

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510011199.9

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100354304C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2005.1.18

[21] 申请号 200510011199.9

[73] 专利权人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路 5 号

[72] 发明人 尚永丰 易霞 孙晓静

[56] 参考文献

WO0127276A2 2001.4.19

WO0208262A2 2002.1.31

Direct submission. Poustka, A. 等. GenBank
序列号 CAH91428. 2004

Direct submission. Poustka, A. 等. GenBank
序列号 CR859248. 2004

审查员 汪波莉

[74] 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有
限责任公司

代理人 何文彬

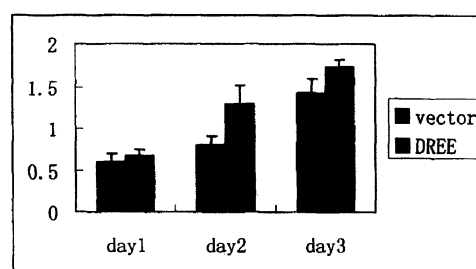
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 7 页

[54] 发明名称

与乳腺癌有关的基因 DREE 及其编码的蛋白
与应用

[57] 摘要

本发明涉及与乳腺癌有关的基因 DREE (down -
regulated by ER in endometrium) 及其编码的蛋白, 该
基因的表达载体, 以及所述基因和蛋白在制备治疗
乳腺癌的药物中的应用。



1、可促进肿瘤细胞的生长和增殖的蛋白，该蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 2 所示。

2、编码权利要求 1 的蛋白的基因，其 DNA 序列如序列 1 所示。

3、含有权利要求 2 的基因或者编码权利要求 1 的蛋白的基因的表达载体。

4、由权利要求 3 的表达载体转化的宿主细胞。

5、生产权利要求 1 的蛋白的方法，该方法包括下列步骤：

培养权利要求 4 的转化的宿主细胞，使转化细胞产生权利要求 1 的蛋白；和

从培养物中分离出蛋白。

6、针对权利要求 1 的蛋白的抗体，它是使用所述蛋白作为免疫原而产生的特异性抗体。

7、检测权利要求 1 的蛋白的试剂盒，它含有权利要求 6 的特异性抗体。

8、权利要求 1 的蛋白在制备治疗乳腺癌的药物中的应用。

9、权利要求 2 的基因在制备治疗乳腺癌的药物中的应用。

与乳腺癌有关的基因 *DREE* 及其编码的蛋白与应用

发明领域

本发明涉及与乳腺癌有关的基因 *DREE* (down-regulated by ER in endometrium) 及其编码的蛋白, 该基因的表达载体, 以及所述基因和蛋白在制备治疗乳腺癌的药物中的应用。

背景技术

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 严重地威胁着女性的生命安全。发现与乳腺癌有关的新基因及其表达的蛋白并由此获得治疗乳腺癌的新的方法因此具有重要意义。

发明内容

本发明发现了一种与乳腺癌等的癌细胞的生长和增殖有关的蛋白, 克隆了编码该蛋白的基因, 构建了含有该基因的表达载体和含有该表达载体的宿主细胞, 并且发现该蛋白可促进乳腺癌等肿瘤细胞的生长和增殖, 基于以上发现, 完成了本发明。

因此, 本发明的一个目的是提供可促进肿瘤细胞的生长和增殖的蛋白, 尤其重组蛋白, 该蛋白具有序列中序列 2 所示的氨基酸序列, 或者通过所述氨基酸序列中的一个或多个氨基酸的缺失, 取代或增加

而得到的氨基酸序列。

本发明的另一个目的提供了编码上述蛋白的基因，它是具有序列 1 所示的碱基序列的 DNA 或者与所述 DNA 在严格条件下杂交的 DNA。

本发明的又一个目的是提供含有上述基因或者编码上述蛋白的基因的表达载体。

本发明的另一个目的是提供由上述表达载体转化的宿主细胞。

本发明的再一个目的是提供生产本发明的重组蛋白的方法，该方法包括下列步骤：

培养上述转化的宿主细胞，使转化细胞产生本发明的重组蛋白；
和从培养物中分离出重组蛋白。

本发明的另一个目的是提供针对上述蛋白的抗体，它是使用所述重组蛋白作为免疫原而产生的特异性抗体。它可以是单克隆或多克隆抗体。

本发明的还一个目的是提供检测所述蛋白的试剂盒，它含有上述特异性抗体，可以进行抗原-抗体反应，用于检测具有序列 2 所示的蛋白。

此外，本发明提供了用于检测序列 1 所示的核苷酸序列的探针诊断试剂盒，它含有与核苷酸序列 1 中的部分核苷酸序列互补的核苷酸序列。

在一个实施方案中，本发明的探针具有如序列表中的序列 3 所示的核苷酸序列。

本发明还提供了用于 PCR 扩增的引物，该引物为：

ups 5'— GGAATTCGCCACCATGTTTCCCCATCACTCGA—3'

downs 5'— CGGGATCCCGCTACTCAGGAAGCCGAAATG—3'.

本发明还提供了上述基因、蛋白或抗体在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

附图简述

图 1 是组织表达谱 (MTN, Clontech), 提示 *DREE* 基因含有 2 个转录本, 分别为 2.4 kb 和 4.5 kb 左右。组织表达谱证实 *DREE* 基因具有明显的组织特异性, 在骨骼肌中表达最强, 其次是心脏、胰腺和胎盘。

图 2 是肿瘤表达谱(multi-tissue tumor profile, Clontech), 分析表明: 与正常组织相比, *DREE* 基因在乳腺癌、胰腺癌等组织中的表达量降低; 在子宫内膜癌、卵巢癌等组织中的表达量增加。

图 3 是肿瘤表达谱(multi-tissue tumor profile, Clontech), 分析表明: 与正常组织相比, *DREE* 基因在乳腺癌、胰腺癌等组织中的表达量降低; 在子宫内膜癌、卵巢癌等组织中的表达量增加。

