

STEAP1 基因的体外转录*

潘玉琢, 李扬, 赵丹, 毛建华, 孙连坤, 赵雪俭[△]

(吉林大学基础医学院病理生理教研室, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的:建立 STEAP1 基因的体外转录模型,为进一步研究其功能奠定基础。方法:应用 RT-PCR 的方法从前列腺癌组织中钓取 STEAP1 全长 cDNA,TA 克隆后测序,亚克隆入 pSP64 载体,构建体外转录用载体 STEAP1-pSP64。同时,通过 PCR 构建具有 SP6 RNA 聚合酶结合位点的 STEAP1 体外转录盒。应用体外转录试剂盒,对比 STEAP1-pSP64 与 STEAP1 体外转录盒转录效率。结果:(1)成功从人前列腺癌组织中钓取了 STEAP1 全长 cDNA,测序发现无一碱基错配。(2)成功构建了 STEAP1-pSP64 载体和 STEAP1 体外转录盒,两者转录效率的比较表明 STEAP1-pSP64 载体转录 RNA 的量明显高于 STEAP1 体外转录盒。结论:成功构建了两种 STEAP1 体外转录模型,并证明 STEAP1-pSP64 载体的转录效率高于 STEAP1 体外转录盒。本研究为进一步研究 STEAP1 的功能奠定了基础。

[关键词] 基因,STEAP1; 前列腺肿瘤; pSP64 载体; 前列腺特异 6 次跨膜上皮抗原

[KEY WORDS] Genes, STEAP1; Prostatic neoplasms; pSP64 vector; Prostatic-specific six-transmembrane epithelial antigen

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

STEAP1 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate) 是一种新近被克隆出来的 6 次跨膜的前列腺上皮抗原^[1],属于 IIIa 型膜蛋白,位于染色体 9q21.2。国人研究了 STEAP1 在人前列腺组织中的表达与分布情况,证明 STEAP1 在前列腺癌组织中高表达,与前列腺癌的发生发展关系密切^[2]。但是 STEAP1 基因的功能目前尚不清楚。为了研究表达在质膜上的基因的功能,首先要探讨该基因表达在膜上发挥怎样的生理功能。为了研究表达在质膜上的基因的功能,必须通过在带有噬菌体源 DNA 依赖的 RNA 聚合酶启动子的质粒构建 STEAP1 cDNA 的转录载体,然后进行体外转录 STEAP1 mRNA,进而在体外细胞模型中研究该基因功能。本研究拟通过 STEAP1-pSP64 载体和 STEAP1 体外转录盒两种方法研究 STEAP1 的体外转录效率,为进一步研究 STEAP1 基因功能奠定基础。

材 料 和 方 法

1 RT-PCR 方法从前列腺癌组织中钓取 STEAP1 的基因

称取正常前列腺组织 3 例和前列腺癌组织 2 例各 100 mg,采用 Trizol 试剂盒一步法提取总 RNA,进行 RNA 变性琼脂糖凝胶电泳证明 RNA 质量,应用紫外分光光度计对 RNA 进行定量,取 5 μg 总 RNA 应用 Promega 的逆转录酶 MMLV 逆转录 cDNA。逆转录的 cDNA 产物 5 倍稀释后取 2 μL 进行 PCR。为了证明模板的质量,首先应用通用引物 β-actin 进行一轮 PCR,证明模板质量后,再根据 STEAP1 mRNA 序列 (GenBank 登录号:NM_012449)和载体限制性酶切位点设计

全长引物,正义链引物含有 Bgl II 酶切位点:5'-GGAGATCTATGCAAAGCAGAAAAGACAT-3';反义链引物含有 Xba I 酶切位点:5'-GCTCTAGACTACAACCTGGGAA-CATATCT-3';引物由上海生工合成。PCR 产物长度为 1 039 bp,PCR 条件为:94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 1 min,共 35 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,应用上海天能凝胶成像系统进行图像分析。

