

肾胚细胞瘤原癌基因 *novC* 在 tTA 调控系统中的表达*

罗怡珊¹ 熊克娟¹ C. Martinerle² B. Perbal³

¹(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

²(法国国家科研中心居里研究所 91405 法国)

³(巴黎第七大生物化学系 巴黎 D-7 法国)

摘 要 *nov* 基因与肾母细胞瘤密切相关,在肾母细胞瘤细胞中大量表达,而在正常的成年肾中不表达。通过将 Bujard's tTA 调控系统引入 QT6 细胞系中,同时将 *novC* 基因克隆到 pUHD10-3 质粒中,与 pUHD-tTA 质粒共转染细胞,诱导 *novC* 大量表达(其分子量约为 48kD),建立了使 *nov* 基因大量表达的细胞系统,为研究 *novC* 基因对细胞的调控机制建立了体外细胞模型系统。

关键词 Bujard's tTA 调控系统,原癌基因 *novC*, 表达

分类号 Q753 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0083-86

由成髓细胞白血病相关病毒(Myeloblastosis-associated viruses, MAVs)诱导的禽类肾胚细胞瘤与人类 Wilms' 肿瘤有非常相似的组织病理学特征,是 Wilms' 肿瘤的一个极好的动物模型^[1],在以 MAV 诱导的鸡肾母细胞瘤为人类 Wilms' 肿瘤的动物模型的研究中还发现了一例上游缺失 29bp 的 *novC* 基因($\Delta novC$)。与随后发现的人类肾母细胞瘤即 wilms' 肿瘤相关基因 *novH* 同源性达 90% 以上。*novC* 基因(Nephroblastoma overexpressed gene)被证实为禽肾胚细胞瘤的原癌基因,*novC* 基因的 cDNA 为 2.2kb,编码一个富含半胱氨酸的分泌性蛋白^[4],在所有的肾胚细胞肿瘤中大量表达,而在正常的成年肾中不表达^[2]。因此研究 *novC* 基因大量表达后对细胞生成的影响,将对研究人类 Wilms' 肿瘤 *novH* 基因有着重要的意义。

Bujard 等以 pUHD10-3 作为基础质粒,构建了由四环素(Tc)调控的 pUHD-tTA (Transcriptional transactivator)以及质粒 pUHC-Luc(Luciferase),作为报道质粒的真核细胞表达系统在 Tc 反式调控下,诱导外源基因 100~1000 倍表达,因此是一个极好的研究目的基因的表达系统^[3]。本实验成功地将这一系列引入 QT6 细胞系中,同时将 *novC* 克隆到 pUHD 质粒中,受 pUHD-tTA 质粒调控而大量表达。这为研究 *nov* 基因大量表达后对细胞生长的影响提供了一个成功的表达系统。

1 材料方法

1.1 细胞和试剂

细胞、质粒及抗血清均由法国居里所肿瘤病毒学和分子生物学实验室提供,所用的细

* 本实验在法国国家科研中心居里研究所肿瘤病毒学和分子生物学实验室及巴黎第七大生物化学系完成,获中国科学院留学基金资助。

收稿日期:1997-07-29,修回日期:1998-02-25。

胞为 QT6 细胞系,其基础培养基为 DMEM,另含 2% 的鸡血清和 5% FCS。实验所需的酶和反应试剂均购自 Europe technic 及 Life Science 公司。实验方法参考文献[5]。

1.2 *novC* 基因克隆

按常规方法将 *novC* 基因和缺失了上游片段的 *nov* 基因, 2.0kb 和 (Δnov , 1.7kb) 分别插入 pUHD10-3 质粒的 *EcoRI* 位点构建重组质粒, *nov* 基因和 Δnov 基因来自 pCB6/*novC* 和 pCB6/ Δnov 重组质粒。

1.3 在 QT6 细胞中建立 Bujard's tTA 调控系统

用 Lipofectin 方法将 pUHD-tTA、报道质粒 pUHD-Luc 和校正质粒 RSV- β -gal 共转染 QT6 细胞, 37℃ 培养, 24h 后加 Tc(四环素) 1 μ g/mL, 48h 后换无 Tc 培养基, 72h 后检测 Luciferase 活性, 从而反应出 pUHD-tTA 质粒瞬间诱导 Luciferase 的表达情况。

1.4 转染细胞和 ECL-Western blot 分析

同上述方法将重组质粒 pUHD-*novC* 和 pUHD-tTA 共转染 QT6 细胞, 72h 后按文献[5]中方法提取细胞蛋白, 然后进行 ECL-Western blot 分析, ECL-Western blot 是一种非放射性光敏显影检测特异抗原的新方法, 详见 Life-Science 公司产品操作指南, 通过 HRP—标记的第二抗体与抗 Nov 蛋白的第一抗体 C26F 反应, 使含有 Nov 蛋白的带显影 (C26F 抗体是 *nov* 基因的一个片段在昆虫细胞表达后, 免疫兔子后得到的抗血清)。

