DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.040
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

文章编号:1000-5404(2000)08-0807-03

技术方法

单羧酸转运泵基因反义真核表达载体的构建

Construction of monocarboxylate transporter gene antisense eukaryotic cell expression vector

成党校,钱桂生,黄桂君 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 构建单羧酸转运泵基因反义逆转录病毒真核表达载体。方法 应用RT-PCR方法扩增带有双酶切位点的单羧酸转运泵目的基因片段,与带有相同酶切位点的pLXSN逆转录病毒真核表达载体粘末端进行反向基因插入连接,构建具有反义表达的逆转录病毒载体。结果 构建载体进行双酶切电泳分析及插入片段基因序列分析,证明反义载体构建成功。结论 应用RT-PCR方法扩增插入DNA片段,简单、灵活、快捷。双酶切定向连接构建反义表达载体可实现构建一步到位,免去正反向筛选的麻烦。

单羧酸转运泵(Monocarboxylate transporter, MCT)在细胞内外的乳酸转运及H^+调节方面具有重要作用[1,2]。本实验应用反义真核表达载体构建技术,构建MCT1反义真核表达载体,对进一步应用反义技术研究肿瘤细胞MCT1基因表达、调控对肿瘤细胞内酸碱及生长代谢的影响具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

A549人肺腺癌细胞株及pLXSN逆转录病毒真核表达载体分别为我所保存的细胞株及真核表达载体;1640培养基及小牛血清为Hyclone产品;RNA提取试剂Tripue、RT及PCR试剂盒分别购自德国宝灵曼及美国Promega公司;核酸内切酶 *EcoR*Ⅰ、*BamH*Ⅰ及T4 DNA连接酶购自MBI公司。

1.2 细胞培养及总RNA提取

A549细胞的培养与传代参照文献[3]进行。RNA提取方法按照Tripue试剂说明书中的操作步骤进行。RNA沉淀经测定后用灭RNA酶三蒸水稀释至2 μg/μl。

1.3 RT-PCR产生反向插入基因片段

逆转录步骤根据宝灵曼试剂盒说明书略加修改进行。PCR引物设计根据Genebank中人心肌细胞MCT1 cDNA序列应用我所引物设计软件进行设计,同时根据pLXSN真核表达载体多克隆位点中的 *EcoR*Ⅰ、*BamH*Ⅰ酶切位点的5′~3′方向,在设计的上游引物5′端引入 *BamH*Ⅰ酶切序列及两个保护碱基,在设计的下游引物5′端引入 *EcoR*Ⅰ酶切序列及两个保护碱基。其具体序列如下:上游引物(96~117 bp) 5′ tt GGATCC ttc cat cgg ctt ctc tta tgc 3′;下游引物(735~715 bp) 5′ gc GAATTC ctc ttg ttt agg gtg tct tcc 3′。PCR操作步骤按照Promega试剂盒操作说明进行。PCR反应条件为:95°C预变性3min;94°C、40 s,59°C、50 s,72°C、1 min,35个循环后,72°C、10 min。

1.4 表达载体和插入基因片段的酶切与质粒构建

真核表达载体pLXSN的扩增及大量提取,按文献[4]进行。提取的质粒分别进行电泳、紫外分光光度仪检测(A_{260}/A_{280}),了解所提质粒的大小、纯度及含量。RT-PCR扩增产物和经上述检测合格的质粒分别进行 *EcoR*Ⅰ、*BamH*Ⅰ双酶切,酶切操作方法、步骤按两酶的操作说明进行。所得的酶切片段分别进行1%琼脂糖凝胶电泳及"V"型槽电泳回收,具体操作按卢圣栋[5]的方法进行。经酶切回收的线状质粒DNA与插入片段DNA按1∶3质量比进行混合,在T4 DNA连接酶的作用下进行反向定向连接,见图1。连接反应操作步骤按连接酶操作说明进行。取5 μl连接产物进行电泳,根据电泳结果分析,初步判断连接效果。然后取2 μl(500 ng)连接产物进行电穿孔基因转染,电穿孔条件为:1.25 kV,25 μF,200 Ω,穿孔后细菌在氨苄青霉素LB培养板上进行筛选培养。