图 4 是显示 *DREE* 基因在多种肿瘤细胞系中表达的 Northern blot 结果图, 显示 *DREE* 基因在多种肿瘤细胞系中表达。

图 5 是显示 *DREE* 基因在多种肿瘤细胞系中表达的 RT-PCR 结果图, 显示 *DREE* 基因在多种肿瘤细胞系中表达。

图 6 是 pGEX-4T-3-*DREE* 原核表达载体的电泳图。

图 7 是 *DREE* 蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达的 SDS-PAGE 电泳图。

图 8 是 pEGFP-C₂-*DREE* 真核表达载体的电泳图。

图 9 是显示 *DREE* 蛋白在 MCF-7 细胞中定位的荧光显微镜图，*DREE* 蛋白主要定位于核膜。

图 10 是 pcDNA3.1(-)-c-myc-*DREE* 真核表达载体的电泳图。

图 11 是显示 *DREE* 蛋白对 ECC-1 细胞的增殖的影响的图 (P<0.05)。

图 12 是通过 Clustal W program 分析得到 *DREE* 的进化树图。

图 13 是非变性总 RNA 的电泳图。

本发明用雌二醇 (E2) 和 Tamoxifen 同时处理 ECC-1 和 ISHIKAWA 细胞(子宫内膜癌细胞)，基因芯片检测显示 EST 序列 AI289489 下调，利用该 EST 序列电子克隆得到一雌激素受体下调靶基因，全长 1553 bp 序列，最长 ORF 为 795bp。RACE 和 RT-PCR 实验证实该基因存在，符合预测结果。将其命名为 *DREE*(down-regulated by ER in endometrium)。ORF: 795bp。编码 265 个氨基酸。ORF 如序列 1 所示。编码的氨基酸序列如序列 2 所示。

DREE 基因生物信息学分析显示，该基因定位于 1q32.3，编码 227 个氨基酸残基。有三个外显子，pI 为 8.0。蛋白质结构分析提示该基因含有多个 PKC 和 CK2 磷酸化位点，C 端有 CCR4 结构域，可能与基因转录有关。此外还提示可能与 RNA 剪接有关。

在 Unigene 中同源比对分析得到其同源类似蛋白如下：

A. thaliana	<u>pir:T45678</u> - T45678 hypothetical protein	29.47 % / 341 aa
	F14P22.170 - Arabidopsis thaliana	(see <u>ProtEST</u>)
C. elegans	<u>pir:T33226</u> - T33226 hypothetical protein	W02G9.5 36.84 % / 223 aa
	- Caenorhabditis elegans	(see <u>ProtEST</u>)
D. melanogaster	<u>pir:S71925</u> - S71925 angel protein - fruit fly	39.45 % / 213 aa
		(see <u>ProtEST</u>)
H. sapiens	<u>pir:T46340</u> - T46340 hypothetical protein	99.85 % / 673 aa
	DKFZp434B0814.1 - human	(see <u>ProtEST</u>)
M. musculus	<u>sp:O35710</u> - NOCT_MOUSE Nocturnin	27.66 % / 226 aa
		(see <u>ProtEST</u>)
R. norvegicus	<u>sp:Q9ET55</u> - NOCT_RAT Nocturnin	29.85 % / 192 aa
		(see <u>ProtEST</u>)
S. cerevisiae	<u>sp:P31384</u> - CCR4_YEAST Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector	

通过 ClustalW program 分析得到其进化树，见图 12。

进行了 MTN 分析和肿瘤表达谱(multi-tissue tumor profile , Clontech)分析。组织表达谱证实 *DREE* 基因具有明显的组织特异性，在骨骼肌中表达最强，其次是心脏、胰腺和胎盘。肿瘤表达谱(multi-tissue tumor profile, Clontech)分析表明：与正常组织相比，*DREE* 基因在乳腺癌、胰腺癌等组织中的表达量降低；在子宫内膜癌、卵巢癌等组织中的表达量增加。

构建了 pGEX-4T-3-*DREE* 质粒，pGEX-4T-3-*DREE* 在大肠杆菌 BL21 菌株中 30℃ 诱导表达 GST-*DREE* 的融合蛋白。SDS-PAGE 电泳证实 *DREE* 基因在大肠杆菌 BL21 中表达。

构建 pEGFP-C₂-*DREE* 真核表达载体，confocol 证实 *DREE* 在 MCF-7 细胞中表达，主要定位于核膜。

MTT 法检测 *DREE* 过表达对乳腺癌细胞增殖的影响，结果发现 *DREE* 蛋白可以促进细胞增殖(P<0.05)。

通过使用本发明的蛋白或者免疫学上等效的多肽，可以获得其抗体，抗体用于所述蛋白的检测和纯化。可以利用本发明的蛋白或其部

分氨基酸序列作为免疫原来产生抗体。可以通过将抗体接种给宿主动物并回收血清的常规方法产生多克隆抗体。还可以通过常规杂交瘤方法产生单克隆抗体。

通过抑制所述蛋白表达，或通过利用针对所述蛋白的抗体，可以抑制肿瘤细胞的生长和增殖，从而可以达到治疗肿瘤的目的。

实施例 1: 用 RT-PCR 方法从人乳腺癌 MCF-7 细胞中克隆 *DREE* 基因

1) 细胞总 RNA 的提取:

对数生长期的 MCF-7 细胞中加入 Trizol Reagent 试剂 (Invitrogen) 1 ml, 转移至 1.5 ml EP 管, 室温静置 5 分钟。加入氯仿 0.2 ml, 剧烈摇晃 EP 管 15 秒。室温静置 2-3 分钟, 4°C, 12,000 rpm 离心 15 分钟。转移上层水相至另一 EP 管中 (约 500-600 μ l), 加入 0.5 ml 异丙醇, 室温静置 10 分钟, 4°C, 10,000 rpm 离心 10 分钟。弃上清, 用 1 ml 75%乙醇漂洗沉淀, 4°C, 7,500 rpm 离心 5 分钟。弃掉 75%乙醇液, 尽量控干, 并于空气中风干少量剩余乙醇, 将 RNA 沉淀溶于 20 μ l DEPC 处理水中, 于 55°C -60°C 水浴中孵育 10 分钟。紫外分光光度计定量 RNA 以及确定所提 RNA 纯度。以 $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$ 为符合要求。

