

研究报告

mRNA 差异展示研究胃癌差异表达基因*

崔大祥 闫小君 王 枫 赵锦荣 苏成芝

(第四军医大学全军基因诊断技术研究所, 西安 710033)

摘要 以胃癌细胞株 GC7901 与胃粘膜细胞株 GES-1 为对比材料, 利用 mRNA 差异展示技术, 研究胃粘膜至胃癌过程的差异表达基因, 为建立胃癌预警系统打下基础. 获得 8 个未知的与胃癌相关的 cDNA, 命名为 GCYS-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 20, 完成其克隆及序列分析, RNA 印迹证实 GCYS-1 至 7 片段与 GCYS-20 基因在 GC7901 细胞株中呈高表达, 在 GES-1 细胞株中呈低表达. 此 8 个序列在 GenBank 数据库中登录, 接受号为 AF054162~AF056168 及 AF219140.

关键词 胃癌, 细胞株, mRNA 差异展示, 基因克隆, 核苷酸序列分析

学科分类号 R735.2

胃癌是由多种基因参与、多阶段多途径协同作用, 使得胃粘膜逐步发展到癌前变再发展到胃癌的这样一个演变过程. 正常胃粘膜到癌前变过程及癌前变至胃癌过程, 皆存在特征性的差异表达基因, 只要找出这些基因并阐明这些基因表达水平的变化与胃癌发生发展不同阶段的相互关系及其规律, 就有可能建立胃癌早期预警系统, 解决胃癌早期诊断难题. 本研究运用 mRNA 差异展示技术研究胃癌细胞株 GC7901 与胃粘膜细胞株 GES-1 之间的差异表达基因, 为深入研究胃癌预警系统奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株: 胃癌 GC7901 细胞株由第四军医大学动物实验中心提供, 胃粘膜 GES-1 细胞株购自北京市肿瘤防治研究所.

1.1.2 mRNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒及测序试剂盒皆购自 Promega 公司, 丙烯酰胺、双丙烯酰胺、尿素、Tris、EDTA 皆购自华美公司.

1.1.3 α - 32 P dATP、 γ - 32 P dATP皆购自北京福瑞公司, PCR 试剂系本所提供.

1.1.4 差示 PCR 引物采用 GenHunter 公司 1996-04 提供的序列, Venderbilt 大学卜昕博士提供. 5' 端引物为 8 条, 3' 端引物为 3 条, 以下是它们的序列. H-AP₁: 5'-AAGCTTGATTGCC-3', H-AP₂: 5'-AAGCTTCGACTGT-3'; H-AP₃: 5'-AAGCTT-TGCTCAG-3', H-AP₄: 5'-AAGCTTCTCAACG-3';

H-AP₅: 5'-AAGCTTAGTAGGC-3', H-AP₆: 5'-AAGCTTGCACCAT-3'; H-AP₇: 5'-AAGCTTAA-CGAGG-3', H-AP₈: 5'-AAGCTTTTACCGC-3'; H-T₁₁G: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTGG-3'; H-T₁₁A: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTAA-3'; H-T₁₁C: 5'-AAG-CTTTTTTTTTTTTTC-3'.

1.2 方法

1.2.1 常规培养胃癌 GC7901 细胞株, 按文献 [1] 培养胃粘膜 GES-1 细胞株.

1.2.2 采用异硫氰酸胍一步法分离细胞株总 RNA, 用无 RNase 的 DNase 去除其中的 DNA, 紫外扫描定量后稀释成 0.1 g/L, 于 -80℃ 保存.

1.2.3 mRNA 反转录、PCR 扩增、测序胶电泳、差异条带的确认、差异条带的回收及差异条带的二次扩增按文献 [2] 进行.

1.2.4 用纯化试剂盒按说明书纯化 PCR 产物.

