

人胃癌细胞一种高表达基因的克隆及序列测定

赵锦荣* 阎小君 韩锋产 崔大祥 侯瑜 严泉剑 苏成芝

(第四军医大学基因诊断研究所, 西安 710032)

摘要 采用 DDRT-PCR 法, 以人胃上皮细胞 GES-1 为对照, 从人胃癌细胞 SGC-7901 中克隆高表达基因, 并对所克隆的基因进行斑点杂交分析, 序列测定, 序列相似性分析及开放读框分析. 斑点杂交分析结果表明所获克隆 YA61 为人胃癌细胞 SGC-7901 中高表达基因. 序列相似性分析结果表明该基因序列为一新基因序列. GenBank 收录号为 AF220415. 开放读框分析结果表明该基因序列有一完全开放读框.

关键词 胃上皮细胞, 胃癌, 差异表达基因

学科分类号 R734.2

和绝大多数肿瘤一样, 胃癌也是由多基因参与的一种渐进积累转化性疾病. 通过系统比较正常上皮细胞或癌前病变细胞和异常肿瘤细胞之间的基因表达指纹, 将有助于揭示这一过程. 在本实验中, 我们运用 DDRT-PCR (differential display reverse transcription polymerase chain reaction) 技术将人胃上皮细胞 GES-1 和人胃癌细胞 SGC-7901 的各自基因表达指纹作了系统的比较.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源: 人胃上皮细胞 GES-1 系由北京肿瘤防治研究所建立, 该细胞系为正常胃上皮经病毒转化后获得的永生性细胞系, 其生长和传代具严格的生长因子依赖性^[1]. 人胃癌细胞 SGC-7901 系为本所保存, 其生长为完全自主性生长.

1.1.2 菌种和质粒: JM109 为本所保存. pGEM -T 载体购自 Promega 公司.

1.1.3 试剂: 无 RNase 的 DNA 酶 I、Sal I 和 Sph I 购自 TaKaLa 公司. SUPERSCRIPTM II RNase H- 反转录酶购自 GBICO 公司. 引物由上海生物工程公司合成. α -[³²P] dATP 购自北京亚辉生物工程公司. DNA 凝胶回收试剂盒购自 CLONTECH 公司.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及其纯度和完整性鉴定: 总 RNA 提取按 Chomczynski 等^[2] 的方法进行. 将所提 RNA 用无 RNase 的 DNA 酶处理后在含甲醛的凝胶上电泳鉴定其完整性. 在核酸和蛋白质分析仪

上 (BECKMAN DU 640) 上对所提总 RNA 进行纯度鉴定和定量.

1.2.2 mRNA 差异显示: 按 GenHunter RNAimageTM kit 1 说明书 (GenHunter 公司) 进行. 0.2 μ g 总 RNA 在 SUPERSCRIPTM II RNase H- 反转录酶作用下首先被反转录为 cDNA. 反转录引物共三种, 5' AAGCTTTTTTTTTT (A, G, C) 3'. 在 α -[³²P] dATP 存在条件下, 将 8 种 5' 端随机引物同 3 种 3' 端引物组合对反转录产物进行 PCR 扩增. PCR 产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后放射自显影^[3].

1.2.3 差异片段克隆: 切取含差异片段的凝胶, 煮沸法回收其中的 cDNA 并对其进行重扩增. 重扩增产物用凝胶回收试剂盒回收后克隆入 pGEM -T 载体. 用 Sal I 和 Sph I 双酶切鉴定插入片段的大小.

1.2.4 总 RNA 斑点杂交: 按文献 [4] 所述的方法进行. 将 10 μ g 总 RNA 点于硝酸纤维素膜上, 然后同 α -[³²P] dATP 标记的随机引物延伸 YA61 探针 68 $^{\circ}$ C 过夜杂交. 杂交膜洗涤凉干后用磷屏曝光, 用同位素荧光两用激光扫描仪 (STORM860 Phosphor Screen) 检测杂交信号.

1.2.5 序列测定及序列分析: 序列测定在上海基康生物技术有限公司进行 (ABI PRISMTM). 序列相似性分析工具为 NCBI BLAST 2.0 高级版本. 开放读框分析工具为 NCBI ORF Finder.

* 通讯联系人.

