

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.006

K-Ras^{G12D} 基因突变体慢病毒载体的构建及其鉴定*赵善民 汤 球 刘志学 余琛琳 孙 伟 蔡丽萍 袁子彦 徐 晨 崔淑芳[△]

(第二军医大学实验动物中心 上海 200433)

摘要 目的: 构建 K-Ras^{G12D} 基因突变体慢病毒载体。**方法:** 从病人组织中提取 RNA 通过 RT-PCR 反转录获得 cDNA 作为 K-Ras^{G12D} 基因模板, 通过 PCR 法扩增出 K-Ras^{G12D} 基因突变体片段。将酶切的片段克隆入真核表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP 中, 构建 K-Ras^{G12D} 基因突变体逆转录病毒真核表达载体。将连接产物转化至感受态大肠埃希菌 DH5 α , 挑取转化平板上的细菌克隆, 在抗生素培养液中培养过夜后进行 PCR 鉴定。经测序正确后转染 293T 细胞系, 利用重组质粒 PCR 及串联基因表达的检测等方法对目的基因的转录与表达进行分析与鉴定。**结果:** 所构建的 K-Ras^{G12D} 突变体基因逆转录病毒真核表达载体经 PCR 鉴定和测序鉴定正确, 转染 293T 细胞后可以观察到可检测到高强度表达的 RFP 荧光信号。**结论:** 成功构建了重组真核表达载体, 为下一步建立稳定转染细胞系及进一步研究 K-Ras 突变在癌症发病中的作用奠定了基础。

关键词: K-Ras; G12D 突变体; 真核表达

中图分类号: Q75, Q78, R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)02-223-03

Construction and Identification of Retrovirus Vector of K-Ras Gene Mutation (G12D)*

ZHAO Shan-min, TANG Qiu, LIU Zhi-xue, YU Chen-lin, SUN Wei, CAI Li-ping, YUAN Zi-yan, XU Chen, CUI Shu-fang[△]

(Laboratory animal centre of Second Military Medical University, Shanghai, 200433 China)

ABSTRACT Objective: The aim is to construct retrovirus vector of K-Ras Gene Mutation (G12D). **Methods:** Total RNA was isolated from the tissues of patients. First-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized by reverse transcriptase using the RNA as template. K-Ras gene mutation (G12D) was amplified by PCR from the cDNA. Then the target genes were identified by enzyme digestion and then cloned into the eukaryotic expression vector pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP, the recombinant plasmid was transfected into 293T cell line after sequencing. PCR was performed to determine the recombinant plasmid and then transient expression of the gene was analysed by immunofluorescence to confirm the tandem gene were expressed. **Results:** The results showed that the recombinant plasmid was constructed successfully. Due to the high fluorescence signals, 293T cells transfected could easily be detected under a standard fluorescence microscope. **Conclusion:** The stable transfected cell lines were constructed successfully, which was useful for construction stable transfected cell lines and laid a foundation for further study of the function of K-Ras gene mutation in cancer development.

Key words: K-Ras; Gene mutation; Eukaryotic expression

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78, R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)02-223-03

引言

恶性肿瘤的形成、发展和转移与癌基因及抑癌基因不可逆的积累突变和失调有密切关系^[1-3]。其中 Ras 基因与肿瘤发生发展的关系引起人们较高的关注。Ras 原癌基因广泛存在于哺乳动物的细胞中, 是 1982 年 Parada 等从人膀胱癌细胞中克隆出的活化的癌基因, 是第一个被鉴定的人类癌基因^[4]。Ras 编码蛋白具有介导细胞因子、生长因子和多种细胞外信号的信息通路的作用, 对细胞的增殖、分化、凋亡等具有重要的调节作用。当 Ras 基因被异常活化后, 可导致下游信号分子的激活, 造成细胞生长失控而无限地增殖, 进而引起肿瘤^[5]。据统计, 30% 左右恶性肿瘤被认为与 Ras 基因突变相关, Ras 功能和信号转导

途径失调在肿瘤的形成过程中起着非常重要的作用^[1-3]。Ras 基因突变中以 K-Ras 基因突变最常见。在几乎所有的胰腺癌和 50% 的大肠癌、甲状腺癌以及 30% 的肺腺癌可见 K-Ras 基因突变^[6]。本研究拟构建 K-Ras^{G12D} 基因突变体真核表达载体, 并转染 293T 细胞系, 采用 PCR 及荧光检测法检测目的基因及蛋白的表达, 以便进一步研究 K-Ras 突变在癌症发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