2) 反转录合成 cDNA (Invitrogen kit):

取所提取的 RNA 模板, 用 DEPC 处理水配制成浓度为 1 μ g/ μ l。制备 20 μ l 逆转录体系: $MgCl_2$ (25 mM) 4 μ l, 10x 逆转录

缓冲液 2 μl , dNTP (10 mM) 2 μl , RNase 抑制剂(40 U/ μl) 0.5 μl , AMV 逆转录酶(20 U/ μl) 0.75 μl , Oligo (dT) (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl , RNA 模板 2 μl , 最后加 DEPC 处理水补足 20 μl 体系。42°C 水浴 90 分钟。加热样品管至 95°C, 5 分钟, 冰浴 5 分钟, 最后于 -20°C 保存。

3) PCR 反应:

引物: pEGFP-C2-*DREE*

ups 5'—GGAATTCGCCACCATGTTTCCCCATCACTCGA—3'

downs 5'—CGGGATCCCGCTACTCAGGAAGCCGAAATG—3'。

采用 25 μl PCR 反应体系扩增 *DREE* 基因: 取 1.67 μl cDNA 做 PCR 模板, 加 10xPCR 缓冲液 2.5 μl ; 2.5 mM dNTP 2 μl ; 上下游引物(10 μM)各 0.5 μl ; Taq DNA 聚合酶(1U/ μl)0.2 μl ; 加去离子水补足 25 μl 体系 (酶购自 TAKARA 公司)。

PCR 条件为 94°C 预变性 3 分钟; 94°C 变性 30 秒; 54°C 退火 30 秒; 72°C 延伸 1 分钟, 共 30 个循环。再 72°C 延伸 10 分钟。取出储存于 -20°C。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

扩增产物用 QIAGEN 公司的试剂盒纯化, 用 EcoRI 及 BamHI 双酶切后, 克隆到相同酶切的 pEGFP-C2 真核表达载体中。DNA 序列分析结果表明 PCR 产物的 DNA 序列与预期相符。

实施例 2: Northern blot 杂交

1) 细胞总 RNA 的提取 (见 RT-PCR)

2) RNA 甲醛凝胶变性电泳

制胶: 50 ml

琼脂糖	0.5 g
0.1% DEPC 水	36 ml
加热 2 min 熔化, 冷至 60°C 加入	
10×MOPS 凝胶电泳缓冲液	5 ml
37% 甲醛 (pH>4.0)	9 ml

混匀后灌胶, 室温 30 min 或更长

样品处理

RNA 溶液(约 30 μg)	4.5 μl
甲酰胺	10 μl
10×MOPS 凝胶电泳缓冲液	2 μl
甲醛 (37%)	3.5 μl

混匀, 65–70°C 温育 15 min, 冰浴 15 min

10×上样缓冲液	2 μl
----------	------

电泳:

电泳槽中加入 1×MOPS 凝胶电泳缓冲液 (没过凝胶 1–2 mm) 预电泳 10 min, 上样, 稳压 40 伏电泳, 待溴酚蓝走至胶长的三分之二时停止电泳, 20×SSC 含 0.5 μg 溴化乙啶染色, 紫外灯下观察并照相。结果见图 13。图中 28S 与 18S 的比值约为 2:

1 且 5S 几乎看不到, 说明所提取的 RNA 很少降解, 可用于 Northern blot 分析。

3) 变性 RNA 转膜

准备一大塑料饭盒, 内置足够厚滤纸筑成平台, 剪三张比胶略大的滤纸和一张硝酸纤维素膜, 用 20×SSC 浸湿滤纸和膜至少 5 min (膜先用去离子水自上而下浸透), 并用 DEPC 水浸泡凝胶数次, 换成 20×SSC 浸泡 2 min。

向盒内加入 20×SSC, 在平台上, 自下而上依次铺滤纸——凝胶——硝酸纤维素膜——滤纸, 期间注意各步都尽量排除所有气泡。封口膜围绕凝胶四周预防短路, 最后于最后一层滤纸上放置足够高的吸水纸, 上压 500 g 重物, 持续转膜 18—24 hr。

转移结束后, 6×SSC 漂洗纤维素膜, 微干, 夹于两张干燥滤纸间紫外交联 5 s。膜可以直接用也可用保鲜膜及锡箔纸包好置 4℃ 保存。

4) 探针制备: RT-PCR 扩增 *DREE* 基因作为探针, 方法同实施例 1。

引物: ups 5'— GGAATTCGCCACCATGTTTCCCCATCACTCGA—
3' ; downs 5' —TCCAGTTGGGCGACAGAGTGAGACC— 3'

参照 Amersham Biosciences 的 Ready-To-Go DNA Labelling Beads(-dCTP) kit 说明书。25ng-1μg DNA 溶于 45μl 水中, 90-100℃ 2-3 分钟, 迅速冰浴 5 分钟, 加 5μl [α -³²P]dCTP 标记的 Random Primers and Reaction Buffer Mix 至 50μL, 37℃ 孵育 20min。

5) 预杂交

用 6×SSC 浸透硝酸纤维素膜，放入杂交袋中，加入 10 ml (0.2 ml/cm²) 预杂交液，排除气泡，封口，恒温摇床轻摇，42℃ 预杂交 3—4 hr 或过夜。

6) 杂交

探针 95—100℃ 水浴 5 min，迅速冷却，加入杂交液中，恒温摇床轻摇 42℃ 杂交 24 hr。

7) 洗膜：

弃去杂交液，迅速洗膜不要使膜干燥。

1×SSC/0.1%SDS 20 min×2

0.2×SSC/0.1%SDS 68℃ 30 min×2

同位素监测直至在无 DNA 区域检测不出放射信号为止。

0.1×SSC 室温洗 5 min，然后取出，吸去多余液体，保鲜膜包好。

8) 放射自显影

—20℃ 曝光 24—48 hr。显影，定影，照相分析结果。

实施例 3、MTN 分析和肿瘤表达谱(multi-tissue tumor profile , Clontech)分析

杂交操作参照 Clontech 公司 MTN 分析和肿瘤表达谱(multi-tissue tumor profile, Clontech)分析试剂盒说明书。过程如下：

