

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001183

基因捕获技术在肝癌侵袭和迁移相关基因筛选中的应用

熊冬梅¹, 朱士胜¹, 汤 华²

(1. 重庆医药高等专科学校医学技术学院, 重庆 401331;

2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:用基因捕获技术在肝癌细胞 SMMC7721 细胞中寻找与肝癌侵袭和迁移相关的基因。**方法:**首先,将 pU21 质粒转染到肝癌细胞 SMMC7721 细胞,用 G418 筛选出单克隆稳定细胞系;其次,采用 Transwell 小室实验和划痕实验,检测这些单克隆细胞侵袭和迁移能力的变化;最后,用 5'-Full RACE 实验、T 克隆及基因测序检测这些细胞系中被 pU21 质粒捕获的基因。**结果:**成功获得了约 300 株稳定转染 pU21 质粒的单克隆细胞系,得到了约 30 株侵袭和迁移能力增强的细胞株和约 40 株侵袭和迁移能力减弱的细胞株。通过 5'-Full RACE 实验、T 克隆及基因测序检测,证明了在 A554 细胞系中,被 pU21 质粒捕获的基因是 long inter-genic non-protein coding RNA 52(LINC00052)。**结论:**应用基因捕获技术筛选肝癌侵袭和迁移相关基因是可行的。

【关键词】基因捕获技术;肝癌;侵袭和迁移;LINC00052**【中图分类号】**R735.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-12-09

Application of gene trap technique in genetic screening of genes related to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma

Xiong Dongmei¹, Zhu Shisheng¹, Tang Hua²

(1. Faculty of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College;

2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease Founded by Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To search for genes related to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma(HCC) with the gene trapping technology. **Methods:** Firstly, SMMC7721 cells were transfected with capture plasmid pU21 vector and then selected by G418 to set up cell lines. Secondly, transwell assay and wound healing assay were used to detect the invasion and migration abilities of these cell lines. Thirdly, 5'-Full RACE, gene cloning experiment and gene sequencing experiments were used to identify what the genes were captured by pU21 vector in these cell lines. **Results:** About 300 cell lines stably transfected with pU21. Invasion and migration abilities of about 70 cell lines were obviously changed. One cell line, A554 was found that the gene captured by pU21 was long inter-genic non-protein coding RNA 52(LINC00052). **Conclusion:** Gene trap technology is useful to find genes related to the invasion and metastasis of HCC.

【Key words】gene trapping technology; hepatocellular carcinoma; invasion and metastasis; LINC00052

基因捕获(gene trapping)技术是目前最具应用前景的基因克隆方法之一,是指通过报告载体随机整合到基因组中,产生插入失活突变并通过后续的一系列技术揭示基因表达模式及其功能的一种实

验技术。目前,基因捕获技术已成为建立高通量、大规模基因突变模型的一种便利手段,是继自然突变、物理突变和化学突变之后发展起来的新的分子生物学方法。基因捕获技术是 Gossler 等^[1]在 1989 年首先应用的一种极具创意的方法,通过在 ES 细胞中使用随机插入突变技术进行基因诱变而产生的一种技术,并形象地命名为“基因捕获”。目前,根据报告基因在载体中的位置及报告基因激活表达

作者介绍:熊冬梅,Email:xiongdongmeigoing@126.com,

研究方向:LINC00052 对肝癌发生发展的影响。

通信作者:汤 华,Email:tanghua86162003@cqmu.edu.cn。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1057.020.html

(2017-03-13)

的方式,基因捕获技术分为 3 种类型:增强子捕获 (enhancer trap)、启动子捕获 (promoter trap) 和基因捕获 (gene trap),而基因捕获实际上是这 3 种类型的统称^[2]。

