

MYETS1 基因的原核表达及其在多发性骨髓瘤细胞系中的缺失分析

王建军, 洪丽萍, 潘艺, 刘水平, 吴坤陆, 汤立军

(中南大学生物科学与技术学院分子生物学研究中心, 长沙 410078)

[摘要] 目的: 初步探讨 MYETS1 基因在多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 及 KM3 中表达下调机制及进行 MYETS1 基因原核表达分析。方法: 运用 FISH 技术检测两株 ARH-77 和 KM3 细胞系染色体 13q14.3 区域缺失情况; RT-PCR 扩增 MYETS1 基因, 并构建 pGEX-4T-MYETS1 重组载体。结果: ARH-77 和 KM3 细胞系中 MYETS1 基因所在染色体 13q14.3 区域获得未缺失阳性信号; 生物信息学分析 MYETS1 基因与 LECT1 基因序列同源, 但通过 RT-PCR 实验证实 MYETS1 基因开放阅读框与 LECT1 基因开放阅读框不一致; 成功获得 MYETS1 基因原核表达蛋白产物。结论: ARH-77 和 KM3 两株骨髓瘤细胞系中 MYETS1 基因所在染色体 13q14.3 区域未发生缺失, 其多发性骨髓瘤细胞中表达下调可能存在其他机制。

[关键词] 多发性骨髓瘤; 13q14.3 缺失; MYETS1 基因; 重组表达

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.01.005

MYETS1 recombinant expression in prokaryotic cells and deletion analysis in multiple myeloma cell lines

WANG Jianjun, HONG Liping, PAN Yi, LIU Shuiping, WU Kunlu, TANG Lijun

(Molecular Biology Research Center, Institute of Life Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, China)

ABSTRACT

Objective: To explore the down-expression mechanism of MYETS1 gene in multiple myeloma cell lines ARH-77 or KM3, and express MYETS1 gene in prokaryotic express system.

Methods: The region of chromosome 13q14.3 in ARH-77 and KM3 was detected by FISH. MYETS1 gene was amplified by RT-PCR and cloned into prokaryotic expression vector pGEX-4T.

Results: Positive consequence was acquired in 13q14.3 where MYETS1 located by FISH in ARH-77 and KM3 cell lines. Bioinformatics indicated highly sequence homology between MYETS1 and LECT1, but excluded the homology of open reading frame between MYETS1 and that of LECT1 by RT-PCR. Myets1 protein was expressed and harvested successfully

Conclusion: The region of chromosome 13q14.3, where MYETS1 gene located, was not defected in ARH-77 and KM3 cell lines. Down-expression of MYETS1 might be regulated by other mechanisms in multiple myeloma cell lines.

KEY WORDS

multiple myeloma; 13q14.3 deletion; MYETS1; recombinant expression

收稿日期 (Date of reception): 2011-12-31

作者简介 (Biography): 王建军, 硕士研究生, 主要从事白血病发生的分子机制及巨噬细胞先天性免疫机制研究。

通信作者 (Corresponding author): 汤立军, Email:tljxie@csu.edu.cn

基金项目 (Foundation items): 国家自然科学基金 (30400529,81071326), 湖南省杰出青年基金 (04JJ1006), 中南大学米塔尔学生创新基金 (08MX26), 2010 年中南大学第 6 批教学改革研究立项项目。 This work was supported by the National Natural Science Foundation (30400529,81071326), Hunan Provincial Natural Science Fund for Distinguished Young Scholars(04JJ1006), Mittal Student Innovation Projects of Central South University (08MX26), and the 6th Teaching Reform Project of Central South University in 2010.

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是以骨髓中克隆性浆细胞恶性增殖和异常积累为特征的肿瘤,在中老年中发病率较高。MM发病机制尚未完全清楚,肿瘤在发生发展过程中伴随着多种瘤基因的扩增、过度表达及抑瘤基因的缺失、突变或低表达^[1-2]。多发性骨髓瘤病人的13号染色体14.3区缺失的概率很高,具有独立的预后判断价值^[3]。大量研究表明在13q14.3区域存在众多的抑瘤基因,如Rb等^[4]。Zojer等^[5-6]使用针对13q14常见缺失位点RB-1和D13S319的探针进行检测,两者缺失率分别为46.2%和38.9%。汤立军等^[7]通过疾病基因定位分析锁定了MM患者位于13q14.2-13q14.3及13q21.1缺失热点区,通过生物信息学分析找到了这段缺失热点区内的表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs);半定量RT-PCR方法分析表明缺失热点区内的EST H86826在正常人骨髓、多发性骨髓瘤细胞系ARH-77和KM3中存在表达差异;然后利用EST H86826搜索到美国Invitrogen公司IMAGE223589克隆并测序得到一条长1495 bp的核苷酸序列,Genbank注册被命名为MYETS1。本研究应用荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)技术检测2株多发性骨髓瘤细胞系ARH-77和KM3染色体13q14.3区域的缺失情况,进一步验证了MYETS1基因的表达,并原核重组表达了MYETS1基因的开放阅读框。

