

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 04. 013

pcDNA3. 1/DLC-1 重组质粒的构建及其在 HT-29 细胞中的表达

吴平平¹,金 治²,吴 鹏²,金月玲²,黄培林²

Construction and Expression of Recombinant Plasmid pcDNA3. 1/DLC-1

WU Ping-ping¹,JIN Zhi²,WU Peng²,JIN Yue-lin²,HUANG Pei-lin²

1. Department of Oncology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2 Department of Pathology, School of Medical Science, Southeast University

Corresponding Author: HUANG Pei-lin, E-mail: huangpeilin2002@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To construct and express the recombinant plasmid of DLC-1 (deleted in liver cancer). **Methods** DLC-1 gene fragment was obtained by PCR. DLC-1 DNA fragment was digested with *Xba* I and *Bam*H I together, and then ligation reaction to eukaryotic expression vector pcDNA3. 1 which was also digested under the same condition. The product of ligation reaction was transformed into Escherichia coli DH5a. Recombinant plasmid pcDNA3. 1/DLC-1 was transfected into HT-29 cells with liposome. Then, the product of recombinant plasmid was obtained by RT-PCR. **Results** Double restriction enzyme digestion and subsequent sequencing of recombinant plasmids confirmed the correctness of the recombinant plasmids. Recombinant plasmid pcDNA3. 1/DLC-1 was transfected into HT-29 cells with liposome, and the product of recombinant plasmid was obtained. **Conclusion** The pcDNA3. 1/DLC-1 was expressed in HT-29. This method provides a basis for studying colorectal cancer.

Key words: DLC-1; Recombinant plasmid; HT-29 cell line; Colon cancer; Gene transfection

摘要:目的 构建和表达 DLC-1 (deleted in liver cancer) 基因重组质粒。**方法** 用 PCR 法得到 DLC-1 基因片段,此基因片段带有 *Xba* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点,然后将此片段和真核表达载体 pcDNA3. 1 连接,转化大肠杆菌 DH5a,利用脂质体介导将 pcDNA3. 1/DLC-1 重组质粒转染到结肠癌 HT-29 细胞中,再用 RT-PCR 法检测重组质粒的表达。**结果** 重组质粒经 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切和测序与 DLC-1 基因序列一致;利用脂质体介导将 pcDNA3. 1/DLC-1 重组质粒导入 HT-29 细胞,获得了 DLC-1 基因的表达。**结论** 成功构建 pcDNA3. 1/DLC-1 重组质粒并在 HT-29 细胞内表达。

关键词: DLC-1; 重组质粒; HT-29 细胞株; 结肠癌; 基因转染

中图分类号: R735. 3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)04-0417-04

0 引言

转基因通常是指利用一定的载体和导入方法将外源基因导入细胞,使其在靶细胞内表达^[1]。DLC-1 (frequently deleted in liver cancer, DLC-1) 基因又称肝癌经常丢失基因^[2]。最近的研究表明,应用核糖核酸干扰 (RNAi) 技术对结肠癌细胞株 Lo-Vo 中 DLC-1 基因 mRNA 的表达进行抑制,发现 DLC-1 基因可抑制细胞株的增殖^[3]。本研究利用

PCR 技术筛选获得 DLC-1 基因,然后构建其重组质粒并转染 DLC-1 阴性表达的结肠癌细胞 HT-29 细胞,最终获得该基因产物的表达。为深入研究 DLC-1 基因构建实验技术平台。

1 材料与方法

1. 1 材料

1. 1. 1 主要试剂 脂质体 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen), 无血清培养液 OPTI-MEM (Gibco 公司), T4 连接酶和限制性核酸内切酶 *Xba* I、*Bam*H I (Takara 公司), Trizol (Invitrogen), 反转录试剂盒 (Takara 公司), 纯化回收试剂盒 (QIA-GEN 公司), 引物: 由 Invitrogen 公司和 Takara 公司合成, 质粒抽提试剂盒 (Promega 公司)。