Tel: 029-3374771, E-mail: zhaojrr@yeah.net

收稿日期: 2000-02-22, 接受日期: 2000-03-31

2 结 果

2.1 总 RNA 纯度和完整性

电泳结果表明所提 RNA 较为完整 (图 1). A_{260}/A_{280} 值为 2.1199, 表明所提总 RNA 纯度较高.

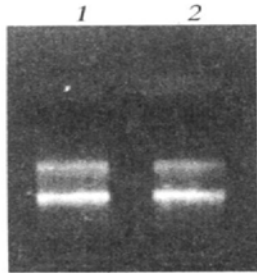


Fig. 1 Electrophoresis pattern of total RNA on 10 g/L agarose gel
1: GES-1 total RNA; 2: SGC-7901 total RNA.

2.2 mRNA 差异显示结果

如图 2 所示, mRNA 差异显示结果清晰, 条带分隔良好.

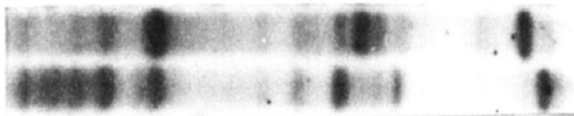


Fig. 2 Partial pattern of mRNA differential display

2.3 差异片段克隆

图 3 为差异带 YA61 重扩增产物及重组克隆酶切产物电泳结果, 重扩增片段大小介于 527 bp 和 622 bp 之间. 从重组 pGEM -T 载体所切下片段其大小接近 622 bp (*Sal* I 和 *Sph* I 间隔约 57 bp, 切下片段应比重扩增产物大 57 bp). 结果显示差异

cDNA 带 YA61 已成功克隆入 pGEM -T 载体.

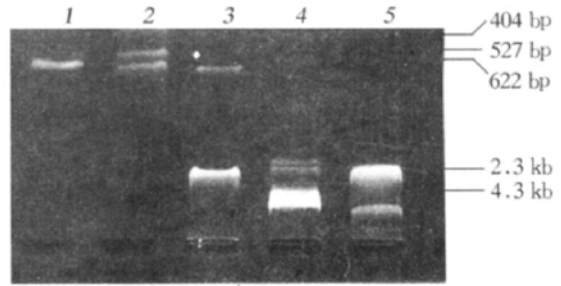


Fig. 3 Electrophoresis pattern of reamplification product and digestion product on 14 g/L agarose gel

1: reamplification product; 2: pBR322/*Msp* I DNA markers; 3: digestion product of recombinant vector; 4: λ DNA/*Hind* III markers; 5: recombinant plasmid.

2.4 总 RNA 斑点杂交分析结果

图 4 为总 RNA 斑点杂交结果. 结果显示 YA61 在正常人胃上皮细胞 GES-1 未见表达.

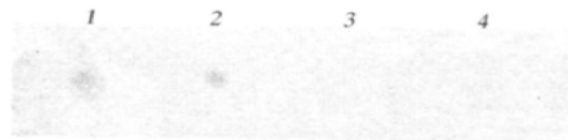


Fig. 4 Dot-blot hybridization

1: positive control; 2: SGC-7901 total RNA; 3: GES-1 total RNA; 4: negative control.

2.5 序列测定及序列分析结果

序列测定结果显示, 5' 端随机引物和 3' 端引物均存在, 长度为 540 bp (图 5). 序列相似性分析结果显示该序列为一新序列, GenBank 收录号为 AF220415. 开放读框分析结果显示该基因序列具有一完全开放读框 (图 6).

```
5' AAGCTTGCACCATTAGTACACTTTTTAGATAAAAAAATTCGGAATTAGCCACGGA
T TTATGACTACAGTTCACGCTTATACAGCTGATCAAAGACTACAAGATTCACCACAC
AAAGATTTAAGAAGAGCTAGAGCTGCTGCTTATAATATTGTTCTTCTTCAACAGGG
CCAGCAAAACCTATTGCTTTAGTTCTTCTTTCATTAAGTGGAAAATTACACCGAATT
GCTATTAGAGTTCAGTTATTACAGGGTCAATTTGTTGACTTATCTGTTGAATTAATA
TCAAATCCAAGCGTTGAAGAAGTAAATGCCGAAATGAAAAGAGTTCAAATGAATCA
TTCCAATACAACGAAGATCAAGTTGTTTCTTTCAGATATTGTTAACAATACACATGGT
TCCATTTTTGATGCAACATTAATAAATTTATAGATGTAATGGAAAAGATTATAC
AAACTCTATGCTTGATATGACAATGAATCTTCAATTTGTTGCTCAATATGTAAGAGTT
GCTTTACACTTTGCAAAAAAAGCTT 3'
```