1.2.5 采用末端标记法在 PCR 产物末端标记上 γ - 32 P dATP 作探针, 对胃癌及胃粘膜细胞株总 RNA 进行 RNA 印迹^[3].

1.2.6 把 PCR 产物克隆入 T 载体, 同时进行全自动测序.

1.2.7 测序结果进行 GenBank 同源性检索, 确认为新序列后, 递交给 GenBank.

* 陕西省卫生厅重点基金资助项目 (99ZH-002).

Tel: (029) 3374771, E-mail: cuidx@ig.d.edu.cn

收稿日期: 1999-06-28, 修回日期: 1999-11-01

2 结 果

2.1 细胞株 GC7901 与 GES-1 之间 DD-PCR 测序 胶电泳部分结果

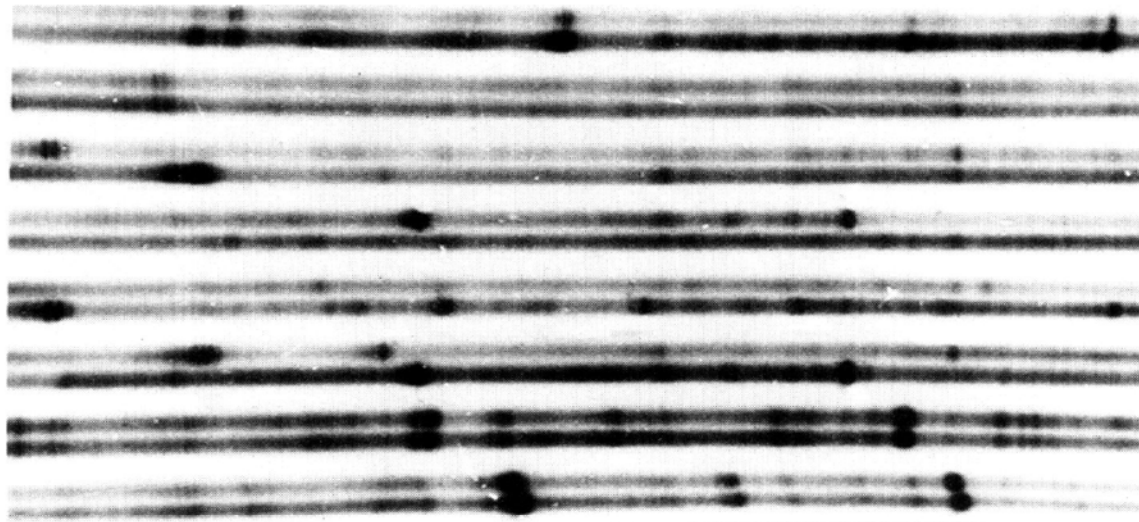


图 1 细胞株 GC7901 与 GES-1 之间部分差异 PCR 结果

从上到下依次为 D-T₁₁G 为锚定引物与 AP₁~ AP₈ 的 PCR 产物。

2.2 RNA 印迹结果

8 个差异片段作探针, 与 GC7901 及 GES-1 总 RNA 进行 RNA 印迹, 证实这些片段在胃癌与胃粘膜细胞株中呈差异表达 (图 2)。

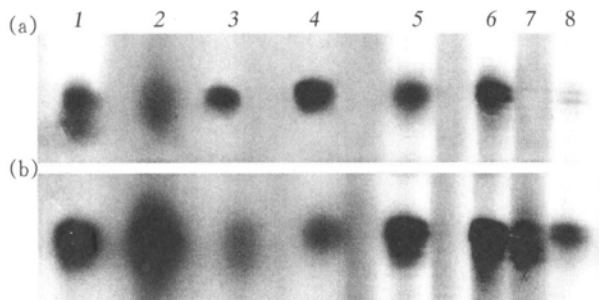


图 2 RNA 印迹结果

1~8 分别为 GCYS-1 至 GCYS-7 和 GCYS-20 片段的杂交结果, (a) 与 GES-1 总 RNA 杂交结果; (b) 与 GC7901 总 RNA 杂交结果。