1 材料与方法

1.1 材料

ARH-77细胞系、KM3细胞系为中南大学生物科学与技术学院分子生物学研究中心自存,用含10%小牛血清的RPMI1640培养基,在5% CO₂, 37℃条件下培养;分离单个核细胞的正常人外周血,来自中南大学湘雅第三医院。

1.2 探针

检测探针为BAC探针库中针对13q14.3区域序列的特异性DNA探针chr13-321 RP11-457D13;对照探针为BAC探针库中针对13q22.1

序列特异性DNA探针chr13-64 RP11-142F15,探针于-20℃保存备用。BAC探针由中南大学医学遗传国家重点实验室提供。

1.3 引物

根据已报道的MYETS1基因及Genbank中注册的LECT1基因7个外显子序列设计引物见表1。

1.4 主要试剂

正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖和碘化丙啶购于美国Sigma公司;RPMI1640干粉和小牛血清购于美国GIBCO公司;Taq DNA聚合酶, dNTPs, EcoRI, 5' RACE试剂盒购于中国大连宝生物工程有限公司(TaKaRa);RNA提取试剂盒、少量提取质粒试剂盒和PCR产物回收试剂盒购于美国Qiagene公司。

1.5 RNA提取

按照TRIzol试剂盒说明书进行提取细胞总RNA, -80℃保存备用。

1.6 RT-PCR及产物凝胶电泳

30 μL反转录体系中含30 pmol/L oligo(dT)₁₅ 1 μL, 2.5 mmol/L dNTPs混合物4 μL, RNA酶抑制剂30 U, AMV反转录酶10 U, 5×RT缓冲液6 μL, 1 μg模板RNA, 37℃水浴1 h合成cDNA; 50 μL PCR体系中含cDNA 5 μL, TaqDNA聚合酶2.5 U, 10 μmol/L上游引物1 μL, 10 μmol/L下游引物1 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, 无核糖核酸酶水33 μL, 10×PCR缓冲液5 μL, 预变性94℃ 2 min, 然后94℃变性30 s, 52℃退火30 s, 72℃延伸35 s, 共30个循环, 最后72℃延伸5 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。

1.7 MYETS1基因原核表达分析

将MYETS1基因编码114个氨基酸的开放阅读框克隆到pGEX-4T原核表达载体, 利用限制性内切酶酶切及DNA序列测定鉴定阳性重组子。取10 μL重组菌液, 接种入1 mL含氨苄青霉

表1 MYETS1基因及LECT1基因相关引物

Table 1 Related primers of MYETS1 and LECT1 genes

引物名称	引物序列	扩增产物大小
MYETS1 P1	5'-CCCTTTAGGTCAGCTAATTAGTGGC-3'	—
MYETS1 R1	5'-CTGTCCATCCATAGTCTAACCAGAG-3'	MYETS1P1与MYETS1R1扩增产物146 bp
MYETS1 P2	5'-TGGTTAGACTATGGATGGACAGGAG-3'	—
MYETS1 R3	5'-CAGTTACCATTGGATGTGTGTGAG-3'	MYETS1P2与MYETS1R3扩增产物1221 bp
LECT1e2e3R1	5'-GGTCTCCAAGTTGTTCCAGCGTCT-3'	—
LECT1e2e3P1	5'-AGGTGGGAGCCGTGGTCTCATTTC-3'	e2e3P1与e2e3R1扩增产物179 bp
LECT1e2e3P2	5'-GAAGGGGAGCGACAGTCACATTAC-3'	e2e3P2与e2e3R1扩增产物106 bp
LECT1e3e4LP1	5'-GGAAATAGACGCTGGGAACAAC-3'	—
LECT1e3e4LR1	5'-TAAGCCAGAAAAATAGGAAGGTC-3'	e3e4LP1与e3e4LR1扩增产物335 bp
LECT1e1e7P1	5'-CTCCGACAAAGTTCCTATGCCCTG-3'	—
LECT1e1e7R1	5'-CTTCTGGCAGTGGGTAGTCCGC-3'	e1e7P1与e1e7R1扩增产物871 bp

