

AFP 与 CEA 基因的启动子克隆及 肿瘤细胞特异性表达的研究

雷 文, 王世兵, 马步云, 叶 静, 夏玉龙, 王毅刚

(浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘 要: 为了研究 AFP 和 CEA 基因启动子的转录活性与肿瘤特异性, 本实验利用 PCR 技术扩增 AFP 和 CEA 基因上游序列, 并将其克隆到 pGL3-Basic 载体中构建 pGL3-AFP 和 pGL3-CEA 荧光报告质粒。将构建的 pGL3-AFP 和 pGL3-CEA 质粒分别与 pRL-TK 共转染人结肠癌细胞株 SW620、肝癌细胞株 Huh-7、肺癌细胞株 A549、宫颈癌细胞株 Hela、人肝正常细胞株 QSG-7701、人肺正常细胞株 Beas-2b, 用双荧光报告系统检测这两种质粒在不同细胞里的荧光活性表达。酶切和测序结果证实成功构建了双荧光素酶报告质粒 pGL3-AFP 和 pGL3-CEA, 双荧光素酶报告基因检测结果证明 AFP 和 CEA 均具有一定的肿瘤特异性。这些结果表明 AFP 和 CEA 均具有一定的肿瘤特异性, 为进一步研究 AFP 和 CEA 基因的表达调控机制和探讨靶向基因-病毒治疗提供依据。

关键词: AFP; CEA; 双荧光素酶报告基因; 转录靶向性

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是一种分子量为 150~300 kD 的糖蛋白, 45% 为蛋白质, 其它为岩藻糖, 甘露糖, 半乳糖以及唾液酸。CEA 的编码基因位于 19 号染色体。1965 年 Gold 和 Freedman 首先自人结肠癌组织发现, 是胚胎性致癌抗原^[1], 主要存在于胎儿消化道上皮组织、胰脏和肝脏, 正常成人血清中 CEA 含量极低。癌胚抗原是一个广谱性肿瘤标志物, 对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计是一个较好的肿瘤标志物^[2]。由于 CEA 的免疫原性很弱, 一般不能引起机体产生有效的免疫反应, 因此机体的免疫系统无法识别肿瘤细胞表面的癌胚抗原, 使肿瘤细胞逃避了免疫系统的杀伤。因此增强 CEA 的免疫原性, 诱导机体产生特异性的免疫反应成为肿瘤治疗的一个新的靶点。

甲胎蛋白(α -Fetoprotein, AFP) 是血清中一种 α 球蛋白, 分子量 6.8 kD, 从妊娠 6 周开始由卵黄囊

和胎儿肝产生, 13 周达到高峰, 胎儿出生后 3 个月至第二年逐渐降至成人水平并保持终身^[3-6]。AFP 主要起免疫抑制作用, 不仅是胎儿宫内发育状态的重要监测指标, 同时又是肿瘤组织产生的肿瘤标志物之一^[7-8], 因此在围产保健和肿瘤诊治方面有重要作用, 并已列常规检查。

肿瘤的靶向基因-病毒治疗是近年来兴起的肿瘤新疗法。该疗法是由中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所的刘新垣院士于 2001 年首次提出。其理念就是利用病毒在细胞中无限复制能力与一些抑癌基因的肿瘤杀伤力联合治疗肿瘤。我们将只特异性地在肿瘤细胞中复制而在正常细胞中不复制的腺病毒称为溶瘤腺病毒。因此, 增强溶瘤腺病毒的靶向性是改造病毒提高抑癌效率的关键。本实验利用 PCR 技术克隆 AFP 和 CEA 基因的启动子核心区到双荧光素酶载体中, 通过检测在该启动子驱动下的荧光素酶的表达活性来验证 AFP 和

收稿日期: 2011-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800093); 浙江省自然科学基金资助项目(Y2090935); 浙江理工大学科研启动基金(1016845-Y, 1016834-Y); 浙江省大学生科技创新计划资助课题(2010R406036)

作者简介: 雷 文(1986-), 女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的靶向基因-病毒治疗的研究。