- (1) 探针标记：方法同实施例 2。
- (2) 杂交：68℃预热杂交液，将吸附有核酸的尼龙膜放入含有杂交液的杂交瓶中，加入含有 100 $\mu\text{g/ml}$ 的鲑精 DNA 的杂交液 0.1ml/cm²，68℃预杂交 30min。20 ng/ml 探针混入杂交液，95℃ 2-5 分钟，冰浴 5 分钟。加入杂交瓶，68℃杂交 1 小时。
- (3) 洗膜：用 Wash Buffer 1 室温洗膜 30-40 分钟，用 Wash Buffer 2 50℃洗膜 40 分钟。
- (4) 显色：用镊子取出膜，洗干 Wash Buffer 2，用保鲜膜覆盖，-70℃ 曝光 1-3 天后显影，定影。

组织表达谱 (MTN, Clontech)及 Northern blot 结果 (图 1、4) 均提示 *DREE* 基因含有 2 个转录本，分别为 2.4 kb 和 4.5 kb 左右。组织表达谱证实 *DREE* 基因表达具有明显的组织特异性,在骨骼肌中表达最强，其次是心脏、胰腺和胎盘 (图 1)。

肿瘤表达谱(multi-tissue tumor profile, Clontech)分析表明：与正常组织相比，*DREE* 基因在乳腺癌、胰腺癌等组织中的表达量降低；在子宫内膜癌、卵巢癌等组织中的表达量增加 (图 2、3)。

Northern blot (图 4) 及 RT-PCR (图 5) 结果显示 *DREE* 基因在多种肿瘤细胞系中表达。

实施例 4: *DREE* 基因在原核细胞中的表达及纯化

构建 pGEX-4T-3-*DREE* 质粒：RT-PCR 获取 *DREE* 目的基因，方法

同实施例 1。引物序列如下：pGEX-4T-3-*DREE*

ups 5'— GGAATTCCATGTTTCCCCATCACTCGA—3'

downs5'— AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCTACTCAGGAAGCCGAA
ATG—3'

1) Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化, EcoR I 和 Not I 双酶切 (50 ul 体系: 10×EcoRI buffer 5 ul、EcoR I 酶 2 ul、Not I 酶 2 ul, 补水至 50 ul 。37°C 反应 5 hrs 。试剂盒购自 NEB 公司), Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化, 同 EcoR I 和 Not I 双酶切且纯化后的 pGEX-4T-3 连接 (10 ul 体系: 10×buffer 1 ul 、pGEX-4T-3 100 ng、*DREE* 产物 50 ng、连接酶 1 ul, 补水至 10 ul。15°C 反应 18 hrs。试剂盒购自 Promega 公司)。连接后转化、筛选测序。

2) pGEX-4T-3-*DREE* 可以在大肠杆菌 BL21 菌株中 30°C 诱导表达 GST-*DREE* 的融合蛋白, 首先制备 BL21 的感受态细胞: 挑取单克隆到适量培养基中, 37°C 250 rpm 培养至 A_{600} 0.4-0.5, 2500 g 离心 15 分钟, 备用。将 1-50ng pGEX-4T-3-*DREE* 转化到上述制备的感受态细胞中, 用 Glutathione Sepharose 4B 进行纯化, 纯化步骤如下:

- (1) 取单克隆到 2-3mL 2YTA 培养基中培养 4-5 小时。转接到 100 ml 的锥形瓶中生长过夜。
- (2) 转接到 500 ml 的锥形瓶中培养 3-5 小时。
- (3) 加 0.5mL 1M IPTG 30°C, 培养 3-6 小时。
- (4) 3000 rpm 10 分钟离心收集细胞。

- (5) 用 25ml PBS 重悬细胞。超声 10 分钟。
- (6) 加 1.25ml 20% Triton X-100, 混匀 1 小时。
- (7) 1000 rpm 10 分钟离心, 加入 0.5mL 50% slurry of Glutathione Sepharose 4B, 室温 30 分钟。
- (8) 1000 rpm 5 分钟离心, PBS 洗三遍。
- (9) 用 0.5ml 洗脱 Buffer 洗脱, 短暂离心后收集上清。

构建 pGEX-4T-3-DREE 原核表达载体如图 6 所示, SDS-PAGE 电泳证实 DREE 在大肠杆菌 BL21 中表达 (图 7)。

实施例 6: DREE 在细胞内的定位

利用本实验室保存的 pEGFP-C1 C 末端蛋白融合载体构建了 pEGFP-C2-DREE 载体 (构建方法同 pGEX-4T-3-DREE),

引物:

ups 5'—GGAATTCGCCACCATGTTTCCCCATCACTCGA—3'

downs 5'—CGGGATCCCGCTACTCAGGAAGCCGAAATG—3'。

它可以在真核细胞内表达 GFP-DREE 的融合蛋白。

1) 用 Lipofectin™ 方法瞬时转染该载体至 MCF-7 细胞

于转染前一天将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板 (已放置盖玻片) 中, 接种密度为 8×10^5 个细胞/孔, 每孔加入培养液 2 ml。24 小时后, 细胞长至覆盖培养孔底面积约 70-80% 时, 可准备转染。在 EP 管中配制下述溶液: 溶液 A: 4 μ g pEGFP-C2-DREE 及对照表达质粒, 分别溶于 250ul 无血清无双抗 DMEM 培养液。溶液 B:

将 10 μ l 脂质体溶液 (lipofectamine 2000 reagent) 加入到 250 ml 无血清无双抗 DMEM 培养液中。室温静置 5 分钟。然后将溶液 A、B 混合, 室温静置 20 分钟。用无血清和不含双抗的 DMEM 培养液洗涤细胞。将上述溶液 A、B 的混合液中加入 2ml 无血清无双抗的 DMEM 培养液, 混匀后加至细胞表面。37°C, 5% CO₂ 条件下孵育 4-6 小时后, 再用正常含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液取代前述培养液, 继续培养细胞至 36 小时。

