

鼻咽癌相关新基因 NPCEDRG 突变型重组表达载体的构建及生物信息学分析

阳 帅¹, 胡 华², 赵 强¹, 龚邵新¹, 贺荣芳¹, 张小丽¹, 贺修胜³

(1. 南华大学附属第一医院病理科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学附属第二医院病理科;
3. 南华大学肿瘤研究所)

摘要: 目的 构建带 His 标签的突变型及野生型 pcDNATM3.1/myc-HisB/NPCEDRG 重组表达载体。方法 以 pcDNA3.1-NPCEDRG 重组质粒为模板, 采用聚合酶链式反应(PCR)技术扩增 NPCEDRG 基因编码区, 利用 PCR 过程中的碱基错配, 随机突变产生 NPCEDRG 的突变体, 分别将野生型及突变型 NPCEDRG 基因编码区 cDNA 插入 pcDNATM3.1/myc-HisB 真核表达载体, 双酶切鉴定, 测序验证, 生物信息学方法进行蛋白质结构预测。结果 双酶切突变型及野生型 pcDNATM3.1/myc-HisB/NPCEDRG 重组表达载体, 均产生 519 bp 长度的目的片段。测序结果证实, 突变型 NPCEDRG 基因有两个点发生了突变, 分别是 T²⁶⁰-C²⁶⁰ 和 T²⁸⁷-C²⁸⁷, 但没有移码突变, 在线生物信息学分析结果显示其相应氨基酸序列改变为 V⁷³-A⁷³ 和 M⁸²-T⁸²; 野生型 NPCEDRG 基因序列与 Genebank 已知序列一致。两个重组载体插入片段大小均为 513 bp, 插入方向及位置正确, 能表达预期所要的融合蛋白。结论 成功构建了带 His 标签的突变型及野生型 pcDNATM3.1/myc-HisB/NPCEDRG 重组表达载体, 为深入研究 NPCEDRG 基因功能和揭示鼻咽癌发病分子机制提供实验手段。

关键词: NPCEDRG; 聚合酶链式反应; 随机突变

中图分类号: R739.6 文献标识码: A

Construction of Eukaryotic Expression Recombinant of Mutational NPCEDRG and Its Bioinformatics Analysis

YANG Shuai, HU Hua, ZHAO Qiang, et al

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To construct two eukaryotic expression vectors of mutational and wild NPCEDRG by Random Mutation. **Methods** The ORF of NPCEDRG gene was amplified from the recombinant plasmid of pcDNA3.1-NPCEDRG by polymerase chain reaction (PCR), and mutational NPCEDRG was procured by Random Mutation. The ORFs' cDNAs of the wild NPCEDRG gene and its mutant were recombined respectively into the pcDNATM3.1/myc-HisB vector with two tags of myc and 6 × His following the target genes. Then the products were transferred into E. coli DH5 α , and the positive clones were screened after being identified with restrictive enzymes and sequence analysis. **Results** The 519 bp target segments of mutational and wild NPCEDRG were obtained successfully in digestion products. The DNA sequence of wild NPCEDRG was consistent with the cDNA sequence of NPCEDRG from GeneBank. And the sequence of the mutational NPCEDRG revealed two altered codons, T²⁶⁰-C²⁶⁰ and T²⁸⁷-C²⁸⁷, which resulted in amino acid exchanges V⁷³-A⁷³ and M⁸²-T⁸². **Conclusion** Two recombinant expression vectors of mutational or wild NPCEDRG gene were constructed successfully.

Key words: NPCEDRG; polymerase chain reaction (PCR); random mutation

收稿日期: 2013-05-15

基金项目: 国家自然科学基金课题(81172575)资助。

作者简介: 阳帅, 硕士, 主治医师, 研究方向: 鼻咽癌易感分子机制, E-mail: 641447803@qq.com. 通讯作者贺修胜, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 恶性肿瘤发病的易感分子机制, E-mail: hexiusheng118@yahoo.com.cn.