通讯作者: 王毅刚, 电子邮箱: wangyigang43@163.com

CEA 启动子的肿瘤表达特异性,为今后进一步构建强复制力的溶瘤腺病毒、提高基因—病毒治疗的靶向性奠定基础。此外,本实验比较 AFP 与 CEA 这两个启动子在肿瘤细胞中的表达活性高低,为以后更好地选择正确的启动子来提高溶瘤腺病毒的扩增效率提供依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

a)细胞,菌株,质粒 大肠杆菌 DH5 α (TRANS),质粒 pGL3-Basic, pGL3-control 和 RL-TK 均由中国科学院生物化学与细胞生物研究所提供,人结肠癌细胞株 SW620,肝癌细胞株 Huh-7,肺癌细胞株 A549,宫颈癌细胞株 Hela,人肝正常细胞株 QSG-7701,人肺正常细胞株 Beas-2B 均为本实验室保存。

b)试剂 双荧光素酶检测试剂盒 (Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System, Promega); RT-PCR 试剂盒 (ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit, TOYOBO); DNA 小量抽提试剂盒 (Lifefeng), DNA 凝胶试剂盒 (AxyprepTM DNA Gel extraction kit, AXYGEn), DNA PCR 纯化试剂盒 (AxyprepTM PCR kit, AXYGEn); DNA ligation kit; DNA Ladder Marker (5K, 1.2K, TRANS) 和限制性内切酶。SYBR qPCR Mix (QPK201, TOYOBO); LipofectamineTM 2000 Reagent (Invitrogen); DMEM 培养基及胎牛血清。

c)仪器 5415R Centrifuge (Eppendorf), 7300 real-time PCR 仪 (Applied Biosystems)。

1.2 方 法

1.2.1 AFP 和 CEA 启动子的克隆

以本实验室原有的带 AFP 和 CEA 启动子的质粒 pCA13-AFP-MnSOD, pCA13-CEA-Trail 为模板,分别使用两端加有 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点的上下游引物,经 PCR 分别扩增获取两端含有 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点的 AFP 和 CEA 基因启动子片段 (反应参数为: 95 $^{\circ}$ C、5 min, 95 $^{\circ}$ C、45 s, 55 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、40 s, 30 个循环)。扩增产物纯化后分别经 *Hind* III/*Xho* I 双酶切后回收。

1.2.2 荧光素酶报告质粒 pGL3-AFP 和 pGL3-CEA 的构建

pGL3-Basic 经 *Hind* III 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切并回收得到 4801bp 的 pGL3-Basic 载体大片段。载体大片段分别与 1.2.1 中获得的 AFP 和 CEA 启动子片段经 DNA 连接酶连接并转化, 37 $^{\circ}$ C

培养 12 h 后挑取阳性克隆于 LB 琼脂糖液体培养基摇床培养 12 h 后抽取质粒, PCR 和双酶切鉴定重组子并测序, 将构建的分别含有 AFP 和 CEA 启动子的 pGL3-basic 命名为 pGL3-AFP 和 pGL3-CEA。

1.2.3 细胞瞬时转染及荧光素酶的检测

转染前一天将 Huh7、SW620、A549、Hela 4 种癌细胞以及 QSG-7701 和 Beas-2b 2 种正常细胞分别接种于 24 孔板, 密度为 $(0.5 \sim 2.0) \times 10^5$ 每孔, 无抗生素培养液进行培养, 至次日 90%~95% 铺满时换无血清培养基进行转染, 转染试剂使用 Lipofectamine 2000, 严格按照说明书进行操作。每个质粒转染设 3 个复孔。转染质粒比例为 500 : 1, 即 pGL3-basic、pGL3-AFP、pGL3-CEA、pGL3-control 质粒各 0.5 μ g 与内参质粒 pRL-TK 0.001 μ g 共转染每孔, 转染 4~6 h 后, 换常规培养基继续培养。转染 48 h 后弃培液, 用冰上预冷的 PBS 洗涤细胞, 每孔加入 100 μ L 1 \times PLB (passive lysis buffer, 裂解液), 室温摇床孵育 15 min, 使之充分裂解细胞, 收集每孔细胞至 1.5 mL 离心管中, 12 000 \times g 离心 5 min, 吸取上清液检测, 分别检测得到萤火虫荧光素酶 LUC 和海肾荧光素酶 RL 的荧光活性值, 后者的活性反应每孔的转染效率, 用来消除转染误差, 两者的比值即为相对荧光素酶的表达量, 用 LUC/RL 的比值表示。以此值的高低作为启动子表达活性强度的指标。