2) DAPI 染色: 36 小时后, 用 PBS 洗三遍, 用 4%多聚甲醛/PBS 进行固定, 室温 15 分钟, 然后用 PBS 洗三遍。用 0.1% Triton X-100/PBS 透化 15 分钟, 然后用 PBS 洗三遍, 加入 200 μ L 2.5mg/ml 的 DAPI, 室温作用 30 分钟, 然后用 PBS 洗三遍, 在荧光显微镜下分别用常规荧光波长和 DAPI 波长进行观察, 并进行拍照。

实施例 7: MTT 法检测 *DREE* 过表达对乳腺癌细胞增殖的影响

利用本实验室保存的 pcDNA3.1(-)载体构建了 pcDNA3.1-c-myc-*DREE* 融合蛋白表达载体 (构建方法同 pGEX-4T-3-*DREE* 构建), 引物: ups 5'-GGAATTCGCCACCATGTTTCCCCATCACTCGA-3' downs 5'-CGGGATCCACAGGAAGCCGAAATGAGAGG-3'。

MTT (四甲基偶氮唑兰) 可被细胞摄取, 并被活细胞内线粒体脱氢酶还原成一种不溶于水的蓝紫色产物甲瓚, 并沉淀于细胞中, 而死细胞没有这种功能。甲瓚可溶于二甲基亚砷 (DMSO), 溶液在 570 nm 处有最大吸收。故该波段处吸收值越大代表存活

细胞量越多。MTT 法广泛应用于细胞毒性实验、细胞生长测定等。本实验利用 MTT 法观察 DREE 蛋白对 MCF-7 生长的影响。具体操作方法如下：

将培养到对数生长期的 ECC-1 细胞接种于 96 孔板中，每孔接种细胞数为 1×10^5 个。次日转染 100 ng pcDNA3.1-c-myc-DREE 及对照表达质粒（转染方法同 pEGFP-C2-DREE 载体转染），重复 6 孔细胞， 37°C ，5% CO_2 进行培养。分别培养 1d、2d、3d 后，在每个细胞培养孔内加入 50 μl 1 mg/ml 的 MTT 溶液，同样培养条件下作用 4 小时后取出，小心吸出每孔内液体，每孔加入二甲苯亚枫 150 μl ，轻微振荡 10 分钟，使蓝紫色结晶充分溶解在二甲苯亚枫中。用自动酶标仪测量 96 孔板中每孔在 570 nm 处的吸光值。

DREE序~1
SEQUENCE LISTING

<110> 北京大学

<120> 与乳腺癌有关的基因DREE及其编码的蛋白与应用

<130>

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 795

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(792)

<223>

<400> 1

atg ttt ccc cat cac tcg agg agt ctg ggc aga gac tgg act aca ccg	48
Met Phe Pro His His Ser Arg Ser Leu Gly Arg Asp Trp Thr Thr Pro	
1 5 10 15	
tgg gag aat ctg caa agg tgt tgc tgg aac aga cat att tct agt tgt	96
Trp Glu Asn Leu Gln Arg Cys Cys Trp Asn Arg His Ile Ser Ser Cys	
20 25 30	
atg agg tgg cct gga cat tac tct cga gct cct tac cca tac ttc agt	144
Met Arg Trp Pro Gly His Tyr Ser Arg Ala Pro Tyr Pro Tyr Phe Ser	
35 40 45	
agt agg cat ttt tca cta aat tgg aga cca ccc tgt ttg ttt gag tct	192
Ser Arg His Phe Ser Leu Asn Trp Arg Pro Pro Cys Leu Phe Glu Ser	
50 55 60	
aga act cag ttc cag tac tgt aac tgg aga cct gac aac ctg agc cag	240
Arg Thr Gln Phe Gln Tyr Cys Asn Trp Arg Pro Asp Asn Leu Ser Gln	
65 70 75 80	
aca tct ttg att cat ctc tct agt tac gtc atg aac gct gag gga gat	288
Thr Ser Leu Ile His Leu Ser Ser Tyr Val Met Asn Ala Glu Gly Asp	
85 90 95	
gag cct tca tca aaa cga aga aaa cac caa ggt gtg ata aag cgg aat	336
Glu Pro Ser Ser Lys Arg Arg Lys His Gln Gly Val Ile Lys Arg Asn	
100 105 110	
tgg gaa tat ata tgt agc cat gat aaa gaa aaa acg aag atc cta gga	384
Trp Glu Tyr Ile Cys Ser His Asp Lys Glu Lys Thr Lys Ile Leu Gly	
115 120 125	
gac aaa aat gtt gat ccc aaa tgt gaa gac agt gag aac aag ttt gac	432

DREE序~1

Asp	Lys	Asn	Val	Asp	Pro	Lys	Cys	Glu	Asp	Ser	Glu	Asn	Lys	Phe	Asp	
	130					135					140					
ttt	tca	gtg	atg	tcc	tat	aat	ata	ctt	tca	caa	gat	tta	ctg	gaa	gat	480
Phe	Ser	Val	Met	Ser	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	
145				150					155					160		
aac	tct	cac	ctt	tat	aga	cat	tgc	cgg	cgg	cca	gta	tta	cac	tgg	agt	528
Asn	Ser	His	Leu	Tyr	Arg	His	Cys	Arg	Arg	Pro	Val	Leu	His	Trp	Ser	
			165					170						175		
ttt	agg	ttt	ccc	aat	att	ctg	aaa	gaa	att	aaa	cat	ttt	gat	gca	gac	576
Phe	Arg	Phe	Pro	Asn	Ile	Leu	Lys	Glu	Ile	Lys	His	Phe	Asp	Ala	Asp	
			180					185					190			
gta	ctt	tgt	ttg	caa	gaa	ggt	caa	gaa	gat	cat	tat	gga	gca	gag	atc	624
Val	Leu	Cys	Leu	Gln	Glu	Val	Gln	Glu	Asp	His	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ile	
		195					200					205				
agg	cca	agt	ttg	gaa	tca	ctg	ggt	aca	atg	caa	ctt	ttt	ttt	ttt	ttt	672
Arg	Pro	Ser	Leu	Glu	Ser	Leu	Gly	Thr	Met	Gln	Leu	Phe	Phe	Phe	Phe	
	210					215					220					
ttt	tct	ttt	ttg	aga	cag	ggt	ctc	act	ctg	tcg	ccc	aac	tgg	agt	gca	720
Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Asn	Trp	Ser	Ala	
225				230					235					240		
gtg	gca	caa	tca	tgg	ctc	act	aca	gcc	tca	acc	tac	tgg	gct	caa	gta	768
Val	Ala	Gln	Ser	Trp	Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Trp	Ala	Gln	Val	
				245					250					255		
atc	ctc	tca	ttt	cgg	ctt	cct	gag	tag								795
Ile	Leu	Ser	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu									
			260													

