

# 重组体 pcDNA3.1(+)-tyr 的构建及在小鼠 NIH3T3 细胞中的表达

吉琼梅, 朱振宇, 张海涛, 李秀英, 岳滔, 李茜, 马润泉  
(中山大学中山医学院生物化学教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】克隆酪氨酸酶基因(*tyr*), 构建 pcDNA3.1(+)-*tyr* 真核表达重组体, 并导入 NIH3T3 细胞表达。【方法】用 RT-PCR 法从小鼠 B16 黑色素瘤细胞中克隆 *tyr* 全长 cDNA 片段, 利用 DNA 重组技术将其定向插入真核表达质粒 pcDNA3.1(+ )的 T7 启动子下游, 并用脂质体法导入 NIH3T3 细胞, RT-PCR, 酪氨酸酶活性测定及多巴染色法检测 *tyr* 的表达。【结果】成功克隆 1.74 kb 的全长 *tyr* cDNA 片段, 经测序证实与 GenBank 所报道的序列完全一致, *tyr* 准确克隆入 pcDNA3.1(+ )的多克隆位点, RT-PCR 及酪氨酸酶活性测定等方法检测到感染了重组体的 NIH3T3 细胞中有 *tyr* 的表达。【结论】本实验成功构建了 pcDNA3.1(+)-*tyr* 真核表达重组体, 并成功导入 NIH3T3 细胞中表达。

**关键词:** 黑色素瘤细胞; 一元酚单氧酶/遗传学; 质粒, pcDNA3.1(+); 基因表达

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)04-0358-05

## Construction of Eukaryotic Cell Expression Recombinant pcDNA3.1(+)-*tyr* and the Expression of *tyr* in Murine Fibroblast Cells

Ji Qiong-mei, Zhu Zhen-yu, Zhang Hai-tao, Li Xiu-ying, Yue Tao, Li Qian, Ma Jian-quan  
(Department of Biochemistry, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To construct eukaryotic cell expression recombinant pcDNA3.1(+)-*tyr*, and express *tyr* in murine fibroblast cells. 【Methods】 The fragment of complete *tyr* cDNA was amplified by RT-PCR from murine B16 melanoma cell and was recombined to the downstream of T7 promoter in the eukaryotic cell expression plasmid pcDNA3.1(+), the pcDNA3.1(+)-*tyr* recombinant was used to infect murine fibroblast cell NIH3T3 for expression of *tyr*. 【Results】 The 1.74 kb fragment of complete *tyr* cDNA was successfully cloned. DNA sequencing analysis proved that the sequence of the gene cloned was totally consistent with the data of GenBank. The *tyr* cDNA fragment was cloned into the multiple cloning sites of vector pcDNA3.1(+ ) properly. Then the recombinant was introduced into NIH3T3 cells. RT-PCR, determination of the activity of tyrosinase and DOPA staining showed that the *tyr* was successfully expressed in NIH3T3 cells. 【Conclusion】 The pcDNA3.1(+)-*tyr* eukaryotic cell expression recombinant is successfully constructed, and *tyr* is successfully expressed in NIH3T3 cells.

**Key words:** melanoma cell; tyrosinase/genetics; plasmid pcDNA3.1(+); gene expression

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4):358 ~ 362]

酪氨酸酶基因 (*tyr*) 主要编码酪氨酸酶的产生。酪氨酸酶是黑色素生物合成过程中的限速酶,

细胞中酪氨酸酶的含量和活性直接影响着黑色素生成的速度和产量。黑色素主要在黑色素细胞合

收稿日期: 2002-09-12

基金项目: 教育部留学人员启动基金资助项目 (2000479)

作者简介: 吉琼梅 (1969-), 女, 河南洛阳人, 博士生, 讲师; 马润泉, 教授, 导师; 朱振宇, 教授, 通讯作者. E-mail: zhuqun@gzsums.edu.cn