Fig. 5 Sequence of YA61 clone

```

59  a t g a c t a c a g t t c a e g c t t a t a c a g c t g a t c a a a g a c t a c a a g a t
    M T T V H A Y T A D Q R L Q D
104 t c a c c a c a e a a a g a t t t a a g a a g a g c t a g a g c t g c t g c t t a t a a t
    S P H K D L R R A R A A A Y N
149 a t t g t t c c t t c t t c a a c a g g g g c a g c a a a a g c t a t t g g t t t a g t t
    I V P S S T G A A K A I G L V
194 g t t c c t t c a t t a a c t g g a a a a t t a g a c g g a a t t g c t a t t a g a g t t
    V P S L T G K L D G I A I R V
239 c c a g t t a t t a c a g g g t c a t t t g t t g a c t t a t c t g t t g a a t t a a a a
    P V I T G S F V D L S V E L K
284 t c a a a t c c a a g c g t t g a a g a a g t t a a t g c c g a a a t g a a a a g a g t t
    S N P S V E E V N A E M K R V
329 c a a a a t g a a t c a t t c c a a t a c a a c g a a g a t c a a g t t g t t t c t t c a
    Q N E S F Q Y N E D Q V V S S
374 g a t a t t g t t a a c a a t a c a c a t g g t t c c a t t t t t g a t g c a a c a t t a
    D I C N N T H G S I F D A T L
419 a c t a a a t t t a t a g a t g t a a a t g g a a a a g a t t a t a c a a a c t e t a t
    T K F I D V N G K R L Y K L Y
464 g c t t g a 469
    A *

```

Fig. 6 Analysis of open reading frame

3 讨 论

DDRT-PCR 技术因其具有快速, 多功能, 所需 RNA 量少以及重复性高等优点, 目前已成为近年来应用较为广泛的克隆差异表达基因的方法之一. 理论上, DDRT-PCR 技术比较简单, 但实施起来却存在着一些问题, 如凝胶带的误切, 所获 cDNA 较短 (约 300 bp) 等. 从凝胶上切割 DNA 带时, 凝胶同 X 光片是否对齐, 决定着切割的精确性与否. 现今采用的对齐技术, 可分为将 X 光片上凝胶的轮廓同凝胶对齐, 穿过凝胶和胶片打孔, 将荧光染料或放射性染料点于凝胶上和实验泳道的左侧和右侧泳道上加上放射性混合物等多种^[5]. 同上述方法相比, 我们在实验中所建立的方法则比较简便且可靠. 该方法的基本过程是, 电泳完毕后, 将凝胶同 X 光片对齐, 用剪刀连续剪出不规则的锯齿形状后压片, 在切割 DNA 带时, 只需将凝胶同 X 光片的不规则锯齿对齐既可. 切割完毕后的放射自显影结果显示, 切割较为准确. 针对所获 cDNA 较短问题, 我们采用延长电泳时间的方

式, 在一定程度上缓解了这一问题. DDRT-PCR 技术常用电泳时间通常为 3.5 h (60 W, 1 700 V), 我们则在二甲苯青移至底部后 (约需 5 h), 继续电泳 2 h. 如此获得差异带多在 300 bp 以上, 有的甚至超过 600 bp.

参 考 文 献

- 1 柯 杨, 宁 涛, 王 冰, 等. 人胃粘膜上皮细胞系 GES-1 的建立及其生物学特性. 中华肿瘤杂志, 1994, **16** (1): 7~ 10
Ke Y, Ning T, Wang B, *et al.* Chinese Journal of Oncology, 1994, **16** (1): 7~ 10
- 2 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, **162** (1): 156~ 159
- 3 Liang P, Zhu W, Zhang X, *et al.* Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. Nucleic Acids Res, 1994, **22** (25): 5763~ 5764
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 7.52~ 7.53
- 5 Kim A, Roffler-Tarlov S, Lin C S. New technique for precise alignment of an RNA differential display gel with its film image. Biotechniques, 1995, **19** (3): 346