1.5 重组载体的筛选与鉴定

用接种环挑取上述在抗菌素LB培养基上生长的细菌菌落分别接种于不同标签的LB培养基试管中进行细菌扩增及质粒小量提取,提取的质粒分别进行电泳及酶切后电泳,若重组质粒大小与线状质粒DNA及目的插入片段DNA之和相同,且在双酶切后能产生与原线状质粒DNA及插入DNA大小相同的两

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900067)

作者简介:成党校(1965—),男,陕西省西安市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事单羧酸转运泵基因在人肺癌细胞中的表达、pH调节及功能方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68755320

收稿日期:1999-12-24;修回日期:2000-04-02

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

个电泳条带，则说明此重组质粒为目的质粒。扩增此重组质粒并进行插入片段测序，测序结果与 MCT1 相应目的序列进行比较，进一步证明插入反义基因的正确性。

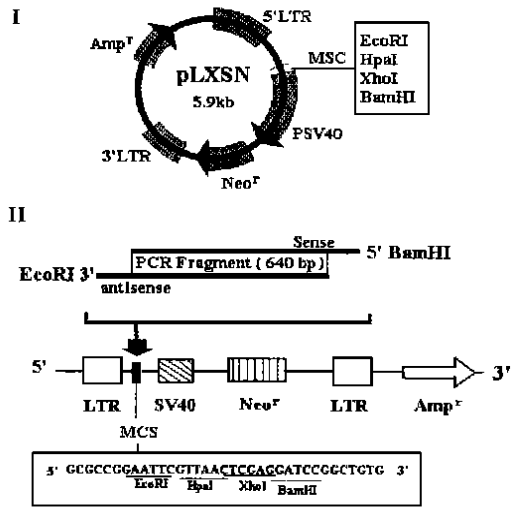


图 **1** 质粒构建策略图

Ⅰ：用于构建的真核表达载体；Ⅱ：构建策略图

2 结果

2.1 总 RNA 提取结果

应用 10% 小牛血清 1640 培养基培养的 A_{549} 人肺腺癌细胞株生长旺盛。应用 Tripue 核酸提取试剂一步法提取的 RNA 其 A_{260}/A_{280} 比值为 2.0，RNA 纯度高。长满 10 ml 瓶底的两瓶细胞可提取的总 RNA 约为 60～100 μg。

2.2 RT-PCR 结果

应用我所引物合成软件设计的带有酶切位点的引物经 RT-PCR 后产生一长约 640 bp 的 DNA 片段。见图 2 中泳道 3。

2.3 PCR 产物、质粒双酶切及连接结果

PCR 扩增产物及质粒经双酶切、T4 DNA 连接酶连接后，1% 琼脂糖凝胶电泳证明酶切及连接成功，见图 2，可见酶切 PCR 产物单体、二聚体、三聚体分别位于 Maker 的 564～831 bp、947～1 375 bp、1 548～1 904 bp 之间。位于 5 148 bp 之后的两条较亮的条带为连接成功的新载体质粒。因加入了插入片段，其比 5 道的双酶切质粒 DNA 电泳迁移速度略慢而位于其后。

2.4 重组载体鉴定结果

连接成功的质粒经电穿孔基因转染法在氨苄青霉素的 LB 琼脂培养板上获得数个阳性转染菌落。此菌落经扩增培养、质粒大量提取、质粒 *EcoR*Ⅰ、*BamH*Ⅰ双酶切及 1% 琼脂糖凝胶电泳，同一泳道可见约 5.9 kb 及 640 bp 两条带，与 pLXSN 酶切片段及插入 DNA 片段电泳位置相同，证明质粒构建成功，见图 3。构建质粒经纯化回收及插入片段测序，测序结果证明插入的基因序列与 Genebank 中的人心肌细胞的 MCT1 cDNA 中的 96～735 bp 之间的 DNA 序列相同，证明反义真核表达载体构建成功。

