

· 基础研究 ·

突变型 DNA 聚合酶 β 真核表达载体的构建及其表达*赵四敏¹, 陈旭东², 赵国强³, 董子明^{4△}

(漯河医学高等专科学校: 1. 病理生理学教研室; 2. 微生物学与免疫学教研室, 河南漯河 462002;

郑州大学基础医学院: 1. 微生物学与免疫学教研室; 4. 病理生理学教研室, 郑州 450001)

摘要:目的 构建含食管癌突变型 DNA 聚合酶 β 基因(DNA polymerase β , pol β)的真核表达载体 pcDNA4-C-pol β ,使其在 pol β 基因敲除的 EC9706 细胞中表达。方法 根据食管癌突变型 pol β 基因序列,设计并合成一对特异性引物(引物 1、引物 2),通过 PCR 扩增获得含 BamH I 和 Apa I 的基因序列,将其克隆入 T 载体,PCR 及测序鉴定无误后,将其插入真核表达载体 pcDNA4-C,从而构建了含突变型 pol β 基因的真核表达载体 pcDNA4-C-pol β 。将重组质粒以脂质体包裹的方式转染入 pol β 基因敲除的 EC 9706 细胞,G418 筛选获得稳定转染的细胞株。结果 经过 PCR 筛选及 DNA 测序鉴定,证实真核表达载体 pcDNA4-C-pol β 构建成功。筛选后的 EC 9706 细胞经 HislinkTM 蛋白纯化试剂盒纯化,仅在 39 kD 位置有一条带,证明蛋白表达及纯化成功。结论 成功构建了食管癌突变型 pol β 基因的真核表达载体 pcDNA4-C-pol β ,并纯化出 pol β 蛋白,为进一步研究 pol β 的功能奠定坚实的基础。

关键词:突变型 DNA 聚合酶 β ; pcDNA4-C 真核表达载体; EC 9706 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)17-1716-03

Construction of eukaryotic expressing vector of mutation pol β and its express*Zhao Simin¹, Chen Xudong², Zhao Guoqiang³, Dong Ziming^{4△}

(1. Department of Pathophysiology; 2. Department of Department of Microbiology and Immunology,

Luohe Medical College, Luohe, Henan 462002, China; 3. Department of Microbiology

and Immunology; 4. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical

Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: Objective To construct mutant pol β eukaryotic expression vector and to transfect it into EC9706 cell of pol β gene targeting. **Methods** To design a primer pair (primer 1/ primer 2) for amplifying pol β , the gene containing BamH I and Apa I was amplified by PCR, then was cloned into T-vector. Recombinant was identified by PCR and by DNA sequencing. After that, it was subcloned into pcDNA4-C plasmid. The eukaryotic expressing vector pcDNA4-C-pol β was obtained. It was transfected into EC9706 cells of pol β gene targeting. The EC9706 cell lasting transfected with pcDNA4-C-pol β was obtained by G-418 screening. **Results** The eukaryotic expressing vector pcDNA4-C-pol β was obtained by PCR and sequencing. pol β protion was obtained from EC9706 cells which were screened by HislinkTM protion purification system, the result was identified by SDS-PAGE. **Conclusion** Mutant pol β eukaryotic expression vector pcDNA4-C-pol β is successfully constructed and pol β protion is purified, which lays a solid foundation for further studying pol β function.

Key words: mutation DNA polymerase β ; pcDNA4-C eukaryotic expression vector; EC9706 cell

DNA 聚合酶 β (DNA polymerase β , pol β) 是真核细胞 DNA 聚合酶家族的一员,为一看家基因,基因全长 35 kb,位于第 8 号染色体近着丝点处,有 14 个外显子及 13 个内含子,转录 1.4 kb mRNA,其启动子位于主要转录起始点的上游 115 bp 内^[1]。从酵母到哺乳类细胞的 pol β 均高度保守,并且广泛分布于哺乳动物细胞核内,其表达产物是相对分子质量为 39 kD 的单链小分子蛋白,是真核细胞中相对分子质量最小的 DNA 聚合酶。pol β 主要参与 DNA 修复。一系列 DNA 体外复制实验也证实 pol β 不参与 DNA 复制,它的主要功能是参与 DNA 损伤修复,尤其是碱基切除修复(BER),包括短片段和长片段 BER,起催化 DNA 合成填补缺口以及从无嘌呤/嘧啶(AP)位点催化 5'末端脱氧核糖磷酸残基释放的作用^[2-3]。碱基切除修复是一种重要的真核 DNA 修复途径,它可以除去