素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 取 50 μL 过夜培养物接种入 5 mL 含氨苄青霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2 h 以上至对数生长期 (OD_{600nm}=0.8); 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L 继续培养 4 h 后, SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定表达产物。以转 pGEX-4T 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 在同等条件下诱导作为阴性对照。

1.8 FISH 分析

分别取 1×10^6 个 ARH-77 和 KM3 细胞离心去上清, 加入 5 mL 0.075% KCl 低渗液, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水箱中孵育 20 min, 缓慢加 2 mL 固定液 (甲醇: 冰醋酸=3:1) 于试管中混匀, 离心后去上清, 重悬细胞, 室温下缓慢加入 5 mL 固定液固定 30 min, 气干法滴片, 晾干后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温的 $2 \times \text{SSC}$ 30 min, 70%, 85%, 100% 乙醇室温梯度脱水, 每梯度 2 min, 晾干, 加入 70% 甲酰胺 72 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min, 70%, 85%, 100% 乙醇室温梯度脱水, 每梯度 2 min, 晾干; 采用 BAC 探针库特异性 DNA 探针 chr13-321 RP11-457D13 和 chr13-64 RP11-142F15, 暗环境下取 4 μL 探针与 8 μL 杂交缓冲液混匀, 72 $^{\circ}\text{C}$ 水浴变性 5 min 后, 加入于 37 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 2 min 的玻片杂交区域内, 随即盖上盖玻片, 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内杂交过夜, 杂交后的标本经 50% 甲酰胺/ $2 \times \text{SSC}$ 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 洗片, 避光晾干

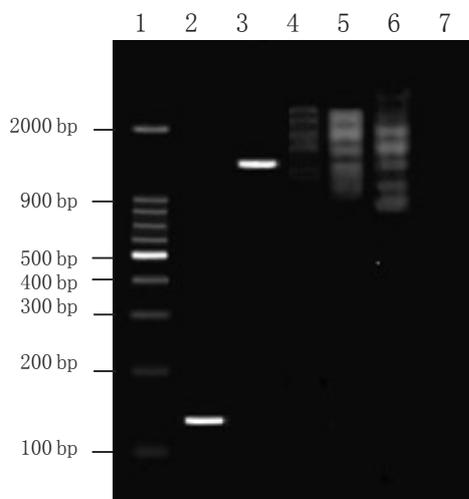


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果。1: 100 bp DNA ladder; 2: MYETS1 P1 与 MYETS1 R1 引物扩增产物 (146 bp); 3: MYETS1 P2 与 MYETS1 R3 引物扩增产物 (1221 bp); 4: LECT1 e2e3 P1 与 e2e3 R1 引物扩增结果 (179 bp); 5: LECT1 e2e3 P2 与 e2e3 R1 引物扩增结果 (106 bp); 6: LECT1 e3e4 LP1 与 e3e4 LR1 引物扩增结果 (335 bp); 7: LECT1 e1e7 P1 与 e1e7 R1 引物扩增结果 (871 bp)。

Figure 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product. 1: 100bp DNA ladder; 2: Amplified fragment with MYETS1 P1 and MYETS1 R1 primers (146 bp); 3: Amplified fragment with MYETS1 P2 and MYETS1 R3 primers (1221 bp); 4: Amplified fragment with LECT1 e2e3 P1 and e2e3 R1 primers (179 bp); 5: Amplified fragment with LECT1 e2e3 P2 and e2e3 R1 primers (106 bp); 6: Amplified fragment with LECT1 e3e4 LP1 and e3e4 LR1 primers (335 bp); 7: Amplified fragment with LECT1 e1e7 P1 and e1e7 R1 primers (871 bp).

后加 DAPI 复染; 用配有 DAPI/FITC/Texas 三色滤光镜 (OLYMPUS-BX51) 激发下观察细胞或染色体荧光杂交信号。对照探针信号标示为橘黄色, 检测 13q14.3 区域的特异性 DNA 探针信号标示为绿色。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增验证 MYETS1 基因与 LECT1 同源基因的关系

搜索 NCBI 数据库 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), 获得一条与 MYETS1 基因高度同源的 cDNA 序列 LECT1。RT-PCR 验证分析 MYETS1、LECT1 在外周血单个核细胞中的表达。凝胶电泳结果如图 1, MYETS1 基因在外周血单个核细胞中表达, 而 LECT1 基因在外周血单个核细胞中未检测到表达。

2.2 MYETS1 基因的原核表达

SDS-PAGE 分析结果显示, 经 IPTG 诱导的含重组质粒 pGEX-4T-114aa 的 *E. coli* BL21 与含空载体 pGEX-4T 的对照菌的蛋白相比, 在相对分子质量约 37 kD 位置上出现一条新条带, 与目的蛋白的相对分子质量大小基本一致 (图 2)。