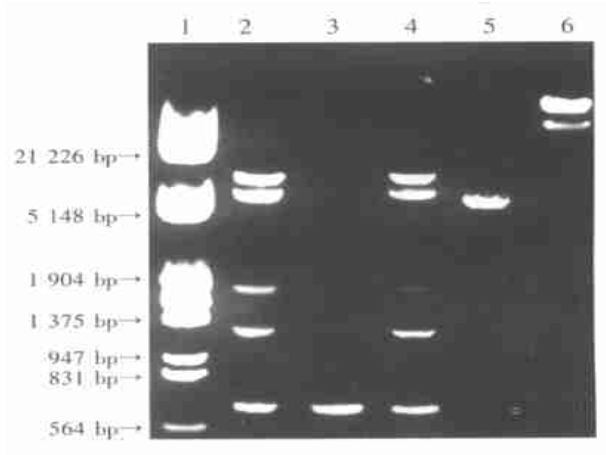


图 **2** 酶切 **PCR** 插入片段、酶切质粒经 **T4 DNA** 连接酶作用后的电泳结果

1 道：大分子量 Marker(λDNA＋*EcoR*Ⅰ＋*Hand* Ⅲ)；2、4 道：酶切质粒、酶切 PCR 产物经 T4 DNA 连接酶作用后的电泳结果；3 道：PCR 产物；5 道：pLXSN＋*EcoR*Ⅰ＋*BamH*Ⅰ；6 道：pLXSN 质粒

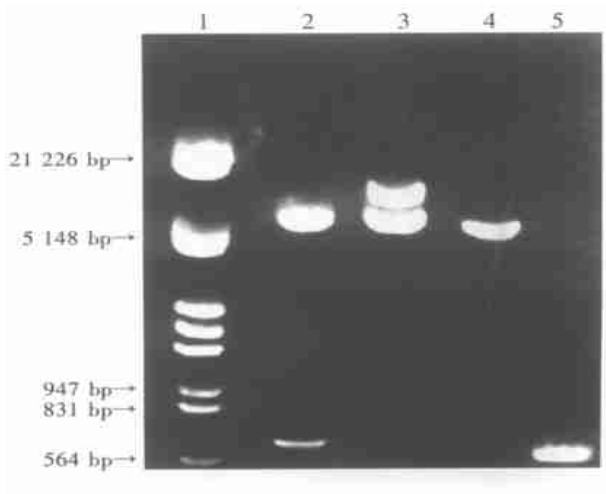


图 **3** 构建质粒双酶切电泳结果

1 道：大分子量 Marker(λDNA＋*EcoR*Ⅰ＋*Hind* Ⅲ)；2 道：经双酶切(*EcoR*Ⅰ＋*BamH*Ⅰ)的构建质粒；3 道：构建的质粒；4 道：双酶切 pLXSN 质粒；5 道：双酶切插入片段