DNA 损伤,包括脱碱基位点氧化损伤,甲基化碱基^[4]。

有研究表明,细胞中 pol β 基因的突变会导致异常 pol β 的产生,损害 BER 功能,也会增加抑癌基因、原癌基因以及其他控制生长的重要基因的突变频率,从而增加肿瘤的发生概率。pol β 是 BER 过程的重要组成部分,而 BER 又是异常基因修复的重要途径,对于细胞的正常生长具有至关重要的作用。pol β 异常的细胞会显示 BER 的缺乏和对损伤碱基物质的敏感性增加。目前,已在直肠癌、前列腺癌、食管癌、胃癌、鼻咽癌等多种人类肿瘤组织中发现了 pol β 基因突变和(或)表达异常^[5-9]。因此,有必要构建人突变型 pol β 基因真核表达载体,将其转染入 pol β 基因敲除的 EC 9706 细胞,利用该细胞株可有效排除本底干扰,确保表达的是突变型的 pol β 基因,为进一步研究突变型 pol β 基因对食管癌细胞的生物学影响打下坚实的实验

基础。

1 材料与方法

1.1 材料 限制性内切酶 *Bam*H I、*Apa* I (Takara 公司); T_4 DNA 连接酶 (Promega 公司); pGEM-T-easy 克隆载体 (Promega 公司); 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自 QIA-GEN 公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-Gal) 购自 Invitrogen 公司; 食管癌突变型及野生型 *pol* β 基因 (M*pol* β 及 W*pol* β)、大肠杆菌 DH α 及 TOP10、真核表达载体 pcDNA4-C、*pol* β 基因敲除的 EC 9706 细胞均由本实验室保存; Hislink 蛋白纯化试剂盒购自 Promega 公司; G 418 购自 Gibco 公司; 脂质体 (LipofectamineTM 2000) 购自 Invitrogen 公司; DMEM、胎牛血清购自杭州四季青生物工程研究所; 引物合成及序列分析均由上海生工生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 所提供的 *pol* β 基因序列设计引物, 引物 1: 5'-TCG GAT CCA TGA GCA AAC GGA AGG CGC CGC AGG AG-3' (*Bam*H I); 引物 2: 5'-TTG GGC CCT CAT TCG CTC CGG TCC TTG GGT TCC C-3' (*Apa* I)。

1.2.2 目的基因的扩增 PCR 扩增 *pol* β 基因以 M*pol* β 及 W*pol* β 为模板, 利用引物 1、引物 2 进行 PCR 扩增, 获得含 *Bam*H I、*Apa* I 酶切位点的目的基因。扩增的反应体系: 10 \times 缓冲液 3 μ L, 4 \times dNTP 2 μ L, 引物 1 0.5 μ L, 引物 2 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, Mini-H $_2$ O 18.5 μ L, 模版 DNA 5 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个反应循环, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 5 min, 产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 分别从琼脂糖凝胶中回收目的基因。具体步骤按胶回收试剂盒说明操作。

1.2.3 克隆 将回收的 M*pol* β 及 W*pol* β 基因序列与 Promega 公司的质粒载体 pGEM-T 以摩尔比 3 : 1 的比例混合连接, 连接产物 16 $^{\circ}$ C 过夜, 构建含有目的基因的重组质粒 pGEM-T-M*pol* β 及 pGEM-T-W*pol* β , 用 CaCl $_2$ 法转化大肠杆菌 TOP10 株, 通过蓝白筛选, 挑选白色菌落进行 PCR 鉴定, 然后选取插入了目的片段的重组质粒进行测序鉴定, 即获得了阳性重组质粒 pGEM-T-M*pol* β 及 pGEM-T-W*pol* β 。

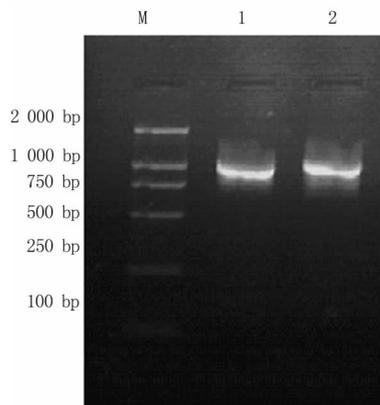
1.2.4 亚克隆 用小量质粒提取试剂盒提取质粒 pcDNA4-C 和鉴定正确的 pGEM-T-M*pol* β 及 pGEM-T-W*pol* β , 分别经 *Bam*H I、*Apa* I 双酶切后胶回收纯化。具体步骤参照胶回收纯化试剂盒。在 T_4 DNA 连接酶的作用下, 16 $^{\circ}$ C 过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH α 株感受态细胞, 产生重组质粒 pcDNA4-C-M*pol* β 及 pcDNA4-C-W*pol* β 。经 PCR 鉴定, 选取鉴定正确细菌, 接种于 30 mL 含氨苄西林的液体培养基中扩菌, 用质粒提取试剂盒提取质粒即得重组质粒。

