

[文章编号] 1000-2200(2005)01-0009-03

# 人神经营养索-3 全长基因克隆及序列分析

陈传好<sup>1</sup>, 陈昌杰<sup>2</sup>, 赵 莉<sup>1</sup>

[摘要] 目的: 扩增人神经营养索-3(human neurotrophin-3, hNT-3) 全长基因并进行序列分析。方法: 应用聚合酶链反应技术, 以一个健康成人基因组 DNA 为模板, 扩增出编码 hNT-3 的全长基因, 并克隆至 pMD18-T 载体中进行基因测序。结果: 所得序列与 Genbank 提供的序列(M61180) 对比显示, 除 hNT-3 中第 555 位碱基由 C→T 外, 余序列同已知序列完全一致, 改变的碱基并不影响基因编码的氨基酸序列。结论: 成功地获得了 hNT-3 的全长基因, 且序列与已知序列高度一致。

[关键词] 神经生长因子; 神经营养索-3; 基因克隆; 聚合酶链反应; DNA 序列分析

[中国图书资料分类法分类号] Q 593.2 [文献标识码] A

## Cloning and sequencing of human neurotrophin-3 intact gene

CHEN Chuan-hao<sup>1</sup>, CHEN Chang-jie<sup>2</sup>, ZHAO Li<sup>1</sup>

(1. Department of Anatomy, 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Anhui 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To amplify and sequence the human neurotrophin-3(hNT-3) intact gene. **Methods:** hNT-3 intact gene was obtained by polymerase chain reaction using human genomic DNA as a template and cloned into pMD18-T vector and sequenced. **Results:** DNA sequence comparison of the cloned fragments and the reported hNT-3(M61180) demonstrated that the gene sequence was identical to that had been reported before except one base(555th) changing from C to T, but it had no influence on the encoded amino acids. **Conclusions:** hNT-3 intact gene was obtained and its sequence was highly consistent with ones reported.

[Key words] nerve growth factor; neurotrophin-3; gene cloning; PCR; DNA sequencing

神经营养索-3(neurotrophin-3, NT-3) 是神经营养索家族中的一个成员, 它对胚胎期神经系统的发育极为重要<sup>[1]</sup>。有文献报道<sup>[2~4]</sup>, NT-3 通过与神经元细胞表面受体结合, 对离体培养的脊髓运动神经元存活有促进作用, 可促进感觉神经传导; 能改善基底前脑胆碱能神经元退变导致学习记忆障碍; 提高纹状体内多巴胺和 5-羟色胺代谢等。可见, NT-3 在阿尔默病、帕金森病和外周神经损伤的治疗中具有很好的临床应用前景。本实验拟用聚合酶链反应(PCR) 方法直接从人基因组 DNA 中扩增并克隆出 hNT-3 全长基因并进行全序列分析, 为今后利用基因工程技术制备 NT-3, 并探讨其在周围神经损伤治疗的作用奠定实验基础。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 pMD-T 载体(大连宝生物工程公司产品), 大肠埃希菌 *E coli* DH5 $\alpha$ (本室保存)。限制性内切酶 Hind III, EcoR I (购自上海生工公司), X-gal 和 IPTG(购自 Promega 公司), 余试剂为国产分析纯。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 引物设计 根据 Genbank 提供的已知序列

[收稿日期] 2004-02-04

[基金项目] 安徽省教育厅优秀青年科研项目(2000JQ136)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 人体解剖学教研室, 2. 蚌埠医学院 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 陈传好(1971-), 男, 安徽五河县人, 讲师。

(M61180), 预扩增出 774bp hNT-3 全长基因, 设计两条引物:

Primer-F: 5'-GGTGATGTCCATCTTGTTTT-ATGTG-3',

Primer-R: 5'-TCATGTTCTTCCGAT-TTTTCTCGAC-3',

引物合成由上海申友公司完成。

1.2.2 模板 DNA 制备 (1) 取外周静脉血 5 ml, 加 0.2 ml 0.5 mol/L 的 EDTA 抗凝, 2 000 r/min 离心 2 min, 收集细胞成分, 并用 10 ml 0.1 mol/L 的 PBS 稀释; (2) 将稀释的血细胞铺于淋巴细胞分离液上, 3 000 r/min 离心 20 min; (3) 收集中间的单核细胞层 8 000 r/min 离心 5 min; (4) 用 0.1 mol/L PBS 洗沉淀一次; (5) 加 0.5 ml 裂解液(TE 缓冲液 pH 8.0, 0.5% SDS, 蛋白酶 K 200  $\mu$ g/ml) 37  $^{\circ}$ C 水浴 3 h; (6) 等体积酚、酚: 氯仿、氯仿各抽提一次; (7) 加 50  $\mu$ l 5 mol/L NaCl, 1 ml 冰预冷的无水乙醇, 充分混匀后, 1 200 r/min 离心 10 min; (8) 沉淀经 70% 乙醇洗一次后, 真空干燥; (9) 加 50  $\mu$ l TE 缓冲液(pH 8.0) 溶解, 测 OD 值计算出核酸得率为 0.12  $\mu$ g/ml, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 PCR 法扩增目的基因 (1) 在 0.5 ml 的 EP 管内建立如下反应体系: 1  $\mu$ l 30 pmol/ $\mu$ l 正向引物, 1  $\mu$ l 30 pmol/ $\mu$ l 反向引物, 1  $\mu$ l 0.12  $\mu$ g/ml 模板 DNA, 1  $\mu$ l 4dNTP(10 mmol/L), 0.5  $\mu$ l Taq DNA 聚合酶(5 u/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l 10 $\times$  缓冲液, 3  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L), 最后补消毒去离子水至 50  $\mu$ l, 上面覆盖石蜡油。(2) PCR 仪扩增目的基因, 条件为 94  $^{\circ}$ C 预

变性 5 min; 94 °C 50 s, 56 °C 50 s, 72 °C 1 min, 35 次循环后, 再 72 °C 延伸 10 min; (3) 取 5 μl PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定; (4) PCR 反应产物经低熔点胶电泳回收, 常规正丁醇浓缩, 酚: 氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, 将沉淀用适当水溶解, 置于 -20 °C 保存备用。

1.2.4 克隆 PCR 产物 (1) PCR 产物 4 μl, pMD18-T 载体 1 μl, 连接酶缓冲液 5 μl, 在 16 °C 孵育 8 h。 (2) 连接产物转化: 用 CaCl<sub>2</sub> 法制备感受态 *E. coli* DH5α 细胞, 并将转化菌涂布在表面涂有 X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上 (AP+) 进行培养, 37 °C 倒置过夜, 筛选阳性克隆至 3 ml AMP/LB 中, 在 37 °C 恒温振荡器以 250 r/min 培养过夜。

1.2.5 克隆基因鉴定及序列分析 (1) 采用碱裂解法小量提取质粒; (2) 利用 pMD18-T 载体的 Hind III 和 EcoRI 的酶切位点进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定克隆基因大小; (3) 克隆基因测序 (上海申友公司检测)。

## 2 结果

2.1 PCR 产物鉴定 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并以标准 DNA 分子量作对照, 可见 PCR 产物约 780bp 一电泳条带 (见图 1), 与预计值相符。

2.2 PCR 产物克隆结果 将重组质粒 pMD18-T-NT-3 作双酶切 (Hind III + EcoRI) 后, 可获得一个分子量略大于 PCR 产物的 DNA 片段。1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 实际值与理论值一致 (见图 2)。

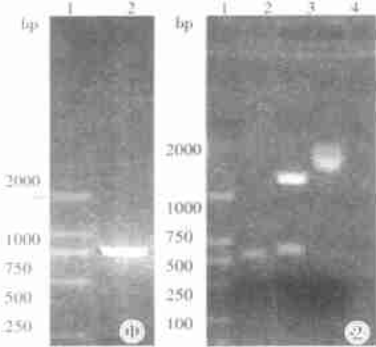


图 1 PCR 产物电泳图谱 (1. DNA 分子量标准, 2. PCR 产物); 图 2 重组质粒 pMD18-T-NT-3 双酶切 (Hind III + EcoRI) 电泳图谱 (1. DNA 分子量标准, 2. PCR 产物, 3. pMD18-T-NT-3 双酶切, 4. pMD18-T-NT-3)