成,分为真黑素与脱黑素两种,它们广泛存在于生物体内,从霉菌到人都有的。近年来的研究表明,黑色素具有独特的结构和性质,且其功能多种多样。皮肤黑色素的主要功能是保护组织不发生由紫外线引起的急慢性改变,即晒伤、老化、癌变等。酪氨酸酶基因的结构改变或表达异常可导致酪氨酸酶活性改变,从而引起黑色素合成过多、过少或缺失,临床上则导致黄褐斑、白化病、白癜风、色素痣等皮肤色素病的发生。此外,皮肤癌之一:恶性黑色素瘤也与酪氨酸酶的活性密切相关,它们均属于难治性疾病,目前尚未有特异有效地治疗方法。因此探讨 *tyr* 的表达调控机制,寻找调控 *tyr* 表达的有效方法对由 *tyr* 表达失控引起的多种难治疾病的防治具有重要的意义。本研究拟克隆小鼠 *tyr* 并构建 pcDNA3.1(+)-*tyr* 真核表达质粒,导入小鼠 NIH3T3 成纤维细胞表达,为进一步探讨 *tyr* 表达调控机制和对由 *tyr* 表达失控引起的疾病的防治等提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

小鼠 B16 黑色素瘤细胞株及小鼠成纤维细胞株均购自中山大学实验动物中心,用含体积分数为 15% 胎牛血清,青霉素和链霉素各 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 RPMI1640, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  环境常规传代培养,待细胞生长至对数生长期即可抽提其 RNA。

### 1.2 试剂

TRIzol 试剂, M-MLV RTase, Lipofectamine, G418 等购自 Gibco 公司; pMD18-T 载体, TaKaRa LA *Taq* 购于大连宝生生物工程公司;限制性内切酶 (*Bam*H I, *Hind* III), 200 bp DNA marker 为华美公司产品;凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; T4 连接酶, 低熔点 Agarose 购自上海生工生物工程公司, DOPA 为 Sigma 公司出产。大肠杆菌 JM109 本室保存, 真核表达质粒 pcDNA3.1(+ ) 为 Invitrogen 公司出产。

### 1.3 引物

RT-PCR 克隆用上游引物: 5'-GGAAGCTTGATC TAAAGGAGAAAATGT-3'; 下游引物 5'-GCCGATCC AAGCCAAACAGCTATGG-3', 扩增长度为 1 742 bp 的全长 *tyr* cDNA 片段, 且上下游引物中分别引入了限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 的识别位点(划

线部分)以保证克隆的方向性。RT-PCR 检测用上游引物: 5'-GGGAATTCAGCTTTCAGGCAGAGGT-3'; 下游引物: 5'-GGAAGCTTGTGGGGATGACATAGACT-3', 扩增长度为 314 bp 的 *tyr* 片段。 $\beta$ -actin 扩增上游引物: 5'-AGCGGGAAATCGTGCGTGAC-3'; 下游引物: 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3', 拟扩增 471 bp 长的  $\beta$ -actin 基因片段。测序引物: 通用引物 M13 为上海申友公司制备。

### 1.4 RT-PCR 法扩增 *tyr* cDNA

1.4.1 总 RNA 抽提 用 TRIzol 试剂抽提小鼠 B16 黑色素瘤细胞的总 RNA, 14 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测有无降解, 紫外分光光度仪测定浓度及纯度。

1.4.2 RT-PCR 第一链合成反应体系为: 20  $\mu\text{L}$  反应终液内含 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 下游引物, 5  $\mu\text{g}$  总 RNA, 1  $\mu\text{L}$  dNTP (10  $\text{mmol}/\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  DTT, 4  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Buffer, 1  $\mu\text{L}$  RNasin, 1  $\mu\text{L}$  M-MLV Rtase, 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 50 min, 70  $^{\circ}\text{C}$  15 min 灭活, 产物可直接用于 PCR 反应。PCR 反应体系为: 50  $\mu\text{L}$  反应终液内含 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Buffer, 1  $\mu\text{L}$  dNTP (10  $\text{mmol}/\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ , 上游及下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , RT 产物 5  $\mu\text{L}$  及 TaKaRa LA *Taq* 0.5 U, 基因扩增的热循环参数为: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 共 35 个循环, 取 10  $\mu\text{L}$  反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.5 构建 PMD18-T-*tyr* 质粒及测序

1.5.1 PCR 产物的纯化与回收 按 QIAGEN 公司试剂盒操作说明, 用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收和纯化 PCR 产物。

1.5.2 PCR 产物(目的基因)与 pMD18-T 载体连接 10  $\mu\text{L}$  反应体系含 pMD18-T 载体 1  $\mu\text{L}$ , 目的基因 4  $\mu\text{L}$ , Buffer 1(含连接酶) 5  $\mu\text{L}$ , 16  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。

