# APOPTOSIS OF HUMAN COLON CANCER CELL LINE DLD1 TREATED WITH TRICHOSTATIN A

PANG Xi Ning, SONG Jin Dan, SHIBAHARA. Shigeki
(*Dept. of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang* 110001)

**ABSTRACT**

We treated human colon cancer cell line DLD1 with trichostatin A (TSA) to explore the relationship between histone hyperacylation and the apoptosis of the cancer cells with expression of the microphthalmia transcription factor (MITF). Northern blot result showed: In TSA-treated group the increase of MITF expression was obviously higher, whereas the control group exhibited no apparent MITF expression. Electron microscope demonstrated ultrastructure damage and apoptosis change of DLD1 after TSA treatment, which imply that TSA may act as effective drug to kill cancer cells. The cytokines-treated group also showed elevated MITF expression level and the ultrastructure impairment. Taken together, our results suggest that MITF expression caused by TSA may be related to the cytokine acting pathway.

**Key words: Trichostatin A Microphthalmia transcription factor Colon cancer cell Apoptosis**

**研究简报**

# 银杏雄株 *GinNdly* 全长基因的分离克隆*

张建业 陈力耕 胡西琴 何新华**
(浙江大学园艺系 杭州 310029) (**广西大学园艺系 南宁 530005)

银杏(*Ginkgo Biloba* L.),又名白果,公孙树,著名的孑遗植物,被誉为活化石,是珍贵的药用、材用、观赏用树种。银杏果实营养丰富,味道鲜美,遗憾的是银杏的童期很长,实生树的开花需要20年以上。为缩短银杏童期,果树工作者进行了大量的研究,从栽培方式,传统育种方法进行了探索,但成效不大。近年来,拟南芥菜等模式植物的花发育研究取得了突破性进展。1992年,Weigel等从拟南芥菜中克隆到 *LFY* 基因,指出 *LFY* 是一个花分生组织特征基因,调控着植物开花的时间[1,2]。最近 Michael 报道[3],银杏雌株体内有双拷贝的 *LFY* 同源基因。由于银杏是严格的雌雄异株植物,目前还没有发现雌雄同株的现象。其雌雄花形态截然不同,雌雄株在染色体核型、过氧化物同工酶谱等方面都存在着较大差异[4],还有人认为存在性染色体。其雌雄株花分生组织特征基因 *LFY* 是否也有差异尚不知道。如果有差异,可以作为鉴别雌雄的方法。为此,我们克隆了银杏雄株 *LFY*(*GinNdly*)全长基因。

## 材料和方法

**1. 主要试剂**

T4 DNA 连接酶、pUCm-T 载体、X-Gal、IPTG、dNTP、Taq Plus DNA 聚合酶均购自上海生物工程公司;限制性内切酶等酶类购自 Promega 公司;DL2000 DAN Marker 购自 TaKaRa 公司。氨苄青霉素(Amp)购自华美生物工程公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。

**2. 菌株和质粒**

大肠杆菌(*E. coli*)TG1 和质粒 pUC19 本实验室保存。

**3. 植物材料**

银杏品种大佛手雄株四月中旬幼嫩的叶片采自浙江大学园艺系果园。

**4. 寡核苷酸引物**

据国外发表的银杏(品系不明)雌株 *LFY* 基因[3],设计一对引物,委托上海生物工程公司合成。引物如下:

上游引物 5'ATGGATGCAGAAGATTTTGGCGCAGC 3'
下游引物 5'TTATTGCATATTGCAATGTTTGCTTC 3'

**5. PCR 反应**

PCR 扩增方法反应体系为:10×PCR 缓冲液(不含 $Mg^{2+}$)5.0μl, $MgCl_2$(2.5mmol/L)4.0μl, dNTP 混合物(dATP,dTTP,dCTP,dGTP 各自 2.5mmol/L)4.0μl,上下游引物均为(10μmol/L)1μl,模板 DNA(50ng/μl)1.0μl,Taqplus 酶(5个活性单位/μl)0.5μl,加灭菌双蒸水至总体积 50μl。

本文 2001 年 12 月 14 日收到,2002 年 3 月 26 日接受。
* 国家自然科学基金(项目批准号:30070634)资助。

扩增参数为:94℃ 预变性 5min,然后 94℃,40s,52℃,40s,72℃,60s,进行 35 个循环,再 72℃ 延伸 10min。

**6. 基因组 DNA 与质粒 DNA 的提取**

因银杏黄酮等酚类物质含量特别丰富,氧化现象很严重。所以将 CTAB 法[5]稍做修改,加入适量 PVP,将 β-巯基乙醇的量增加到提取液体积的 4%,获得了高质量的银杏基因组 DNA。碱法小批量抽提质粒[5]。

