

[文章编号] 1007-385X(2008)02-0179-03

· 短篇论著 ·

人 $P21^{WAF1/CIP1}$ 启动子荧光素酶真核表达载体的构建Construction of luciferase eukaryotic expression vector containing human $P21^{WAF1/CIP1}$ promoter李兵¹, 申社林^{1*}, 李朝争², 郭靠山¹, 李建广¹(1. 邢台医学高等专科学校, 河北邢台 054000; 2. 邢台市矿务局医院, 河北邢台 054000)

[摘要] 目的: 构建含人 $P21^{WAF1/CIP1}$ 基因启动子的表达载体 pGL3- P21p。方法: 以全血总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增 $P21^{WAF1/CIP1}$ 基因启动子, 并将其克隆到 T-easy 载体, 测序分析, 然后经酶切再克隆到 pGL3-basic, 构成重组真核表达载体 pGL3- P21p。将 pGL3- P21p 转染到乳腺癌细胞株 MCF7 中, 并检测细胞中荧光素酶的活性。结果: 经测序、酶切等检测证实重组真核表达载体 pGL3- P21p 构建成功, 荧光素酶活性检测显示 $P21^{WAF1/CIP1}$ 基因启动子对荧光素酶基因表达起到了正调控作用。结论: $P21^{WAF1/CIP1}$ 启动子荧光素酶真核表达载体的成功构建为进一步研究 $P21^{WAF1/CIP1}$ 基因启动子的表达调控奠定了基础。

[关键词] $P21^{WAF1/CIP1}$; 启动子; pGL3-basic 载体; 荧光素酶

[中图分类号] R737.2; Q782

[文献标志码] A

$P21^{WAF1/CIP1}$ 基因是 1993 年发现并克隆的细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 (cyclin - dependent kinas inhibitor, CD2 KI) 家族的成员, 在细胞周期中起关键调控作用, 并参与细胞的多种功能活动^[1-2]。近年许多研究表明, $P21$ 基因与肿瘤的发生、发展关系密切^[3-4]。因此, 研究它的启动子序列和相关信号通路对细胞凋亡及肿瘤的发生机制具有重要意义^[5-6]。 $P21^{WAF1/CIP1}$ 与细胞周期依赖激酶特异性结合并使之失活, 进而导致细胞周期阻滞, 很可能是抑制细胞增殖、调节细胞分化的中心事件^[7-8]。本研究将从健康志愿者血液中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增 $P21^{WAF1/CIP1}$ 启动子序列, 并将其克隆入荧光素酶质粒载体 pGL3-basic, 为研究 $P21^{WAF1/CIP1}$ 基因对肿瘤发生的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

T-easy Vector、pGL3-basic Vector 均购自 pro-mega 公司, 细胞培养试剂及 PCR 相关试剂均购自 TaKaRa 公司, 质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒均购自 Omega 公司。乳腺癌细胞株 MCF7、大肠埃希菌 DH5 α 均由本实验室保存。新鲜抗凝血为静脉抽取健康体检者血样, 以抗凝剂 (柠檬酸 0.48%, 柠檬酸钠 1.32%, 葡萄糖 1.47%) 抗凝, PCR 引物: Sense: 5'-GCCGGTACCAGCTTCTGACTTCGGCAG-3' Antisense: 5'-GCCGCTAGCAACAAGCTTGGGCAG-CAG-3' (上海生工生物工程公司合成)。

1.2 RT-PCR 扩增 $P21^{WAF1/CIP1}$ 启动子序列

微量全血总 RNA 的提取参照文献 [9], 以

Sense: 5'-GCCGGTACCAGCTTCTGACTTCGGCAG-3' Antisense: 5'-GCCGCTAGCAACA AGCTTGGGCAG-CAG-3' 为引物。扩增程序: 48 °C 反转录 45 min; 94 °C 2 min 灭活反转录酶; 94 °C 30 s, 55 °C 50 s, 72 °C 90 s, 30 个循环, 72 °C 最后延伸 10 min。将 RT-PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 用 DNA 回收试剂盒进行纯化回收。

