

人 DNA 聚合酶 β 全长 cDNA 的克隆、鉴定及真核表达载体的构建

杜柳涛¹, 庄志雄², 高 昆³, 杨杏芬⁴, 何 云¹, 徐 雷¹, 魏 青¹

(1. 中山大学公共卫生学院卫生毒理教研室, 广东 广州 510089; 2. 深圳市防疫站, 广东 深圳 518020;

3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510175; 4. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510300)

摘 要: 【目的】克隆人类 DNA 聚合酶($\text{pol}\beta$)基因全长 cDNA, 构建该基因的真核高效表达载体。【方法】抽提人胚肺纤维细胞 HLF 总 RNA 进行 RT-PCR 扩增, 用 pGEM-T 载体经 T/A 克隆、DNA 测序确定后, 用双酶切将 $\text{pol}\beta$ 全长 cDNA 定向克隆到绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-C1, 转染大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, 双酶切鉴定重组质粒。【结果】经 RT-PCR 获得 1.03 kb 的产物, 经 DNA 测序, 确定所扩增片段为人类 $\text{pol}\beta$ 基因全长 cDNA, 进而成功筛选出真核表达载体 pEGFP-C1- β 。【结论】成功构建人 $\text{pol}\beta$ 基因全长 cDNA 真核表达载体, 为进一步建立该基因的高表达细胞株提供基础。

关键词: DNA 聚合酶 β ; 聚合酶链反应; DNA, 重组

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)03-0187-03

Cloning and Sequencing of the Human DNA Polymerase β Entire cDNA and Construction of Its Eukaryotic Expression Vector

DU Liu-tao¹, ZHUANG Zhi-xiong², GAO Kun³, YANG Xing-fen⁴, HE Yun¹, XU Lei¹, WEI Qing¹.
(1. Department of Health Toxicology, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 2. Shenzhen Health and Anti-epidemic Station, Shenzhen 518020, China; 3. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510175, China; 4. Centers for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China)

Abstract 【Objective】To construct an efficient Eukaryotic expression vector of human DNA polymerase β ($\text{pol}\beta$). 【Methods】Following total RNA being extracted from human embryo lung fibroblast HLF and RT-PCR being carried out, the PCR product was cloned into pGEM-T-vector. The recombinant plasmid certified by sequencing. The $\text{pol}\beta$ entire cDNA was cloned into expression vector pEGFP-C1, and then transferred into *E. coli* DH5 α . The recombinant plasmids were identified by restriction endonuclease enzyme analysis 【Results】1.03 kb fragment containing restriction sites on 5'-stream was obtained through RT-PCR. The object fragment is homology with $\text{pol}\beta$. The recombinant plasmid pEGFP-C1- β was successfully selected. 【Conclusion】The efficient expression vector of human $\text{pol}\beta$ has been constructed, it can be used in establishing the human cell line of overexpression of $\text{pol}\beta$.

Key words: DNA polymerase beta; polymerase chain reaction; DNA, recombinant

DNA 碱基切除修复 (Base excision repair, BER) 是机体一种主要的 DNA 修复系统, 主要针对那些受损伤的核苷酸以及内源性和外源性生成的脱嘌呤/脱嘧啶位点, 是涉及几种成分的多步骤过程^[1]。DNA 聚合酶 β ($\text{pol}\beta$) 负责 BER 中的 DNA 合成, 是关键酶之一。除了在 BER 中发挥作用外, 它可能还涉及其它过程, 如细胞周期的停滞和细胞分化、参与 DNA 复制、重组以及维持基因组稳定性, 与癌细胞对某些药物的抗药性也有关系^[2]。作为一种重要的 DNA 修复基因, $\text{pol}\beta$ 已被列为美国环境基因组计划优先考虑的 70 余种环境应答候选基因之一。关于该酶的高表达对基因组稳定性的影响仍不清楚, 所以, 本研究对人 $\text{pol}\beta$ 全长 cDNA

进行克隆和测序鉴定, 并成功构建该基因高效真核表达载体, 为以后建立 $\text{pol}\beta$ 高表达的细胞株, 进而探讨该酶的高表达与基因组稳定性之间的关系提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人胚肺纤维细胞 HLF, 由中科院上海细胞所提供; TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒、Super-script One Step RT-PCR System、Rnase 抑制剂 Rnase OUT、快速凝胶回收试剂盒、快速质粒抽提试剂盒均为 GIBCO 产品; pGEM-T 载体试剂盒 (Promega 公司); BamH I, Kpn I (TaKaRa 公司), pEGFP-

收稿日期: 2001-11-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100152)

作者简介: 杜柳涛(1972-), 男, 河南卢氏人, 讲师。

C1 载体(Clonrtech 公司)。

1.2 RT-PCR 引物

用 RT-PCR 方法。引物 1: 5' AAG CTT TCT GAA CAC TCT GGG GTT CTC 3'; 引物 2: 5' AAG GAT CCA GGG AGG ATA CAG GCC TC 3'; 引物 3: 5' TTG GTA CCA TGA GCA AAC GGA AGG CG 3'。引物 2、3 上下游分别含 *Kpn* I、*Bam*H I 切点。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3 HLF 细胞培养及总 RNA 提取