Overexpressed Gene YA61 Cloned from Human Gastric Carcinoma Cell SGC-7901 and Its Sequencing

ZHAO Jir-Rong, YAN Xiao-Jun, HAN Feng-Chan, CUI Da-Xiang,
HOU Yu, YAN Quan-Jian, SU Cheng-Zhi

(Institute of Genetic Diagnosis, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract To clone overexpressed gene from human gastric carcinoma cell SGC-7901, DDRT-PCR technique is used with human gastric epithelial cell GES-1 as control. After cloned into pGEM -T vector, YA61, one of the overexpressed genes, was analyzed by dot blot and was sequenced then. The sequence gotten was then compared to GenBank data and analyzed by NCBI ORF Finder. Dot blot results showed that the gene YA61 was overexpressed in human gastric carcinoma cell SGC-7901. NCBI's sequence similarity search indicated that the gene YA61 was a new gene sequence. Open reading frame analysis demonstrated that the gene YA61 had one complete open reading frame. In conclusion, the gene YA61 was a new gene sequence that was overexpressed in human gastric carcinoma cell SGC-7901.

Key words gastric epithelial cell, gastric carcinoma, differentially expressed gene

** Corresponding author. Tel: 86-29-3374771, E-mail: zhaojrr@yeah.net

Received: February 22, 2000 Accepted: March 31, 2000

“网络时代的生命科学研讨会”即将召开

二十一世纪将是信息技术 (IT) 和生物技术 (BT) 高速发展与互相促进的时代, 信息经济与生物经济时代就要到来! 世纪之初, 中国遗传学会《遗传》杂志 (<http://www.ycjournal.com>) 与宝芝林商务网 (<http://www.biogene.com.cn>)、中国生物软件网 (<http://www.biologysoft.com>) 将联合举办“第一届网络时代的生命科学研讨会”, 为国内外 IT、BT 企业和专家学者提供沟通、交流与合作的机会, 以互联网为平台, 联合推广新产品、新技术、新成果, 加速实现产业化。协办单位有《科学新闻》周刊、北京华大基因中心、赢家在线网络科技有限公司、健康 123 网、《生物工程进展》杂志社等。已报名参会作报告的院士、博导有数十人。详细信息请浏览上述网站。

大会名誉主席: 中国科协副主席李振声院士, 中国科学院遗传所副所长朱 祯教授。大会执行主席: 李绍武; 大会秘书长: 王 佩。

一、会议主题与研讨内容

1. 生物技术、生物信息学、生物芯片、基因组学、转基因与克隆技术新进展; 2. 基因诊断与基因治疗; 3. 生物产业新成果、新技术与风险投资; 4. 基于生物、医药领域的优秀互联网公司新赢利模式; 5. 药厂、医疗机构、媒体、生物企业网站开发及 ASP 模式; 6. 生物技术专业人才培养与生物企业人才需求。

二、展览与参观内容

1. 生物技术新成果、新品种、新药的转让与推广洽谈; 2. 实验室新装备及医疗器械展销; 3. 网站/主页建设的咨询与承接服务; 4. 电脑与生物、医药、农学类新书展销; 5. 人才招聘与人才交流; 6. 参观中科院遗传所人类基因组中心暨北京华大基因中心; 7. 参观北京锦绣大地农业股份有限公司。

三、日期与地点

本次会议将于 2001 年 4 月 8-11 日在北京劳动大厦举行, 地址: 德胜门外北沙滩。乘 328、315、355、345、602、809、919 等公共汽车均可到达, 交通便利。欢迎海内外企业家与专家学者参加会议。4 月 8 日报到, 4 月 9 日上午开幕。

四、收费标准

每位参会代表会议注册费 400 元 (含餐费), 住宿者 (三星级酒店) 标准间每日每床 90 余元。凡参会代表赠阅 2001 年 1~6 期《遗传》杂志及大会专刊《科学新闻》周刊, 免费参加会议参观。参会通知函索即寄, 请汇款预交注册费。

咨询电话: 010-68161382; 传真: 010-68161380

联系人: 王 佩; 电子信箱: business@biogene.com.cn 或与《遗传》编辑部联系:

传 真: 010-64889348; 电 话: 010-64889354