1.2.4 RT-PCR 检测 AFP 和 CEA 的 mRNA 水平表达

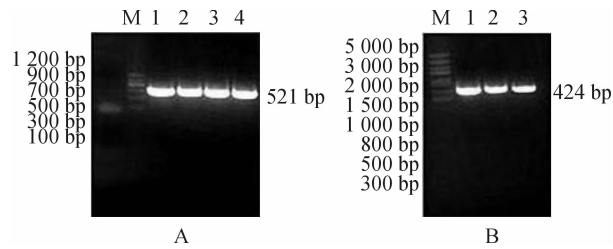
SW620, Huh7, A549, Hela 4 种不同的癌细胞以及 QSG-7701, Beas-2b 2 种正常细胞分别培养于含 5% 和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养。按 TRIZOL 法提取细胞总 RNA, 以抽提的总 RNA 为模板逆转录成 cDNA, 应用 Primer5.0 软件设计引物。cDNA 通过 SYBR qPCR Mix 进行荧光定量 PCR, 扩增体系为 20 μ L, 扩增参数为: 95 $^{\circ}$ C、1 min, 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、1 min, 40 个循环。结果由 Applied Biosystems 7300 real-time PCR 仪软件分析。

2 实验结果

2.1 AFP 和 CEA 启动子的克隆

利用 PCR 技术, 设计 AFP 和 CEA 基因上下游引物, 以重组质粒 pCA13-AFP, pCA13-CEA 为模板分别可得到 521bp 和 424bp 的 AFP 和 CEA 基因启动子片段, 该片段含有 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位

点,见图 1。



A)AFP 启动子核心区 PCR 扩增结果。泳道 1~4 为 4 个重复的 PCR 产物。B) CEA 启动子核心区 PCE 扩增结果。泳道 1~3 为 3 个重复的 PCR 产物。

图 1 AFP 与 CEA 基因启动子核心区 PCR 产物电泳分析

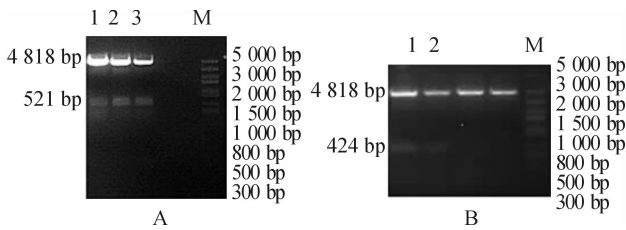
2.2 重组荧光素酶报告基因质粒 pGL3-AFP 和 pGL3-CEA 载体的鉴定

重组质粒 pGL3-AFP 和 pGL3-CEA 经 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切分别得到 521 bp 和 424 bp 的 AFP 和 CEA 启动子片段以及 4818bp 的大片段。测序结果显示,其亚克隆序列与标准序列完全一致,表明重组质粒 pGL3-AFP 和 pGL3-CEA 构建正确,结果如图 2。

2.3 AFP 和 CEA 启动子的表达活性检测

将 pGL3-basic,pGL3-AFP 和 pGL3-CEA 以及 pGL3-control 分别与参照质粒 pRL-TK 共转染上述 6 种不同的细胞系,48 h 后检测萤火虫荧光素酶