1.5.3 连接产物转化大肠杆菌  $\text{CaCl}_2$  法制备感受态大肠杆菌 JM109。将 10  $\mu\text{L}$  连接产物加入 100  $\mu\text{L}$  感受态菌中, 冰浴 30 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  热休克 90 s, 立即静置冰浴 2 min, 加入 400  $\mu\text{L}$  LB 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$  温和振荡 1 h, 短暂离心, 弃一部分上清, 余约 200  $\mu\text{L}$  与菌体混匀, 全部用无菌铺菌棒均匀涂布于含 50  $\text{mg}/\text{L}$  氨苄西林的 LB 选择平板上, 室温平放 30 min 后, 置 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱倒置培养 14 ~ 16 h。

1.5.4 阳性克隆的筛选与测序 从 LB 选择平板上挑取单克隆于含 100  $\text{mg}/\text{L}$  氨苄西林的 LB 液体

培养基中, 37 °C 剧烈振摇过夜, 按试剂盒操作说明, 小量抽提质粒, 用 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切和 PCR 法检测, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性质粒。阳性质粒送上海申友公司测序。

### 1.6 目的基因定向亚克隆构建 pcDNA3.1(+)-tyr 真核表达质粒

pMD18-T 和 pcDNA3.1(+) 质粒均用 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切后低熔点琼脂糖凝胶回收目的基因 *tyr* 和 pcDNA3.1(+) 酶切片段, T4 连接酶连接, 转化 JM109 菌株, 筛选阳性克隆, 双酶切和 PCR 鉴定, 方法同前。

### 1.7 NIH3T3 细胞转染及筛选

用脂质体法 (lipofectamine), 按脂质体试剂盒 (GIBCO BRL) 说明方法转染 NIH3T3 细胞, 并经 G418 (300 μg/L) 筛选获得阳性克隆, 扩增培养。

### 1.8 *tyr* 在小鼠成纤维细胞中表达的检测

用 RT-PCR 法分别检测感染了重组质粒 pcDNA3.1(+)-*tyr*、空质粒 pcDNA3.1(+) 及未感染的 NIH3T3 细胞中的 *tyr* 的表达, 在同一 RT-PCR 反应体系中同时加入 *tyr* 检测引物和  $\beta$ -actin 对照引物, 以  $\beta$ -actin 基因作为内对照, 其余操作同前。

### 1.9 酪氨酸酶活性测定<sup>[1]</sup>

96 孔培养板分别加入感染了重组质粒 pcDNA3.1(+)-*tyr*、感染了空质粒 pcDNA3.1(+) 及未感染的 NIH3T3 细胞的单细胞悬液 10<sup>4</sup>/孔, 每组细胞 10 个孔, 待贴壁后用 pH 7.4 的 PBS 洗涤两次, 每孔加体积分数为 1% Triton-X-100 溶液 50 μL, 迅速置 -80 °C 冷冻 30 min, 随后室温融化使细胞完全破裂, 37 °C 预温后加入 10 g/L 多巴 (DOPA) 溶液 10 μL, 37 °C 反应 2 h, 测定 490 nm 吸光度值, 以未感染的 NIH3T3 细胞孔作为对照, 每一细胞组设 10 个复孔, 取平均值, 用方差分析统计结果, 对比各组间的差异, 计算 *P* 值。

### 1.10 多巴染色

将传代细胞接种于盖玻片上, 贴壁后, 予体积分数 10% 的甲醛固定 1 h, 入 1 g/L 二羟基苯丙氨酸 (DOPA) 孵育溶液, 37 °C 孵育 45 min, 再入新鲜的孵育溶液, 37 °C 孵育 6~8 h 冲洗、染色并脱水, 光镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 B16 细胞总 RNA 抽提

用 TRIzol 试剂抽提的 B16 细胞总 RNA 质量好,  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8~2.0 之间, 14 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测未降解。

### 2.2 RT-PCR 扩增 *tyr* 全长 cDNA 片段

RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳可见一条清晰的特异性扩增条带 (图 1), 其大小与理论预期值相符, 为 1 742 bp。