细胞在含 100 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养基, 5% CO₂ 培养箱环境下常规培养, 至对数生长期, 用 2.5 mg/L 胰酶消化收获细胞, TRIZOL 试剂提取总 RNA, 经琼脂糖电泳及紫外分光光度仪鉴定 RNA 完整性和纯度。

1.4 RT-PCR

总反应体系 50 μL 中含: RNA 约 0.5 μg, 5 U 的 RNAse Out, 引物 1 和引物 2 各 0.2 μmol/L, 0.2 μmol/L dNTP, 1.8 mmol/L Mg²⁺, 1 μL RT/*Taq* 酶。52 °C 逆转录反应 40 min, 94 °C 预变性 3 min 后, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min 扩增 20 个循环, 再 72 °C 延伸 10 min。产物用引物 2 和引物 3 扩增 20 个循环, 条件同前。产物用 12 mg/L 脂糖电泳鉴定。

1.5 PCR 产物纯化

用快速凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 获得目的条带。

1.6 T 载体克隆、重组子双酶切鉴定、PCR 产物序列分析

连接反应体系 20 μL, 含 10 μL 2× 连接反应缓冲液, pGEM-T 载体 2 μL, PCR 产物 0.5 μg, T₄ 连接酶 2 μL。4 °C 连接过夜。感受态细胞按 TSS 法制备^[3]: 振荡培养 DH5α 细菌至微浊, 取 1 mL 菌液 4 °C 8 000 r/min 离心 1 min, 弃上清加入转化液及连接产物, 37 °C 振荡培养 1 h, 取菌液 40 μL 均匀涂抹至预先制备含 IPTG/X-Gal/氨苄青霉素的 LB 平板上, 蓝白筛选, 扩增转化子, 抽提重组质粒, 酶切鉴定。用 SP6 及 T7 引物从两端进行序列分析, 与 GeneBank 内的人 *polβ* 基因进行比较。

1.7 *polβ* 全长 cDNA 重组真核绿色荧光表达载体的构建

用 *Kpn* I、*Bam*H I 分别双酶切 pEGM-T-β 和 p-EGFP-C1 载体, 回收目的片段和载体混合, 加入 T₄ DNA 连接酶, 4 °C 连接过夜。同上法转化大

肠杆菌 DH5α, 双酶切筛选鉴定重组体 pEGFP-C1-β。

2 结 果

2.1 RNA 完整性和纯度鉴定

提取的 RNA 如图 1 所示, 28 S 亮度明显强于 18 S, 无 5 S 带, 说明总 RNA 完整性良好。所得 RNA A₂₆₀/A₂₈₀ 为 2.00, 显示其纯度符合 RT-PCR 要求。

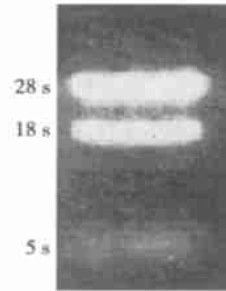


图 1 总 RNA 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for total RNA

2.2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

如图 2 所示, 在 1 000 bp 处有一明显条带, 与预期目的带大小一致。

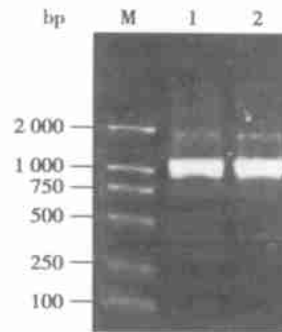


图 2 RT-PCR 产物的琼脂糖电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis for RT-PCR products

M: 2 000 bp marker; 1, 2: *polβ* entire cDNA (1.03 kb)

2.3 T/A 克隆及序列鉴定

T/A 克隆, 挑选白色菌落, 抽提质粒 DNA 后用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定, 筛选含目的片段的克隆。测序结果见图 3, 与 Genebank 内人 *polβ* 的 cDNA 一致, 证实所得即为人 *polβ* 全长 cDNA。