1. 1. 2 质粒 原核细胞表达载体 pCMV-SPORT6,

收稿日期: 2008-12-28; 修回日期: 2009-05-06
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471937)
作者单位: 1. 210009 南京, 东南大学附属中大医院肿瘤科; 2. 东南大学医学院病理学系
通信作者: 黄培林, E-mail: huangpeilin2002 @ yahoo. com. cn
作者简介: 吴平平 (1978-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤的研究

Amp 抗性 (RZPD 公司), 真核细胞表达载体 pcDNA3.1 (Invitrogen 公司)。

1.1.3 细胞 结直肠癌细胞株 HT-29、CaCo₂、LoVo (上海细胞生物研究所)。3 种人结肠癌细胞株均在含 10 % 小牛血清的 RPMI-1640 培养液、37 °C、5 % CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 DLC-1 表达阴性结肠癌细胞株筛选 结肠癌细胞株 CaCo₂、LoVo、HT-29 提取 RNA 后 RT-PCR 检测 DLC-1 mRNA 表达。DLC-1 mRNA 上游引物序列: 5'-GGACACCATGATCCTAACAC -3', 下游引物序列: 5'-CTCATCCTCGTCTGAATCGT -3', 反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 1 min, 退火温度 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物于 2 % 琼脂糖凝胶电泳判定 DLC-1 表达阴性结肠癌细胞株。

1.2.2 目的基因的获取、回收和纯化 从 RZPD 公司购买原核表达载体 pCMV-SPORT6 (此载体含有 DLC-1 基因全长的 cDNA), 以此质粒为模板, PCR 扩增 DLC-1 目的片段, 根据 GenBank AF035119 公布的 DLC-1 基因全长序列, 用计算机软件设计引物, 上游引物序列: 5'-CTAGTCTAG ATGTGCAG AAA-GAAGCCGGA CACCATGA TCCTAACACAAATT-GAAGCCAAGGAAGC -3' (斜体为 *Xba* I 酶切位点), 下游引物序列: 5'-CGCGGATCC TCACCTAGATTT-GGTGTCTTTG -3' (斜体为 *Bam*H I 酶切位点), 反应条件: 94 °C 预变性 30s, 94 °C 变性 30s, 退火温度 60 °C 退火 30s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 6 min。PCR 产物于 1 % 琼脂糖凝胶电泳观察, 切取目的条带, 将含目的片段的琼脂糖凝胶经 DNA 纯化回收试剂盒回收。

1.2.3 pcDNA3.1/DLC-1 表达载体构建 用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切 DLC-1 目的片段和质粒 pcDNA3.1, 酶切体系如下: pcDNA3.1 (或 DLC-1) 2 μl, 10 × buffer 5 μl, 100 × BSA 0.5 μl, *Xba* I 1 μl, *Bam*H I 1 μl, ddH₂O 40.5 μl, 然后置于 37 °C 水浴 1 h 后行琼脂糖电泳后用纯化回收试剂盒回收。接下来采用 T₄ DNA 连接酶将经酶切的目的片段及经相同酶切的质粒载体 pcDNA3.1 连接其连接体系如下: 酶切回收的 DLC-1 1 μl, 酶切回收的 pcDNA3.1 1 μl, 10 × buffer 1 μl, T₄ DNA 连接酶 1 μl, ddH₂O 6 μl, 置于 4 °C 12 h, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5a, 在含有氨苄青霉素的 LB 培养液中培养 16 h。

1.2.4 重组质粒 pcDNA3.1/DLC-1 的鉴定 在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中挑取菌落按照质粒抽

提试剂盒操作步骤进行质粒提取。然后用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切提取的重组质粒, 取 5 μl 酶切反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 初步判定重组质粒构建是否正确, 再将重组质粒保菌液送公司进行测序。

1.2.5 重组质粒在 HT-29 细胞中的表达与检测 重组质粒 pcDNA3.1/DLC-1 2 μg 置于 50 μl OPTI-MEM 中, 6 μl LipofectamineTM 2000 置于 50 μl OPTI-MEM 中, 轻轻混匀, 室温放置 5 min 后合并为 100 μl, 再轻轻混匀室温放置 20 min, 加入 6 孔板培养的 HT-29 细胞培养 48 h 后, 提取对照组、空白载体组和转染组 HT-29 细胞的 RNA, RT-PCR 检测 mRNA 表达。操作同 1.2.1。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测结肠癌细胞株中 DLC-1 mRNA 的表达