2 STEAP1 基因的 TA 克隆

扩增后的 PCR 产物,1% 琼脂糖电泳,应用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)回收目的 DNA。取 5 μL 回收 DNA 与 TAKARA 的 pMD 18-T vector 进行连接。转化感受态细胞 JM109,挑选阳性克隆,大量扩增,应用 TAKARA 的 MiniBEST Plasmid Purification Kit 提取质粒,双酶切鉴定,获得与预期相一致的目的条带,送上海生工公司测序。限制性内切酶 Bgl II、Xba I 购于 Promega 公司。

3 STEAP1 基因亚克隆

取测序完的 TA 载体和目标载体 pSP64T,分别进行酶切后电泳,回收酶切下的片段,将获得的片段用 T4 DNA 连接酶连接过夜后,将连接产物转化感受态细胞 JM109,挑选阳性克隆,大量扩增,应用 TAKARA 的 MiniBEST Plasmid Purification Kit 提取质粒,酶切鉴定,获得 STEAP1 基因亚克隆载体。

4 STEAP1 体外转录盒的构建

Sp6 体外转录盒是指前端带有 Sp6 RNA 聚合酶结合位点和转录起始区其后含有目的基因需要转录的片段。小片段的转录盒可通过人工合成和 PCR 的方法构建,但对于

[收稿日期] 2004-10-18 [修回日期] 2004-12-30

* [基金项目] 吉林省科技厅资助项目 (No. 20010709)

△通讯作者 Tel: 0431-5632348; E-mail: pro_2@jlu.edu.cn

STEAP1 基因只能通过 PCR 的方法构建。两端的引物:P1: 5' - atttaggtgacactatagaagcgtatggaagcagaaaaga - 3' 含有 Sp6 RNA 聚合酶位点;P2: 5' - gctctagactacaactgggaacatatctt₁₈ - 3' 含有 POLY T 尾。以 STEAP1 - pSP64 载体为模板,PCR 反应条件:94 °C 45 s,60 °C 45 s,72 °C 90 s,共进行 35 个循环。

5 STEAP1 的体外转录

RiboMAX™ Large Scale RNA Production System - Sp6 试剂盒购于 Promega 公司。体外转录根据公司的操作手册进行。将 STEAP1 - pSP64 载体用 *EcoR* I 线性化后,与体外转录盒 DNA 一起定量。两者取相同的量进行体外转录,转录体系总体积为 25 μL,反应体系:SP6 Transcription 5X Buffer 4 μL,rNTPs(25 mmol/L ATP, CTP, GTP, UTP)4 μL;*EcoR* I 线性化 STEAP1 - pSP64 载体和体外转录盒 DNA (各 1 μg),Enzyme Mix(SP6)2 μL,Nuclease - Free Water 补至 25 μL,37 °C 反应 4 h,向反应体系中加入 Promega 的 RQ1 RNase - Free DNase 2 μL,37 °C 孵育 15 min 以去除模板 DNA,转录结束后,取 2 μL 行变性的 RNA 电泳。

结 果

1 STEAP1 基因的克隆与载体构建

1.1 国人 STEAP1 基因 cDNA 钓取 以前列腺癌组织为模板,经 RT - PCR 扩增后,取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳,获得 1 个 1 039 bp 的条带,与预期的片段大小一致。见图 1。

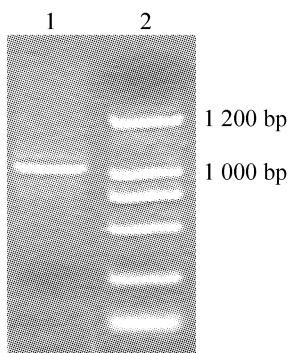


Fig 1 PCR product of STEAP1 was separated on 1% agarose. Lane 1: PCR amplification from prostate cancer cDNA; Lane 2: DNA ladder from Dingguo DGL016.

