

哈萨克族食管癌中 *Survivin* 基因启动子区 CpG 岛真核表达载体的构建

刘 玲, 张景萍, 李 卉, 陈 艳, 赵学信, 李惠武

新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011

摘要 食管癌的形成与多种基因的异常表达有关, 哈萨克族食管癌的发病又有其独特的机制。克隆并研究早期相关基因的启动子区 CpG 岛可为进一步揭示其发病机制奠定基础。本研究构建 *Survivin* 基因启动子区 CpG 岛真核表达载体, 探讨其甲基化在新疆哈萨克族食管癌中的作用。通过 Primer 5.0 设计软件设计引物, 采用常规 PCR 法从新疆哈萨克族食管癌患者的基因组 DNA 中扩增出 *Survivin* 基因启动子区 CpG 岛, CpG 岛与真核表达载体 pCAT3 promoter 经 HindⅢ 单酶切后, 连接试剂盒将二者连接并转导入甲基化酶缺陷的大肠杆菌 *E. coli* ER1793 中扩增。DNA 测序证明获得 *Survivin* 基因启动子区 CpG 岛, 并成功克隆入真核表达载体 pCAT3 promoter 中。

关键词 *Survivin* 基因; 启动子区; 哈萨克族食管癌; 载体构建

中图分类号 R735.1

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)09-0093-03

Construction of *Survivin* Promoter CpG Island of Hazak's Esophageal Cancer in Eukaryotic Expression Vector

LIU Ling, ZHANG Jingping, LI Hui, CHEN Yan, ZHAO Xuexin, LI Huiwu

College of Pre-clinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract There are many kinds of genes' abnormal expressions participating in the form of esophageal cancer. Hazak's esophageal cancer has a special mechanism. Cloning and studying the early related genes' promoter CpG island would provide a basis for revealing the mechanism. The *Survivin* promoter CpG island in Hazak's esophageal cancer in Eukaryotic Expression Vector is constructed in this study for identifying the methylation function of the CpG island on Hazak's esophageal cancer. By Primer 5.0 software, the primer is designed, and the *Survivin* promoter CpG island is cloned with PCR from Hazak's esophageal cancer in genome DNA, after cutting by restrictive endonuclease enzyme HindⅢ, linking the fragment to eukaryotic expression vector pCAT3 promoter and transferring into *E. coli* ER1793. After the DNA sequence, the fragment is successfully linked with pCAT3 promoter eukaryotic expression vector. As a result, the eukaryotic expression vector is constructed, which may help studies of the effects of *Survivin* promoter methylation on Hazak's esophageal cancer.

Keywords *Survivin* gene; promoter; Hazak's esophageal cancer; construction of vector

0 引言

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 中国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家^[1]。食管癌的发病在种族方面有很大差异。中国部分少数民族食管癌死亡情况的比较统计结果表明, 新疆哈萨克族食管癌最为多见, 发病率高达 155.9/10 万, 远高于同地区其他民族的 22.3/10 万; 其病死率比其他少数民族地区高 2~31 倍, 比全国平均病死率高 2.3

倍^[2]。研究民族遗传背景的差异或基因多态性与肿瘤发生发展的关系, 对肿瘤发病机制的阐明和肿瘤的诊断与治疗具有重要意义^[3-4]。

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族的成员^[5], 表达于大多数肿瘤组织和胚胎组织中, 而在正常组织中未见有表达。*Survivin* 主要表达于细胞周期的 G2/M 期, 具有抑制凋亡、调控细胞周期的作用, 并与血管形成、肿瘤的浸润、转移、耐药和放疗抗

收稿日期: 2010-01-05

基金项目: 新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划项目(200810103)

作者简介: 刘玲, 博士研究生, 研究方向为哈萨克族食管癌发病机制, 电子信箱: liulingpine@sohu.com; 李惠武(通信作者), 教授, 研究方向为哈萨克族食管癌发病机制, 电子信箱: huiwuli1234@163.com