选择已知 DLC-1 阳性的细胞 CaCo₂、LoVo 细胞株作为阳性对照, 结果显示: CaCo₂、LoVo 细胞株在 262 bp 处出现 DLC-1 mRNA 表达条带, 而 HT-29 细胞在该处表达缺失, 见图 1。

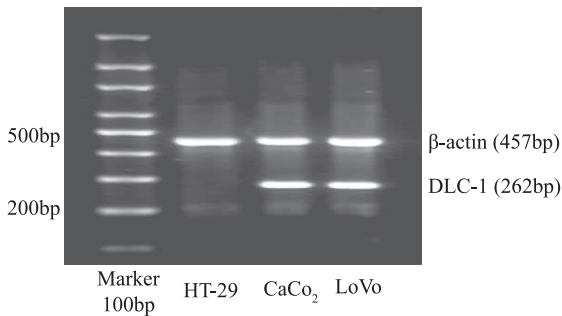


图 1 结肠癌细胞株 DLC-1 mRNA 表达
Figure 1 DLC-1 mRNA Expression of human colorectal cancer cell lines

2.2 目的基因的 PCR 产物及酶切产物

以原核表达载体 pCMV-SPORT6 (此载体上含有 DLC-1 基因全长的 cDNA) 为模板, 进行 PCR 获得带有酶切位点的 3 294 bp 的目的片段, 见图 2; 将纯化回收的 DLC-1 目的片段用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切, 获得了具有粘性末端 DLC-1 目的片段, 见图 3。

2.3 重组质粒 pcDNA3.1/DLC-1 的双酶切鉴定 pcDNA3.1/DLC1 经 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切得到 5.4 kb 的 pcDNA3.1 空载体条带和 3.2 kb 的目的 DLC-1 基因条带, 见图 4, 与预期条带大小一致。

2.4 质粒测序结果

经测序与 GenBank AF035119 一致, 见图 5。

2.5 重组质粒在 HT-29 细胞中的表达与检测

提取对照组、空白载体组和转染组细胞的 RNA,RT-PCR 检测 DLC-1mRNA 表达,结果显示转染组有 DLC-1 基因 mRNA 的表达,见图 6。

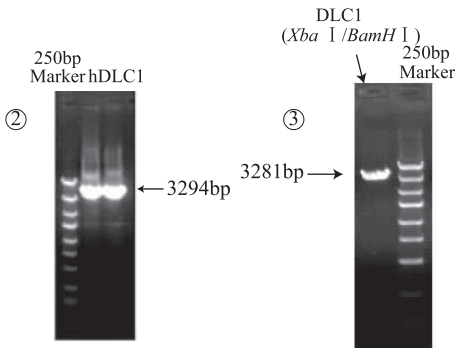


图 2 PCR 产物凝胶电泳结果
图 3 酶切后产物凝胶电泳结果

Figure 2 Agorse gel electrophoresis of product of PCR
Figure 3 Agorse gel electrophoresis of product of restriction enzyme digestion

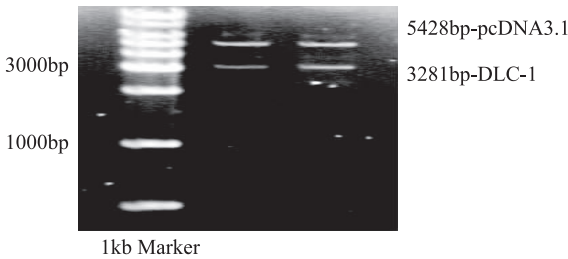


图 4 重组真核表达质粒 pcDNA3.1/DLC-1 酶切鉴定
Figure 4 Restriction enzyme digestion of the recombinant plasmid pcDNA3.1/DLC-1