1.3 目的基因片段的鉴定

将 RT-PCR 产物连接到 T-easy Vector, 并测序检测。连接体系为 10 μ l, 其中灭菌双蒸水 3 μ l, 10 倍缓冲液 1 μ l, RT-PCR 产物 3 μ l (约 20 ng), T-easy Vector 2 μ l, 连接酶 1 μ l; 4 °C 连接过夜。将此连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α , 蓝白斑筛选阳性重组子, 少量提取质粒用于测序。

1.4 pGL3- P21p 重组质粒的构建

RT-PCR 扩增得到 2.4 kb 的 $P21^{WAF1/CIP1}$ 启动子片段, 经电泳、凝胶纯化回收, 用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Kpn* I 双酶切回收产物及 pGL3-basic, 再经 DNA 纯化回收试剂盒回收酶切片段及载体。将此 2 个 DNA 片段进行定向克隆连接, 连接体系 10 μ l, 其中灭菌双蒸水 4 μ l, 10 倍缓冲液 1 μ l, 目的 DNA 片段 3 μ l (300 ng), 载体 DNA 片段 1 μ l (100 ng), T4 连接酶 1 μ l; 16 °C 连接过夜。连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α 。蓝白斑筛选阳性重组子, 少量提取质粒双酶切鉴定。重组质粒命名 pGL3- P21p。

1.5 细胞培养与转染

[作者简介] 李兵 (1978-), 男, 河北省唐山市人, 硕士研究生, 从事生物化学与分子生物学研究

* Corresponding author. E-mail: xtmcjiejou@126.com

乳腺癌细胞株 MCF7 在 37 ℃、5 % CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养,培养基为含 10% 胎牛血清及青霉素、链霉素各 100 U/ml 的 DMEM。于 200 μl 无血清 DMEM 中加入重组质粒 10 μl (2 μg), 另一 200 μl 无血清 DMEM 中加入脂质体试剂 4 μl, 室温下静置 35 ~ 45 min, 混合两溶液并轻轻混匀, 室温下孵育 10 ~ 15 min, 加无血清 DMEM 至 1 ml 混匀, 构成转染液。取培养 72 ~ 84 h 的乳腺癌细胞 MCF7, 用 2 ml 无血清 DMEM 洗涤 1 次。每支 35 mm 细胞培养瓶中加入 1 ml 转染液覆盖于细胞表面, 于 CO₂ 培养箱中培养 10 h, 去掉转染液, 更换 20 % 高糖 DMEM 继续培养 72 h。

1.6 荧光素酶表达活性测定

2 500 × g 离心收集转染细胞, 经裂解液裂解细胞释放胞内酶。取细胞裂解液 15 μl, 在其中加入 30 μl 的萤火虫荧光素酶检测试剂, 混匀后立即在化学发光仪中检测发光值, 记录 10 s 时的值(对应于荧光素酶的表达水平); 然后再加入 30 μl 的 stop&Glo 试剂, 同样测 10 s 时的值(对应 Renilla 荧光素酶的表达值), 按前者相对于后者的百分比作为报告基因的相对表达水平。测量共设 3 组: pGL3- P21p 重组质粒转染组, pGL3-basic 空质粒转染组, 癌细胞非转染组。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳及测序结果

RT-PCR 产物于 1 % 琼脂糖凝胶电泳(图 1), 在约 2 400 bp 处有 1 条与目的基因片段大小相符的 DNA 条带。克隆于 T-easy Vector 载体中的启动子序列经上海生工生物工程有限公司测序, 结果用 Blast 软件和 Gene Bank 中的序列比对发现, 序列相似性达到了 99%, 只是 P53 的结合位点 -2345 bp 处 G 突变成了 A。说明 RT-PCR 产物正是要克隆的目的片段。

2.2 pGL3- P21p 重组质粒双酶切鉴定结果

取 2 个白斑菌落提取的质粒用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Kpn* I 进行双酶切, 酶切产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳。结果如图 2 所示, 2、3 条带中两个阳性克隆质粒酶切结果在约 2 500 bp 处均出现了 1 条条带, 在约 5 000 bp 处出现了一条载体的双酶切片段。证明 RT-PCR 产物已成功地克隆到了 pGL3-basic Vector 载体中。