拒等有关^[6-7]。此外,鉴于 *Survivin* 在肿瘤组织高表达而在成人终末分化组织不表达的特征,推测恶性肿瘤细胞 *Survivin* 的重新表达可能与获得异常凋亡能力有关,其有望成为一种广谱的肿瘤诊断、治疗、预后评价的标志物。本研究构建了 *Survivin* 基因启动子区真核表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料

哈萨克族食管癌基因组 DNA 为哈萨克族食管癌新鲜组织(新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科提供)提取。pCAT3 promoter 质粒和大肠杆菌 *E. coli* ER1793 购自 Promega 公司。*Survivin* 启动子区引物经 Genebank 检索为特异性引物(上海生物工程有限公司合成)。

上游引物:5'-ATATAAGCTTCCCCACGGATACAGTTCA-3';
下游引物:5'-ATATAAGCTTCTGGGCAACAAGAGTGA-3'。

感受态试剂盒、ampinycin、固体和液体 LB、PCR 试剂盒等购自上海生物工程有限公司。限制性核酸内切酶 HindIII 和 T4DNA 连接酶购于大连宝生物公司,DNA 纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购于 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Survivin* 基因启动子区的查找

从 Genebank 中查找 *Survivin* 基因的启动子区,利用 CpG 岛序列分析软件 Methprimer 筛选出富含 CpG 岛的序列。利用 Methprimer 软件检测到 *Survivin* 基因整个基因序列上有 5 个 CpG 岛,启动子区有一个 CpG 岛(图 1、图 2),其中数值为基因在染色体上的位置。

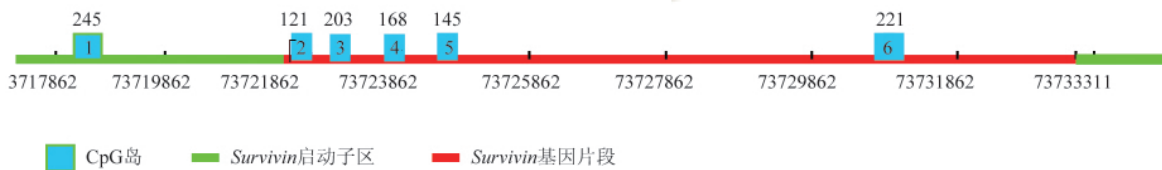


图 1 *Survivin* 基因的 CpG 岛

Fig. 1 *Survivin* gene's CpG islands

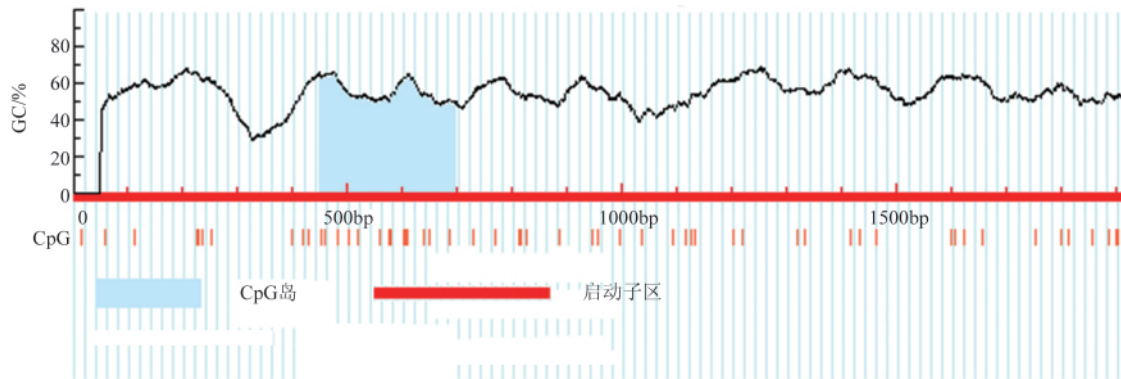


图 2 *Survivin* 基因启动子区 CpG 岛

Fig. 2 *Survivin* gene's CpG island in promoter

1.2.2 引物设计

用 Primer 5.0 软件设计引物时,选取 *Survivin* 基因启动子区第一个 CpG 岛序列作为扩增序列。分别在上、下游引物中引入 HindIII 内切酶的识别位点,另外在两端引物前均加入 4 个保护碱基,以保证在酶切过程中获得最大的切割效率。