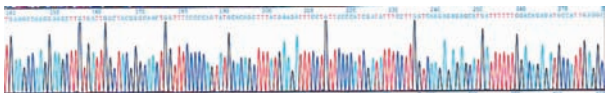


图 5 重组质粒 pcDNA3.1/DLC-1 部分测序图
Figure 5 Part of sequencing charter of the recombinant plasmid pcDNA3.1/DLC-1

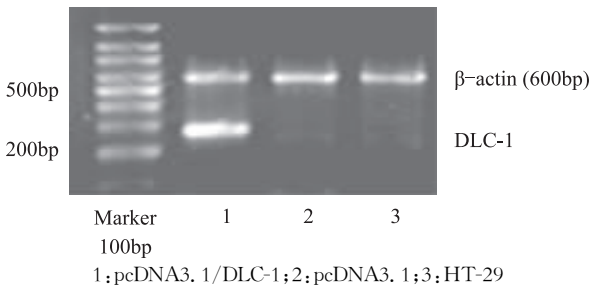


图 6 DLC-1 目的片段在 HT-29 细胞中的表达
Figure 6 DLC-1 fragment expression in transfected HT-29 cells

3 讨论

基因转移是分子生物学的核心技术,其关键是

构建真核表达载体并使其在真核细胞中获得表达。本实验的 RT-PCR 结果显示: HT-29 细胞株中 DLC-1 基因在 mRNA 水平上表达为阴性,LoVo、CaCO₂ 细胞表达为阳性。这一结果和国外学者^[4] 的实验数据是一致的。之后,本实验首先通过 PCR 技术获得目的基因,然后与真核表达载体 pcDNA3.1 连接,再转入感受态细胞扩增,这一过程需要注意以下几个问题:第一,设计引物时酶切位点前保护碱基的选择:因为本实验中的目的基因片段较长,仅仅只加入两个保护碱基,不能使内切酶有效结合 DNA,导致其内切反应不能顺利进行,为此我们多加了几个保护性碱基,实验证明此手段是有效的;第二,载体的选择:pcDNA3.1 是一个高效真核表达载体,具有表达克隆化 cDNA 所需的启动子、增强子、加 poly(A) 信号等调控元件,及 SV40 病毒复制子、G418 筛选标记基因等序列^[5]。由于 pcDNA3.1 的这些优点,所以被用作分子生物学研究的重要载体。

实践证明“粘-粘”定向克隆的连接效率高。其优点是:(1)质粒与外源 DNA 接合处的限制酶切位点常可保留;(2)外源 DNA 只以一个方向插入至重组质粒中;(3)由于载体的两个突出端不互补,因此,载体片断不能环化。本研究中 pcDNA3.1 和 DLC-1 均含有 Xba I 和 BamH I 两个酶切位点,用双酶切后,DNA 两端为非同源互补的粘性末端(粘-粘),这样载体 pcDNA3.1 酶切后产生的末端与 DLC-1 酶切后片断的末端完全匹配。然后在 T₄ DNA 连接酶作用下,即可将 DLC-1 片段定向地插入到 pcDNA3.1 载体中。最后我们用 Xba I 和 BamH I 双酶切 pcDNA3.1 重组子后,凝胶电泳检测有 5.4 kb 的 pcDNA3.1 空载体条带和 3.2 kb 的目的 DLC-1 基因条带。其测序结果与 GenBank AF035119 一致,进一步证实已成功地完成了重组真核表达载体 pcDNA3.1/DLC-1 的构建。目的基因能有效的在靶细胞中的表达是基因研究必不可少的条件。本实验采用当前普遍使用的脂质体转染方法^[6] 进行基因转染,脂质体转染具有高效、稳定、快速、方便易行的特点,且对细胞毒性影响较小^[7]。结果证实 DLC-1 基因成功导入 HT-29 细胞中。

DLC-1 基因目前被认为是一个新的抑癌基因。该基因在肝癌^[8]、卵巢癌^[9]、胃癌^[10]、前列腺癌^[11] 的研究已陆续展开,但在结直肠癌中的研究报道颇少。我们有必要利用基因转染技术,深入研究和阐明 DLC-1 基因在结直肠癌发生发展过程中的作用和功能。

参考文献:

[1] 高峰,郑声琴,张宇伟,等. RegIV 基因在结直肠癌细胞系中的

mRNA 表达及 pcDNA-RegIV 的构建与转染[J]. 东南大学学报, 2006, 3(25): 147-150.