<210> 2
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Phe Pro His His Ser Arg Ser Leu Gly Arg Asp Trp Thr Thr Pro
 1 5 10 15

Trp Glu Asn Leu Gln Arg Cys Cys Trp Asn Arg His Ile Ser Ser Cys
 20 25 30

Met Arg Trp Pro Gly His Tyr Ser Arg Ala Pro Tyr Pro Tyr Phe Ser
 35 40 45

Ser Arg His Phe Ser Leu Asn Trp Arg Pro Pro Cys Leu Phe Glu Ser

DREE序~1

<211> 715
 <212> DNA
 <213> 人工合成

<400> 3

```

atgtttcccc atcaactcgag gagtctgggc agagactgga ctacaccgtg ggagaatctg      60
caaaggtggt gctggaacag acatatttct agttgtatga ggtggcctgg acattactct      120
cgagctcctt acccataactt cagtagtagg catttttcac taaattggag accaccctgt      180
ttgtttgagt ctagaactca gttccagtac tgtaactgga gacctgacaa cctgagccag      240
acatctttga ttcattcttc tagttacgtc atgaacgctg agggagatga gccttcatca      300
aaacgaagaa aacaccaagg tgtgataaag cggaattggg aatatatatg tagccatgat      360
aaagaaaaaa cgaagatcct aggagacaaa aatggtgatc ccaaagtga agacagtgag      420
aacaagtttg acttttcagt gatgtcctat aatatacttt cacaagattt actggaagat      480
aactctcacc tttatagaca ttgccggcgg ccagtattac actggagttt taggtttccc      540
aatattctga aagaaattaa acattttgat gcagacgtac tttgtttgca agaagttcaa      600
gaagatcatt atggagcaga gatcaggcca agtttggaa cactgggtac aatgcaactt      660
tttttttttt ttttttcttt tttgagacag ggtctcactc tgtcgcccaa ctgga      715

