

人胰腺癌 Hedgehog 信号转导途径中 PTCH 基因表达载体的构建

Construction of PTCH gene vector in Hedgehog signal pathway of human pancreatic cancer

邵建国,李兆申*,屠振兴,高 军,龚燕芳,许爱芳,满晓华,金 晶

(第二军医大学长海医院消化内科,上海 200433)

[摘要] 目的:克隆人胰腺癌 Hedgehog 信号通路中 PTCH 基因,构建 PTCH 基因表达载体。方法:从人胰腺癌细胞株 SW₁₉₉₀ 抽提总 RNA,经 RT-PCR 扩增出 PTCH 基因,经纯化、回收目的基因 PTCH,将其插入表达载体 PET22b,转化 *E. coli* BL₂₁,构建重组质粒 PTCH/PET22b。结果:从人胰腺癌细胞株 SW₁₉₉₀ 克隆出 789 bp 的 PTCH 目的片段,成功构建重组质粒 PTCH/PET22b。结论:成功构建重组质粒 PTCH/PET22b,为 PTCH 蛋白表达奠定基础。

[关键词] Hedgehog;PTCH 基因;载体构建;克隆

[中图分类号] R 735.9 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0101-02

Hedgehog 信号转导途径与胰腺胚胎发育密切相关,而在正常胰腺成熟组织中无表达或仅低表达。近年来随着对其研究的不断深入,发现 Hedgehog 信号转导异常可导致胰腺癌的发生。目前已知 PTCH 基因是 Hedgehog 信号转导途径上的一个重要基因,通过表达受体细胞跨膜蛋白,参与并调控 Hedgehog 信号转导^[1,2]。PTCH 蛋白作为跨膜受体,可与所有 HH 家族成员结合,从而在 Hedgehog 信号转导途径中发挥作用。为进一步深入研究 PTCH 基因在 Hedgehog 信号转导途径中的作用,我们拟克隆人胰腺癌 Hedgehog 信号通路中的 PTCH 基因,构建 PTCH 基因表达载体。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL₂₁、PET22b 由本实验室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I, T₄ DNA 连接酶及 DNA 分子质量标准购于 NEB 公司(基因公司代理);TRIzol 购自晶美公司;RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒购自上海宾国医疗科技有限公司;质粒回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.1.3 人胰腺癌细胞株 胰腺癌细胞株 SW₁₉₉₀ 由本实验室传代培养。

1.1.4 引物 根据 GenBank 中 PTCH 全序列自行设计而成。上、下游引物 5'端分别携带 *EcoR* I、*Sal* I 酶切位点,由上海生工生物工程服务有限公司合成。上游引物:GAA TTC GCT TCC CGT GCT TTT GTC TT,下游引物:GTC GAC CTG CAG CTC AAT GAC TTC。

1.2 方法

1.2.1 人胰腺癌细胞株 SW₁₉₉₀ 总 RNA 提取 将本实验室人胰腺癌细胞株 SW₁₉₉₀ 传代培养,TRIzol 一步法提取总 RNA,分光光度法测定 RNA 量。

1.2.2 RT-PCR 扩增 PTCH 基因 取人胰腺癌细胞株 SW₁₉₉₀ 总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒提供的方法扩增 PTCH 基因。反应体系为:10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ l;25 mmol/L

MgCl₂ 10 μ l;10 mmol/L dNTP 5 μ l;40 U/ μ l 核糖核酸酶抑制剂 1 μ l;5 U/ μ l AMV 逆转录酶 1 μ l;5 U/ μ l AMV-Optimized *Taq* DNA 聚合酶 1 μ l;25 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ l;1.8 μ g/ μ l RNA 模板 1 μ l;无核酸酶双蒸水 24 μ l。RT-PCR 反应条件:50 $^{\circ}$ C 40 min,94 $^{\circ}$ C 2 min,然后 94 $^{\circ}$ C 40 s,55 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。按照胶回收试剂盒提供的方法回收目的基因片段。

1.2.3 质粒酶切及回收 将本实验室甘油保存的含 PET22b 的 *E. coli* DH5 α 涂板、挑菌扩增培养,按小剂量质粒抽提试剂盒提供的方法抽提质粒,用 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,鉴定酶切质粒,按照胶回收试剂盒提供的方法回收酶切质粒。

1.2.4 PCR 产物的克隆 15 μ l 连接反应体系为连接缓冲液 2 μ l,PET22b 3 μ l,纯化 PCR 产物 9 μ l,T₄ DNA 连接酶 1 μ l,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,得到连接产物 PET22b/PTCH。取 3 μ l 上述连接反应液电转化感受态 *E. coli* BL₂₁。铺涂布于含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.5 阳性重组克隆的筛选 挑取菌落 4 个,接种于含 5 μ l 0.1 mg/ml 氨苄青霉素的 5 ml LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按试剂盒提供的碱裂解法提取质粒,用 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,鉴定阳性克隆,命名为 PET22b/PTCH。

1.2.6 DNA 序列测定 取含有重组质粒的菌液 1.5 ml,以 M13⁻/T7 为序列分析引物正反两端对 PET22b 中目的基因进行序列分析。序列测定由上海生工生物工程服务有限公司完成。所测序列与 GenBank 中 PTCH 基因序列进行分析比较。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取 总 RNA 抽提产物经 1%琼脂糖凝胶

[作者简介] 邵建国(1965-),男(汉族),博士,副主任医师。

E-mail:20022044@china.com

* Corresponding author.