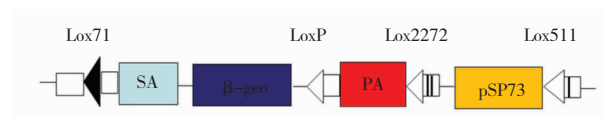
此外,在基因捕获技术中,一个重要的、必不可少的元件是基因捕获载体。基因捕获载体是带有报告基因和(或)选择标记基因的不完整的基因表达载体,这些载体所带的基因只有在整合到宿主功能基因内部且与融合的宿主基因编码框一致时才能得以表达。由于基因捕获技术在未知基因筛选和研究中的重要性及科学性,研究者对捕获质粒进行了优化,即在捕获质粒中引入可通过化学染色而容易被观察到的 β 葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase gusA or uidA)^[3-4]。基因捕获技术主要优点之一就是单个基因捕获载体可研究成千上万个单个基因的功能,十分适合高通量、大范围的基因突变,并且经济实效,起初多用于胚胎干细胞的研究^[5]。如 Tang 等^[6]通过基因捕获技术,在鼠干细胞中发现了鼠源的 Ayu17-449 基因。

黄婷婷等^[7]用经改造的捕获载体 pU21 质粒通过电转的方式稳定转染肝癌细胞 HepG2.2.15 细胞,经过抗生素筛选获得了功能发生变化的单克隆细胞系。捕获载体 pU21 质粒是一种无启动子、含抗生素筛选基因和 LacZ 报告基因的载体。pU21 质粒具有一个剪接受体 (splicing acceptor, SA) 片段,该片段能有效地随机插入细胞染色体中。由于 pU21 质粒本身没有启动子,其抗生素筛选基因的表达完全依赖于该质粒所整合的基因的启动子。pU21 质粒结构如图 1 A 所示。因此,在本试验中,将捕获载体 pU21 质粒通过 Lipofectamine2000 稳定转染肝癌细胞 SMMC7721 细胞,通过 G418 的筛选,同样得到了侵袭、迁移能力发生不同变化的单克隆细胞系,并通过 5'-Full RACE 实验、T 克隆及基因测序的实验方法证实 A554 细胞系中被 pU21 质粒捕获的基因是 long inter-genic non-protein coding RNA 52 (LINC00052),如图 1B 所示。

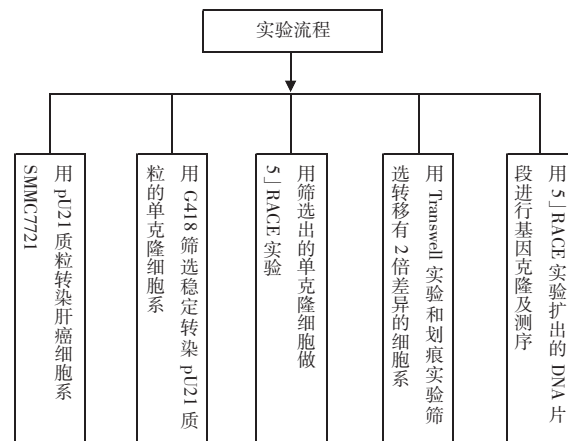
1 材料与方法

1.1 细胞及质粒

SMMC7721 细胞、pU21 质粒、感受态细菌均由本实验室保存。



A. 捕获质粒 pU21 质粒的结构示意图



B. 本实验的技术流程图

图 1 捕获质粒 pU21 质粒的结构图示意图和本实验的技术流程图
Fig.1 Structure of the pU21 plasmid and the technical flow chart of the experiment

1.2 主要试剂

DNA Marker (DL15000、DL2000、 λ DNA/Hind III)、T-vector 试剂盒、5'-Full RACE 试剂盒等试剂购自 Takara 公司;质粒鉴定时所用的普通质粒抽提试剂盒、质粒转染细胞时所用的去内毒素质粒抽提试剂盒、转染质粒用的 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 试剂公司;DMEM 细胞培养基购自 Hyclone 试剂公司,消化细胞用的胰酶试剂和 PBS 粉剂购自鼎国试剂公司,胎牛血清购自 TBD 试剂公司;Transwell 小室购自 COSTAR 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将肝癌细胞 SMMC7721 细胞置于温度设置为 37 °C, CO₂ 含量设置为 5% 的细胞培养孵箱中。500 mL Hyclone-DMEM 基础培养基中加入 50 mL 胎牛血清和 5 mL 青霉素/链霉素,使 FBS 终浓度为 10%、青霉素/链霉素终浓度为 1%。根据细胞的生长状况及实验目的及时进行细胞传代和换液。