```

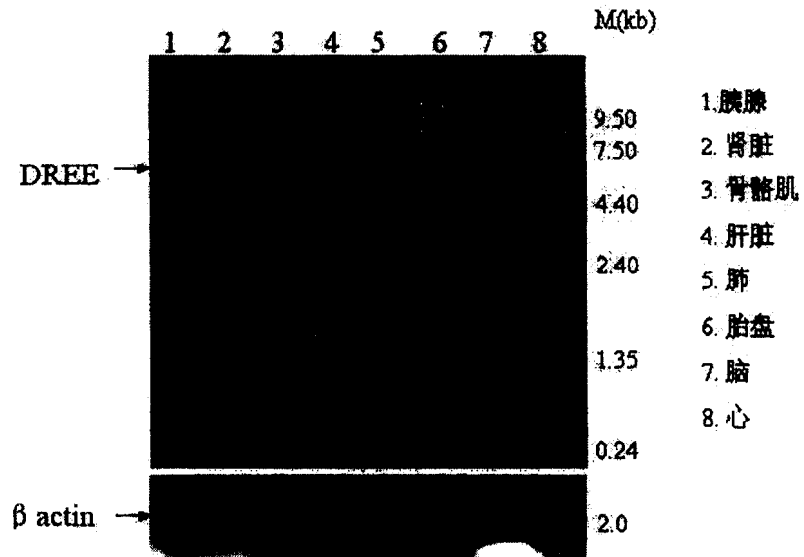


图 1

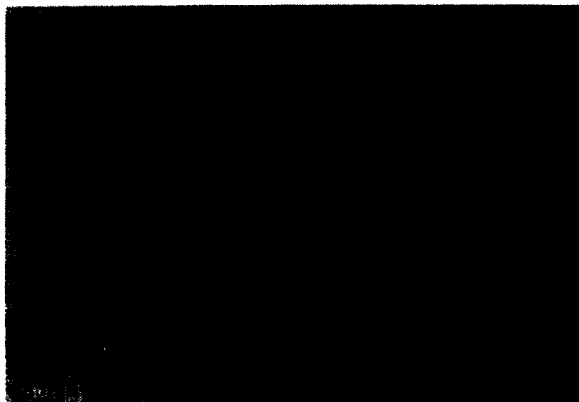


图 2

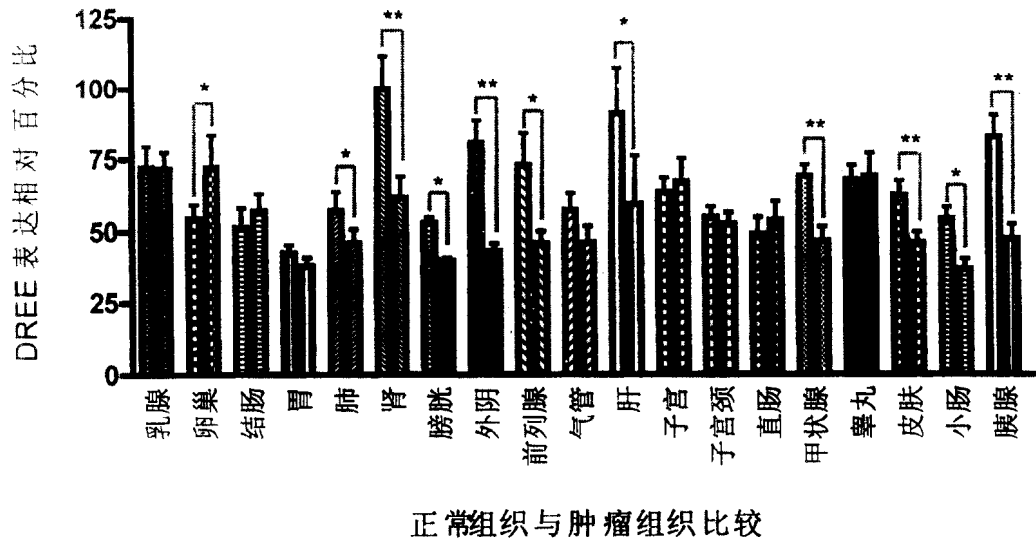


图 3

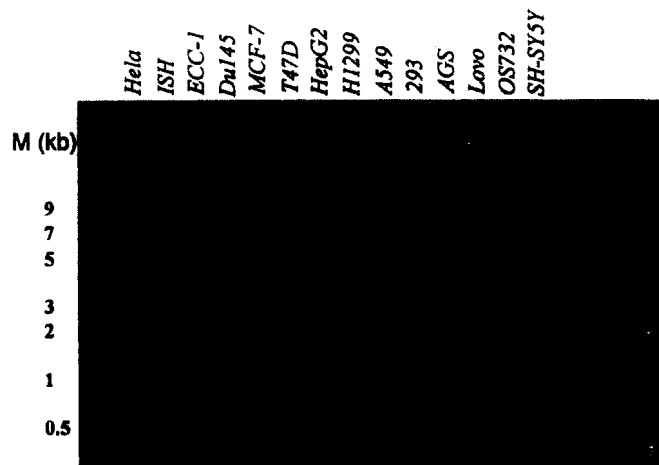


图 4

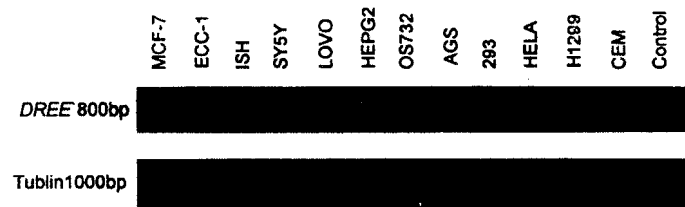


图 5

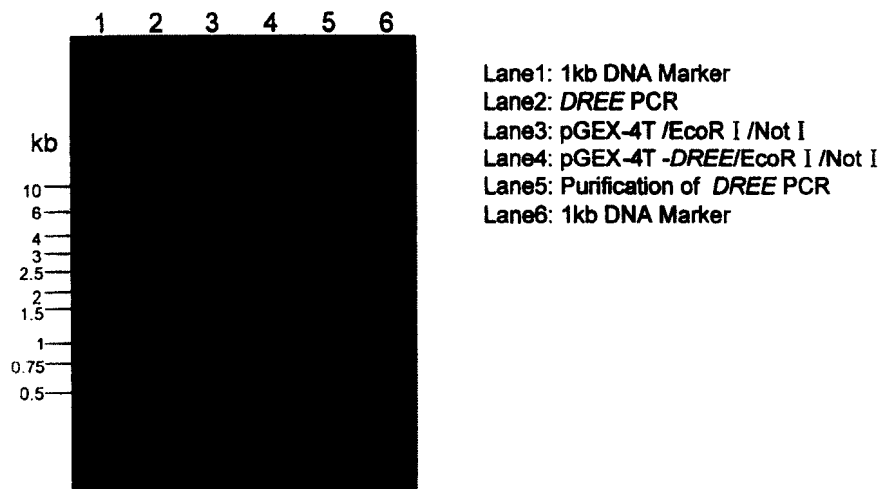


图 6

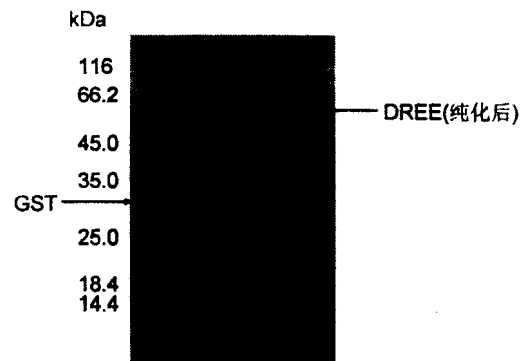


图 7

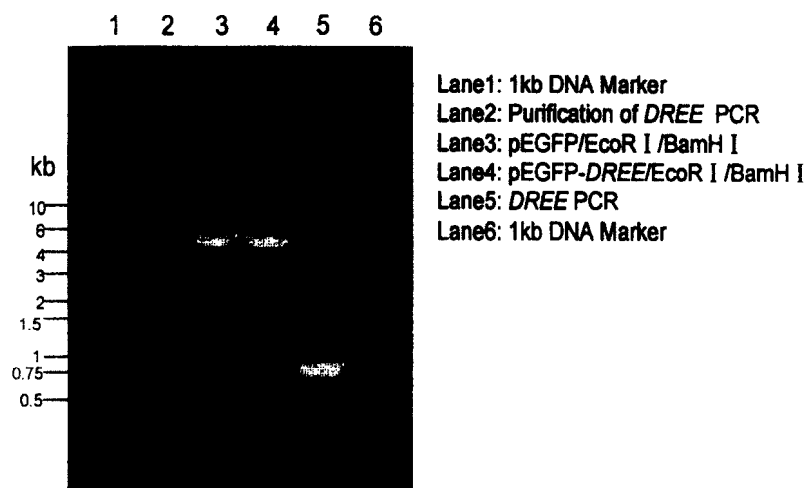


图 8

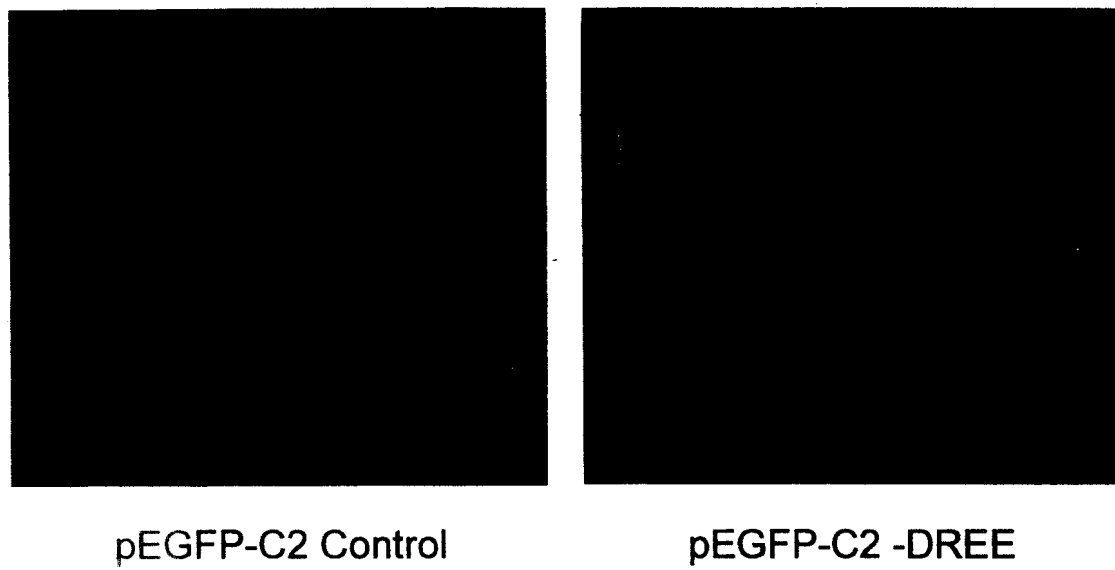


图 9

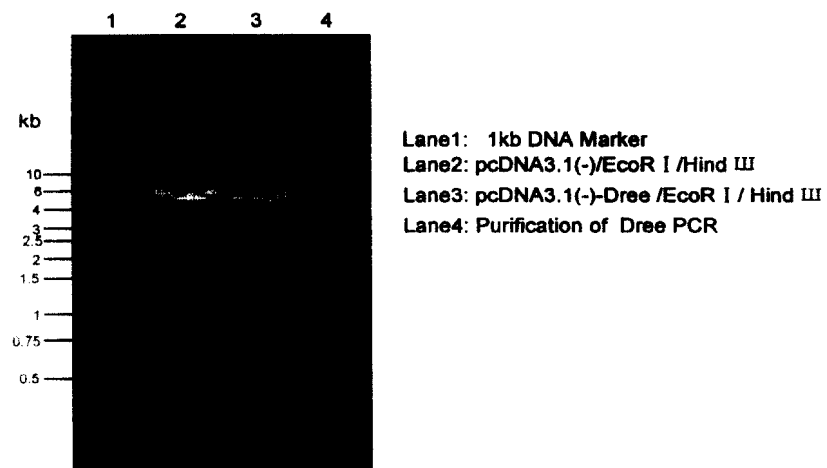


图 10

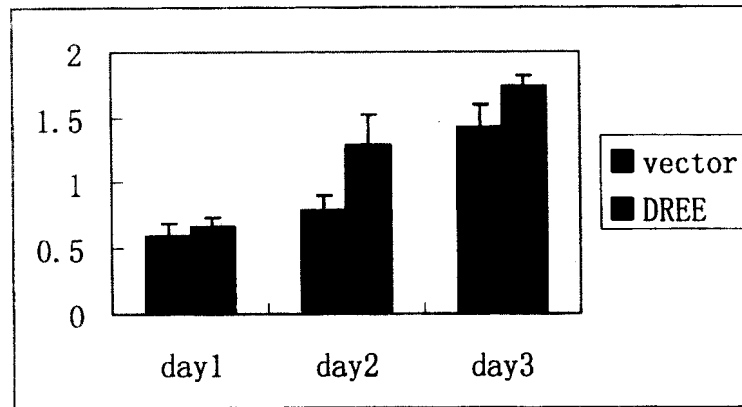


图 11