2 结 果

2.1 重组质粒的构建

用 *EcoRI* 酶切 pCB6/*novC* 和 pCB6/ $\Delta novC$ 重组质粒, 获得 *novC* 基因和 $\Delta novC$ 基因, 然后插入到 pUHD10-3 质粒的 *EcoRI* 位点, 如图 1。选择抗青霉素菌落, 并用细菌原位杂交法和 *HindIII* 酶切进一步选择阳性和正向克隆株, 根据 *nov* 基因的 *HindIII* 位点, 从 10 个菌落酶切结果可知获得了 5 个阳性克隆株。其中 10 号为 pUHD/ Δnov 正向重组质粒, 11 号为 pUHD/*nov* 正向重组质粒, 如图 2。

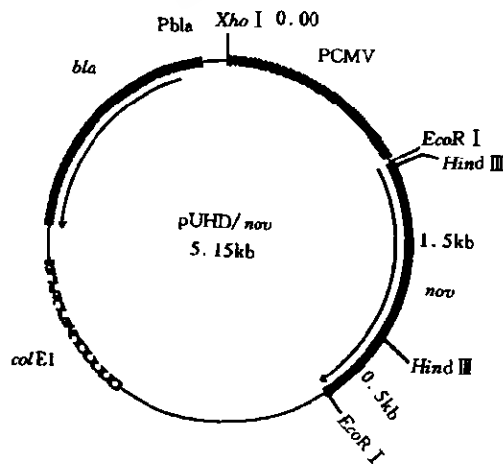


图 1 重组质粒 pUHD/*nov* 图谱

Fig. 1 Recombinant plasmid pUHD/*nov* map

2.2 Bujard tTA 调控系统在 QT6 中的表达

pUHD-tTA 质粒和 pUHD-luc 质粒共转染细胞, 质粒 pUHD-tTA 的表达产物 tTA 蛋白对质粒 pUHD13-3 的 *luc* 基因的调控原理如图 3 所示, 同时用 RSV- β -gal 作为校正质粒共转染细胞, 72h 后裂解细胞, 离心后取上清, 分别检测 Luciferase 活性和 β -gal 活性, β -gal 活性用于校正 Luciferase 值, 如表 1 所示。

表 1 中当有 tTA 质粒存在时, 随着 pUHD-luc 质粒的浓度提高 Luciferase 的活性的增高是未加 tTA 质粒样品 10~100 倍。说明 tTA 调控系统在适合的条件能够在 QT6 细胞中高效工作, 可以用来调控目的基因, 使之高效表达。

图 2 重组质粒的 *Hind* III 酶切分析

Fig.2 Restriction analysis of recombinant plasmid digested by *Hind* III

1. λ DNA + *Hind* III marker 2. ~4, 8. Negative clone
6, 7, 9, pUHD/ Δ *nov* (opposite orientation)
10. pUHD/ Δ *nov* (positive orientation)
11. pUHD/*nov* (positive orientation)
12. pUHD + *Hind* III
14. pUHD10-3 plasmid

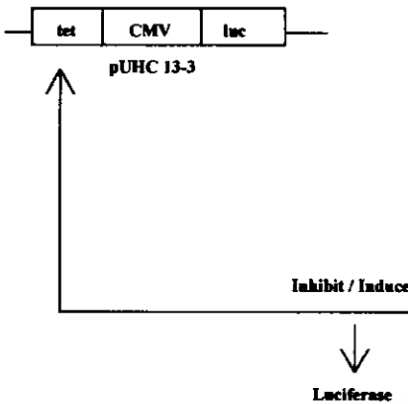
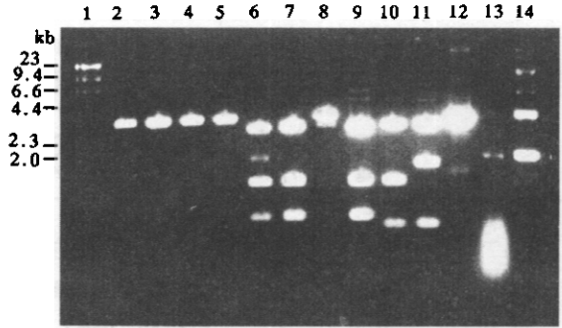


图 3 tTA 调控系统

Fig.3 tTA regulation system

NovC 蛋白 C26F 抗体检测 Nov 蛋白带(图 4),从结果可知,受 tTA 质粒调控,分子量约为 48kD 的 Nov 蛋白被诱导而大量表达,而缺失基因 Δ Nov 不表达。没有加入 tTA 质粒的细胞也不表达 Nov 蛋白。

3 讨论

从实验结果可知 tTA 调控系统能在 QT6 细胞中高效表达,而且也能诱导目的基因 *novC* 的大量表达,tTA 调控系统是 Bujard 等近年来建立的一个诱导目的基因提高表达量 100~1000 倍,并能在多种真核细胞中表达的理想系统。