1.3.2 构建稳定的单克隆细胞系 用 pU21 质粒按照脂质体 2 000 μ L、pU21 质粒 4 μ g 转染 SMMC7721 细胞,转染 48 h 后,用 G418 杀未成功转染 pU21 质粒的细胞,使 G418 终浓度为 2 000 μ g/mL。2 周后,将 G418 终浓度改为 1 000 μ g/mL 的维持浓度,并用此维持浓度继续培养 2 周。在此期间,用 10 μ L 的枪头挑取单克隆细胞团,置于 24 孔板培养,待细胞团增多增大时,采用有限稀释法加入 96 孔板,使每孔中细胞

数 0~1 个,并用 G418 的维持浓度继续培养,使单个细胞数量增多,直至获得单克隆细胞株。

1.3.3 检测单克隆细胞系侵袭能力的变化 获得单克隆稳定细胞株,以 SMMC7721 细胞作对照组做侵袭试验检测成功转染 pU21 质粒的细胞株侵袭能力的变化。将 Transwell 小室置于 24 孔板内,加入 100 μ L、含 10^4 个细胞的细胞悬液接种到上室,再加入 700 μ L 含 10%FBS 的 DMEM 培养基至下室,用枪头轻轻混匀,并避免产生气泡;37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱内培养 24 h。24 h 后,取出 24 孔板,吸干小室内外的培养基,用 37%多聚甲醛固定 5 min,吸干 37%多聚甲醛后用 PBS 轻柔洗涤 3 遍,再用 0.1%结晶紫染色 30 s;吸掉结晶紫后用 PBS 轻柔洗涤,轻轻拭去小室内细胞,主要不要触破小室的膜,风干后倒置小室于显微镜下取若干视野进行观察、拍照。该实验至少做 3 次。

1.3.4 检测单克隆细胞系迁移能力的变化 用各单克隆细胞株铺 6 孔板,密度为 90%左右,待细胞全部贴壁后(大约 6 h),用 100 μ L 的枪头在 6 孔板底部划一条直线,在显微镜下拍照,记为 0 h。此时,将细胞培养基改为不含血清的 DMEM 继续培养。24 h 后拍照,记为 24 h。处理 3 次拍照的图片,分析细胞迁移能力的变化。该实验至少做 3 次。

1.3.5 引物合成 为了检测被 pU21 质粒捕获的基因是什么,在 pU21 质粒上设计了 2 条特异性引物用于做 5'-Full RACE 实验,Z1:gcgttaccacaacttaatcg;Z2:tgtgagcgagtaacaacc。

1.3.6 5'-Full RACE 实验、T 克隆及基因测序 按照 Trizol 试剂盒提细胞总 RNA 的方法提取各单克隆稳定细胞的总 RNA。提取完毕后,用 1%的琼脂糖凝胶检测 RNA 的质量,然后测总 RNA 的浓度,取 1 μ g 总 RNA 进行去 DNA 处理后用以后续的 5'-Full RACE 实验。按照 Takara 公司 5'-Full RACE 试剂盒中的操作步骤进行 5'-Full RACE 实验。该实验至少做 3 次。

1.4 统计学分析

所得数据均采用 SPSS 21.0 统计软件处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Tukey 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 获得了稳定转染 pU21 质粒的单克隆细胞系

为了获得稳定转染捕获载体 pU21 质粒的单克隆细胞系,pU21 质粒通过 Lipofectamine2000 转染到肝癌细胞 SMMC7721 细胞中,并用 G418 和有限稀释法进行筛选。1 个月,获得了很多单克隆细胞系,并依次命名为 A1、A2、A3、A4、A5、A6 等,同时,还获得了已经是单克隆细胞系的第 2 次单克隆筛选的细胞系,如 A551、A552、A553、A554 等。

2.2 Transwell 小室实验检测单克隆稳定细胞系侵袭能力的变化

采用 Transwell 小室实验检测稳定转染 pU21 质粒的单克隆细胞系侵袭能力的变化。分析侵袭细胞数发现,与未转染的染 pU21 质粒的 SMMC7721 细胞[(127.33 $\pm$ 12.58)个]相比,这些单克隆细胞系中,有的侵袭能力明显增强,如 A26 [(431.67 $\pm$ 19.01)个]、A55[(280.33 $\pm$ 26.10)个]、A56[(250.33 $\pm$ 35.64)个]、A59[(258.67 $\pm$ 32.31)个];有的侵袭能力明显减弱,如 A16[(30.67 $\pm$ 9.45)个]、A18[(42.67 $\pm$ 9.71)个]、A28 [(49.00 $\pm$ 7.55)个]($F=132.819$, $P=0.000$; $P=0.001$, $P=0.004$, $P=0.008$),如图 2 所示。