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)的分布具有明显的种族性和地区性^[1],全球范围以黄种人发病率最高,尤其是在中国南方和国外的中国南方移民及后裔中发病率极高,提示 NPC 是一个多基因影响的遗传性肿瘤^[2]。鼻咽癌表达下调基因(nasopharyngeal carcinoma express down related gene, NPCEDRG, GenBank 登陆号为 AF538150)是新近克隆的一个鼻咽癌相关新基因,定位于 3p21.3,该点存在于湖南家族性鼻咽癌的遗传易感区 3p21.31 ~ 21.2 区域内^[3-4]。前期研究显示, NPCEDRG 基因为一个鼻咽癌候选抑瘤基因,至少存在 7 个转录起始位点,产生 7 种 mRNA 剪接变异体,但其关键功能位点还不清楚^[5-9]。本研究在前期研究的基础上,利用 PCR 错配随机突变方法,构建带 His 标签的突变型及野生型 pcDNATM3.1/myc-HisB/NPCEDRG 重组表达载体,并结合生物信息学分析,初步筛选出可能具有生物学意义的突变体,为深入研究 NPCEDRG 基因的抑瘤功能及其功能位点分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细菌、质粒及主要试剂

大肠杆菌 DH5 α 菌株为本室保存。含 NPCEDRG 基因编码区的 pcDNA3.1-NPCEDRG 重组质粒由中南大学肿瘤研究所构建; pcDNATM3.1/myc-HisB 载体购自 Invitrogen 公司。胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司, TaqDNA 聚合酶、dNTP 购自上海生工, BamH I、Hind III 内切酶购自华美生物工程有限公司, T4DNA 连接酶购自 Promega 公司, 胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司, 质粒小量抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司, 其他试剂为进口或国产分析纯。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 引物设计

在 Genbank 中检索 NPCEDRG 基因 cDNA 序列(登陆号为 AF538150), 根据其编码序列(位于 cDNA 全长的 43 ~ 552 bp), 应用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 在上游引物 5' 端添加 Hind III 酶切位点和 Kozak 序列, 并包含 ATG 起始密码子序列, 下游引物 5' 端添加 BamH I 酶切位点, 但不包括 TAA 终止密码子序列, 并在酶切位点外侧添加数个碱基以保证内切酶的切割效率。设计的引物序列如下: 上游引物: 5'-GGAAGCTTGCCACCATGTCCCGCTTTT-3', 下游引物: 5'-CCAGGATCCCCTAGGGTGAGGGCTTAC-3',

扩增片段长度为 531 bp。

1.3 PCR 扩增目的基因片段

以 pcDNA3.1-NPCEDRG 重组载体为模板, 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 扩增 NPCEDRG 基因编码区。反应体系: 在 100 μ L 总反应体系中加 10 \times 缓冲液 10 μ L, 模板 DNA 1 ng, 25 mmol/L MgCl₂ 6 μ L, 20 mmol/L dNTP 混合液 4 μ L, 20 μ mol/L 上、下游引物各 4 μ L, Taq DNA 聚合酶 5 u, 灭菌去离子水补足至 100 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 进行下述循环: 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测扩增片段大小。

1.4 质粒和 PCR 产物酶切、连接

将 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 切下 530 bp 目的条带, 回收、纯化。BamHI 和 HindIII 双酶切 PCR 产物, 纯化试剂盒纯化、回收。BamHI 和 Hind III 双酶切 pcDNATM3.1/myc-HisB 质粒, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收, 纯化。所有步骤均按试剂说明书进行操作。将酶切后的 pcDNATM3.1/myc-HisB 质粒及 PCR 产物按摩尔比 1:3 连接, 连接条件为 15 $^{\circ}$ C, 水浴 16 h。

1.5 重组质粒转化及筛选

取 10 μ L 过夜连接产物转化 200 μ L 感受态细菌, 在氨苄青霉素抗性平板上筛选重组载体, 随机挑取数个单克隆进行 PCR 鉴定, 以空 pcDNATM3.1/myc-HisB 质粒作为阴性对照。挑选多个阳性细菌克隆扩增并抽提质粒。

1.6 重组质粒的酶切和测序鉴定

对候选阳性克隆质粒进一步用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 做双酶切鉴定, 以空 pcDNATM3.1/myc-HisB 质粒作为阴性对照, 阳性克隆送上海生工测序验证。将测序结果与 Genbank 序列比对, 获得野生型和突变型 NPCEDRG 重组表达载体。