本实验在 QT6 细胞中成功地

2.3 *novC* 基因的表达及检测

与 Luciferase 表达相同的方法表达目的基因 *novC*,将 pUHD-tTA 和 pUHD/*novC* 共同转染 QT6 细胞,24h 后和 48h 后分别加 Tc (1 μ g/mL) 和不加 Tc,72h 后停止培养,裂解细胞,提取细胞蛋白,进行 ECL-Western blot,用抗

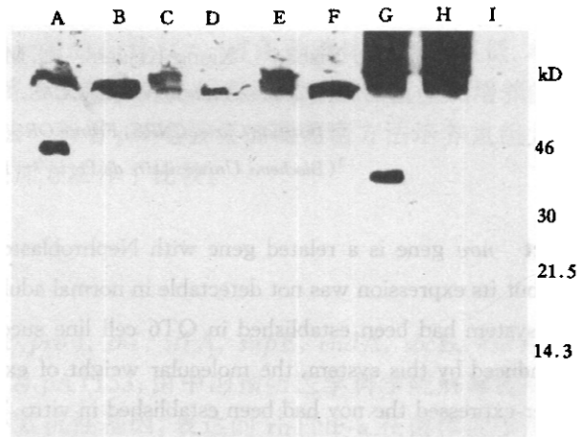


图 4 tTA 调控系统诱导 *nov* 基因的表达

Fig.4 Expression of *nov* induced by tTA regulation System
UHD-tTA, pUHD/*nov*, B. pUHD/*nov*, C. pUHD-tTA, pUHD/ Δ *nov*,
D. pUHD/ Δ *nov*, E. pUHD/*nov*, F. pUHD/ Δ *nov*,
G. Positive control, *nov* protein expresde in BM₂ cell,
H. Negative control, I. Standard MW

表 1 由 tTA 调控系统诱导表达的萤光素酶活性

Table 1 Luciferase expression of pUHC13-3 induced by Tc regulation system

pUHD15-1	pUHC13-3	RSV	pUHD10-3	Tetracycline($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Without tetracyclin			
				hydrochloride			hydrochloride			
				Luciferase	$\beta\text{-gal}$	Value corrected	Luciferase	$\beta\text{-gal}$	Value corrected	
tTA	luciferase	$\beta\text{-gal}$								
/ μg	/ μg	/ μg	/ μg							
1	10	—	2	2	176	0.090	97	167	0.052	157
2	—	0.5	2	11.5	8231	0.107	374	171	0.240	35
3	—	1	2	11	22407	0.187	5897	13789	0.145	4596
4	—	2	2	10	12039	0.110	5468	15640	0.150	5214
5	10	0.5	2	1.5	10045	0.087	5581	942727	0.089	51798
6	10	1	2	1	6305	0.048	7005	1002767	0.050	946007
7	10	2	2	—	26394	0.088	14663	1744338	0.049	1744338

建立了 Bujard's tTA 调控系统,为探讨 *novC* 的表达在肿瘤形成过程中的作用奠定了前期工作基础。因缺失基因 Δnov 是不能表达产物的,它是否在肿瘤形成过程中起某种作用,还有待进一步实验证实。

参 考 文 献

- [1] B. Perbal. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 1994, 5: 589~613
- [2] C. Martineris, E. Viegas-Pequigot, L. Guenard. *Oncogene*, 1992, 7: 2529~2534
- [3] M. Gossen, H. Bujard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 5547~5551
- [4] V. Jolit, C. Martinerie, G. Dambrine. *Mol-Cell Biol.*, 1992, 12: 10~21
- [5] B. Perbal, A. Practical Guide to Molecular Cloning, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York. 1988

Expression of Nephroblastoma Proto-oncogene *nov C* Induced by tTA Regulation System*

Luo Yishan¹ Xiong Kejuan¹ C. Martinerle² B. Perbal³

¹(Wuhan Institute of Virology, CAS, Wuhan, 430071)

²(Institute Curie, CNRS, France ORSAY, 91405, UFR de)

³(Biochemi Universitaire de Paris 7 - D, France)

Abstract *nov* gene is a related gene with Nephroblastoma, over-expressed in all Nephroblastoma tested, but its expression was not detectable in normal adult kindeys. In this paper, Bujard's tTA regulation system had been established in QT6 cell line successfully, and *novC* was expressed at high levels induced by this system, the molecular weight of expressed Nov protein is 48 kD, so, one cell line over-expressed the *nov* had been established in vitro. This is necessary for the study of the regulation principle of *nov* gene in the cell.

Key words Bujard's tTA regulation system, proto-oncogene, *novC* expression

* This experiment has got the fund by Chinese Academy of Science for studying abroad. It is made part of the works in the Lab. of tumour virology and molecular biology institute Curie France Research Center of Sciences. Biochemis Universitaire de Paris 7-D.