LUC 和海肾荧光素酶 RL 的相对荧光活性值, LUC/RL 的结果表明,pGL3-AFP 和 pGL3-CEA 在两株正常细胞系 Beas-2b 和 QSG 7701 中的荧光素酶活性表达量较肿瘤细胞均比较低,表明 AFP 和 CEA 启动子具有肿瘤靶向性。此外,pGL3-AFP 在 Huh7 细胞里的荧光素酶活性明显高于其它细胞系中的活性,同样 pGL3-CEA 在结肠癌细胞 SW620 中的荧光素酶活性也明显高于其它细胞系里的活性。结果表明,AFP 和 CEA 启动子均具有肿瘤特异性,前者靶向于肝癌细胞,而后者则靶向于结肠癌。结果见表 1、表 2、图 3。



A) pGL3-AFP 经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定结果。泳道 1~3 为三个重复的酶切产物,分别为 4818bp 的 pGL3-basic 载体片段和 521bp 的 AFP 核心启动子片段。B)pGL3-CEA 经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定结果。泳道 1~2 为两个重复的酶切产物,分别为 4818bp 的 pGL3-basic 载体片段和 424bp 的 CEA 核心启动子片段。

图 2 pGL3-AFP 质粒与 pGL3-CEA 质粒酶切鉴定结果

表 1 肿瘤细胞中各种质粒相对荧光素酶活力的比较

Plasmid	LUC/RL in Huh-7 cell	LUC/RL in SW620 cell	LUC/RL in A549 cell	LUC/RL in Hela cell
pGL3-basic	1	1	1	1
pGL3-AFP	61. 88±3. 69	9. 81±0. 52	9. 86±0. 67	9. 37±1. 97
pGL3-CEA	21. 68±2. 64	133. 85±20. 29	4. 31±0. 92	3. 26±1. 27
pGL3-control	69. 49±5. 8	130. 28±12. 87	67. 63±2. 38	331. 85±17. 32

注:(LUC/RL)_x/(LUC/RL)_{pGL3-basic}±S, n=3

表 2 正常细胞中这种质粒相对双荧光素酶的活力的比较

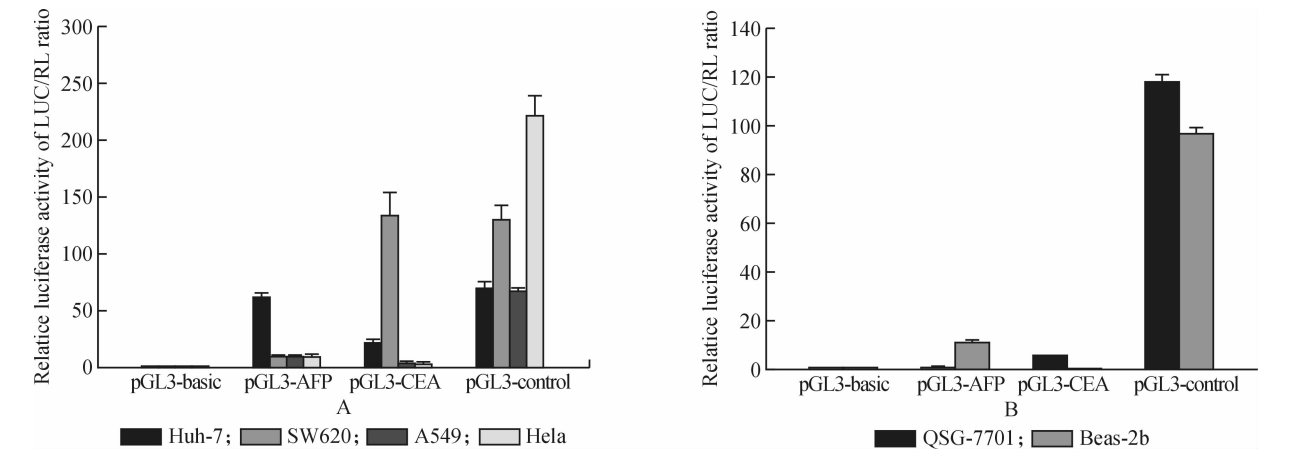
Plasmid	LUC/RL in QSG-7701 cell	LUC/RL in Beas-2b cell
pGL3-basic	1	1
pGL3-AFP	1. 34±0. 17	11. 35±1. 1
pGL3-CEA	6. 12±0. 06	0. 53±0. 036
pGL3-control	1. 34±0. 17	97. 1±3. 48