2.3 NT-3 克隆片段测序结果 对本实验扩增得到的 NT-3 基因开放阅读框进行的核苷酸序列测定结果与 GenBank 收录的 NT-3 蛋白编码基因 (收录号为 M61180) 比较, 两者有 1 个碱基不同: 除在第 555 位碱基 C→T 突变外 (下划线部分为突变碱基), 余序列同文献报道完全一致, 改变的碱基并不影响基因编码的氨基酸序列 (见图 3)。

```

ATGCCATCTTGT TTT TATGTGATATTTCTCGCTTA
TCTCCGTGGCATCCAAGGTAACAACATGGATCAAAGGA
GTTTCCAGAAGACTCGCTCAATTCCTCAT TATTAAG
CTGATCCAGG CAGATATTT TGAAAACAAGCTCCAA
GCAGATGGTGGACGT TAAGGAAAATTA CCAGAGCACCC
TGCCCAAAGCTGAGGCTCCCCGAGAGCCG GAGCGGGGA
GGGCCC GCCAA GTCA GCA TCCAGCCAGTGATTGCAAT
GGACACCGAA CTGCTGCGACAACAGAGACGCTA CAACT
CACCGCGGTCTCTGCTGAGCGA CAGCACCCCTTGGAG
CCCCCGCCCTTGTATCTCATG GAGGATTACGTGGGCAG
CCCCGTGGTGGCGAACAGAACATCACGGCGGAAACGGT
ACGCGGAGCATAAGAGTCAACCGAGGGGA GACTCGGTA
TGTGACAGTGAGAGTCTGTG GGTGACCGACAAGTCATC
GGCCATCGACATTCGGTGACACCAGGTCACGGTGCTGG
GGGAGATCAAACGGGCAACTCTCT(C)GTCAAACAA
TATTTTTATGAAACCGCATGTAAGGAAGCCAGGCCGGT
CAA AAACGGT TGCAGGGTATTGATGATAAA CACTGGA
ACTCTCAGTGCAAAAACA TCCCAAACCTACGTCCGA GCA
CTGACTTCAGAAACAATAAACTCGTGGGCTGGCGGTG
GATACGGATAGACACGTCTCTGTGTGTGCCCTGTGCA
GAAAAATCGGAAGAACA TGA
  
```

图 3 hNT-3 开读框核苷酸序列测定结果

## 3 讨论

hNT-3 全长基因由 774bp 组成, 其基因位于人类染色体 12p13, 因该基因无内含子, 仅有一个外显子, 故理论上既可建立 hNT-3 cDNA 克隆, 也可建立 hNT-3 DNA 克隆。Kaisho 等<sup>[5]</sup> 从人胶质瘤细胞 cDNA 文库中分离出 hNT-3cDNA 片段, 穆援越等<sup>[6]</sup> 自胎儿脑基因组 DNA 中扩增出 hNT-3 全长基因, 我们则以健康成人静脉血染色体 DNA 为模板, 扩增出 hNT-3 全长基因。用此方法克隆 hNT-3 基因, 取材方便, 省时可行。经序列测定分析比较, 除第 555 位碱基发生了改变, 余序列跟文献提供完全一致, 而改变的碱基不影响其编码的氨基酸仍为脯氨酸, 因而不影响 hNT-3 的生物学活性。张伶俐等<sup>[7]</sup> 研究表明, ATG 起始位点上游的几个碱基中, 其中 -3 位的嘌呤碱基保证了起始密码子有强大的起始功能, 故我们在设计引物时, 在 ATG 上游加上 GGTG。本实验成功地克隆出编码 hNT-3 全长基因, 可为进一步研究 NT-3 生物学作用奠定基础, 同时也可作为基因治疗周围神经损伤创造前提条件。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Chakozonitis A. Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system[J]. *Mol Neurobiol*, 1996, 12(1): 39~53.
- [2] Gao WQ, Dybdal N, Shinsky N, et al. Neurotrophin-3 reverses experimental cisplatin induced peripheral sensory neuropathy[J]. *Ann Neurol*, 1995, 38(1): 30~37.

[ 文章编号 ] 1000-2200(2005)01-0011-03

# As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导人膀胱癌 BIU-87 细胞株凋亡及其对细胞周期的影响

夏俊<sup>1</sup>, 陈俊霞<sup>2</sup>, 盛甫秀<sup>2</sup>, 崔秀云<sup>2</sup>

[ 摘要 ] 目的: 观察三氧化二砷 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 对人膀胱癌 BIU-87 细胞株生长抑制作用, 并探讨对细胞周期及凋亡的影响。方法: CellTiter 96 Aqueous One 试剂检测 BIU-87 细胞株增殖活力; 荧光染色观察凋亡细胞的形态学变化; 流式细胞术分析细胞周期及凋亡。结果: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 与 BIU-87 细胞株生长抑制率之间有明显的浓度依赖关系 ( $P < 0.01$ ), IC<sub>50</sub> 为 28.92 μmol/L; 荧光显微镜下观察到经 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用的 BIU-87 细胞核膜消失, 核染色质呈大小不等的小圆形碎片; 流式细胞术结果表明 30 μmol/L 的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 BIU-87 细胞株 48 h 后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例下降, S 期细胞比例增加, 凋亡率为 47.37%。结论: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 能显著抑制 BIU-87 细胞株增殖; 使细胞阻滞在 S 期, 并进一步诱导细胞凋亡。