[2] Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, et al. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat Rho GAP [J]. Cancer Res, 1998, 58(10): 2196-2199.

[3] Y Jin, X Tian, Y Shang, et al. Inhibition of DLC-1 gene expression by RNA interference in colon cancer LoVo cell line[J]. Oncology Reports, 2008, 19(3): 669-674.

[4] Wilson PJ, McGling E, Marsh A, et al. Sequence variants of DLC-1 in colorectal and ovarian tumors[J]. Hum Mutant, 2000, 15(2): 156-165.

[5] 刘淑娟, 韩军涛, 辛晓燕, 等. 肿瘤抑制基因 DOC-2 真核表达载体的构建及在卵巢癌细胞 HO-8910 中的表达与鉴定[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(1): 29-31.

[6] 陈艳, 王熙才, 伍治平, 等. VEGFR-3 胞外区基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(1): 40-42.

[7] Wu G, Nomoto S, Hoque MO, et al. DeltaNp63alpha and Tap63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development[J]. Cancer Res, 2003, 63(10): 2351-2357.

[8] Kim TY, Lee JW, Kim HP, et al. DLC-1, a GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology, and migration in human hepatocellular carcinoma[J]. Biochem and Biophys Res Commun, 2007, 355(1): 72-77.

[9] Isyed V, Mukherjee K, Lyons-Weiler J, et al. Identification of ATF-3, Caveolin-1, DLC-1, and NM23-H2 as putative autitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling[J]. Oncogene, 2005, 24(10): 1774-1787.

[10] 刘涛, 杨维良, 张新晨, 等. 肝癌缺失基因在胃癌中的表达及启动子甲基化[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(7): 822-824.

[11] Guan M, Zhou X, Soultzis N, et al. Aberrant Methylation and Deacetylation of Deleted in liver cancer-1 Gene in Prostate Cancer: Potential Clinical Applications[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(5): 1412-1419.

[编辑: 周永红; 校对: 贺文]

(上接第 397 页)

参考文献:

[1] Mora LB, Buettner R, Seigne J, et al. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6659-6666.

[2] Dolled-Filhart M, Camp RL, Kowalski DP, et al. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(2): 594-600.

[3] Nagpal JK, Mishra R, Das BR. Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis[J]. Cancer, 2002, 94(9): 2393-2400.

[4] Hsiao JR, Jin YT, Tsai ST, et al. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis[J]. Br J Cancer, 2003, 89(2): 344-349.

[5] Xie TX, Wei D, Liu M, et al. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis[J]. Oncogene, 2004, 23(20): 3550-3560.

[6] Lutticken C, Wegenka UM, Yuan J, et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130[J]. Science, 1994, 263: 89-92.

[7] Gritsko T, Williams A, Turkson J, et al. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1): 11-19.

[8] Xie TX, Huang FJ, Aldpe KD, et al. Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3188-4196.

[9] Orimoto AM, Neto CF, Primentel ER, et al. High numbers of human skin cancers express MMP2 and several integrin genes[J]. J Cutan Pathol, 2008, 35(3): 285-291.

[10] Kader AK, Liu J, Shao L, et al. Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with bladder cancer invasiveness [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(9): 2614-2620.

[11] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.

[12] Holle L, Hicks L, Song W, et al. Bcl-2 targeting siRNA expressed by a T7 vector system inhibits human tumor cell growth in vitro[J]. Int J Oncol, 2004, 24(3): 615-621.

[13] 潘立峰, 李巧霞, 单保恩, 等. VEGF 反义 RNA 对人食管癌细胞抑制作用的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(1): 41-45.

[14] Jiang H, Yu J, Song H, et al. Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368(1): 1-5.

[编辑: 安凤; 校对: 黄国玲]