**7. DNA 片段重组入质粒载体**

PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,用 QIA quick 胶回收试剂盒从凝胶上回收、纯化目的条带。将回收产物连接到 pUCm-T 载体上,连接产物转化大肠杆菌 TG1 菌株感受态细胞,通过蓝白斑筛选、PCR 验证、质粒长度对比和酶切鉴定获得重组质粒[6]。

**8. DNA 序列测定**

委托上海晶泰生物技术有限公司测序。

## 结 果

**1. PCR 产物的获得和克隆**

以银杏基因组 DNA 为模板,用所设计引物进行 PCR 扩增,扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。结果显示扩增出一条特异条带,长度约为 1.5kb。从胶上割取目的条带,用 QIA quick 胶回收试剂盒回收 DNA。取适量纯化的 PCR 产物与 pUCm-T 载体在 T4-DNA 连接酶的催化下 14℃ 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 TG1 菌株感受态细胞,转化细胞涂布于含氨苄青霉素,X-gal 及 IPTG 的新鲜固体 LB 平板上过夜培养。挑取白色菌斑进行 PCR、质粒长度对比和酶切(*EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切见图 1)

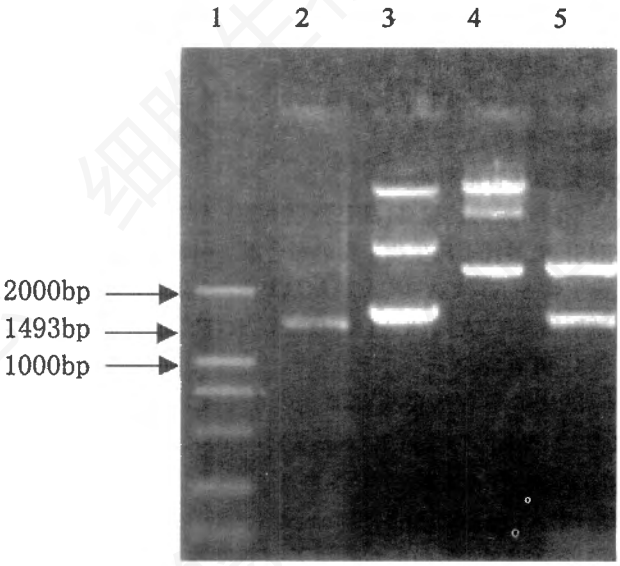


**图 1 PCR 产物、重组质粒、质粒酶切产物凝胶电泳**
lanel DNA Marker 2、3、4、5 分别为 PCR 产物,pUC19,重组质粒 GD,酶切重组质粒 pGdly。

鉴定,获得重组质粒,命名为 pGdly。

**2. 基因序列测定与结构分析**

测定重组质粒 pGdly 中外源 DNA 片段核苷酸序列,表明所克隆的 DNA 片段长 1493bp,而 Michael 等报道的银杏雌株 *GinNdly* 基因长 1496bp,少了三个碱基。用 DNAstar 软件包分析,该基因含两个内含子,三个外显子。我们获得的雄株 *LEAFY* 基因核苷酸序列与银杏雌株 *GinNdly* 基因核苷酸序列同源性为 99.7%,氨基酸序列同源性为 99.3%。与雌株 *GinNdly* 基因相比较,雄株 *GinNdly* 基因少三个碱基,即在第 24－36nt 处对应地少了一个氨基酸(a 丙氨酸)。第 71nt T→68nt C,使氨基酸 v(缬氨酸)→a(丙氨酸),第 439ntA→436G,氨基酸 i(异亮氨酸)→v(缬氨酸),第 828ntA→825G,氨基酸 r(精氨酸)→g(甘氨酸)。但突变位点均不在 *LEAFY* 基因保守区内(序列中的阴影部分),可能不会影响到它的功能。所得的银杏雄株 *GinNdly* 全长基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列如图 2。

```
ATGGATGCAGAAGATTTTGGCGCAGCAGCAGCAGCAGGCTTCTTCAGATGGGATCAGAGAAGCACAGCATTCCAG    75
 M  D  A  E  D  F  G  A  A  A  A  A  G  F  F  R  W  D  Q  R  S  T  A  F  Q     25
AAGGATAACCGACCATTTGAGCTTCTTCTTCCTCCGAATGCACGCAAGGAATTGAAGTCACTTGAAGATCTCTTC   150
 K  D  N  R  P  F  E  L  L  L  P  P  N  A  R  K  E  L  K  S  L  E  D  L  F     50
AGAGAATATGGTGTGCGCTACTCCACCATGGCCAAGATGAATGAGATGGGCTTCACTGCTAACACTCTTGTCAAT   225
 R  E  Y  G  V  R  Y  S  T  M  A  K  M  N  E  M  G  F  T  A  N  T  L  V  N     75
ATGACTGAAGAAGAAATTGAAGATCTGATGAAGGCTTTGGTCGAAATCTACCGCATGGATCTTCTCATTGGGGAG   300
 M  T  E  E  E  I  E  D  L  M  K  A  L  V  E  I  Y  R  M  D  L  L  I  G  E    100
AGATATGGAATAAAATCTGCAGTAAGAGCTGAAAAGAAACGGTTGCAGGATAATTTGGAGATGCAACGGTTAGAA   375
 R  Y  G  I  K  S  A  V  R  A  E  K  K  R  L  Q  D  N  L  E  M  Q  R  L  E    125
