

BLCAP 基因克隆及其真核表达质粒的构建

范德刚,范清宇,张惠中,张 鹏,龙 华,刘云燕

关键词: BLCAP 基因;骨肉瘤;转移;基因重组

中图分类号:R738.1 文献标识码:D

文章编号:1000-8578(2004)08-0000-01

0 引言

BLCAP 基因(又称为 bc10 基因)是国外学者在研究侵袭性膀胱癌时发现的^[1],其与细胞侵袭性相关,具有抑癌基因的部分特征,考虑是一种新的抑癌基因^[2]。该基因在人骨肉瘤细胞内有表达,并且在高转移亚系中表达水平明显降低^[4]。本研究克隆 BLCAP 基因,并构建真核细胞表达质粒,为进一步研究其功能提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料 RPMI-1640、Trizol、G418、cDNA 第一链合成试剂盒、Wizard™ Minicolumn 试剂盒及 EcoRI、XhoI、T4 DNA 等试剂购自鼎国公司。pcDNA 3.1 逆转录病毒载体由第四军医大学冯骥良博士惠赠,宿主菌 JM109 由本所保存。
1.2 细胞培养、提取总 RNA、反转录 cDNA 人骨肉瘤细胞系 SOSP-9607^[3] 用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基常规培养,达 1.0×10^7 后收获细胞,用 Trizol 试剂一步法抽提总 RNA,用 Clontech 试剂盒反转录为 cDNA。
1.3 RT-PCR、回收目的片段 根据 BLCAP 基因序列设计特异性引物^[1],第一链 5'-gaattcat gtatt gcctcca gt gg-3',第二链 5'-ctc gagttt ggt gcccacaaac gcc-3'。PCR 反应条件为:95℃预变性 5min;94℃、60s,56℃、60s,72℃、2min,35 个循环后,72℃、10min。PCR 产物大小约 280bp,低溶点琼脂糖凝胶电泳回收,WizardTMMinicolumn 纯化,-20℃保存备用。
1.4 连接、转化 将纯化的 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体连接,连接产物命名为 pGEM-BLCAP。常规转化 JM109

感受态细菌,氨苄青霉素抗性的 X-gal/LB 平板筛选,37℃培养过夜。

1.5 重组 pGEM-BLCAP 质粒鉴定 挑取白色菌落扩大培养,碱裂解法提取质粒。EcoRI、XhoI 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳。选择酶切鉴定阳性克隆,送上海博亚生物技术有限公司作 DNA 测序。
1.6 构建 pcDNA 3.1 -BLCAP 质粒并鉴定 pcDNA 3.1 及 pGEM-BLCAP 均用设计酶切位点作 EcoRI、XhoI 双酶切,回收线性片段,同前连接、转化,提取质粒,作 EcoRI、XhoI 双酶切鉴定。

2 结果

2.1 总 RNA 骨肉瘤细胞总 RNA 进行变性琼脂糖凝胶电泳,可见 28s、18s 条带。分光光度计测定 $A_{260}/A_{280} = 0.052/0.027 = 1.93$ 。RNA 浓度为 185μg/ml。

2.2 RT-PCR 结果 RT-PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,可见大小约 280bp 的特异性扩增产物。

2.3 克隆与鉴定 RT-PCR 片段与 pGEM-Teasy 载体连接、转化后质粒进行双酶切鉴定,电泳见有大小约 280bp 条带。该质粒即为阳性克隆,命名为 pGEM-BLCAP。

2.4 DNA 序列分析 pGEM-BLCAP 质粒 DNA 测序,与 BLCAP 基因 cDNA 的(255~508)bp 间序列同源性为 100%。

2.5 构建重组逆转录病毒质粒 pcDNA 3.1 -BLCAP 并鉴定 分别将 pcDNA 3.1 和 pGEM-BLCAP 作 EcoRI、XhoI 双酶切,回收目的片段,构建重组质粒 pcDNA 3.1 -BLCAP。转化 JM109 细菌,提取质粒,作 EcoRI、XhoI 双酶切及 PCR 鉴定,见有插入片段大小约 280bp,证明 pcDNA 3.1 -BLCAP 构建成功。

3 讨论

BLCAP 基因即膀胱癌相关蛋白基因,是国外学者用差异筛选方法从侵袭性不同的膀胱癌细胞中筛选发现的一个新基因^[1]。2002 年,国外学者利用 mRNA 差异显示技术克隆到该基因并做了研究,RT-PCR 结果表明该基因在非侵袭性病变中过度表达,在侵袭性肿瘤的下调提示其在肿瘤进展中起相当的作用。该基因具有抑癌基因的部分特征,有可能是一个新的抑癌基因^[2]。其在骨肉瘤表达等相关研究尚未见报道。

前期研究发现 BLCAP 基因在人骨肉瘤高转移亚系中的表达水平有所下降,说明其与骨肉瘤转移具有相关性^[4]。我们在实验中发现,BLCAPASODNs 对细胞贴壁生长、克隆形成和细胞增殖都有明显的促进作用(另文发表),从另一个角度证明 BLCAP 基因具有抑癌基因的功能。

本实验利用分子生物学常规手段,克隆 BLCAP 基因并构建了相应的真核细胞表达质粒,为细胞转染等实验作准备,为进一步研究该基因的功能创造了条件。

参考文献:

- [1] GromovaI,GromovP,CelisJE.Identificationoftrue differential gene expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using differential display procedure[J].Electrophoresis,1999,20 (2):241-248.
- [2] GromovaI,GromovP,CelisJE.Bc10: a novel human bladder cancer-associated protein with a conserved genomic structure downregulated in invasive cancer[J].Int J Cancer,2002,98 (4):539-545.
- [3] 杨彤涛,范清宇,张殿忠,等.1 株人成骨肉瘤细胞系的建立及特性观察[J].第四军医大学学报,1998,19 (3):264.
- [4] 范德刚,范清宇,张惠中,等.利用基因芯片技术筛选不同转移能力骨肉瘤细胞差异表达基因[J].第四军医大学学报,2003,24 (9):816-819.

[编辑:李奇明;校对:周永红]

收稿日期:2003-06-16;修回日期:2003-08-20

作者单位:710038 西安,第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研究所