2.3 差异表达片段的克隆及全自动测序结果

所获 8 个差异表达基因片段全部克隆入 pGEM-T 载体, 转化 JM109 后, 提质粒用 *Hind* III 酶切鉴定, 证实克隆成功。用通用引物进行测序结果如图 3。

3 讨 论

胃癌的发病率在我国居恶性肿瘤之首, 在世界居第二位。临床医学一直强调胃癌的早期诊断与治

从差异条带中分离回收了 8 条有明显表达差别的 cDNA, 二次 PCR 扩增皆有特异带, 命名为 GCYS-1~ GCYS-7, GCYS-20。

疗, 以便降低死亡率, 基础医学把胃癌发病机制的研究列为重点并取得一些重大成果, 初步阐明了 100 多种基因与胃癌发生发展有关^[4]; 发现一些致胃癌的物质^[5]; 研制出一批胃癌单抗, 促进了消化医学的发展。但是到目前为止, 胃癌的早期诊断难题还远未解决。如何解决胃癌患者的早期诊断难题呢? 我们认为: 只有建立胃癌的预警系统^[6], 才有可能实现这一目标。现代分子生物学研究表明: 人类基因组由 10 万左右的不同基因组成, 这些基因的选择性表达决定了机体整个生命过程, 基因表达的变化处于控制生物学调节机制的中心位置。基因表达水平的变化是最根本的变化, 也是最敏感的变化, 反映了机体特定阶段的生命特征。正常胃粘膜到癌前变过程及癌前变至胃癌过程, 皆存在特征性的差异表达基因, 只要找出这些基因并阐明这些基因表达水平的变化与胃癌发生发展不同阶段的相互关系及其规律, 才有可能建立胃癌的预警系统, 解决胃癌早期诊断难题。

我们在此思想指导下, 以胃癌 GC7901 与胃粘膜 GES-1 细胞株为研究对象, 运用差异展示技术获取了差异表达基因 8 个, 它们在 GenBank 中同源性序列较少或无, 我们还很难阐明这 8 个基因在胃粘膜至胃癌过程中的作用, 只有获取全基因序列并阐明其结构与功能, 才有可能阐明它们的全部意义。

总之, 本研究获取了 8 个胃癌相关基因片段,

为深入研究其功能奠定了基础.

GCYS-1 片段 (AF054162), AP₂ 与 D-T₁₁G 为引物:

AAGCTTTGCT	CAGCAGATGA	TCCTACAAC	GCGACACTAT	CATGCGCGCT	CGCTACTAGA	TAAGTCACTC	GACAGTGCTA
TATTGACTGA	CGTACGATCG	ACATCGTTGG	ACTATCCAGA	GTCATTGAAG	ATATGTATGG	AGTGATTTCA	TCTGAAGAAT
GACATATCTT	TTATGGATCG	GACACATTGG	TACAGAGACT	ACCGGATACG	ACGACAGACT	GATAATTAGG	AGCCTTCGAT
ACTACTACGA	CGTATCGATA	CCAGTCAGTC	ATCAGGACAA	CGAGCTGCCA	CGTTGGTCGC	TTGCATGTCT	GCCTATGTGT
CTCATCAAGG	CACCGGTACG	GCACCGCAGT	ATCACCGATA	TTGGAGTACA	GGACTTAATC	ACG;	

GCYS-2 片段 (AF054163), AP₂ 与 D-T₁₁G 为引物:

AAGCTTCGAC	TGTGGCCTTC	TCGGCATGTG	GCGGAGTGCT	CCGTGTGTGG	CTACTACTTC	TAGGATCGCT	ACGCTGGTAC
TTGCTAGCAG	CCGCTACTCG	GCCCTAGCTG	CCGAAGCTCT	AGCAGGTCTT	GTCAGTCAGC	TCCGAGTCAG	CTGTTGCATA
TGCTCCAGTC	CATCGGTCAT	GCTTGACTCT	GCTGGCTCTC	TGCAAGTCTG	TCTCTCGATC	AGGATCAGTC	GGCGATCGGT
ATCTTGTTCC	TGCCCAGCCA	TGGATCTCCT	GGCAATACGC	CTCAGCCAAG;			