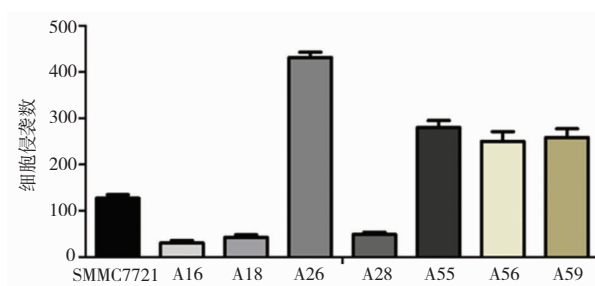
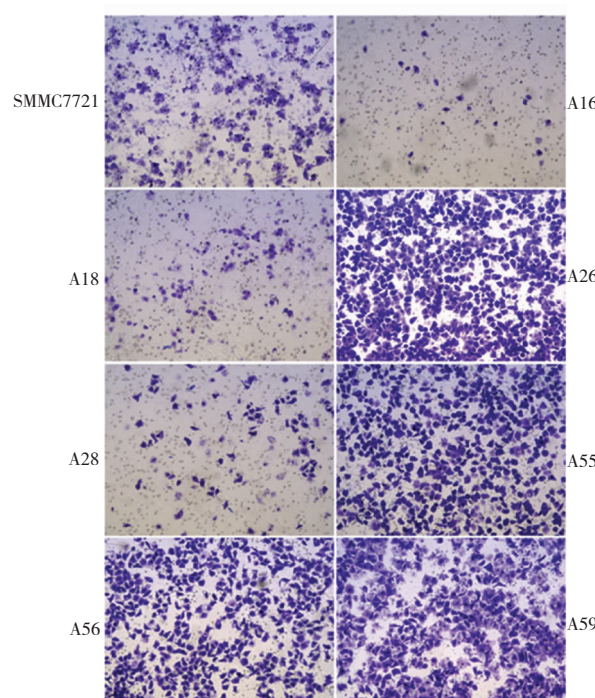


图 2 Transwell 小室实验检测稳定转染 pU21 质粒的单克隆细胞系侵袭能力的变化 (200 $\times$)

Fig.2 Invasion abilities of cell lines checked with transwell assays (200 $\times$)

2.3 划痕实验检测单克隆稳定细胞系迁移能力的变化

采用划痕实验检测稳定转染 pU21 质粒的单克隆细胞系迁移能力的变化,分析细胞的相对迁移距离[相对迁移距离比=(0 h 距离-24 h 距离)/0 h 距离]发现,与未转染 pU21 质粒的 SMMC7721 细胞(0.302 $\pm$ 0.015)相比,这些单克隆细胞

系中,有的迁移能力明显增强,如 A26(0.557 ± 0.075)、A55(0.671 ± 0.117)($F=35.910$; $P=0.003$, $P=0.000$);有的侵袭能力减弱,如 A16(0.175 ± 0.045)、A18(0.158 ± 0.008)、A28(0.211 ± 0.053)($F=35.910$; $P=0.482$, $P=0.110$, $P=0.482$),如图 3 所示。