于 TAE 电泳缓冲液中电泳,紫外透射仪下见 3 条清晰条带,由上到下分别是 28 S、18 S、5 S。分光光度计测定 50 倍稀释的总 RNA $D_{260} = 0.879, D_{280} = 0.410, D_{260} : D_{280} = 2.095$ 。总 RNA 浓度 = $40 \times D_{260} \times \text{稀释倍数} / 1000 = 1.8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

2.2 RT-PCR 扩增人 PTCH 基因 RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,PCR 产物长度与人 PTCH cDNA 片段长度 789 bp 基本一致,初步证实为人 PTCH cDNA(图 1)。

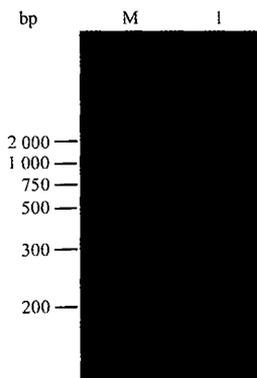


图 1 RT-PCR 产物电泳图
M: Marker; 1: PCR 产物

2.3 PCR 产物的克隆及酶切鉴定 纯化的 PCR 产物在连接液的作用下直接克隆到 PET22b 载体中,挑选 4 个白色克隆,小量提取质粒,分别经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳(图 2),证实其中有 3 个扩增片段插入该菌落载体中,表明克隆成功。

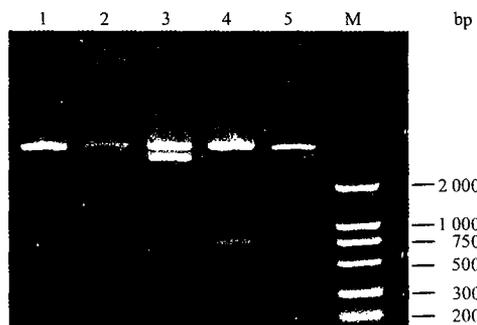


图 2 重组质粒酶切图谱
1、2、4、5: 双酶切质粒,其中 1、4、5 为阳性克隆;
3: 非酶切质粒,设为对照;M: Marker

2.4 人 PTCH cDNA 序列分析 挑选阳性克隆,碱裂解法抽提质粒后,获重组质粒 PET22b/PTCH。经上海生工生物工程服务有限公司序列分析测定,显示插入片段为 789 bp,与 GenBank 中 PTCH 公布的基因序列进行分析比较,证实两者完全一致。

3 讨论

Hedgehog 信号转导途径首先在果蝇中发现,随后在脊椎动物中被证实,并进行了广泛和深入的研究^[1,2]。Hedgehog 信号转导途径由 HH 配体、2 个跨膜蛋白即 PTCH 和

SMO 及下游的转录因子、Gli 蛋白等组成。

一般认为在没有 HH 配体信号刺激下,PTCH 能抑制 SMO 的活性。当 HH 与 PTCH 结合后,解除了 PTCH 对 SMO 的抑制,释放的 SMO 进入胞内,引发细胞内信号下传,激活下游转录因子 Gli 家族,调节多种靶基因的表达^[3,4]。鼠 IHH、PTCH 的突变可导致胰腺发育缺陷^[5,6]。近来,对 Hedgehog 信号转导通路与人胰腺癌之间的关系作了深入的研究。Berman 等^[7]用定量 RT-PCR 的方法对 15 例新鲜的胰腺癌标本检测其 PTCH mRNA 的表达水平,发现在胰腺癌中,PTCH mRNA 的平均水平要高于邻近正常组织的 448 倍。Thayer 等^[8]从 26 株胰腺癌细胞系筛选 Hedgehog 信号成员的表达,这些细胞系来源于人原发或转移性胰腺癌,结果发现所有细胞株均检测到 2 种以上 Hedgehog 信号成员,即 PTCH、SMO 和 Gli3。以上实验研究表明,无论在体内或体外,Hedgehog 信号途径的激活和表达对人胰腺癌的发生和恶性生物学特性的维持极为重要。

PTCH 全长 4 600 bp。按其开放阅读框架,我们自行设计其引物,扩增从 3 511~4 300 位点全长 789 bp 的目的片段。在胰腺癌细胞株 SW1990,经过 RT-PCR 获得该基因片段。在实验过程中,对连接反应体系和酶切体系的条件反复摸索,以保证实验在最佳条件下进行;同时,应用电转化方法替代以往氯化钙转化法使得转化效率大为提高。我们通过分子克隆手段成功构建了 PTCH-PET22b 重组质粒,为将来 PTCH 的蛋白表达和抗体制备打下良好基础。

[参考文献]

- [1] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles[J]. *Genes Dev*, 2001, 15 (23): 3059-3087.
- [2] Ho KS, Scott MP. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2002, 12(1): 57-63.
- [3] Chiang C, Litingtung Y, Lee E. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog function[J]. *Nature*, 1996, 383(6599): 407-413.
- [4] Goodrich LV, Jung D, Higgins KM, et al. Overexpression of ptc1 inhibits induction of Shh target genes and prevents normal patterning in the neural tube[J]. *Dev Biol*, 1999, 211(2): 323-334.
- [5] Gross RE, Chisholm TC. Annular pancreas producing duodenal obstruction[J]. *Ann Surg*, 1991, 37(1): 759-769.
- [6] Hebrok M, Kim SK, Melton DA. Notochord repression of endodermal sonic hedgehog permits pancreas development[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(11): 1705-1713.
- [7] Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Wide spread requirement for hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours[J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 780-782.
- [8] Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis[J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 851-856.

[收稿日期] 2004-07-30

[修回日期] 2004-10-14

[本文编辑] 贾泽军