1.7 在线生物信息学分析

DNA 序列比对参照 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>; 蛋白质二级结构预测参照 <http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>; 蛋白质三级结构预测参照 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/html/index.html>。

2 结 果

2.1 重组质粒酶切鉴定结果

随机选取 1、2 号细菌克隆扩大培养, 小量抽提

质粒。将空 pcDNATM3.1/myc-HisB 质粒和 pcDNATM3.1/myc-HisB/NPCEDRG 重组质粒 1、2 号分别用限制性内切酶 Hind III 和 BamH I 做双酶切,重组质粒 1、2 号均成功切出约 5.5 kb 的载体片段和 519 bp 的目的片段,而空 pcDNATM3.1/myc-HisB 质粒只切出约 5.5 kb 的线性载体片段(图 1)。

2.2 重组质粒测序鉴定结果

将 pcDNATM3.1/myc-HisB/NPCEDRG 重组质粒 1、2 号克隆菌测序,结果发现 1 号重组质粒有两个点发生了突变,分别是 T²⁶⁰-C²⁶⁰和 T²⁸⁷-C²⁸⁷,但没有移码突变;2 号重组质粒经测序结果证实,将测序所得序列与 Genebank 中 NPCEDRG 基因 cDNA 序列进行比对,结果完全相符,无移码、缺失和突变。两个重组质粒插入片段大小均为 513 bp,包括起始密码子 ATG 及其之前添加的 Kozak 序列,不含终止密码子 TAA,

插入方向及位置正确,能表达预期所要的融合蛋白(图 2)。将 1、2 号重组质粒分别命名为突变型及野生型 pcDNATM3.1/myc-HisB/NPCEDRG 重组质粒(分别以 MUTANT 和 NPCEDRG 表示)。

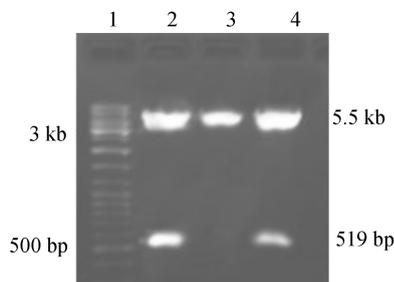


图 1 pcDNATM3.1/myc-HisB/NPCEDRG 重组质粒双酶切鉴定 1:DNA ladder;2:1 号重组质粒;3:空 pcDNATM3.1/myc-HisB 质粒;4:2 号重组质粒

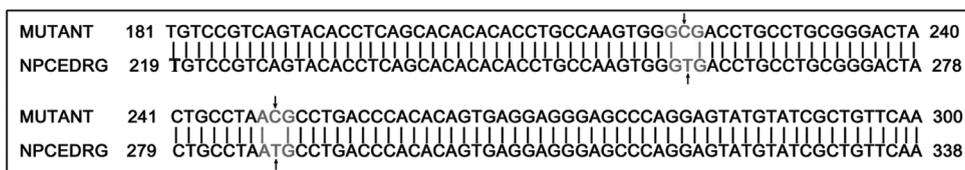


图 2 突变型 NPCEDRG 与野生型 NPCEDRG DNA 序列比对 ↑ ↓ 显示突变位点

2.3 野生型及突变型 NPCEDRG 蛋白质结构预测

NPCEDRG 基因 DNA 序列的两个碱基突变,导致其相应氨基酸序列发生改变: Val⁷³-Ala⁷³, Met⁸²-Thr⁸²(图 3)。

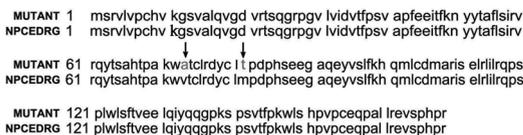


图 3 野生型及突变型 NPCEDRG 氨基酸序列比对 ↓ 显示突变位点

经蛋白质二级结构预测分析发现,Val⁷³-Ala⁷³突变导致其二级结构中的 β-折叠转变为 α-螺旋结构(图 4)。三级结构预测结果显示,与野生型 NPCEDRG 相比较,突变后的 NPCEDRG 蛋白质结构发生改变,突变处两个 α-螺旋由紧密变得松散(图 5)。