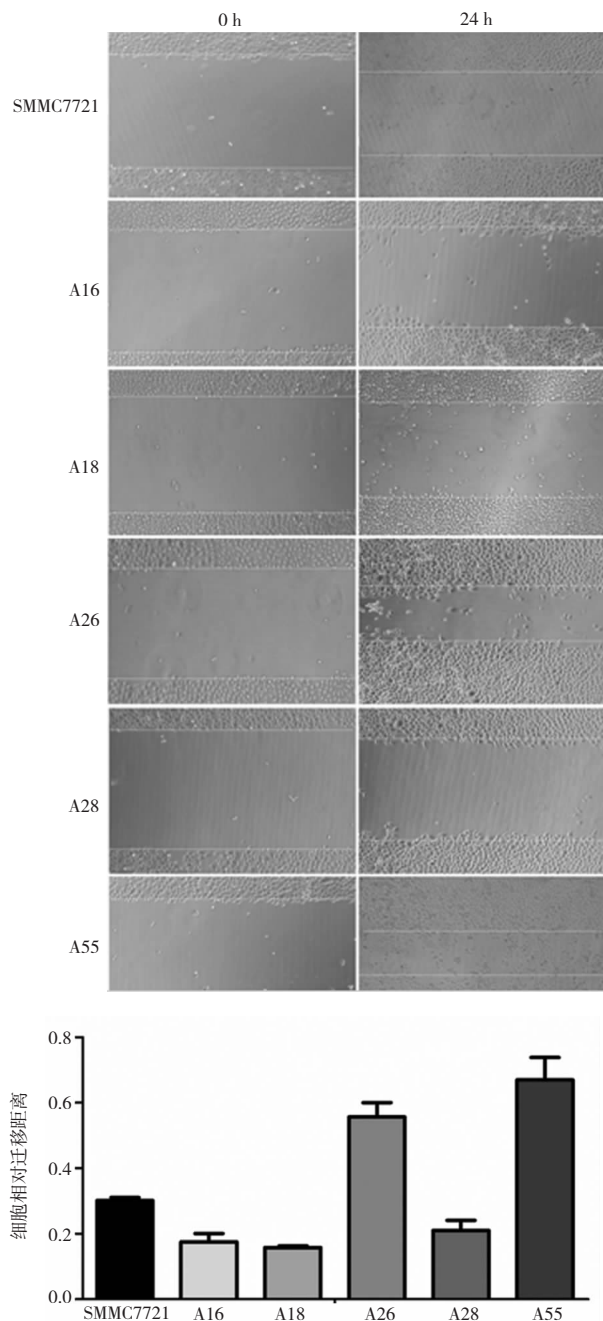


图3 划痕实验检测稳定转染 pU21 质粒的单克隆细胞系迁移能力的变化 (200 ×)

Fig.3 Invasion abilities of cell lines checked with wound healing assays (200 ×)

2.4 5'-Full RACE 实验及 T 克隆及基因测序确认被 pU21 质粒捕获的基因

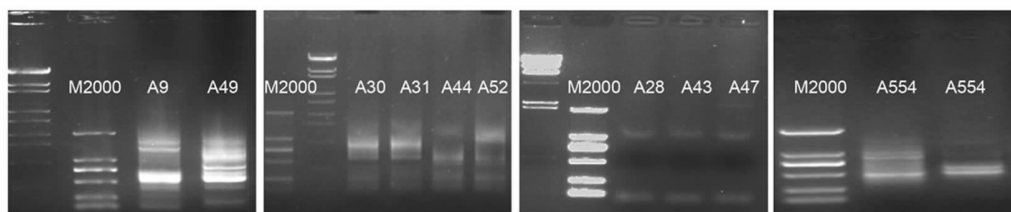
通过 Transwell 小室实验和划痕实验,获得了转染 pU21

质粒后侵袭能力增强、减弱的细胞系。为了检测这些单克隆细胞系中哪个基因被 pU21 质粒“捕获”,采用了 5'-Full RACE 实验,在 A9、A28、A30、A31、A43、A44、A47、A49、A52、A554 细胞株中得到了 DNA 片段(图 4A)。TA 克隆实验将这些片段连接在 TA 克隆上进行基因测序。在 NCBI-BLAST 的进一步基因比对中发现,A30 和 A31 克隆测出的碱基序列相同,两者为同一克隆,并且碱基所对应的基因没有特异性。A554 克隆测出的碱基序列所对应的基因具有特异性,为 LINC00052 基因的一部分碱基(图 4B),并且通过生物信息学进一步比对发现,pU21 质粒在 LINC00052 基因中的插入位置为 LINC00052 基因第一个外显子的后面(图 4C)。同时 RT-PCR 实验显示,与 SMMC7721 细胞相比,LINC00052 在 A554 中表达下降(图 4D)。