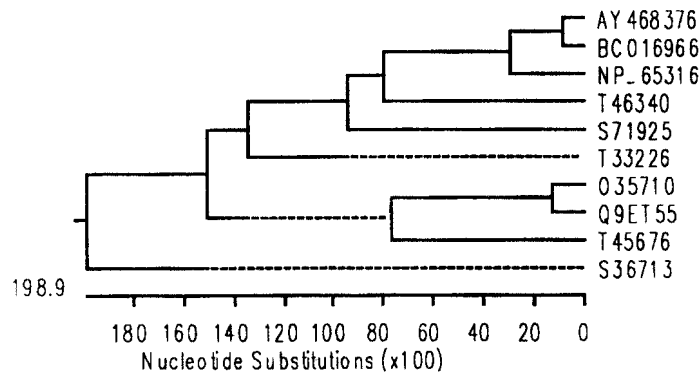


图 12

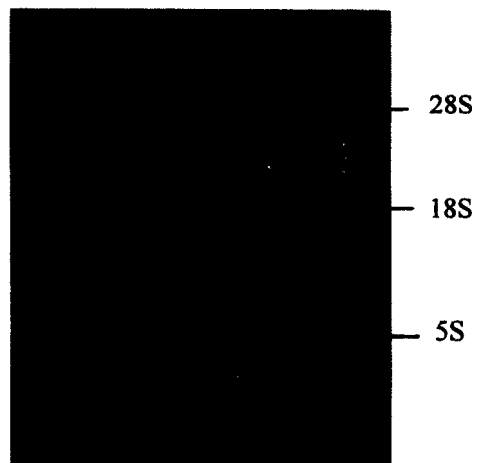


图 13

专利名称(译)	与乳腺癌有关的基因DREE及其编码的蛋白与应用		
公开(公告)号	CN100354304C	公开(公告)日	2007-12-12
申请号	CN200510011199.9	申请日	2005-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	尚永丰 易霞 孙晓静		
发明人	尚永丰 易霞 孙晓静		
IPC分类号	C07K14/435 C07K16/18 C12N15/12 C12N15/63 G01N33/68 G01N33/53 A61P35/00		
代理人(译)	何文彬		
其他公开文献	CN1807455A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及与乳腺癌有关的基因DREE(down-regulated by ER inendometrium)及其编码的蛋白，该基因的表达载体，以及所述基因和蛋白在制备治疗乳腺癌的药物中的应用。