图 1 STEAP1 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳

1.2 PCR 产物 TA 克隆、鉴定 将回收后的 PCR 产物,与克隆载体 pMD 18 - T 连接,转化感受态细胞,酶切鉴定。获得与预期相一致的目的片段,见图 2。第 1、2、3、5 泳道为正确的酶切产物。经测序测得 1 072 bp,经过 blast 搜索(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast),发现与基因 NM_012449 完全匹配。为证明是否存在突变,采用双向测通的方法,证明该序列双链都不存在突变。

1.3 STEAP1 基因亚克隆、鉴定 pMD 18T - STEAP1 质粒和 STEAP1 - pSP64 载体分别经 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶切,T4 DNA 连接酶连接,转化感受态细胞,挑取阳性克隆,酶切鉴定,获得与 STEAP1 大小一致的片段,见图 3。2、3、4、6 泳道为正确的酶切产物。

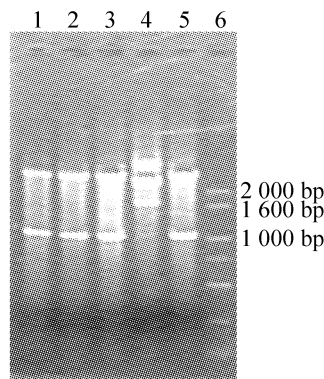


Fig 2 Identification of TA clone plasmid of pMD 18T - STEAP1. Lane 1 - 5: pMD 18T - STEAP1 digested with *Bgl* II, *Xba* I; Lane 1,2,3,5 are the right constructs of pMD 18T - STEAP1; Lane 6: Dingguo DNA ladder DGL2000.

图 2 pMD - 18T STEAP1 质粒酶切鉴定琼脂糖电泳

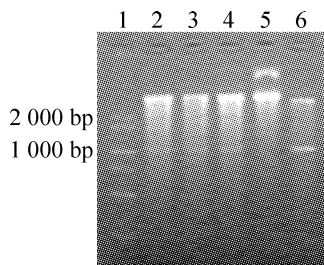


Fig 3 Identification of recombination plasmid of pSP64 - STEAP1. Lane 1: Dingguo DNA ladder DGL2000; Lane 2 - 5: pSP64 - STEAP1 digested with *Bgl* II, *Xba* I; Lane 6: is right construct of pSP64 - STEAP1.

图 3 pSP64 - STEAP1 重组质粒酶切鉴定琼脂糖电泳

2 STEAP1 体外转录盒的构建

以 pMD 18T - STEAP1 为模板,通过 PCR 获得 STEAP1 体外转录盒。见图 4。

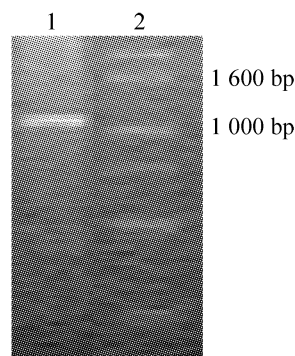


Fig 4 Construction of *in vitro* transcription cassette. Lane 1: PCR product amplified with pMD 18T - STEAP1; Lane 2: Dingguo DNA ladder DGL2000.

图 4 STEAP1 体外转录盒的构建

3 STEAP1 基因的体外转录

将 pSP64 - STEAP1 载体和 STEAP1 体外转录盒按照 RiboMAX™ Large Scale RNA Rroduction System - SP6 试剂盒的

操作手册进行,如图 5 所示,1、2 由 pSP64 - STEAP1 载体转录;3、4 由 STEAP1 体外转录盒转录而成。1、2 转录量明显高于 3、4。

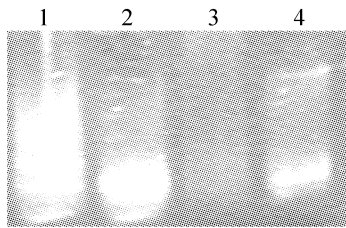


Fig 5 *In vitro* transcription product of STEAP1. Lane 1, 2: *in vitro* transcription product of *EcoR* I linearized pSP64 - STEAP1; Lane 3, 4: *in vitro* transcription product of PCR based transcription cassette.