293T 细胞系由本实验室保存; pCDH 载体购自美国 System Biosciences 公司, RNA 提取使用 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; 限制性内切酶、DNA 连接酶等购自美国 NEB 公司;

* 基金项目: 上海市科技发展基金项目(10140900800)

作者简介: 赵善民, 男, 硕士, 助教, 主要研究方向: 人类疾病的动物模型

[△] 通讯作者: 崔淑芳, 电话: 021-81870262, E-mail: youngstar_sf@163.com

(收稿日期: 2013-05-07 接受日期: 2013-05-24)

PCR reaction mix、普通质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京 Tiangen 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 K-Ras 突变体基因的引物设计 参考 GenBank 发表的 K-Ras 基因序列设计引物, 正向: 5'-CTGGCTAGCATGACT-GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGC AAGAGTGCCTT-3' (划线为 *Nhe*I 酶切位点, 灰白部分为突变位点); K-Ras 反向: 5'-ACAGCGGCCGCTTACATAATTACA-CACCTTGTCTTTGACTTCTTTT-3' (划线为 *Not*I 酶切位点), 由上海生工生物公司合成有限公司合成。

1.2.2 目的基因的扩增 从病人组织中提取总 RNA, 经逆转录获得的 cDNA 作为模板 PCR 克隆 K-Ras 突变体基因, 反应条件为: 93 °C 预变性 2 min, 93 °C 30 s, 65 °C 40 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 扩增 K-Ras 突变体基因。将所有的扩增产物以 1 % 琼脂糖凝胶电泳, 采用 Tiangen 回收试剂盒进行割胶回收。

1.2.3 重组逆转录病毒载体的构建 利用限制性内切酶 *Nhe*I, *Not*I 双酶切 SBI 公司的 pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP 病毒载体。将切胶回收片段克隆至该病毒载体多克隆位点(MCS)中。

1.2.4 重组逆转录病毒载体的 PCR 鉴定 将连接产物转化至感受态大肠埃希菌 DH5 α , 挑取转化平板上的细菌克隆, 在抗生素培养液中培养过夜, 后取 1 μ L 菌液进行 PCR。电泳检测后阳性克隆送上海美吉生物有限公司测序。

1.2.5 转染细胞中重组逆转录病毒载体串联基因表达的检测 按照 1 μ g 质粒使用 2.5 μ L 的 FuGENE HD 试剂进行, 具体为, 取 100 μ L Opti-MEM 培养液于进口 EP 管中, 加入质粒 1 μ g, 混匀后加入 2.5 μ L 的 FuGENE HD 试剂, 轻轻混匀, 室温放置 10 min, 然后向其中加入 2 mL 培养液混匀后置换培养细胞中的培养液, 培养 48 小时后在荧光显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 K-RasG12D 基因突变体的扩增、克隆和构建

利用此引物进行 PCR 扩增, 经过优化 PCR 条件, 获得了如图 1 所示的特异性的扩增目的条带, 条带大小约 587 bp, 与预期相符, 对此条带进行切胶回收, 使用 *Not*I 和 *Nhe*I 进行双

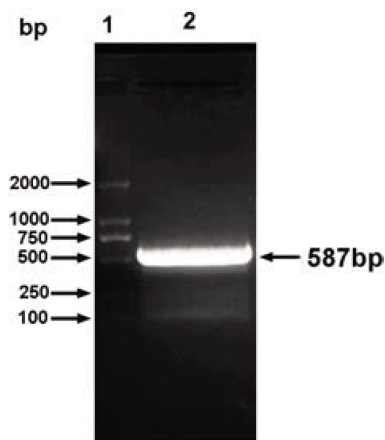


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

1: DL2000 Marker; 2: K-RasG12D 基因突变体扩增片段

Fig. 1 Identification of PCR product

1: DL2000 Marker; 2: Amplification of the fragment of K-RasG12D gene

酶切。

2.2 重组逆转录病毒载体的筛选和鉴定

以此双酶切的载体和 PCR 片段进行切胶回收, 链接, 转化, 涂平板, 挑克隆, 培养, 并进一步使用 PCR 进行鉴定。结果如图 2 所示, 两个组合都有特异性的条带的克隆存在, 因此, 将对应的克隆送上海生工生物公司测序, 测序结果完全正确。