2.4 重组表达载体的鉴定

p-EGFP-C1-β 重组体转化大肠杆菌后, 挑取白色菌落扩大培养, 抽提质粒 DNA, 电泳初筛, 再用

双酶切成功筛选出阳性克隆,双酶切图见图4。

```

111 GCCATGAGCA AACGGAAGGC GCCGCAGGAG ACTCTCAACG
151 GGGGAATCAC CGACATGCTC ACAGAACTCG CAAACTTTGA
191 GAAGAACGCTG AGCCAAGCTA TCCACAACTA CAATGCTTAC
231 AGAAAAGCAG CATCTGTTAT AGCAAAATAC CCACACAAAA
271 TAAAGAGTGG AGCTGAAGCT AAGAAATTCG CTGGAGTAGG
311 AACAAAAATT GCTGAAAAGA TTGATGAGTT TTTAGCAACT
351 GGAAAATTAC GTAAACTGGA AAAGATTTCG CAGGATGATA
391 CGAGTTTATC CATCAA TTTC CTGACTCGAG TTAGTGGCAT
431 TGGTCCA TCT GCTGCAAGGA AGTTTGTAGA TGAAGGAATT
471 AAAACACTAG AAGATCTCAG AAAAAATGAA GATAAATTTA
511 ACCATCATCA GCGAATTGGG CTGAAA TATT TTGGGGACTT
551 TGAAAAAAGA ATTCCTCTGT AAGAGATGTT ACAAATGCAA
591 GATATTGTAC TAAATGAAGT TAAAAAAGTG GATTCTGAAT
631 ACATTGCTAC AGTCTGTGGC AGTTTCAGAA GAGGTGCAGA
671 GTCAGTGGT GACA TGGATG TTCTCTCTGAC CCATCCCAGC
711 TTCACTTCAG AATCAACCAA ACAGCCAAAA CTGTTCATC
751 AGGTTGTGGA GCAGTTACAA AAGGTTTATT TATTCACAGA
791 TACCCTGTCA AAGGGTGAGA CAAAGTTTCAT GGGTGT TTTGC
831 CAGCTTCCCA GTAAAAATGA TGAAAAAGAA TATCCACACA
871 GAAGAATTGA TATCAGGTTG ATACCCAAAG ATCAGTATTA
911 CTCTGGTCTT CTCTATTTCA CTGGGAGTGA TATTTTCAAT
951 AAGAATA TGA GGGCTCATGC CCTAGAAAAA GGTTCACAA
991 TCAATGAGTA CACCATCCGT CCCTTGGGAG TCACTGGAGT
1031 TGCAGGAGAA CCCCTGCCAG TGGA TAGTGA AAAAGACATC
1071 TTTGATTACA CCAGTGGAA ATACCCGGAA CCCAAGGACC
1111 GGAGCGAATG AGGCTGTAT CCTCCCTGG

```

图3 重组质粒中人 $\text{pol}\beta$ cDNA 测序结果

Fig 3 Result of sequencing of the human $\text{pol}\beta$ cDNA in the recombinant plasmid

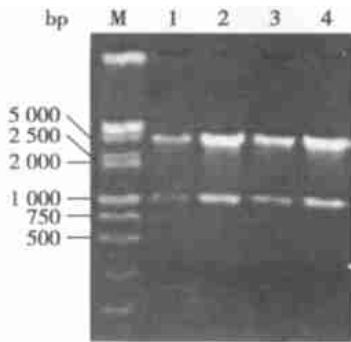


图4 重组质粒 $\text{pEGFP-C1}\beta$ 的双酶切鉴定

Fig 4 Restriction endonuclease enzyme analysis of recombinant plasmid $\text{pEGFP-C1}\beta$

M: 1 500 bp DNA marker; 1~4: digestion of recombinant with *Kpn* I and *Bam* HI

3 讨论

鉴于DNA修复酶类在维持细胞基因组稳定以

及生物遗传稳定中发挥的重要作用,DNA修复系统缺陷或异常与肿瘤发生的关系也受到了人们的关注,成为癌症病因学研究的一个热点^[4]。

现已在多种肿瘤和肿瘤细胞株内发现 $\text{pol}\beta$ 的表达增加^[3],例如,在结肠癌、前列腺癌、乳腺癌中 $\text{pol}\beta$ 明显增高,在结肠癌、乳腺癌和卵巢癌的细胞株内的表达也高于正常细胞。此外,在包括白血病、卵巢癌和结肠癌细胞在内的某些对抗癌药顺铂有抗性的肿瘤细胞株内, $\text{pol}\beta$ mRNA 水平都有增加。

在几种已知的DNA聚合酶中, $\text{pol}\beta$ 所催化的DNA合成的保真性是最底的,因而有学者提出 $\text{pol}\beta$ 高表达会不会促进基因组不稳定性^[6],但此方面资料目前仍很少。本研究克隆了人 $\text{pol}\beta$ 全长cDNA,并成功构建了真核表达载体 $\text{pEGFP-C1}\beta$,这就为以后建立该基因的高表达细胞株来研究人 $\text{pol}\beta$ 高表达的效应提供了基础。本研究所用真核表达载体为一种新型增强绿色荧光GFP高效表达载体,具有很多优点,这为以后要进行的在人细胞内的表达提供很多便利。

此外,我们采用了巢式PCR扩增目的片段,提高了PCR的有效性和特异性,显示在扩增某些较难常规得到的目的片段时,巢式PCR不失为一种可以考虑的策略。

参考文献:

- [1] Wilson S H. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta[J]. *Mutation Res*, 1998, 407(3): 203.
- [2] Horton J K, Prasad R, Hou E, *et al*. Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase β -dependent long patch base excision repair[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(3): 2211.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999. 281~282.
- [4] Lindahl T, Wood R D. Quality control by DNA repair[J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1897.
- [5] Srivastava D K, Husain I, Arteaga C, *et al*. DNA polymerase β expression differences in selected human tumors and cell lines[J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(6): 1049.
- [6] Canitrot Y, Frechet M, Servant L, *et al*. Overexpression of DNA polymerase beta: a genomic instability enhancer process[J]. *Faseb*, 1999, 13(9): 1107.

(编辑 黄小延)