1.2.5 细胞转染和蛋白纯化 将本实验室先前构建的质粒 pcDNA4-C-M*pol* β 和 pcDNA4-C-W*pol* β 分别以脂质体包裹的方式转染入 *pol* β 基因敲除的 EC 9706 细胞, 转染 6 h 后换为含 100 mL/LBSA 的 DMEM 完全培养基继续培养, 继续培养 24 h 后 G 418 筛选 2 周, G418 筛选浓度为 700 μ g/ μ L, 得到稳定表达 pcDNA4-C-M*pol* β , pcDNA4-C-W*pol* β 的细胞克隆, 收集稳定转染的细胞使用 HislinTM 蛋白纯化试剂盒纯化蛋白。

2 结果

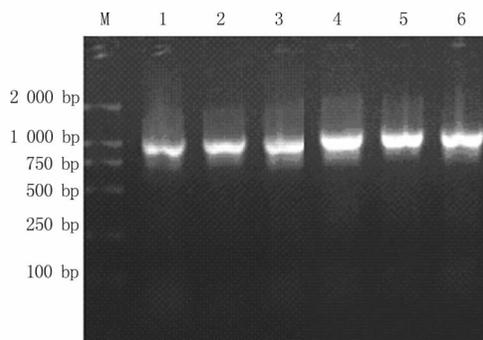
2.1 *pol* β 基因的扩增 以 M*pol* β 及 W*pol* β 为模板, 利用引物 1、引物 2 经 PCR 扩增获得 *pol* β 基因序列, 在 DNA marker 1 000 bp 处有条带, 可能为 1 100 bp 的目的片段, 与该片段的理论值一致, 见图 1。

2.2 *pol* β 基因片段的克隆及 PCR 鉴定 重组质粒 pGEM-T-M*pol* β 及 pGEM-T-W*pol* β 经转化扩增后, 经蓝白筛选后分别从两个氨苄西林阳性的平板上随机筛选 3 个菌落, 分别以 6 个菌落的裂解产物为模板, 扩增片段长度大致为 1 100 bp, 与预期结果相符, 见图 2。



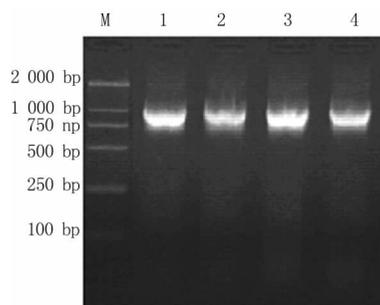
M: DNA 标记物; 1: 突变型 *pol* β 基因的 PCR 产物; 2: 野生型 *pol* β 基因的 PCR 产物。

图 1 PCR 扩增电泳结果



M: DNA 标记; 1~3: pGEM-T-M*pol* β 的 PCR 产物; 4~6: pGEM-T-W*pol* β 的 PCR 产物。

图 2 pGEM-T-M*pol* β /W*pol* β 质粒 PCR 鉴定结果



M: DNA 标记物; 1~2: pcDNA4-C-M*pol* β 的 PCR 产物; 3~4: pcDNA4-C-W*pol* β 的 PCR 产物。

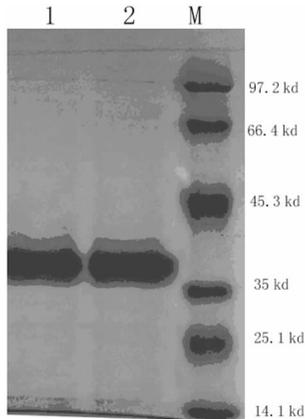
图 3 重组质粒 pcDNA4-C-*pol* β PCR 扩增产物电泳结果

2.3 测序及分析结果 含点突变片段的重组质粒与标本中的

突变完全一致,构建载体中外源片段完全忠实于所选标本,可应用于下游操作。

2.4 pol β 基因片段表达载体的构建及鉴定 T₄ 连接酶分别连接双黏的 Mpol β 及 Wpol β 基因和羟基化后双黏的 pcDNA4-C,转化入感受态细胞 DH₅ α ,从每个氨苄西林阳性的平板上随机挑选 2 个菌落溶菌进行 PCR 鉴定,电泳结果与设计一致,见图 3。

2.5 细胞转染后 pol β 蛋白的纯化 表达产物经 SDS-PAGE 分析,结果显示,在相对分子质量约为 39 kD 位置有一条带,与预期的融合蛋白大小相符,说明诱导表达及纯化成功,见图 4。



M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的突变型 pol β 蛋白; 2: 纯化的野生型 pol β 蛋白。