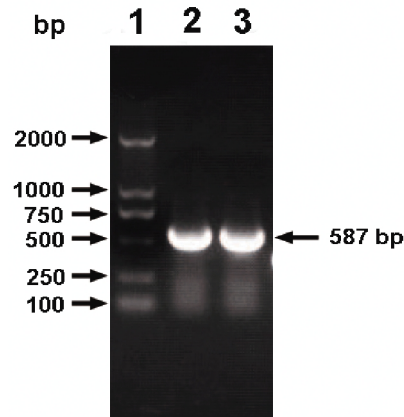


图 2 不同突变体聚落克隆培养后的菌液 PCR 经琼脂糖凝胶

电泳检测结果

1: DL2000 marker; 2, 3: RFP 标签质粒 K-RasG12D 基因突变体扩增片段

Fig. 2 PCR results of culture broth of different mutants

1: DL2000 Marker; 2, 3: Amplification of the fragment of K-RasG12D with RFP label

2.3 重组逆转录病毒载体在细胞中瞬时表达的检测

将构建的逆转录病毒载体转染 293T 细胞后可检测到高强度表达的 RFP 荧光信号(图 3), 表明我们构建的逆转录病毒载体不仅序列上是正确的, 而且能够有效表达目的基因。

3 讨论

与肿瘤相关的 Ras 原癌基因家族主要分为 3 类: N-Ras、H-Ras 和 K-Ras, 分别定位在 1、11 和 12 号染色体上, 编码相对分子质量为 21 kDa 的蛋白, 即 p21 蛋白 (p21ras, p21, Ras 蛋白)^[7,8]。p21 ras 是一类重要的功能蛋白, 介导生长因子、细胞因子和多种细胞外信号的信息通路, 对细胞的增殖、分化、凋亡等多种生理过程发挥重要调节作用。当 Ras 基因被异常活化后 p21ras 蛋白持续地保持活化状态, 激活下游信号分子, 造成细胞生长失控而无限增殖^[2,4]。

目前认为, Ras 基因被异常激活最常见的方式是编码区内的点突变, Ras 基因点突变后能使细胞无休止分裂、增殖, 并能使某些类型的细胞发生恶性转化。此外还有基因扩增、染色体异位与基因重排、基因甲基化改变、基因过量表达等方式也可引发 Ras 基因异常激活。Ras 基因突变率在不同种类的人类肿瘤有明显差异, 例如结肠癌中 Ras 基因突变率为 40-50 %, 肺癌和膀胱癌为 40 %, 最高为胰腺癌达 90 %, 而在胃癌 Ras 基因的突变率仅有 15 % 左右^[9-14]。Ras 基因突变中以 K-Ras 基因突变最常见。在几乎所有的胰腺癌和 50 % 的大肠癌、甲状腺癌以及 30 % 的肺腺癌可见 K-Ras 基因突变。K-Ras 尤其和腺癌相关, 其具体机制目前尚不明确。前人通过对测序数据分析发现 Ras 家族成员在 AML 患者中出现较高比例的突变^[15-17]。慢病毒载体

