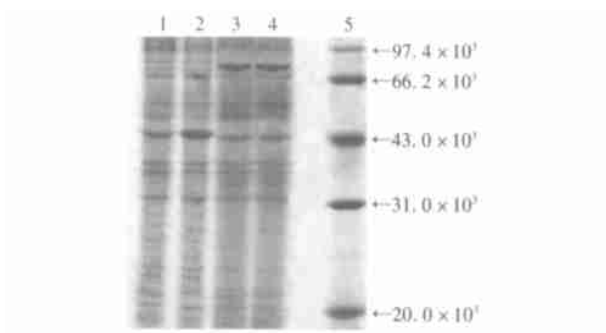
M: Marker; O: ORF; R: Recombined plasmid digested with enzyme; N: PCR negative control

图 2　重组质粒酶切产物电泳结果

Fig 2　Electrophoresis of the recombined plasmid digested with enzyme

2.3　诱导产物的 SDS-PAGE

阳性克隆在 IPTG 诱导下, 表达出分子量为 70×10^3 的融合蛋白。外源基因插入后, 与质粒 pMAL-c2X 的麦芽糖结合蛋白基因一起以融合蛋白的形式表达, 由于麦芽糖结合蛋白的分子量为 42×10^3, 因此融合蛋白中 IDD01 基因表达产物约为 28×10^3。图像分析软件分析结果示, 融合蛋白的表达量约占全菌蛋白的 30.4%(图 3)。



1: TB1 induced by IPTG; 2: TB1 transformed with PMAL-C2X; 3, 4: TB1 transformed with the recombined plasmid; 5: Marker

图 3　诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig 3　SDS-PAGE analysis of introduced expressed products

3　讨论

Parkin[1]报道 2000 年全球肿瘤死亡率排序为胃癌、肝癌及结直肠癌等。肝癌目前是我国的第二大癌

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

症,全世界每年约45%新发肝癌病例在我国大陆,其病死率呈上升趋势。由于其具有早期诊断困难、多中心发生、易早期转移、复发等特点,治疗效果和预后很差,国家已将其列为癌症防治的重中之重[2]。

目前临床上用于肝癌诊断的方法虽然较多,但尚不令人满意,能手术切除的肝癌不足25%[5],其早期诊断率由此可见一斑;肝癌基因治疗作为解决转移、复发问题的一个极具潜力的治疗手段,实验研究报道很多,但少见报道在肝癌中有较高阳性率、特异性强的基因[6],限制了基因、免疫治疗应用于肝癌临床。

作者对21例HCC患者的癌、癌旁非癌标本进行半定量RT-PCR证实,IDD01基因高表达于HCC组织,说明可能和HCC的发生、发展有关。电子基因定位显示,IDD01定位于2p13~15,已有文献[7]报道,2号染色体短臂异常是HCC发生的重要原因;蛋白质功能预测示,IDD01编码蛋白质含有3个WD40保守区域,WD40有多种功能,如信号转导调控、前mRNA加工、细胞骨架组装等[8],我们有充分理由推测这条基因和HCC的发生、发展有关。为进一步研究IDD01的功能,作者构建其原核表达载体,并进行蛋白质表达。

pMAL-c2X带有强启动子(tac)的高效融合表达载体,其特点是带有一个标签蛋白(麦芽糖结合蛋白—MBP),外源基因插入后,与麦芽糖结合蛋白基因一起以融合蛋白的形式进行表达。由于麦芽糖结合蛋白的分子量为42×10^3,因此融合蛋白中IDD01基因表达产物约为28×10^3,与与生物信息学预测结果一致。

此外,本研究结果表明,该表达体系具有很高的表达率。以标签蛋白形式存在的麦芽糖结合蛋白为以后纯化提供了基础。在麦芽糖结合蛋白和IDD01表达蛋白之间有一酶切位点,可以应用现有的蛋白切割因子(如Factor Xa)进行酶切,可纯化出不带任何多肽标签的IDD01蛋白。本研究为HCC诊断抗体的制备、免疫治疗提供有价值的参考依据。

参考文献:

[1] Parkin D M, Bray F, Ferly J, *et al*. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000[J]. Int J Cancer, 2001, 94(2): 153—156.

[2] 董志伟,乔友林,李连弟,等. 中国癌症控制策略研究报告[J]. 中国肿瘤, 2002, 11(5): 250—260.

[3] 朱武凌,段芳龄,刘东亮,等. 应用抑制性消减杂交方法克隆人肝细胞癌差异表达基因[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(3): 183—184.

[4] 黄培堂 译. 聚合酶链式反应体外扩增DNA[A]. 见: Sambrook J, Russell D主编. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002. 597—701.

[5] 吴孟超. 原发性肝癌治疗的进展及展望[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(1): 1—4.

[6] Xu X R, Huang J, Xu Z G, *et al*. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(26): 15089—15094.

[7] Wang G, Zhao Y, Liu X, *et al*. Allelic loss and gain, but not genomic instability, as the major somatic mutation in primary hepatocellular carcinoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2001, 31(3): 221—227.

[8] Smith T F, Gaitatzes C, Saxena K, *et al*. The WD repeat: a common architecture for diverse functions[J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24(5): 181—185.

(编辑 郭建秀)

(上接891页)

起关节功能障碍,可运用膝关节松动技术。其方法为:①髌股关节:分离牵引、侧方滑动为一般松动,能增加髌骨活动度,向上滑动增加伸膝活动范围,向下滑动增加屈膝活动范围。②股胫关节:长轴牵引,能缓解疼痛;前后向滑动及伸膝摆动,能增加膝关节伸的活动范围;侧方滑动,能增加膝关节活动范围;内旋摆动增加小腿内旋活动范围,外旋摆动,增加小腿外旋活动范围。③上胫腓关节:作前后向、后前向滑动为一般松动,能缓解疼痛。主、被动牵拉伸膝、屈膝肌群。用屈膝牵引架牵引,来改善膝关节活动。以上手法,每日或隔日1次,每次20~40 m,10次为1疗程,共3个疗程。

2 治疗效果

痊愈21例(70%),显效7例(23.3%),好转2例(6.7%),无效0例,有效率100%。

3 讨论

膝关节作为下肢重要的行走和负重的关节,其病损颇多见。膝关节附近任何结构的病损(如骨折、软组织损伤、骨质增生和类风湿),除病损直接破坏关节的正常结构外,在治疗过程中,常由于制动或固定时间过久,均可造成关节内外组织的粘连和挛缩引起关节功能障碍。因此,膝关节病变早期和损伤后手术修复早期介入康复是预防膝关节僵硬的重要时机。关节松动术主要适用于任何因力学因素(非神经性)引起的关节功能障碍,包括:①关节疼痛、肌内紧张及痉挛。②可逆性关节活动降低。③进行性关节活动受限。④功能性关节制动。其禁忌证为关节活动已经过度,外伤或疾病引起的关节肿胀(渗出、增加)、关节的更症、恶性疾病以及未愈合的骨折。

关键词:膝关节功能障碍;康复治疗
中图法分类号:R493 文献标识码:B

参考文献:

[1] 刘 榕. 综合康复治疗下股骨折后膝关节功能障碍的疗效分析[J]. 现代康复, 2001, 5(4): 77.

[2] 黄晓春,李泽兵,孙玉春. 膝关节功能障碍的综合康复疗效分析[J]. 伤残医学杂志, 2000, 8(2): 58—61.

(编辑 张大春)

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