图 4 纯化后蛋白 SDS-PAGE 结果

3 讨 论

pol β 基因和肿瘤之间的关系正受到越来越多的关注,很多的研究证明它参与了肿瘤的发生和发展, pol β 基因突变已经在人类结肠直肠癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌、小鼠淋巴瘤中得到证实。迄今为止,只有 90 种肿瘤接受突变与聚合酶 β 编码序列关系的分析,其中 35% 的肿瘤有 pol β 基因突变,这种与肿瘤有关的 pol β 基因突变只在肿瘤组织中发现,而在同一患者的正常组织中未发现 pol β 突变,这暗示了 pol β 基因突变是引起肿瘤疾病的自发突变,此外,在这些肿瘤中存在的 pol β 基因突变在 124 个正常个体的 pol β 基因中都未出现。更有意思的是: pol β 定位于 8 号染色体 (p12~p11) 短臂的近侧区,这个区段在一些人类肿瘤(如结肠直肠癌,前列腺癌)中经常丢失^[10]。这些研究表明 pol β 基因突变和致癌作用间有一定的联系。另一个与 pol β 在肿瘤中作用相一致的证据就是它与肿瘤抑制因子 P53 的相互作用^[11-12]。P53 蛋白可以在一个脱碱基位点稳定 pol β , P53 和 pol β 相互作用的改变会引起 DNA 修复效率的降低,而这可能导致肿瘤疾病的进展,如果在人类细胞表达 87 个碱基缺失的 pol β 基因突变(这种突变已经在原发结肠癌、肺癌、乳腺癌中发现^[13]),它会比野生型 pol β 占优势,并且会破坏它的碱基切除活性,很可能在其他的肿瘤样本中发现的 pol β 基因突变有相似的生物学影响。因此,进一步研究 pol β 及其在 DNA 修复中作用的规律和机制已经成为肿瘤分子机制深入研究一个新的领域。本实验室曾发现在食管癌高发区及非高发区食管癌患者中有 pol β 基因的突变,且其突变形式与已报道的在其他肿瘤中 pol β 基因的突变形式不尽相同^[14-15]。作为该课题的后继研究,本实验选择突变型基因片段构建真核表达载体,为研究突变型 pol β 的功能及其对肿瘤的影响等作准备。构建突变型 pcDNA4-C-pol β 真核表达载体并纯化出

pol β 蛋白可继续进行其他研究,进而深入探讨 pol β 基因突变及功能突变与环境、遗传因素等的关系。

参考文献:

- [1] 董子明. DNA 聚合酶 β 的研究现状[J]. 郑州大学学报, 2003, 38(4): 477.
- [2] Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, et al. Human DNA repair genes[J]. Science, 2001, 291(5507): 1284-1289.
- [3] 鹿伟, 傅剑云. DNA 聚合酶 β 与肿瘤关系的研究进展[J]. 现代预防医学, 2006, 33(12): 2344.
- [4] Lindahl T. Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair[J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001, 68: xvii-xxxx.
- [5] Bhattacharyy N, Chen HC, Wang L, et al. Heterogeneity in expression of DNA polymerase beta and DNA repair activity in human tumor cell lines[J]. Gene Expr, 2002, 10(3): 115.
- [6] 王蕾, 董子明, 赵国强. siRNA 沉默 DNA 聚合酶 β 基因对胃癌 BGC-823 细胞增殖的影响[J]. 肿瘤, 2008, 28(8): 651.
- [7] Starcevic D, Dalal S, Saeasy JB. Is there a link between DNA polymerase beta and cancer[J]. Cell Cycle, 2004, 3(8): 998.
- [8] Podlutzky AJ, Dianova II, Wilson SH, et al. DNA Synthesis and dRPase activities of Polymerase beta Are Both Essential for Single-Nucleotide Patch Base Excision Repair in Mammalian Cell Extracts[J]. Biochemistry, 2001, 40(3): 809-813.
- [9] Tieming L, Mausumi M, Daniela S, et al. A DNA polymerase mutant from colon cancer cells induces mutations[J]. PNAS, 2004, 101(16): 6074-6079.
- [10] Macoska JA, Trybus TM, Sakr WA, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer[J]. Cancer Res, 1994, 54(14): 3824-3830.
- [11] Seo YR, Fishel ML, Amundson S, et al. Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence[J]. Oncogene, 2002, 21(5): 731-737.
- [12] Zhou J, Ahn J, Wilson SH, et al. A role for p53 in base excision repair[J]. EMBO J, 2001, 20: 914-923.
- [13] Bhattacharyya N, Chen HC. Variant forms of DNA polymerase beta in primary lung carcinomas[J]. DNA Cell Biol, 1999, 18(7): 549-554.
- [14] 刘栋, 董子明, 赵国强. 食管癌 DNA 聚合酶 β 的突变[J]. 河南职工医学院学报, 2002, 14(4): 289.
- [15] 赵国强, 郑乃刚, 赵勤, 等. 人食管癌组织中 DNA 聚合酶 β 基因突变特点分析[J]. 郑州大学学报, 2003, 38(4): 499.