GCYS-3 片段 (AF054164), AP₃ 与 D-T₁₁G 为引物:

AAGCTTTGCT	CAGAGGAGCA	GATTGTCAGA	CAGTCGTCTATGCTGCACTG	CGGGCTCGCA	GTCAGCATTC	GTGTTGGTTA
TATTGTGTCC	GATTCGTGTT	GGTACGATCA	TGGTGTGTGCT	GTCGCTTGAT	GCATGACTCA	ATCAGTTGAC
AGTAGGTCAG	GCTTTATGGG	CCTAGTATCT	TTATATATCA	GGACACATTG	GTATCGACGG	CTGCTCATCG
CGCTGTACCG	AGTTGG;					TCAAGCTTGT

GCYS-4 片段 (AF054165), AP₆ 与 D-T₁₁G 为引物:

AAGCTTGAC	CATCTGTCTCT	TCGTACTCTG	CTGCTTCTGC	TGCTCTGATC	CCAGCTGTCTG	CAGCCCACGG	ACCTATCCAT
GCTCGTGGG	TCCATCGTCA	GACTGGTCTG	CGCCTAGATG	GTCTCTGATC	TGTGCTTGCA	GTCGCTTGAC	GTCCGACGTC
AGAGTCCGAG	GACGCGTGGG	CAGTCCGACG	CAGTCGTCTG	CGACCTGGAT	CAGGGTCGAT	GTGTCAGCCG	GTCTATCGTC
CTGTTCACTG	GCTAGGGTAC	ATGCGTTGTG	TTCAGGCTGG	TCAGGCTG;			

GCYS-5 片段 (AF054166), AP₇ 与 D-T₁₁G 为引物:

AAGCTTAACG	AGGCAGACTA	GCCGATCATC	AGATAGGTCA	GGATGCCAGA	TGACGTGGTG	CGTCTCGGAT	CCTAGGACTC
GACGCAGTCT	AGCTAGTCTA	GGGTCTAGGT	ATGGCTGGTC	GCGACTGTCT	GGCTGTCCAG	CCAGTGTTC	GATCAGTAGT
GGCTTGCTCG	GCGGGCGCTA	TCTAGCTTCA	GTCAGTATGT	CAGATCTGAT	CCGGTGCCGG	AGGCAG;	

GCYS-6 片段 (AF054167), AP₄ 与 D-T₁₁G 为引物:

AAGCTTCTCA	ACGAGCAAAG	CTGAATCACA	ACTCAACCAG	TCACGGACAA	CCACAGTATC	GTCAGTCGAT	ATTGCTGTAT
CTACGAGCGG	ACTGTGCTCT	TGGTCCAGAT	CTGCCCTTGAT	GTCAGTCGGT	CTTGGATCCT	GGATTAGACC	GGTCCGGATC
CTATGTTTC;							

GCYS-7 片段 (AF054168), AP₈ 与 D-T₁₁G 为引物:

AAGCTTTTAC	CGCGGCCGAC	GCGGGCGGTG	GTGCTGCATG	CAGTGTGAGA	TCCGGTGGAT	TGCTGCTAGC	TTGCTGTCAA
GTGCCAGGGG	TTTGTCTAGG	TCTTGGTCAG	TCTGCTGCC	GGATCTGCCA	CCAGGACGAT	CGATCGAGTC	GATCGATCAG
TGCGCTAGTT	GTGAGGTCTG	CCTCGTGGCT	CATGATCGTC	CTGATCTCCG	ATCTAGGTCC	TGTCTGGACT	GTCTGTCCGA
CTATGTCCGA	CTGTTTGATC	GGATCGATCG	CCATGTCTGTC	GGTGGACCTG	ACAGCCTGAT	CCGGTGCCGG	CGA;