CTTCTGTCAGCTGAAACTGAAAGAAAACGCATGCCTGATGATCATAACACTCTGGTTGGCGTTACATCTGAAGgt   450
 L  L  S  A  E  T  E  R  K  R  M  P  D  D  H  N  T  L  V  G  V  T  S  E      149
aatatacatgttttgactgtatcaatttcagtatgaatatatgtttttttgttgaaaaaaatcattagagatgc   525
tagatgggtttcagaaaacatatagaacattgattagatcaggggtataagctctaattaaaacaataatttatc   600
ctaagccctgctgttttgttgtagGAACATCTAAGGATCTGAAAACAAATGACCCAATGATTTTCTCAGAAAACA   675
                         G  T  S  K  D  L  K  T  N  D  P  M  I  F  S  E  N  T    167
CAAGCGGAAATCATGCTCCAATGAATATGAATGGCAAAGATAATCCTTATATTTTTGTCCGGCAGAATAATATAA   750
 S  G  N  H  A  P  M  N  M  N  G  K  D  N  P  Y  I  F  V  R  Q  N  N  I  N    192
ATAAAATTAATAATGGGCATTTTTGTTCATCGGGATTAGTTGGAATGCCAGAGCACAGCAGTGACAGCGACGAAG   825
 K  I  N  N  G  H  F  C  S  S  G  L  V  G  M  P  E  H  S  S  D  S  D  E  G    217
GGAGAATCCATACCAGTAAGCAGAAGAGAAGGCGGCCCAAAGAAGGCGCAGAGGATGGAGAAGACAGGCCAAGGG   900
 R  I  H  T  S  K  Q  K  R  R  R  P  K  E  G  A  E  D  G  E  D  R  P  R  E    242
AGCATCCTTTCATTGTAACTGAACCTGGTGAACTTGCCAGAGGAAAGAAAAATGGCCTGCATTATCTGTTTGATC   975
 H  P  F  I  V  T  E  P  G  E  L  A  R  G  K  K  N  G  L  D  Y  L  F  D  L    267
TGTATGAACAATGTGGAAAATTTTTATCAGAAGTTCAAAGGATTGCCAAAGAAAGGGGAGAAAAATGTCCAACTA  1050
 Y  E  Q  C  G  K  F  L  S  E  V  Q  R  I  A  K  E  R  G  E  K  C  P  T  K    292
AGgtatataactatgattttaactttgtttgaatgttgcttcatgtccactgttataatattcagtatatatata  1125
tatatatttgacatatgagtgctgtattattgtttcagGTTACAAATCAAGTATTTCGGCATGCAAAGCACACAG  1200
                                       V  T  N  Q  V  F  R  H  A  K  H  T  G    305
GCGCTGTCTACATAAATAAACCCAAAATGCGACATTATGTGCACTGTTATGCTCTACACTGTTTGGACAGTGAGC  1275
 A  V  Y  I  N  K  P  K  M  R  H  Y  V  H  C  Y  A  L  H  C  L  D  S  E  Q    330
AATCAAATCACCTGAGGAGAATATACAAGGAACGGGGTGAAAATGTTGGAGCTTGGCGCCAGGCCTGTTATTATC  1350
 S  N  H  L  R  R  I  Y  K  E  R  G  E  N  V  G  A  W  R  Q  A  C  Y  Y  P    355
CCTTAGTCGCCATAGCCAGGGAAAGCAATTGGACATTGAAGGCGTTTTTAATAGAAATGAGAAGCTTAGGATTTG  1425
 L  V  A  I  A  R  E  S  N  W  D  I  E  G  V  F  N  R  N  E  K  L  R  I  W    380
GGTATGTTCCGACTAAATTAAGGCAGCTCTGTCACATGGAGAGAAGCAAACATTGCAATATGCAATAA        1493
 Y  V  P  T  K  L  R  Q  L  C  H  M  E  R  S  K  H  C  N  M  Q  <             401
```