注:(LUC/RL)_x/(LUC/RL)_{pGL3-basic}±S, n=3

2.4 AFP 和 CEA 基因在肿瘤细胞内转录水平的特异性表达

选取 4 种不同的肿瘤细胞系,包括肝癌细胞

Huh7,结肠癌细胞 SW60,肺癌细胞 A549,宫颈癌细胞 Hela。抽提细胞总 RNA,以总 RNA 为模板逆转录成 cDNA,分别以 AFP 和 CEA 的特异性荧光定量 PCR 引物做荧光定量 PCR。本实验选择 GAPDH 作为内参,以肺正常细胞 Beas-2b 和肝正常细胞 QSG-7701 为对照进行相对定量 PCR。结果显示,AFP 在肝癌细胞系 Huh-7 细胞里呈高水平表达,大约是 Beas-2b 细胞的 250 倍,而 CEA 基因在结肠癌细胞 SW620 里表达量高出 QSG-7701 将近 350 倍,表明 AFP 和 CEA 具有转录靶向性,同时 AFP 和 CEA 在正常细胞均呈低表达表明它们具有肿瘤特异性。结果见表 3、图 4。



A) 4 种肿瘤细胞的相对荧光素酶活力(LUC/RL)的比较。B) 2 种正常细胞的相对荧光素酶活力(LUC/RL)的比较。

图 3 不同细胞的相对荧光素酶活力(LUC/RL)的比较

表 3 AFP、CEA 和 GAPDH 的 real-time PCR 引物序列

基因名称	引物序列	序列位点
AFP	F: 5'-CTTACACAAAGAAAGCC-3'	1 345~2 361
	R: 5'-CCGATAATAATGTCTAGCCG-3'	1 471~1 489
CEA	F: 5'-CTCCTGCTCACAGCCTCACTTC-3'	173~194
	R: 5'-TTGCCATCCACTCTTTCACCTT-3'	327~348
GAPDH	F: 5'-GATTTGGTCGTATTGGGCG-3'	29~47
	R: 5'-TGGAAGATGGTGATGGGAT-3'	215~233

注: AFP,CEA 和 GAPDH 的引物序列分别参考基因库中 VO1514, NM_004363 和 NM_002046 序列

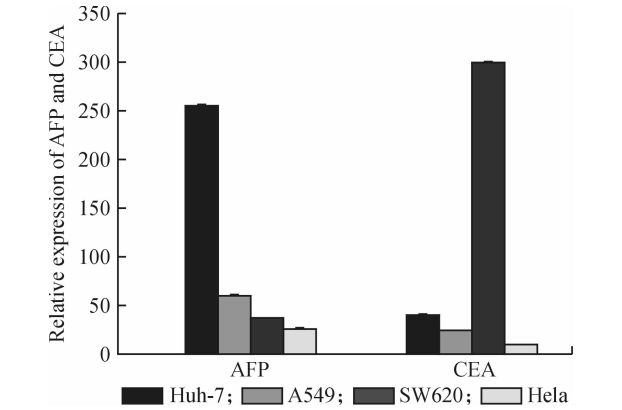


图 4 Quantitative real-time PCR(qRT-PCR) 检测 4 种肿瘤细胞中 AFP 和 CEA 在 mRNA 水平上的表达

3 讨论

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)最早由 Gold 和 Freedman 于 1965 年在人结肠癌组织发现,是一种胚胎性致癌抗原^[1]。由于在正常成人血清中含量极低,因此 CEA 可作为一种广谱性肿瘤标志物,用于大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计^[2]。自 1987 起,CEA 的 cDNA 就被很多实验室克隆^[9-10]。随后 CEA 家族中其他成员也被相继克隆出来,如非特异性交叉反应抗原(NCAs)。基于序列的同源性,CEA 基因家