GCYS-20 (AF219140), AP₈ 与 D-T₁₁A 为引物:

CTGATGAATC	CCCTAATGAT	TTTGCTAAAA	ATCATTAAGT	TAAGGTGGAT	ACACATCTTG	TCATATGATC	AAATGGTTTC
GCGAAAAATC	AATAATCAGA	CAACAAGATG	TGCGAACTCG	ATATTTTACA	CGACTCTCTT	TACCAATTCT	GCCCCGAATT
ACACTTAAAA	CGACTCAACA	GCTTAACGTT	GGCTTGCCAC	GCATTACTTG	ACTGTAAAAC	TCTCACTCTT	ACCGAACTTG
GCGGTAACCT	GCCAACCAAA	GCGAGAACAA	AACATAACAT	CAAACGAATC	GACCGATTGT	TAGGTAATCG	TCACCTCCAC
AAAGAGCGAC	TGCTGTATA	CCGTTGGCAT	GCTAGCTTTA	TCTGTTCCGG	CAATACGATG	CCCATTTGAT	TTGTTGACTG
GTCTGATATT	CGTGAGCAAA	AACGACTTAT	GGTATTTTCA	GTTTGTTCGG	AGTACTGGGT	AAAAGATCGG	CCGGGAACCT
CGTATAATGG	CTCATGTGGT	GGAGCCGAGT	ACCAGTCACT	ACGACCGAAA	ATTTACCGGT	ACCATATTAG	GCAATCTTTC
GACCCAACCA	TGAACCAATT	CAGCTCATTC	TCCTTTTCAT	GTTATACGTC	TGAATCCTCG	CCTTTTGAAC	CTTTGGGATA
CTCGTTGAAT	GTAATATACA	GTAATACAGT	GAGTTTCTGC	AATCCGATAT	TCTCCGACTG	GTTTTCGTTA	GGTTATAGTA
CGTTTAAGAT	AACATATTTA	GAGCGAGATT	TCCGGCTTTT	TTATTCGCGA	GCTGTGCCCTG	AGTATCAGTG	GTGGGCAGTG
GATTTTAGAT	GCGTCGACG	CGTTTCCTCG	GTGCTTAAGA	TGCTTGATTG	GATGGACAAC	TTTAAGCTTG	TGGGTTTGTT
GAACAATTAT	AGATATGCTT	CGCTTACGTC	TAACCTCTTT	GGAAGGCTCT	CAACTTTTCA	GGACGGATGC	CTGATCCGCA
TGCGGTATCG	GCTTGCTCGT	CGAGTCTCGC	AAAACATATAG	TACGACGATT	AGCGGGACTA	CGAAGTTGAT	TGTACAACCG
AACGCCCGCA	AGTACGAGTC	TTTGTTCCAA	CCCTGTTCTG	GGAGGTCCGA	TTGTGTCACT	CTTTAGCTTT	GCATGAGAGT
TGTCAAGCGA	ATCCGTACCT	TCAAAACGCC	GTAAGACCGA	TGTGTTATTG	TTCCCTTCTG	AATGAGCACC	GACGTTGGGA
TGATCGAGTT	TTAATAAAGT	GTGTACCAAT	GCGAAACCCC	TTTAATACTC	CCCTAGAGAG	TCACGTATCG	AACTCATACC
CAATGGGAAA	AGATTGTGAA	GCCTGTGGAA	AGTTTCAGCT	CCCCGAGTTG	GGGGAAAACC	GCTAAAACCTG	CAGATTAGGA
TTTTTAAAT	AAAGATTGGA	TTATAACTCT	AAAAA	AAAAA			