图 5 STEAP1 体外转录 RNA 电泳

讨 论

STEAP1 是一种新的前列腺癌高表达的膜蛋白,通过 blast 分析未发现与该家族同源的基因。由于 STEAP1 表达量与表达部位的特殊性,STEAP1 可能成为前列腺癌早期诊断的标志物和免疫基因治疗的靶点^[2]。

膜蛋白通常包括离子通道蛋白、水通道蛋白、物质转运体蛋白及受体蛋白等。根据疏水性分析,STEAP1 属于 6 次跨膜蛋白。在膜通道蛋白大家族,6 次跨膜蛋白常常是离子通道、水通道或者物质转运体蛋白。同时,由于 STEAP1 表达部位在前列腺腺上皮细胞膜,进一步提示 STEAP1 可能是与前列腺物质运输有关的蛋白^[3]。最初,大部分离子通道(如 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Cl^- 的离子通道蛋白结构都属于 6 次跨膜蛋白)和物质转运体蛋白的功能鉴定和调节机制的发现都依赖于电生理的方法特别是膜片钳技术的应用。即首先通过在带有噬菌体源 DNA 依赖的 RNA 聚合酶启动子的质粒或噬菌体载体上构建目的基因 cDNA 的转录载体,然后将装有目的基因的载体进行体外转录。并将得到的 cRNA 注射到非洲爪蟾卵母细胞。对于独立生长的卵母细胞通过膜片钳等方法进行电生理检测进而研究其确切的生理功能^[4]。可见构筑这样研究体系的首要问题是体外转录模型的建立。

如何获得高质量的 cRNA 是进一步实验的先决条件。通过体外转录的方法获得 cRNA 的方法有两种:一种是载体介导的体外转录,另外一种体外转录盒的构建。我们通过本实验构建了 pSP64 - STEAP1 体外转录载体和 STEAP1 体外

转录盒,并且对比研究了两种体外转录方法的效率,结果表明 pSP64 - STEAP1 载体介导的体外转录系统的效率高于 STEAP1 体外转录盒。我们认为两种方法各有优缺点:载体介导的体外转录能保证转录产物 cRNA 的正确性,而且转录效率很高,非常适合研究基因功能时应用,但费时费力。而 PCR 构建体外转录盒的方法简便易行,快速,整个工作可以在 1 d 内完成,非常适合高通量筛选的需要。但 PCR 法的弊端是容易发生错配,导致序列突变。故在精细的功能研究中很少应用。弥补的办法是可以由高保真的 DNA 聚合酶来提高产物的准确性。目前,PCR 构建体外转录盒的方法与体外翻译系统相偶联形成了高效的蛋白体外翻译系统,成为进行高通量药物筛选非常重要的工具。

本实验成功地构建了 pSP64 - STEAP1 体外转录载体和 STEAP1 体外转录盒,并且对比研究了两种体外转录方法的效率,结果表明 pSP64 - STEAP1 载体介导的体外转录效率高于 STEAP1 体外转录盒。这将为深入研究 STEAP1 基因的功能提供重要手段,进而为阐明 STEAP1 在前列腺癌发生发展中的作用奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Rene H, Igor V, Chen E, et al. STEAP: a prostate - specific cell - surface antigen highly expressed in human prostate tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96 (25): 14523 - 14528.
- [2] Li L, Li J, Shen Z, et al. Clinical significance of six - transmembrane epithelial antigen of the prostate expressed in prostatic carcinoma [J]. Zhonghua Nan Ke Xue, 2004, 10(5): 351 - 354.
- [3] Kemal S, Cem E, Ceren G, et al. Molecular cloning and characterization of STAMP1, a highly prostate - specific six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2002, 277 (39): 36689 - 36696.
- [4] 杨青,李之望,魏劲波. 非洲爪蟾卵母细胞 GABAB 和 GABAC 受体介导的电流反应 [J]. 生理学报, 2001, 53(4): 311 - 315.
- [5] 卢震,沈孝宙,刘冬梅,等. 应用 RT - PCR 检测基因的体外转录活性 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(4): 432 - 436.