**图 2 银杏雄株 *GinNdly* 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列**
(小写字母部分为内含子,阴影部分为多种植物 *LEAFY* 同源基因的保守区)

## 讨 论

高等植物生命周期中有两种基本的生长方式，即营养生长和生殖生长。在开花之前，植株通常需要经历一个营养生长阶段，果树表现的尤其明显。这一阶段的特征是顶端分生组织呈无限生长状态，在侧面发生叶原基，对开花诱导信号没有响应能力。当达到一定的苗龄或大小时，植株获得了开花能力，对开花诱导因子产生响应，促使花序分生组织向花分生组织转变。在诸多的开花诱导因子中，*LFY* 基因起着中心的作用，启动花原基的分化。在拟南芥菜 *LFY* 突变体中，花逆转变为花序枝条[1]。目前，多种植物的 *LFY* 同源基因已被克隆，如拟南芥菜 *LFY*[1]、金鱼草 *FLO*[7]、水稻 *RFL*[8]、花椰菜 *BOFH*[9]、杨树 *PTLF*[10]等。这些 *LFY* 同源基因在其植物体内都是单拷贝存在的。

与被子植物明显不同的是，银杏体内存在双拷贝的 *LFY* 同源基因[3]。我们克隆到银杏雄株 *LFY* 同源基因与雌株 *LFY* 存在一些差异，这是否就是雌雄株银杏内在遗传差异，还是品种间的差异，还不能肯定。我们正在做这方面的研究。目前用于银杏性别鉴别的方法有观察染色体、同工酶谱法与观察花的形态。观察花形态是最准确的方法，可是至少需要十几年的时间。如果雌雄株 *LFY* 基因存在差异，采用分子生物学手段鉴别银杏性别将是一种快速准确的新方法。

银杏的这两个 *LFY* 同源基因在银杏体内的功能是否一样，与拟南芥菜 *LFY* 基因有何异同，为何有两个花分生特征基因的银杏童期却很长，需要深入研究。对于银杏开花的研究报道还很少，史继孔、张万萍等报道过银杏的雌雄株的花芽形态分化[11,12]，但在分子水平上研究其开花的调控机制，尚未见报道，本研究结果——银杏雄株 *GinNdly* 基因的克隆，为此打下了一个很好的基础。

## 摘 要

以银杏栽培品种大佛手(Ginkgo biloba L. cv. Dafushou)雄株为材料，用四月中旬幼嫩的叶片基因组 DNA 为模板，通过 PCR 扩增，获得银杏雄株 *LEAFY*(*LFY*)同源基因 *GinNdly* 全长基因。结果分析表明，该全长基因含 1493 个核苷酸。与文献报道的银杏雌株 *GinNdly* 基因相比，碱基数少了三个，对应地氨基酸少一个，核苷酸同源性为 99.7%，氨基酸同源性为 99.3%。该基因的克隆为在分子水平上研究银杏开花调控机理奠定了良好的基础。

**关键词：银杏 雄株 *GinNdly* 基因**

## 参 考 文 献

[1] Weigel D., et al., 1992, *Cell*, **69**: 843－859.
[2] Weigel D., et al., 1995, *Nature*, **377**: 495－500.
[3] Michael W. et al., 2000, *Systematic botony*. **25**(2): 155－170.
[4] 梁立兴编著，1988，中国银杏，山东科学技术出版社，p25－26.
[5] Frederick M. et al., 1995, *Short protocols in molecular biology 3rd ed*. P37.
[6] Sambrook J. et al., 1989, *Molecular cloning 2nd ed*.
[7] Coen E. S. et al., 1990, *Cell*, **63**: 1311－1322.
[8] Kyozuka J, et al., 1998, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **95**(5): 1979－1982.
[9] Anthony R. G. et al., 1993, *Plant Mol. Biol.*, **22**: 1163－1166.
[10] Rottmann W. et al., 2000, *Plant J*. **22**(3): 235－245.
[11] 史继孔等，1998，园艺学报，**25**(1): 33－36.
[12] 张万萍等，2001，园艺学报，**28**(3): 255－258.

# *GinNdly* GENE CLONED FROM THE MALE GAMETOPHYTE OF *GINKGO BILOBA*

ZHANG Jian Ye CHEN Li Geng HU Xi Qin He Xin hua
(*Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou* 310029, *China*)

## ABSTRACT

The flower-meristem-identity gene *LEAFY*(*LFY*) is a developmental switch, sufficient for flower initiation in diverse plants. *Ginkgo billoba* is a dioecious tree species of gymnosperm. *LFY*(*GinNdly*) homolog gene was cloned from the leaf genomic DNA of the male gametophyte in the mid-April. Sequence analysis indicated that the gene was composed of 1493 bp. The gene is 99% homology to the sequence reported in female tree and deleted 3 bases. The work established a sound foundation for the future research to study the developmental controlling mechanism of *gingko* flower.

**Key words: Male gametophyte, *Ginkgo Biloba* L, *GinNdly*, Gene**