1.2.3 *Survivin* 基因启动子区 CpG 岛的扩增

扩增条件:95℃ 5min,95℃ 30s,59℃ 30s,72℃ 30s,35 个循环;72℃ 10min。反应体系如下:2×PCR master 10μL,模板 (DNA)1μL,上游引物 (10μmol/L)1μL,下游引物 (10μmol/L) 1μL,ddH₂O 7μL。

1.2.4 用 HindIII 酶切 pCAT3 promoter 载体和 PCR 扩增产物

1) pCAT3 promoter 载体的酶切。反应条件:37℃,过夜。反应体系:HindIII 1μL,10×K buffer 2μL,Vector (pCAT3 promoter,

200ng/μL)5μL,ddH₂O 12μL。

2) PCR 扩增产物纯化后酶切。使用 DNA 纯化试剂盒将 PCR 扩增产物纯化。酶切反应条件:37℃,过夜。反应体系:HindIII 1μL,10×K buffer 2μL,DNA (250g/μL)7μL,ddH₂O 10μL。

1.2.5 连接试剂盒

连接 *Survivin* 基因启动子区 CpG 岛和 pCAT3 promoter 载体,二者浓度比例为 1:6,16℃ 过夜。反应体系:pCAT3 promoter vector (150ng/μL)1μL,*Survivin* 基因启动子区 CpG 岛 DNA (150ng/μL)6μL,10×T₄DNA Ligase buffer 1μL,T₄DNA Ligase (3U/μL)1μL,ddH₂O 1μL。

1.2.6 重组体转化 *E. coli* ER1793 感受态细菌

① *E. coli* ER1793 细菌感受态的制备;② 转化;③ 液体

培养;④涂布于含氨苄青霉素的LB培养平板上,倒置培养过夜;⑤次日用Tip枪尖挑取LB培养板上的数个白色单克隆菌落(挑取5个克隆菌落,命名为a1,a2,a3,a4,a5)至含有氨苄青霉素的LB液体培养基(10mL),置37℃,230r/min,振荡培养过夜。

1.2.7 质粒提取

用质粒抽提试剂盒抽提质粒(重组体),步骤按说明书操作。提取质粒浓度 $0.37\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $OD_{260/280}=1.76$ 。

1.2.8 HindIII 酶切质粒

37℃,过夜。电泳鉴定。

1.2.9 菌液测序

将菌液送上海生物工程有限公司鉴定目的片段的正确性。

2 结果

2.1 Survivin 基因启动子区 CpG 岛的获得与鉴定

以哈萨克族食管癌组织DNA为模板进行PCR扩增,电泳结果显示1条约为486bp大小的特异性条带(图3)。

2.2 Survivin 基因启动子区 CpG 岛真核表达载体的构建

提取获得的重组质粒,用HindIII酶切后电泳,得到质粒pCAT3 promoter(4219bp)和Survivin基因启动子区CpG岛(476bp)2条带(图4)。

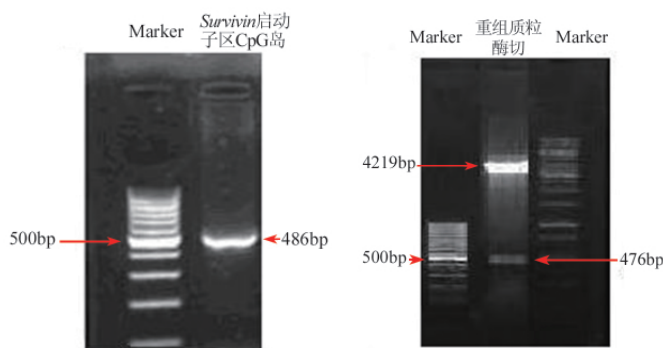


图3 Survivin 启动子区序列
CpG 岛 PRC 电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of
Survivin CpG island in
promoter