3 讨 论

NPCEDRG 基因定位于染色体 3p21.3,该区域

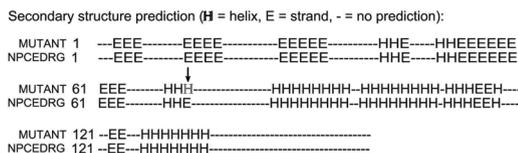


图 4 野生型及突变型 NPCEDRG 二级结构比较 ↓ 显示突变位点

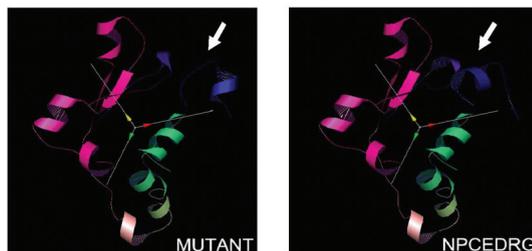


图 5 野生型及突变型 NPCEDRG 三级结构预测比较 ↙ 显示突变型蛋白质结构改变

已被定为是湖南鼻咽癌遗传易感区,并已发现多个与鼻咽癌及其他肿瘤相关的肿瘤抑制基因^[4,10-13]。本课题组前期研究也表明,NPCEDRG 基因在鼻咽癌中存在明显的表达下调,且该基因具有抑制鼻咽

癌细胞生长的作用,并初步将其定位为 II 类肿瘤抑制基因。为探明其具体作用机制及功能位点,本实验构建了一个包含 V⁷³-A⁷³ 和 M⁸²-T⁸² 两个点突变的 NPCEDRG 突变体,经蛋白质结构预测分析发现,突变后的 NPCEDRG 蛋白质其二、三级结构均发生改变,其中一个 β -折叠转变为 α -螺旋结构,突变处两个 α -螺旋由紧密变得松散。蛋白质是生物体各种功能的执行者,同时也是生物体结构的构建者,蛋白质只有正确折叠并形成相应的高级结构,才能正常行使其生物学功能。蛋白质结构是其功能的基础,结构发生改变,可能导致其功能发生改变。例如镰刀型贫血症就是由于血红蛋白的 β -亚基上的第六位氨基酸由谷氨酸变成了缬氨酸,从而导致血红蛋白的结构和功能的改变,其运输氧气的能力大大降低。又如血红蛋白亚基之间存在大量离子键,使其构象呈紧张状态,对氧的亲和力很低,第一个亚基与 O₂ 结合时,离子键的破坏较困难,所需要的能量较多。当血红蛋白的一个亚基结合氧之后引起它的构象从紧张态变成松弛态,其它的离子键也依次破坏,此时破坏离子键所需要的能量也少,构象的变化导致血红蛋白对氧的亲和力大大增强。因此,本研究中所构建的 NPCEDRG 突变体可能由于其蛋白质结构的改变而导致其功能的改变,这对进一步研究该基因的功能位点提供有利的实验手段。

NPCEDRG 基因来源于湖南鼻咽癌遗传易感区,与鼻咽癌的发生发展关系密切,根据李桂源等^[14]提出的鼻咽癌发病易感基因群主导的多阶段性多米诺骨牌效应分子机制假说,推测该基因可能作为易感基因之一参与鼻咽癌发生发展过程中的诸多分子事件。

基因变异是疾病发生的分子基础,包括基因结构变异和基因表达变异两种。在通常情况下,基因结构上的变异包括 DNA 点突变、基因融合、染色体异位、大片断的 DNA 缺失、基因扩增、基因插入和多样性等。而基因表达水平的变化则体现在功能基因表达水平的过高或过低,导致表达产物的生物活性失衡而致疾病^[15]。Knudson 提出的“两次突变”学说认为,抑癌基因的两个等位基因都失活才导致肿瘤的发生^[16]。近年,表观遗传学(epigenetics)研究认为,由于突变导致肿瘤发生的基因仅占有所有基因的 2%,而大量的肿瘤相关基因是以表达激活或受阻的方式在肿瘤发生发展过程中起作用。DNA 甲基化和非编码 RNA 干扰等原因也是抑癌基因失活