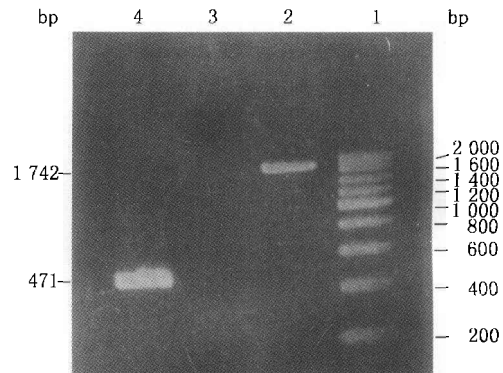


图 1 RT-PCR 产物电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

Lane 1: 200 bp DNA ladder (from 200 ~ 2 000 bp); Lane 2: 1 742 bp *tyr* RT-PCR product; Lane 3: negative control use ddH<sub>2</sub>O as PCR template; Lane 4: positive control of 471 bp  $\beta$ -actin RT-PCR product

### 2.3 pMD18-T-tyr 重组质粒的鉴定

10 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见重组质粒 pMD18-T-*tyr* 比空 pMD18-T 质粒明显滞后, 重组质粒经 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切得到两个片段, pMD18-T 质粒片段和 1 742 bp 的目的 *tyr* 片段, 而空 pMD18-T 质粒经 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切后只得到一条片段 (图 2)。

### 2.4 测序

DNA 测序结果表明, pMD18-T-*tyr* 质粒中的插入片段序列与 GenBank 所公布的小鼠 Tyrosinase 基因序列完全一致。

### 2.5 真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-tyr 的鉴定

9 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测可见 pcDNA3.1(+)-*tyr* 比空 pcDNA3.1(+) 质粒滞后, 两者经 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切分析可见, pcDNA3.1(+)-*tyr* 经双酶切后得到两条清晰条带, 一条为 5.4 kb 的空 pcDNA3.1(+) 载体条带, 一为目的 *tyr* 条带, 而 pcDNA3.1(+) 空质粒只有一条 5.4 kb 的条带, pcDNA3.1(+)-*tyr* 重组质粒 PCR 结果, 得到一清晰的 1 742 bp 目的基因条带, 而空 pcD-

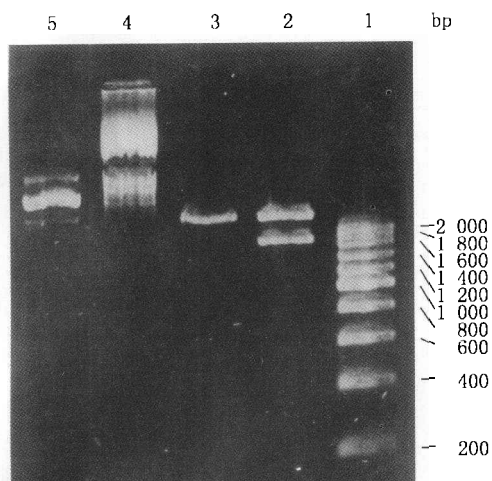


图2 pMD18-T-tyr 质粒的 *Hind* III 与 *Bam*H I 双酶切电泳检测

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of plasmids pMD18-T-Tyr digested by *Hind* III and *Bam*H I

Lane 1; 200 bp DNA ladder (from 200-2 000 bp); Lane 2; plasmid pMD18-T-tyr digested by *Hind* III and *Bam*H I; Lane 3; plasmid pMD18-T digested by *Hind* III and *Bam*H I; Lane 4; plasmid pMD18-T-tyr; Lane 5; plasmid pMD18-T

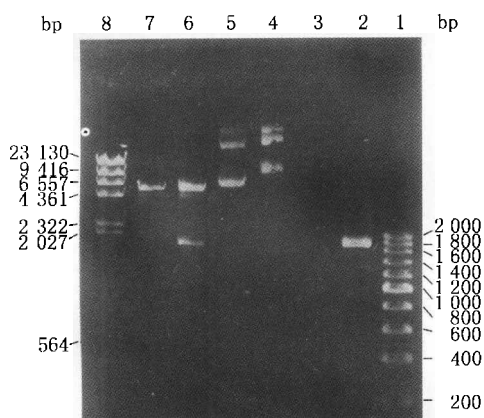


图3 pcDNA3.1(+)-tyr 质粒的 PCR 及 *Hind* III 与 *Bam*H I 双酶切电泳检测

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of plasmids pcDNA3.1(+)-tyr PCR product and plasmids digested by *Hind* III and *Bam*H I