2.3 MCF7 细胞转染重组质粒后荧光素酶的表达

pGL3-basic 空质粒转染组的癌细胞裂解液荧光素酶活性较低, 仅为 5 U; 而 pGL3- P21p 重组质粒转

染组的癌细胞裂解液荧光素酶活性高达 37 U, 明显高于其他对照组; 说明 *P21*^{WAF1/CIP1} 启动子准确插入到了荧光酶基因上游, 并对荧光酶基因的表达起到了正调控作用。非转染组癌细胞裂解液几乎检测不到荧光。

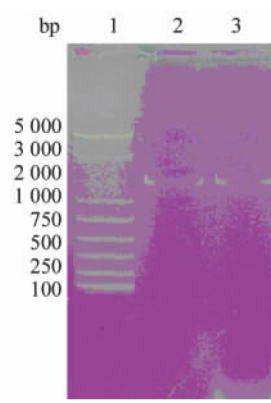


图 1 *P21*^{WAF1/CIP1} 启动子 PCR 产物电泳鉴定

1: Marker(D2000); 2,3: RT-PCR 产物

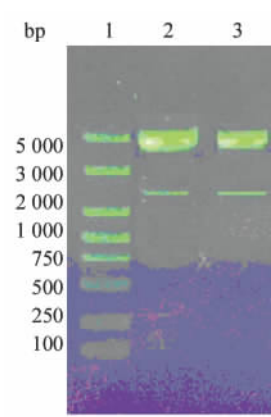


图 2 重组质粒 pGL3- P21p 的双酶切鉴定

1: Marker(D2000); 2,3: 重组子双酶切产物

3 讨论

P21^{WAF1/CIP1} 作为细胞周期的关键调节因子, 广泛的参与细胞凋亡及肿瘤的发生。因此对于 *P21*^{WAF1/CIP1} 基因启动子调控的研究将为肿瘤的预防与治疗提供新的方向。本研究以全血总 RNA 为模板经 RT-PCR, 成功地将 *P21*^{WAF1/CIP1} 基因启动子克隆到了 T-easy 载体, 经测序分析发现除了 p53 蛋白的结合位点 -2 345 bp 处 G 突变成了 A, 其他碱基与 Gene Bank 中公布的序列完全一致。说明本试验成功地克隆了 *P21*^{WAF1/CIP1} 基因启动子序列。为了进一步研究 *P21*^{WAF1/CIP1} 基因启动子的表达调控元件, 又将其克隆到了真核表达载体 pGL3-basic 中, 成功地

构建了荧光素表达载体 pGL3- P21p。经荧光素酶活性分析发现 pGL3- P21p 转染组荧光酶活性高达 37 U,明显高于 pGL3-basic 转染组及非转染组,说明 $P21^{WAF1/CIP1}$ 启动子成功地克隆到了真核表达载体 pGL3-basic 中,并对荧光酶基因的表达起到了正调控作用。这对于研究 $P21^{WAF1/CIP1}$ 基因启动子的转录调控因子奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 杨安强,郑兴征,潘晓琳,等. 细胞周期调控基因 $p21^{WAF1/CIP1}$ 与肿瘤的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(2): 243-245.
- [2] Fujiwara K, Daido S, Yamamoto A, *et al.* Pivotal role of the cyclin-dependent kinase inhibitor $P21^{WAF1/CIP1}$ in apoptosis and autophagy[J]. J Biol Chem, 2008, 283(1): 388-397.
- [3] Buchynska LG, Nesina IP, Yurchenko NP, *et al.* Expression of p53, $P21^{WAF1/CIP1}$, p16^{INK4A} and Ki-67 proteins in serous ovarian tumors[J]. Exp Oncol, 2007, 29(1): 49-53.
- [4] Pérez-Tenorio G, Berglund F, Esguerra Merca A, *et al.* Cytoplasmic $P21^{WAF1/CIP1}$ correlates with Akt activation and poor response to tamoxifen in breast cancer[J]. Int J Oncol, 2006, 28(5):

1031-1042.