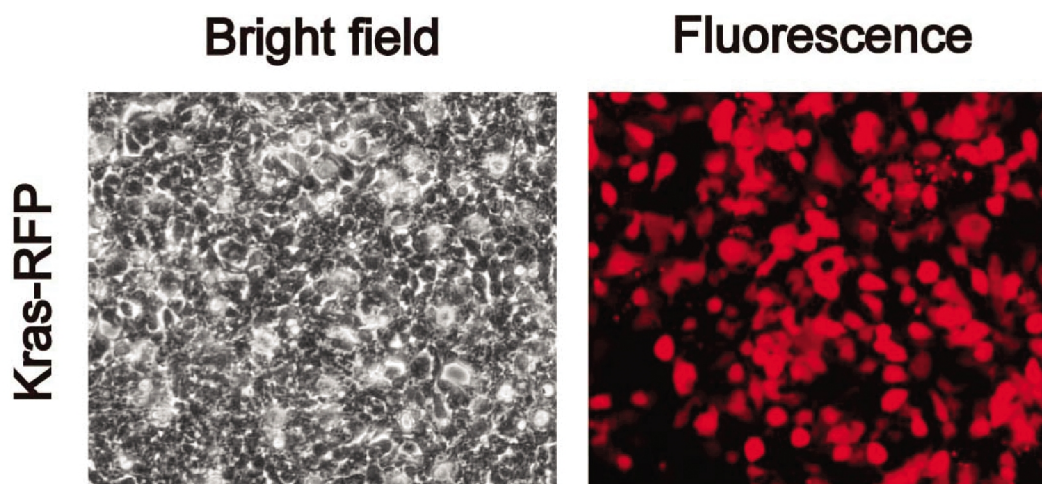


图3 K-Ras 突变体转染细胞荧光检测结果

Fig.3 Fluorescent images of cells transfected with K-Ras mutants

可以将目的基因整合至靶细胞基因组中形成长期稳定表达,引发的免疫反应小,可感染非分裂细胞等优点^[18,19],基于慢病毒载体在实现基因的高效转移和长期稳定表达的同时,又具有较好的生物安全性,因此有望成为理想的基因转移载体^[20,21],本实验中我们选用慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP 作为基因转移载体。

在该研究中,我们将目的基因插入到 pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP 载体多克隆位点(MCS)中,翻译的时候就可以在表达出目的基因(Ras)的同时还可以翻译出指示蛋白 RFP,从而真正实现了将荧光蛋白作为示踪 tag。我们将 K-RasG12D 突变体基因克隆至逆转录病毒真核表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP 经 PCR 及测序鉴定后,采用转染 293T 细胞系,利用重组质粒 PCR 及串联基因表达的检测证实了所构建载体在 293T 细胞中能够有效表达。为下一步建立稳定转染细胞系及进一步研究 K-Ras 突变在癌症发病中的作用奠定了重要基础。

参考文献(References)

- [1] Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion [J]. Cell, 2000,103(2): 227-238
- [2] Der CJ, Van Dyke T. Stopping ras in its tracks [J]. Cell, 2007, 129(5): 855-857
- [3] 张慧, 陈洪. Ras 基因及其调节异常与肿瘤发生的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(12): 950-953
Zhang Hui, Chen Hong. Progress in Ras gene and relationship between abnormality of Ras regulation and tumor[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2010, 17(12): 950-953
- [4] Parada L F, Tabin C J, Shih C, et al. Ituman bladder carcinoma-oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene [J]. Nature, 1982, 297(5866): 474-478
- [5] Rengan R, Cengel KA, Hahn SM. Clinical target promiscuity: lessons from ras molecular trials[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(3): 403-414
- [6] Sasaki H, Okuda K, Kawano O, et al. Nras and Kras mutation in Japanese lung cancer patients: Genotyping analysis using LightCycler [J]. Oncol Rep, 2007, 18(3): 623-628
- [7] Quinlan MP, Settleman J. Isoform-specific ras functions in development and cancer[J]. Future Oncol, 2009, 5(1): 105-116
- [8] Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 459-465
- [9] Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(7): 517-531
- [10] Croce CM. Oncogenes and cancer [J]. N Engl J Med, 2008, 358(5): 502-511
- [11] Marchetti A, Milella M, Felicioni L, et al. Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones [J]. Neoplasia, 2009, 11(10): 1084-1092
- [12] Rodenhuis S. Ras and human tumors [J]. Semin Cancer Biol, 1992, 3(4): 241-247
- [13] Wang Z, Feng Y, Bardessy N, et al. Temporal dissection of K-ras (G12D) mutant in vitro and in vivo using a regulatable K-ras(G12D) mouse allele[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37308
- [14] Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice [J]. Nature, 2001, 410(6832): 1111-1116
- [15] Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients[J]. Blood, 2009, 113(8): 1749-1755
- [16] Chou FS, Wunderlich M, Griesinger A, et al. N-Ras (G12D) induces features of stepwise transformation in preleukemic human umbilical cord blood cultures expressing the AML1-ETO fusion gene[J]. Blood, 2011, 117(7): 2237-2240
- [17] Bowen DT, Frew ME, Hills R, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years [J]. Blood, 2005, 106(6): 2113-2119
- [18] Lau YT, Wong CK, Luo J, et al. Effects of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel blockers on the proliferation and cell cycle progression of embryonic stem cells [J]. Pflugers Arch, 2011, 461(1): 191-202
- [19] Naldini L, Blomer U, Gage FH, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(21): 11382-11388

(下转第 250 页)