[ 关键词 ] 膀胱肿瘤; 三氧化二砷; BIU-87 细胞株; 凋亡; 细胞周期

[ 中国图书资料分类法分类号 ] R 731.14; O 612.5 [ 文献标识码 ] A

## Arsenic trioxide induced apoptosis in human bladder cancer BIU-87 cell line and its influence on cell cycle

XIA Jun<sup>1</sup>, CHEN Jun-xia<sup>2</sup>, SHENG Fu-xiu<sup>2</sup>, CUI Xiu-yun<sup>2</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Anhui 233003; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Liaoning 116027, China)

[ Abstract ] **Objective** To observe the effects of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) on the cell growth, cell cycle and apoptosis of human bladder cancer BIU-87 cells line. **Methods:** CellTiter 96 Aqueous One was used to determine the cell proliferation. Morphological changes of BIU-87 cells were observed by fluorescence staining of Hoechst 33258. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry (FCM). **Results:** There was obviously a concentration-dependent relationship between As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and the inhibition of BIU-87 cell proliferation ( $P < 0.01$ ). IC<sub>50</sub> was 28.92 μmol/L. Morphological observation by fluorescence staining indicated that As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induced apoptosis of BIU-87 cells. FCM demonstrated that the number of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase was decreased, while that in S phase were increased after treated with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and apoptosis rate was 47.37%. **Conclusions:** The results suggest that As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> can inhibit human bladder cancer cells BIU-87 growth by means of cell proliferation inhibition, S phase arrest and induction of apoptosis.

[ Key words ] bladder neoplasms; arsenic trioxide; BIU-87 cell line; apoptosis; cell cycle

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 具有晚期恶性度加重和易复发的特点, 术后化疗是膀胱癌最重要的辅助治疗措施。由于化疗药物毒副作用及肿瘤抗药性的增加, 其疗效显著降低。近年来寻找

安全、有效的防治膀胱癌复发的方法一直是令人关注的研究方向。本实验以人膀胱癌 BIU-87 细胞株为工作模型, 研究 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对其生长抑制作用, 并初步探讨其作用机制, 为膀胱癌的临床治疗提供新的理论和实验依据。

### 1 材料与方法

1.1 材料和试剂 人膀胱癌 BIU-87 细胞株 (大连医科大学生物化学与分子生物学教研室保存); As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma 产品, 用 NaOH 滴定至溶解, 配制成 pH 7.2 的 1 mmol/L 的储存液); DMEM 培养基 (HyClone 产品); 胎牛血清 (中国医学科学院血液学

[ 收稿日期 ] 2004-06-20

[ 基金项目 ] 安徽省教育厅 自然科学研究资助项目 (2003kj256), 蚌埠医学院科研项目 (by0206)

[ 作者单位 ] 1. 蚌埠医学院 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233003; 2. 大连医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 大连 116027

[ 作者简介 ] 夏俊 (1965-), 女, 安徽庐江县人, 硕士, 副教授。

[ 3 ] Arenas E, Persson H. Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo [ J ]. *Nature*, 1994, 367 (6461): 368~371.[ 4 ] Altar CA, Boylan CB, Fritsche M, et al. Efficacy of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions [ J ]. *J Neurochem*, 1994, 63(3): 1021~1032.[ 5 ] Kaisho Y, Yoshimura K, Nakahama K, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a novel human neurotrophic factor [ J ]. *FEBS Lett*, 1990, 266(1-2): 187~191.[ 6 ] 穆援越, 范明, 甘思德. 人神经营养索-3 全长基因克隆 [ J ]. *神经科学*, 1995, 2(2): 73~76.[ 7 ] 张伶俐, 胡火珍, 李小玉, 等. 神经营养索-3 的克隆与真核表达 [ J ]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2002, 39(Suppl): 195~199.