族被分为两个主要的亚族:CEA 亚族和 PSG 亚族(pregnancy-specific glycoproteins)。CEA 亚族包括 CEA 基因本身,NCA 和 BGP(biliary glycoprotein1)^[11]。Northern blot 技术揭示了 CEA 相关基因的表达模式,CEA 和 NCA 被证明在不同的腺癌或腺瘤中经常同时表达。然而据 Kim 等^[12]报道在 8 例正常的肺组织中有 7 例有 NCA 的 RNA 表达,但没有检测到 CEA 和 BGP1 的 RNA 表达。此外,Schrewe 等^[13]克隆了完整的 CEA 基因并分析了它的启动子区域,结果证明 CEA 和 NCA 在启动子区域有同源域,但在翻译起始位点上游 240 核苷酸处却高度不同源。Schrewe 等^[13]进一步发现该段潜在的启动子区位于翻译起始位点上游大约 400 个核苷酸序列处,并且在 SW403(分泌 CEA 和 NCA)中的启动子活力远远强于不分泌 CEA 和 NCA 的 HeLa 细胞。因此,推测 CEA 基因的这种细胞特异性可能与它的启动子的特异靶向性有关。

甲胎蛋白(α -Fetoprotein, AFP)在胎儿和肝肿瘤中高表达,不仅是胎儿宫内发育状态的重要监测指标,同时又是肿瘤组织产生的肿瘤标志物之一^[7-8],因此,在围产保健和肿瘤诊治方面有重要作用。AFP 属于白蛋白基因家族的一个成员^[14],该家族包括白蛋白、AFP、维生素 D 结合蛋白以及 α 白

蛋白。AFP 的分子异型在生物医学领域里很早就被报道过,早期研究揭示 AFP 的两种异型:等电点 pH 亚型和植物凝集素结合异型,它们在氨基酸组成上没有任何区别,仅是在生物化学特性上存在差异。随后,AFP 的基因异型(mRNA 碱基多少的差异)广泛地发现于啮齿类动物的胎儿期或者围产期,癌变和器官再生阶段。随着 90 年代早期的单克隆抗体的出现,本底 AFP 多抗原表位(epitope)被检测及分类。同时,许多 AFP 结合蛋白和受体被报道能够抑制某些 AFP 的免疫反应。随后,人类和啮齿类动物的 AFP 被克隆,AFP 的蛋白编码序列也随报道。

一个健康的成年人血清里 AFP 正常表达水平在 5ng/mL,据报道良性肝肿瘤,病毒性肝炎还有肝硬化患者血清里的 AFP 水平都高于这个值,人类和小鼠的肝癌细胞都最先被发现 AFP 高水表达^[15]。随后,其他的肿瘤类型也检测到 AFP 的表达和分泌,如睾丸生殖细胞肿瘤和卵巢的卵黄囊肿瘤^[16],但这两种肿瘤患者血清里的 AFP 表达水平(500~900ng/mL)并没有早期肝癌患者的高。松果腺/脑垂体囊肿、肝母细胞瘤、胆囊癌和表皮样囊肿等肿瘤也检测到 AFP 高水平表达^[17-19]。因此 AFP 表达水平被作为检测癌症发生的重要分子诊断指标。

本实验通过 PCR 技术扩增 CEA 和 AFP 启动子区并克隆到荧光素酶载体,通过转染不同种类的细胞,检测荧光素酶活性来分析 CEA 和 AFP 启动子的转录靶向性。实验结果显示 CEA 启动子在结肠癌细胞里具有很强的转录活性,其次是肝癌细胞,在肺癌和宫颈癌细胞中表达量则很低。而 AFP 基因的启动子则在肝癌细胞株 Huh-7 中具有很强的表达活性,肺癌细胞 A549 次之,但强于结肠癌和宫颈癌细胞。为验证我们的启动子活性的强弱与相应的基因表达一致,接着进行了 Real Time-PCR 实验。结果显示 CEA 和 AFP 基因在 mRNA 水平上分别在结肠癌和肝癌细胞中具有转录靶向性。这些结果充分证明了 CEA 和 AFP 基因的启动子具有肿瘤特异性,为进一步地研究 CEA 和 AFP 基因的转录和调控机制奠定基础,同时也为更好地利用 AFP 和 CEA 用于靶向肝癌或肠癌基因-病毒治疗提供参考。

参考文献:

[1] Gold P, Freedman S O. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological

tolerance and absorption techniques[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1965, 121: 439-462.