2.3 FISH 技术分析 ARH-77 和 KM3 细胞系

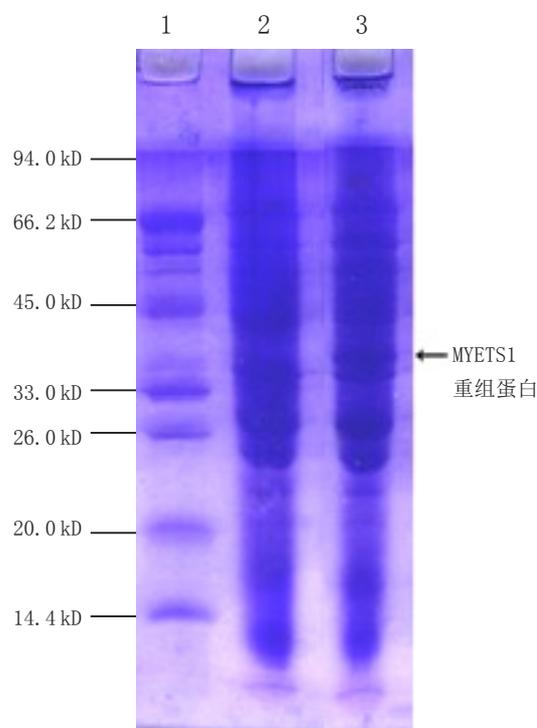


图 2 SDS-PAGE 分析 MYETS1 基因在 *E. coli* BL21 中的重组表达蛋白。1: Protein marker; 2: pGEX-4T 载体; 3: pGEX-4T-114aa 重组子。

Figure 2 SDS-PAGE analysis of MYETS1 recombinant protein in *E. coli* BL21. 1: Protein marker; 2: pGEX-4T vector; 3: pGEX-4T-114aa.

13q14.3 区域缺失

对照探针为针对 13q22.1 区域特异性 DNA 探针即 chr13-64 RP11-142F15, 在 ARH-77 和 KM3 细胞均有 2 个橘黄信号信号, 说明对照探针所针对的区域检测正常; 检测 13q14.3 区域的特异性

DNA 探针为 chr13-321 RP11-457D13, 在 ARH-77 和 KM3 细胞均有 2 个绿色信号, 表明 13q14.3 区域无缺失(图 3)。

3 讨论

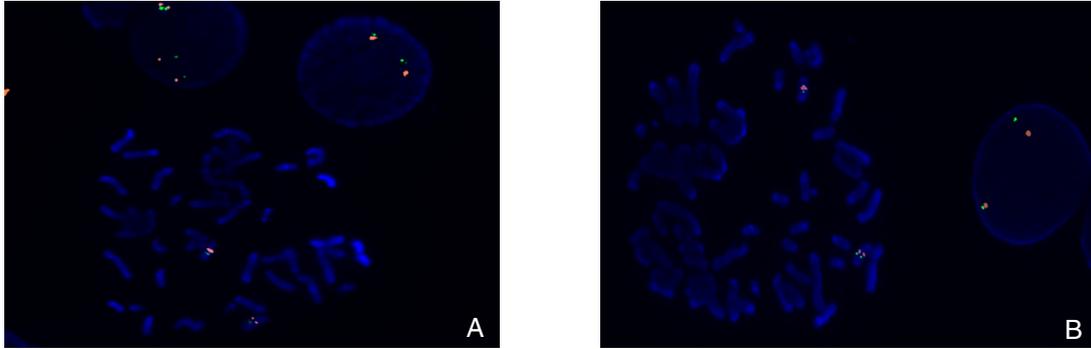


图 3 ARH-77 与 KM3 细胞 FISH 结果图。A:ARH-77 细胞; B:KM3 细胞。

Figure 3 FISH results of ARH-77 and KM3 cells. A:ARH-77; B:KM3.