的重要原因^[17-21]。NPCEDRG 基因在鼻咽癌中存在表达下调,但其是否还有基因突变存在,其功能失活是否与 DNA 甲基化、非编码 RNA 作用等有关,V⁷³-A⁷³ 和 M⁸²-T⁸² 突变能否导致 NPCEDRG 基因生物学功能发生改变,该基因第 73 和 82 位氨基酸位点是否为其关键功能位点,这些问题仍然有待进一步深入研究和探讨。

参考文献:

- [1] Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2005, 365(9476):2041-2054.
- [2] Lo KW, To KF, Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Cell, 2004, 5(5):423-428.
- [3] Xiong W, Zeng ZY, Xia JH, et al. A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(6):1972-1974.
- [4] 关勇军, 贺修胜, 侯德富, 等. 一个鼻咽癌相关 EST 的鉴定及其全长 cDNA 序列分析[J]. 生命科学研究, 2006, 10(2):173-177.
- [5] 阳帅, 胡华, 邓敏, 等. 鼻咽癌相关新基因 NPCEDRG 表达对 CNE2 细胞生长的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(2):167-174.
- [6] 阳帅, 贺修胜, 蒋俊豪, 等. 鼻咽癌相关新基因 NPCEDRG 真核诱导表达载体的构建及鉴定[J]. 南华大学学报:医学版, 2008, 36(2):162-165.
- [7] Hou DF, Guan YJ, Liu JP, et al. Cloning and characterization of the NPCEDRG gene promoter[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 346(1-2):1-10.
- [8] 侯德富, 关勇军, 关瑞, 等. 人 NPCEDRG 基因启动子的克隆及 CCAAT/NFY 结合位点初步分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(8):713-723.
- [9] 侯德富, 关勇军, 关瑞, 等. 鼻咽癌细胞系 CNE2 中 NPCEDRG 基因 mRNA 剪接变异体分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 27(9):841-850.
- [10] Wong AM, Kong KL, Chen L, et al. Characterization of CACNA2D3 as a putative tumor suppressor gene in the development and progression of nasopharyngeal carcinoma [J]. Int J Cancer, 2013, 133(10):2284-2295.
- [11] 贺修胜, 陈主初, 田芳, 等. 鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定[J]. 癌症, 2003, 22(1):1-5.
- [12] Tommasi S, Dammann R, Jin SG, et al. RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1 [J]. Oncogene, 2002, 21(17):2713-2720.

(上接第 554 页)

- [13] Chen J, Fu L, Zhang LY, et al. Tumor suppressor genes on frequently deleted chromosome 3p in nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin J Cancer, 2012, 31(5):215-222.
- [14] 李桂源, 刘华英, 周鸣, 等. 鼻咽癌癌变的分子机理 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(10):922-931.
- [15] Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics, Chapter 9: Instability of the human genome; mutation and DNA repair [M]. Oxford: Bios Scientific Publishers. 1999.
- [16] Knudson AG, Jr. Mutation and cancer; statistical study of retinoblastoma [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1971, 68(4):820-823.
- [17] Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, et al. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2008, 266(1):6-11.
- [18] Yang HJ. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis [J]. Chin J Cancer, 2013, 32(1):42-48.
- [19] Roy A, Roy CN. Reasons of carcinogenesis indicate a big-bang inside: a hypothesis for the aberration of DNA methylation [J]. Med Hypotheses, 2013, 81(1):50-57.
- [20] Ke Y, Zhao W, Xiong J, et al. Downregulation of miR-16 promotes growth and motility by targeting HDGF in non-small cell lung cancer cells [J]. FEBS Lett, 2013, 587(18):3153-3157.
- [21] Kozinn SI, Harty NJ, DeLong JM, et al. MicroRNA Profile to Predict Gemcitabine Resistance in Bladder Carcinoma Cell Lines [J]. Genes Cancer, 2013, 4(1-2):61-69.

(此文编辑: 蒋湘莲)