图3 8个差异表达片段的测序结果

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 崔大祥, 闫小君, 苏成芝. 采用改进的差示 PCR 技术分离胃癌差异表达基因及其临床意义. 第四军医大学学报, 1998, 19 (6): 601~605
Cui D X, Yan X J, Su C Z. J Fourth Milit Med Univ, 1998, 19 (6): 601~605
- 3 崔大祥, 闫小君, 范清宇, 等. 骨骼肌肿瘤中 c-myc 癌基因的改变及其预后意义. 第四军医大学学报, 1997, 18 (4): 310~312
Cui D X, Yan X J, Fan Q Y, et al. J Fourth Milit Med Univ, 1997, 18 (4): 310~312
- 4 Shiao Y H, Palli D, Buzard G S, et al. Implications of p53 mutation spectrum for cancer etiology in gastric cancers of various histologic types from a high-risk area of central Italy. Carcinogenesis, 1998, 19 (12): 2145~2149
- 5 Howe J R, Mitros F A, Summers R W. The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. Ann Surg Oncol, 1998, 5 (8): 751~756
- 6 闫小君. 胃癌早期诊断及预警系统的建立. 世界华人消化杂志, 1999, 7 (2): 96~97
Yan X J. World Chinese Journal of Digestology, 1999, 7 (2): 96~97

Studies on Differentially Expressed Genes of Gastric Cancer by mRNA Differential Display. CUI Da-Xiang, YAN Xiao-Jun, WANG Feng, ZHAO Jir-Rong, SU Cheng-Zhi (Institute of Genetic Diagnosis of the Fourth Military University, Xi'an 710033, China).

Abstract In order to establish warning system of gastric cancer, using cell line GC7901 and GES-1 as targets, 8 cDNAs of differentially expressed genes between them were isolated by mRNA differential display, and then respectively named as GCYS-1 to GCYS-7, GCYS-20, and then were cloned into pGEM-T vector. These cDNA fragments were up-regulated in GC7901 and down-regulated in GES-1 as shown by Northern blot. DNA sequencing demonstrated that all of them were novel. These sequences have been assigned the database accession numbers in GenBank as below: AF054162, AF054163, AF054164, AF054165, AF054166, AF054167, AF054168, AF219140.

Key words gastric cancer, cell line, mRNA differential display, gene cloning, sequencing of DNA

p53 蛋白质 Gly249 和 Ser249 替换型三维结构的分子动力学研究

张 彦

昆明医学院生物学教研室, 昆明 650031
云南大学现代生物学中心, 昆明 650091

石秀凡 刘次全

中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223
云南大学现代生物学中心, 昆明 650091

摘要 利用 p53 蛋白质核心区晶体结构作分子动力学发现, 除了生化方面的稳定性之外, 该区还具有分子力学上的高度稳定性. 在此基础上作的 R249 残基替换分子动力学研究显示, p53 蛋白质核心区 249 位点精氨酸被其他残基替换后能引起 p53 蛋白质核心区 L2、L3 结构域间的密切联系趋于松散, 正常的空间构象发生改变并使整个核心区结构稳定性受到破坏. 这一研究从三维结构变化上, 直观地解释了 R249 残基替换造成的 p53 蛋白质免疫和生化特性改变的结构机制.

关键词 p53 蛋白质, 分子动力学, R249 残基替换

学科分类号 Q612

p53 蛋白质核心区 (core domain) 的结构由两个四股和五股反平行 β 片形成的一个三明治样的片层骨架结构, 一个环-片层-螺旋结构域 (loop-sheet-helix motif, LSH) 和两个大的环状结构

(L2、L3) 组成. 其立体构象主要是由两个反平行的 β 片层构成的基本框架支撑着由非邻接环和 α 螺

Tel: (0871) 5338827, E-mail: yanzhang@yhu.edu.cn

收稿日期: 1999-06-30, 修回日期: 1999-11-11