Lane 1; 200 bp DNA ladder (from 200 ~ 2 000 bp); Lane 2; PCR product of recombinant pcDNA3.1(+)-tyr; Lane 3; PCR result of plasmid pcDNA3.1(+); Lane 4; recombinant pcDNA3.1(+)-tyr; Lane 5; plasmid pcDNA3.1(+); Lane 6; recombinant pcDNA3.1(+)-tyr digested by *Hind* III and *Bam*H I; Lane 7; plasmid pcDNA3.1(+)-tyr digested by *Hind* III and *Bam*H I; Lane 8;  $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker

NA3.1(+)-质粒 PCR 结果无条带出现(图3)。

## 2.6 *tyr* 在小鼠成纤维细胞中表达的检测

2.6.1 RT-PCR 产物电泳分析 结果表明感染外源性基因的 NIH3T3 细胞同时扩增出 314 bp 的 *tyr* 片段及对照的 471 bp 的  $\beta$ -actin 片段, 而感染空载体的 NIH3T3 细胞及未感染的 NIH3T3 细胞只有 471 bp 的  $\beta$ -actin 产物无转染的 *tyr* 的产物, 说明 *tyr* 在感染的 NIH3T3 中有表达(图4)。

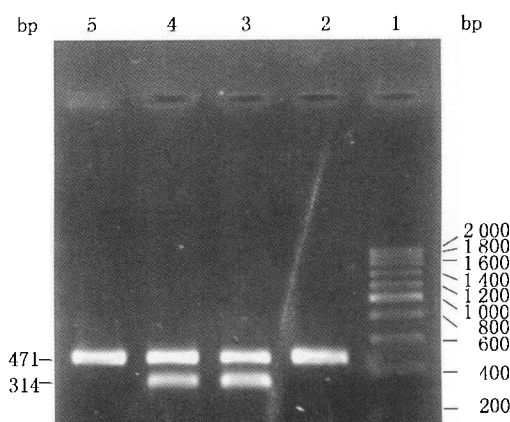


图4 RT-PCR 产物电泳

Fig. 4 Agrose gel electrophoresis of RT-PCR products

Lane 1; 200 bp DNA ladder (from 200 ~ 2 000 bp); Lane 2: RT-PCR product (471 bp  $\beta$ -actin cDNA fragment) from NIH3T3 cells infected with plasmid pcDNA3.1(+); Lane 3-4: RT-PCR product (471 bp  $\beta$ -actin cDNA and 314 bp *tyr* cDNA fragment) from NIH3T3 cells infected with recombinant pcDNA3.1(+)-tyr; Lane 5: RT-PCR product (471 bp  $\beta$ -actin cDNA fragment) from NIH3T3 cells uninfected

2.6.2 酪氨酸酶活性检测 感染外源性基因的 NIH3T3 细胞的  $A_{490}$  为  $0.0968 \pm 0.0033$ , 显著高于对照组(未感染)NIH3T3 的  $0.0393 \pm 0.0016$  ( $P < 0.01$ ), 而感染空载体的 NIH3T3 细胞为  $0.0374 \pm 0.0020$ , 与对照组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 此结果表明感染外源性基因的 NIH3T3 细胞内有较强的酪氨酸酶活性。

2.6.3 多巴染色 结果显示, 感染了外源基因的 NIH3T3 细胞呈多巴反应阳性, 细胞被染为棕黑色, 细胞内有含有大量多巴反应阳性物质, 而对照的未感染 NIH3T3 细胞为多巴反应阴性, 细胞内空染, 无多巴反应阳性物质存在(图5)。