3 讨论

由于肿瘤细胞糖代谢酶谱的改变，以及实体肿瘤组织的特点是肿瘤细胞的生长速度远大于毛细血管的

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

生长速度,因此肿瘤细胞是在一种相对缺氧环境下生长的。显而易见,无氧糖酵解成为肿瘤细胞获取能量的一种主要方式,这种代谢方式导致了肿瘤细胞内乳酸等单羧酸产物大量产生,并可能引起肿瘤细胞胞内酸化和凋零。目前已证明 Na^+/H^+ 离子交换泵(Na^+/H^+ exchanger-1, NHE-1)在肿瘤细胞胞内外的氢离子浓度调节方面发挥有一定作用[6]。但此 Na^+/H^+ 泵并不能转运乳酸等无氧代谢产物,而乳酸等底物的蓄积将反馈抑制糖酵解。因此有理由相信 MCT 可能在肿瘤细胞的能量代谢及细胞内 pH 值调节方面发挥重要作用。本研究应用 RT-PCR 方法直接克隆 MCT1 基因片段并将其插入真核表达的反转录病毒载体 pLXSN 中,为进一步细胞水平研究 MCT1 对肿瘤细胞的作用奠定了基础。应用 RT-PCR 扩增插入基因片段较质粒扩增、酶切等方法产生插入基因片段简单、灵活、快捷。而且可通过在上下游引物中引入不同的酶切序列,可实现插入片段的正向或反向插入。在应用 PCR 进行插入基因片段的引物设计过程中,引入不同的内切酶序列时应注意不同的内切酶所需加的保护碱基数目不同。如果在引物酶切序列前所加的保护碱基数目不够,则扩增出的插入片段有可能不被相应的内切酶作用,无法形成粘性末断插入片段。此可能是造成应用此法构建质粒失败的主要原因。

关键词:单羧酸转运泵基因;RT-PCR;反义载体构建
中图法分类号:R394－3 文献标识码:B

参考文献:

[1] Broer S, Schneider H P, Broer A, *et al*. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in Xenopus laevis oocytes by changes in cytosolic pH[J]. Biochem J, 1998, 333(1): 167－174.
[2] Price N T, Jackson V N, Halestrap A P, *et al*. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past[J]. Biochem J, 1998, 329(Pt2): 321－328.
[3] 司徒镇强,吴军正 主编. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社西安分公司出版, 1996. 127－135.
[4] 金冬雁,黎孟枫, 等译著. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1992. 24－25.
[5] 卢圣栋 主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1993. 128－129.
[6] 黄桂君, 钱桂生. NHE-1 基因表达在人肺癌细胞 pHi 调节及凋亡调控中的作用[J]. 科学, 1998, 242(10): 64－65.

(编辑 潘式文)

文章编号:1000-5404(2000)08-0809-01

经验与短篇

严重瘢痕肢体延长术 1 例

A case report of limb lengthening in patient with extensive scar

许建中,李起鸿,范少地 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

严重瘢痕肢体的短缩畸形多由严重创伤或血源性骨髓炎所致,由于存在大量贴骨瘢痕,骨骼的血循环严重破坏,给肢体延长术带来了较大困难,现将 1 例严重瘢痕肢体延长的成功治疗经验报告如下。

患者,男,19 岁,因右胫骨血源性骨髓炎反复手术后严重肢体短缩畸形收入院。患者 2 岁时因寒战、高热,右小腿肿痛,溢脓在外院诊断为"右胫骨骨髓炎",经 4 次手术治疗后控制感染。3 岁多时又因"右胫骨感染后骨缺损"在外院行同侧腓骨移植代胫骨术,术后伤口再感染经换药后痊愈。随着年龄增长,右下肢短缩渐加剧,严重跛行,故来我院就诊。查体:右下肢跛行,胫前内侧全长 15 cm×3 cm 广泛贴骨瘢痕,较薄,无活动度。左足下垂 15°僵直,内翻 15°畸形,肢体长度测量髂前上棘至内踝,右侧 63.5 cm,左侧 84 cm,绝对长度短缩 20.5 cm,其中大腿短缩 2.5 cm,小腿短缩 18 cm。功能性测量右下肢垫高 15 cm 后脊柱代偿性侧弯可以矫正,但骨盆呈部分固定代偿,右足垫高未能纠正骨盆倾斜,X 线测量见图 1。

经短期的皮肤训练后,于持续硬膜外麻醉下行了胫前贴骨瘢痕广泛切除减张缝合,胫骨上、下干骺端同时截骨骨外固定肢体延长术[1],术后在缓慢牵伸肢体延长的同时,逐渐矫正了足内翻畸形。肢体延长 91 d,共延长 9.6 cm,平均每日 1.1 mm,

(下转 812 页)

作者简介:许建中(1962－),男,辽宁省大连市人,博士,教授,主要从事创伤骨科与骨外固定方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68754190

收稿日期:2000-01-15;修回日期:2000-03-10

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