图4 重组体酶切电泳图
Fig. 4 Enzyme digesting
electrophoresis of
recombinant

2.3 DNA 测序

经上海生物工程有限公司测序结果表明,重组体中克隆序列与Survivin基因启动子区序列CpG岛序列相同。

3 讨论

食管癌的发生、发展有多个基因分子水平表达异常,是多个基因参与、多种因素共同作用的结果,同时还受癌基因与抑癌基因的调控。寻找并研究癌变早期基因,逐步阐明致癌机制是实现早期诊断行之有效的办法。Survivin 基因是新

疆医科大学基础医学院科研中心食管癌课题组从RNA水平和蛋白水平筛选出的与新疆哈萨克族食管癌多个高度相关的基因之一^[8-9]。研究表明,Survivin 除抑制细胞凋亡和调节细胞周期,与血管形成以及肿瘤的浸润、转移、耐药和放疗抗拒有关外,还由于其在肿瘤细胞中的特异性分布,成为肿瘤诊断、治疗的新靶点^[10]。而该基因在食管癌高发民族哈萨克族病例中的异常表达,可否作为该民族高发的易感因素还值得商榷。因此,构建Survivin 基因启动子区真核表达载体,在此基础上研究该基因启动子区甲基化与非甲基化对该基因表达调控的影响,可为进一步研究哈萨克族食管癌的发生发展提供方向。

4 结论

构建了Survivin 基因启动子区真核表达载体,为进一步探讨Survivin 基因启动子区的甲基化与哈萨克族食管癌发生发展的关系奠定基础。目前对食管癌尚未找到真正意义上的早期诊断方法和分子标志物,更没有有效的预防措施,以外科手术为主的综合治疗效果仍不满意,早期诊断、早期治疗是提高治愈率和降低死亡率最有效的方法。

参考文献 (References)

- [1] 杜百廉. 食管癌[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 34-35.
Du Bailian. Oesophagus cancer[M]. Beijing: Science and Technology Publishing Company of China, 1994: 34-35.
- [2] 张月明. 新疆食管癌分布[J]. 新疆医学院学报, 1998, 11(2): 139-144.
Zhang Yueming. Journal of Xinjiang Medical College, 1998, 11(2): 139-144.
- [3] Munoz N. Epidemiological aspects of oesophageal cancer[J]. Endoscopy, 1993, 25: 609-612.
- [4] Li J Y. Epidemiology of esophageal cancer in China[J]. Natl Cancer Inst Monogr, 1982, 62: 113-200.
- [5] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel antiapoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [6] Carter B Z, Milella M, Altieri D C, et al. Cytokine-regulated expression of Survivin in myeloid leukemia[J]. Blood, 2001, 97(9): 2784-2790.
- [7] Sareia A I, Macadam R C, Farmery S M, et al. Expression of the anti-apoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma[J]. Gut, 2000, 46(5): 645-650.
- [8] 彭辉, 陈艳, 刘涛, 等. Survivin 基因在哈萨克族食管癌中表达的研究[J]. 地方病通报, 2008, 23(4): 4-6.
Peng Hui, Chen Yan, Liu Tao, et al. Endemic Diseases Bulletin, 2008, 23(4): 4-6.
- [9] 刘佑斌, 张丽萍, 陈艳, 等. 新疆哈萨克族食管癌中 Survivin 基因真核表达载体的构建[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(5): 555-557.
Liu Youbin, Zhang Liping, Chen Yan, et al. Journal of Xinjiang Medical University, 2009, 32(5): 555-557.
- [10] Adida C, Crotty P L, McGrath J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene Survivin in human and mouse differentiation[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 43-49.

(责任编辑 李慧政)