[2] 李 星, 李 伟. 肝癌及癌旁组织中 P53 基因及 AFP、CEA 表达异常及相关研究[J]. 泰山卫生, 2001, 25(2): 6-8.

[3] Tomasi T B. Structure and function of alpha-fetoprotein [J]. Annual Review of Medicine, 1977, 28(2): 453-465.

[4] Michael B, Gorin, Shirley M, et al. Structure of α -fetoprotein gene in the mouse[J]. Biological Sciences, 1980, 77(3): 1351-1355.

[5] Erkkiruolahti, Hanswizell. Breakage of tolerance to α -fetoprotein in monkeys[J]. Nature, 1975, 255(5511): 716-717.

[6] Tomonori Morinaga, Masaharu Sakai, Thomas G. Primary structures of human α -fetoprotein and its mRNA [J]. Biochemistry, 1983, 80(5): 4604-4608.

[7] Tatarinov Y S. Content of embryo-specific alpha-globulin in the blood serum of the human fetus, newborn, and adult man in primary cancer of the liver[J]. Vop Khim SSR, 1965, 11(10): 20-24.

[8] Abelev G I. Alpha-fetoprotein in association with malignant tumor[J]. Adv Cancer Res, 1971, 14(2): 295-357.

[9] Oikawa S, Nakazato H, Kosaki G. Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 142(2): 511-518.

[10] Beauchemin N, Benchimol S, Cournoyer D, et al. Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen [J]. Mol Cell Biol, 1987, 7(5): 3221-3230.

[11] Thompson J A, Grunert F, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives[J]. J Clin Lab Anal, 1991, 5(5): 344-366.

[12] Kim J, Kaye F J, Henslee J G, et al. Expression of carcinoembryonic antigen and related genes in lung and gastrointestinal cancers [J]. Int J Cancer, 1992, 52(2): 718-725.

[13] Schrewe H, Thompson J, Bona M, et al. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen; analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(6): 2738-2748.

[14] Gerald J, Mizejewski. Alpha-fetoprotein structure and function relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants [J]. Exp Biol Med, 2001, 226(5): 377-408.

[15] Gerald J, Mizejewski. Biological role of α -fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2002, 2(6): 709-735.

[16] Ballas M. Yolk sac carcinoma of the ovary with AFP in serum and ascitic fluid demonstrated by immunophoresis[J]. Am J Clin Pathol, 1972, 56(8): 511-513.

[17] Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease[J]. Science, 1972, 175(129): 949-955.

[18] Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy[J]. Nature, 2004, 427(6977): 779-781.

[19] Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 636-646.

Cloning of AFP and CEA Gene Promoters and Analysis of Their Tumor Specific Activity

LEI Wen, WANG Shi-bing, MA Bu-yun, YE Jing, XIA Yu-long, WANG Yi-gang
(Xin yuan Institute of Medicine and Biochnology, School of Life Sciences,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Clone the AFP and CEA promoters and construct their luciferase report vector of AFP and CEA gene in order to study their transcriptional targeting activity and tumor specific properties. The AFP and CEA gene promoter fragment are generated by PCR (polymerase chain reaction) and then subcolned into the MCS of luciferase report gene vector pGL3-basic to generate the recombined plasmid pGL3-AFP and pGL3-CEA. pGL3-basic, pGL3-AFP, pGL3-CEA as well as pGL3-control are cotransfected with pRL-TK into SW620 cell, Huh-7 cells, A549 cells, Hela cells, QSG-7701 cells and Beas-2b cells respectively. The luciferase activities are measured by dual luciferase reporter (DLR) system. Sequencing and restricted digestive results show that AFP and CEA gene promoters are successfully cloned into plasmid pGL3-basic and constructed their luciferase report plasmids pGL3-AFP and pGL3-CEA respectively. DLR results indicate their high transcriptional activity and tumor specific properties.

Key words: AFP; CEA; transcriptional targeting; dual luciferase reporter gene
(责任编辑: 许惠儿)