## 3 讨论

黑色素主要由黑色素细胞合成, 在生物体内广泛存在, 具有独特的结构和性质, 其功能多样, 能作

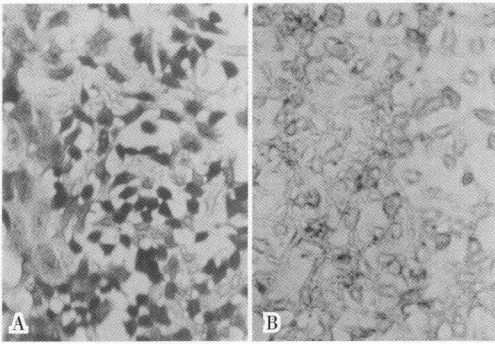


图 5 各组细胞多巴染色结果

Fig. 5 The results of DOPA staining

A: pcDNA3.1(+)-tyr infected NIH3T3 cells; B: uninfected NIH3T3 cells

为紫外线吸收剂、阳离子交换剂、非晶性半导体和新型的天然的药物载体、有对  $\gamma$ -射线和 X-射线辐射以及某些有毒物质的抵抗力、具有抗氧化和体外抗 HIV 病毒的作用<sup>[2, 3]</sup>。皮肤黑色素沉着过多、过少或缺失分别可引起多种疾病。皮肤癌症中恶性程度较高的恶性黑色素瘤 (malignant melanoma, MM) 的发病也与皮肤色素密切相关。近年来,由于自然环境变化尤其是太阳黑子的活动及臭氧层变薄等使得地球表面紫外线大大增强,同时 MM 的发生率也呈明显增长趋势,以白种人发病率上升最快,美国和欧洲国家发病率在 1980~1990 年间从 15% 增高到 60%,病死率也逐年增高,白种人中仅次于肺癌,位居第二。MM 细胞表现为增殖快、酪氨酸酶活性强、黑素合成能力高等特性。此外某些神经性疾病如着色性干皮病、帕金森氏综合症、老年痴呆症等都与黑色素缺乏有关<sup>[4]</sup>。以上这些疾病均是由于 *tyr* 结构改变或表达异常以致酪氨酸酶的量或者活性发生改变所引起,属于难治性疾病,目前尚未有特异有效地治疗方法。

酪氨酸酶是黑色素生物合成过程的关键酶,兼有加单氧酶和氧化酶双重功能,它催化酪氨酸氧化为多巴 (DOPA)、多巴氧化为多巴醌以及 5, 6-二羟基吲哚 (DHI) 氧化为吲哚 -5, 6-醌 3 个关键步骤<sup>[5, 6]</sup>。酪氨酸酶表达的量 and 活性决定着黑素生成的速度和产量。酪氨酸酶由 *tyr* 编码,曾报道有

多种激素、诱癌因素、环境因素和多种顺式作用元件可参与 *tyr* 表达调控<sup>[7-9]</sup>,但调控机制不明。因此,进一步探讨 *tyr* 表达和调控机制,寻求基因治疗的可行方法对由 *tyr* 表达失控引起的多种难治疾病的防治以及黑色素的开发利用具有重要的意义。本研究克隆了 1 742 bp 的小鼠 *tyr* 全长 cDNA 片段,成功构建 pcDNA3.1(+)-*tyr* 真核表达质粒,并在 NIH3T3 细胞中表达出 *tyr*,为下一步研究 *tyr* 在真核细胞内的表达调控机制奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, *et al.* Arbutin increases the pigmentation of culture human melanocytes through mechanisms other than the induction of tyrosinase activity[J]. *Pigment Cell Res*, 1998, 11(1):12.
- [2] Hill H Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant[J]. *Bioessays*, 1992, 14(1):49.
- [3] Wang Y, Casadevall A. Susceptibility of melanized and nonmelanized cryptococcus neoformans to nitrogen and oxygen-derived oxidants[J]. *Infect Immun*, 1994, 62(7):3003.
- [4] Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, *et al.* Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour[J]. *Mol Pathol*, 2001, 54(6):414.
- [5] Ann K, Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reaction in the biosynthesis of melanin[J]. *Science*, 1982, 217(4565):1163.
- [6] Prota G. Melanins, melanogenesis, and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint[J]. *Pigment Cell Res*, 2000, 13(4):283.
- [7] 潘兴华, 陈志龙, 黄丽娜. 黑素细胞及黑素的生成与调节 [J]. *生理科学进展*, 1998, 29(2):179.
- [8] Ganss R, Schmidta A, Schutz G, *et al.* Analysis of the mouse tyrosinase promoter *in vitro* and *in vivo*[J]. *Pigment Cell Res*, 1994, 7(5):275.
- [9] Fuller B B, Smith D R, Spaulding D T. Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and caucasian human melanocyte cell cultures[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 262(2):197.

(编辑 张敏端)