- wear debris-induced inflammatory osteolysis [D]. Fourth Military Medical University, 2012
- [5] Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, et al. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis [J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 454: 251-261
- [6] Oshita K, Yamaoka K, Tanaka Y. Regulation of osteoclastogenesis by human mesenchymal stem cells leading to application of a novel treatment for rheumatoid arthritis[J]. J UOEH, 2013, 35(1): 33-37
- [7] Zupan J, Jeras M, Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts [J]. Biochem Med (Zagreb), 2013, 23(1): 43-63
- [8] Tanaka S. Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways[J]. World J Orthop, 2013, 4(1): 1-6
- [9] Kim HJ, Prasad V, Hyung SW, et al. Plasma membrane calcium ATPase regulates bone mass by fine-tuning osteoclast differentiation and survival[J]. J Cell Biol, 2012, 199(7): 1145-1158
- [10] Schröder HC, Wang XH, Wiens M, et al. Silicate modulates the cross-talk between osteoblasts (SaOS-2) and osteoclasts (RAW 264.7 cells): inhibition of osteoclast growth and differentiation [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(10): 3197-206
- [11] 廉永云. RANKL-RANK-OPG 对人工关节假体周围骨溶解的作用及抗炎药物对其影响[D]. 四川大学, 2006
- Lian Yong-yun. Contribution of RANKL-RANK-OPG in the periprosthetic osteolysis and the effect by anti-inflammatory drugs [D]. Si Chuan University, 2006
- [12] Markel DC, Zhang R, Shi T, et al. Inhibitory effects of erythromycin on wear debris-induced VEGF/Flt-1 gene production and osteolysis [J]. Inflamm Res, 2009, 58(7): 413-421
- [13] Burton L, Paget D, Binder NB, et al. Orthopedic wear debris mediated inflammatory osteolysis is mediated in part by NALP3 inflammasome activation[J]. J Orthop Res, 2013, 31(1): 73-80
- [14] Zhang T, Yu H, Gong W, et al. The effect of osteoprotegerin gene modification on wear debris-induced osteolysis in a murine model of knee prosthesis failure[J]. Biomaterials, 2009, 30(30): 6102-6108
- [15] Mizukami J, Takaesu G, Akatsuka H, et al. Receptor activator of NT-KB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2 and TRAF6[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 992-1000
- [16] 冯建书, 付强, 闫世杰, 等. 仙灵骨葆对骨质疏松大鼠 OPG/RANK/RANKL 表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(23): 4438-4441
- Feng Jian-shu, Fu Qiang, Yan Shi-jie, et al. Effect of Xianlinggubao on the Expression of OPG/RANK/RANKL in Osteoporotic Rats[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(23): 4438-4441
- [17] Steven RC, Douglas CB. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture[J]. JAMA, 2000, 283: 3255-3258
- [18] 田虹, 樊瑜波. OPG、RANK、RANKL 的结构、作用机制和在骨疾病中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3963-3966.
- Tian Hong, Fan Yu-bo. Structure and Mechanism of OPG & RANK & RANKL and Their Effect on Bone Diseases[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(20): 3963-3966
- [19] 吴垠, 赵承斌. OPG/RANK/RANKL 系统与祖国传统医药[J]. 中国医药导报, 2012, 09(10): 134-136
- Wu Yin, Zhao Cheng-bin. OPG/RANK/RANKL system and traditional Chinese medicine[J]. China Medical Herald, 2012, 09(10): 134-136
- [20] 刘胜, 吴春宇, 程旭锋, 等. 从 OPG/RANKL/RANK 系统阐述补骨脂-蛇床子抑制乳腺癌骨转移的机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(5): 684-689
- Liu Sheng, Wu Chun-yu, Cheng Xu-feng, et al. Inhibitory acting mechanism of psoralen-osthole on bone metastasis of breast cancer-an expatiation viewing from OPG/RANKL/RANK system [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2011, 31(5): 684-689

(上接第 225 页)

- [20] Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo [J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(9): 871-875
- [21] 周亚峰, 李红霞, 蔡思达, 等. 穿梭质粒 pCDH1-GFP-HCN 4 的构建及 HCN 4 重组慢病毒的包装[J]. 苏州大学学报(医学版), 2012, 32(3): 354-358
- Zhou Ya-feng, Li Hong-xia, Cai Si-da, et al. Construction of the shuttle plasmid pCDH1-GFP-HCN 4 and packaging of HCN 4 recombinant lentivirus [J]. Suzhou University Journal of Medical Science, 2012, 32(3): 354-358
- [22] Zuber J, Radtke I, Pardee TS, et al. Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response[J]. Genes Dev, 2009, 23(7): 877-889