3 讨论

肝癌的发病率在全世界固体肿瘤中排第 5 位,但其死亡率却排在第 3 位^[8],肝癌细胞的侵袭和转移是最要的原因。随着生物信息学和生物技术的发展,目前常用于寻找与肿瘤转移有关基因的方法包括基因芯片和蛋白质芯片,这与芯片技术有高通量、低误差、耗时少等优点有关。然而,芯片技术也存在局限性,如得到的数据庞大、费用高、获得组织的来源较困难,或者得到的数据不具备普遍性、不能直接证明基因的作用机制,寻找到的差异蛋白与肿瘤的转移有无关系还需要大量的实验证明等。因此,在肿瘤发生发展机制的研究中,研究者不断寻找新的研究技术,其中一个就是基因捕获技术。基因捕获技术虽然是在 1989 年才发明的,但是它已经广泛运用于动植物的研究中,如用基因捕获技术构建水稻突变体库^[9]、鼠源新基因 Ayu 17-449 的克隆^[10]及成体干细胞的捕获及鉴定^[10]等。

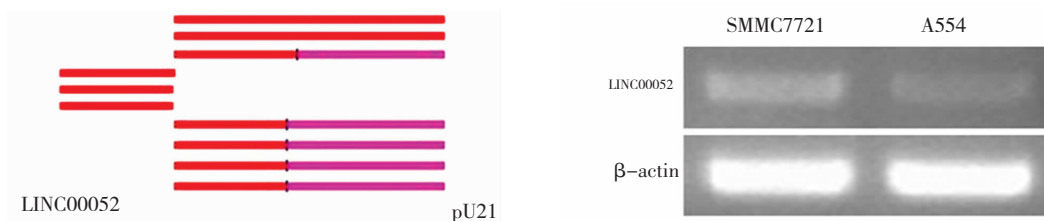
本实验将捕获载体 pU21 质粒转染到肝癌细胞 SMMC7721 中,通过 G418 和有限稀释法筛选出单克隆稳定细胞系,用 Transwell 小室实验和划痕实验检测这些单克隆细胞侵袭和迁移能力的变化,并得到与 SMMC7721 细胞相比侵袭和迁移能力发生改变的单克隆细胞系。通过 5'-Full RACE 实验、T 克隆及基因测序检测这些细胞系中被 pU21 质粒捕获的基因,发现在 A554 细胞系中被 pU21 质粒捕获的基因是 LINC00052。这些实验数据表明,基因捕获技术为肝癌迁移相关基因的筛选提供了有用的方法。



A. 5' -RACE 实验在各细胞株中得到的 DNA 片段



B. A554 细胞株得到的 DNA 片段测序结果



C. pU21 质粒插入基因组中的位置检测

D. RT-PCR 检测 LINC00052 在 A554 细胞株中的表达

图 4 pU21 质粒“捕获”基因的鉴定

Fig.4 Identification of genes which captured by pU21 plasmid

参 考 文 献

- [1] Gossler A, Joyner AL, Rossant J, et al. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes[J]. Science, 1989, 244(4903): 463-465.
- [2] Springer PS. Gene traps: tools for plant development and genomics [J]. Plant Cell, 2000, 12(7): 1007-1020.
- [3] Fobert PR, Miki BL, Iyer VN. Detection of gene regulatory signals in plants revealed by T-DNA-mediated fusions[J]. Plant Mol Biol, 1991, 17(4): 837-851.
- [4] Kerthmdit S, De Greve H, Deboeck F, et al. In vivo random beta-glucuronidase gene fusions in Arabidopsis thaliana[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(12): 5212-5216.

- [5] Abuin A, Hansen GM, Zambrowicz B. Gene trap mutagenesis[J]. Handb Exp Pharmacol, 2007(178): 129-147.
- [6] Tang H, Araki K, Yamamura K. Cloning and expression analysis of a murine novel gene, Ayu 17-449[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(5): 413-419.
- [7] 黄婷婷, 田园园, 张磊, 等. 嘌呤霉素抗性基因捕获载体的构建及在细胞中的功能验证[J]. 医学分子生物学杂志, 2009, 6(6): 490-493.
- [8] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [9] 李素一. 基因捕获技术及其在水稻突变体库构建上的应用[J]. 现代农业科技, 2009, 6(6): 490-493.
- [10] 王明科, 邹仲敏, 罗成基. 基因捕获成体干细胞及鉴定的初步研究[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(2): 112-116.

(责任编辑: 张辉洁)