Shaughnessy 等^[8-10]研究发现: 采用多种涵盖 13 号染色体长臂的探针研究 13 号染色体缺失, 发现多发性骨髓瘤患者存在 13 号染色体缺失, 两个最多见的丢失位点是位于 13q14 的染色体片段 D13S272(13q14.1) 和 D13S31(13q14.21)。亦有报道认为丢失 13 号染色体整个长臂或 13 号染色体完全缺失在多发性骨髓瘤患者中最常见^[11]。Königsberg 等^[12-13]研究表明染色体 13q14 缺失是与多发性骨髓瘤患者生存期相关的独立预后因素。本研究中以多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 和 KM3 为研究对象对 13q14.3 区域的缺失进行研究, 发现这两个多发性骨髓瘤细胞系中 13q14.3 区域未出现缺失, 表明多发性骨髓瘤发病不存在染色体 13q14.3 缺失因素。

研究^[4]发现在 13q14 存在大量的抑瘤基因, 故我们推测该区段可能存在多发性骨髓瘤抑瘤候选基因。从荧光原位杂交结果和 RT-PCR 的结果综合分析, 多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 和 KM3 的 13q14.3 未发生缺失, 而 MYETS1 在多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 和 KM3 中表达下调, 可能提示 MYETS1 在多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 和 KM3 中表达下调与 13q14.3 缺失并无直接关系。MYETS1 表达下调可能与其 5' 端启动子甲基化有关, 其与多发性骨髓瘤的相关性及其发病机制还有待进一步研究。

通过生物信息学分析发现与 MYETS1 基因高度同源的 Genbank 注册基因 LECT1。LECT1 是一种能编码糖基化跨膜蛋白, 促进软骨细胞生长并抑制血管生成的基因^[14-15]。本研究考虑 MYETS1 基因是否就是 LECT1 基因, 但两者的开放阅读框并不一致, LECT1 基因只有预测的外显子 3 存在于 MYETS1 基因的开放阅读框内。基于此, 本研究针对 MYETS1 基因与 LECT1 基因的 cDNA 序列设计

了多对引物进行 RT-PCR 验证, 经多次的实验重复, 结果表明 MYETS1 基因在人外周血中单个核细胞表达, 而人外周血中单个核细胞表达中未检测到 LECT1 cDNA。最后本研究将 MYETS1 基因的开放阅读框克隆到原核表达载体 pGEX-4T 中, 成功地表达出 MYETS1 蛋白。MYETS1 蛋白的表达将为后续 MYETS1 抗体制备及多发性骨髓瘤发病机制研究打下坚实基础。

参考文献

1. Matsui W, Wang Q, Barber, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1): 190-197.
2. Vallet S, Raje N. Bone anabolic agents for the treatment of multiple myeloma[J]. *Cancer Microenviron*, 2011, 4(3): 339-349.
3. Schmidt-Wolf IG, Glasmacher A, Hahn-Ast C, et al. Chromosomal aberrations in 130 patients with multiple myeloma studied by interphase FISH: diagnostic and prognostic relevance[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 167(10): 20-25.
4. Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, et al. Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma[J]. *Brain Dev*, 2011, 33(4): 353-356.
5. Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, et al. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization[J]. *Blood*, 2000, 95(6): 1925-1930.
6. Sagaster V, Ludwig H, Zojer N, et al. Bortezomib in relapsed multiple myeloma: response rates and duration of response are independent of a chromosome 13q-deletion[J]. *Leukemia*, 2007, 21(1): 164-168.
7. 汤立军, 胡维新, 石奕武, 等. 多发性骨髓瘤患者 13q14.3 区域一个候选抑瘤基因 MYETS1 的克隆与序列分析[J]. *生命科*

- 学研究, 2004, 8(3): 264-271.
- TANG Lijun, HU Weixin, SHI Yiwu, et al. Molecular cloning and sequence analysis of a candidate tumor sequence gene MYETS1 on Chromosome 13q14.3 of patients with multiple myeloma[J]. Life Science Research, 2004, 8(3): 264-271.
8. Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, et al. High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH[J]. Blood, 2000, 96(4): 1505-1511.
 9. Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, et al. Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II[J]. Br J Haematol, 2003, 120(1): 44-52.
 10. Shaughnessy J, Haessler J, Rhee F, et al. Testing standard and genetic parameters in 220 patients with multiple myeloma with complete data sets: superiority of molecular genetics[J]. Br J Haematol, 2007, 137(6): 530-536.
 11. Elnenaï MO, Hamoudi RA, Swansbury J. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma[J]. Genes Chromosome Cancer, 2003, 36(1): 99-106.
 12. Königsberg R, Zojer N, Ackermann J, et al. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(4): 804-812.
 13. Königsberg R, Ackermann J, Kaufmann H, et al. Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance[J]. Leukemia, 2000, 14(11): 1975-1979.
 14. Miura S, Mitsui K, Heishi T, et al. Impairment of VEGF-A-stimulated lamellipodial extensions and motility of vascular endothelial cells by chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitor[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(5): 775-788.
 15. Kim Y, De Zoysa M, Lee Y, et al. BRICHOS domain-containing leukocyte cell-derived chemotaxin I-like cDNA from disk abalone *Haliotis discus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(5): 899-902.

(本文编辑 彭敏宁)