- [5] Zupanska A, Adach A, Dziembowska M, *et al.* Alternative pathway of transcriptional induction of $P21^{WAF1/CIP1}$ by cyclosporine a in p53-deficient human glioblastoma cells[J]. Cell Signal, 2007, 19(6): 1268-1278.
- [6] Mitomi H, Ohkura Y, Fukui N, *et al.* $P21^{WAF1/CIP1}$ expression in colorectal carcinomas is related to Kras mutations and prognosis [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2007, 19(10): 883-889.
- [7] Bott SR, Arya M, Kirby RS, *et al.* $P21^{WAF1/CIP1}$ gene is inactivated in metastatic prostatic cancer cell lines by promoter methylation [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005, 8(4): 321-326.
- [8] Allan LA, Duhig T, Read M, *et al.* The p21(WAF1/CIP1) promoter is methylated in Rat-1 cells: stable restoration of p53-dependent p21(WAF1/CIP1) expression after transfection of a genomic clone containing the p21(WAF1/CIP1) gene[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(4): 1291-1298.
- [9] 施贻君, 刘敬忠. 从微量全血直接进行反转录-聚合酶链反应 [J]. 科学通报, 1993, 38(2): 159-161.

[收稿日期] 2007 - 12 - 31

[修回日期] 2008 - 02 - 22

[本文编辑] 郁晓路

· 简 讯 ·

第四届全国消化系统中晚期恶性肿瘤治疗学术会议第一轮通知

由中国医促会胃病专业委员会主办,上海市市北医院、上海市中西医结合学会、上海市医学会肿瘤靶分子学会联合承办,上海交通大学附属瑞金医院、同济大学附属上海市第十人民医院以及上海市闸北医学会协办的第四届全国消化系统中晚期恶性肿瘤治疗学术会议定于 2008 年 10 月 22 日至 26 日在上海召开。

本届大会将以特邀报告、专题讲座、大会交流、壁报、卫星会议等形式进行。与会代表将围绕消化系统肿瘤的基础研究、诊断、治疗(手术、化疗、放疗、生物治疗及靶向治疗)等热点问题进行广泛深入研讨。大会交流的论文将编辑出版《第四届全国消化系统中晚期恶性肿瘤治疗学术会议交流年会论文集》,并择优在中国抗癌协会系列杂志《世界肿瘤杂志》发表。

征文范围:

1. 消化系统肿瘤的病理学、分子生物学、免疫学等基础研究论文;
2. 消化系统肿瘤外科治疗、化学治疗、放射治疗、介入治疗、导向治疗、生物治疗、冷冻治疗、激光治疗、微波治疗、中西医结合治疗的新技术、新进展;
3. 消化系统肿瘤的病因、早期诊断、流行病学研究成果;
4. 资料较新、先进性较高有关肿瘤研究的文献综述;
5. 资料完整的特殊情况消化系统肿瘤的病例报告;
6. 消化系统中晚期肿瘤病人的疲乏、疼痛、出血、感染及其他并发症诊治的经验总结;
7. 消化系统中晚期肿瘤病人特殊情况的护理经验论文;
8. 消化系统肿瘤病人的临终关怀研究经验总结;
9. 其他相关研究。

征文要求与撰稿注意事项:

1. 征文的各类稿件必须寄全文,并应附 300 - 500 字以内的摘要。文章请注明作者、单位、科室、省市名、邮编。论著必须有目的、方法、结果、结论,300 - 500 字结构式摘要和关键词(可参照《世界肿瘤杂志》的投稿须知),基础研究和临床研究论著稿应有中英文对照的结构式摘要和关键词。征文应加盖单位公章,或有加盖单位公章的介绍信。
2. 截稿日期:2008 年 8 月 28 日(以邮戳为准)。
3. 会议征文邮寄地址:上海市 070 - 018 号信箱,《世界肿瘤杂志》编辑部收;邮编 200070(请于信封上注明“全国肿瘤会议征文”字样);稿件寄出的同时请发电子版全文。E - mail: shhsbyy@ hotmail. com; shhsbyy@ 163. com。
4. 联系电话:021 - 56482208 - 8016;手机:13122627952;13120614669;传真:021 - 66249123;联系人:董美玲,张菊芳,黄建林。
5. 会务费:680 元/人,交通食宿自理。
6. 学分:与会者可获得国家继续教育学分 I 类学分 6 分或 II 类学分 10 分。

第四届全国消化系统中晚期恶性肿瘤治疗学术会议交流年会组委会