

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)08-0758-03

人大肠癌线粒体 DNA 重组质粒的构建及对 NIH3T3 细胞的转染

宋卫兵¹, 肖冰¹, 阎丽¹, 李良仁¹, 彭丹丹¹, 吴倩倩², 叶方鹏¹, 马莉³ (¹南方医科大学南方医院消化病研究所, 广东 广州 510515; ²中国人民解放军军事体育学院门诊部, 广东 广州 510515; ³北京二炮干休所, 北京 100086)

Construction of eukaryotic cell expression recombinant pcDNA3.1(+) -mtDNA in colon tumors and transfection of mtDNA into murine fibroblast cells NIH3T3

SONG Wei-Bing¹, XIAO Bing¹, YAN Li¹, LI Liang-Ren¹, PENG Dan-Dan¹, WU Qian-Qian², YE Fang-Peng¹, MA Li³

¹Institute of Digestive Diseases, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Out-patient, Military Physical Education College of PLA, Guangzhou 510515, China; ³Cadre's Sanatorium, Second Artillery of PLA, Beijing 100086, China

【Abstract】 AIM: To investigate mutations in the D-loop region of mitochondrial DNA in colon tumors to construct eukaryotic cell expression recombinant pcDNA3.1(+)-mtDNA and to transfect pcDNA3.1(+)-mtDNA in murine fibroblast cells NIH3T3. **METHODS:** The D-loop region of mtDNA of the three colonic tumors cells (SW480, Lovo and HT29) was amplified by PCR and sequenced. The fragments of mtDNA were inserted into the eukaryotic cell expression plasmid pcDNA3.1(+) and the pcDNA3.1(+)-mtDNA recombinant was used to infect the murine fibroblast cell NIH3T3. **RESULTS:** Among the three colonic tumors cells (SW480, Lovo, HT29), 10, 9 and 8 mutations were identified respectively. The 1119 kb fragment of mtDNA was successfully cloned. DNA sequencing analysis proved that the sequence of the gene cloned was totally consistent with the data of GenBank. The mtDNA fragments were cloned into the multiple cloning sites of vector pcDNA3.1(+) properly. The recombinant was then introduced into NIH3T3 cells. **CONCLUSION:** The D-loop region of mitochondrial DNA is a highly polymorphic and mutable region and the mutation rate is relatively high in cells with colon tumors. The pcDNA3.1(+)-mtDNA eukaryotic cell expression re-

combinant is successfully constructed and mtDNA is successfully transfected into NIH3T3 cells.

【Keywords】 mitochondria DNA; D-loop; mutation; plasmid

【摘要】目的: 构建 pcDNA3.1(+)-mtDNA 真核表达重组体, 并导入 NIH3T3 细胞。方法: 提取大肠癌细胞株(SW480, Lovo, HT29) mtDNA, 扩增 D-loop 区, 产物用 DNA 自动测序法进行序列分析。利用 DNA 重组技术将其定向插入真核表达质粒 pcDNA3.1(+), 并用脂质体法导入 NIH3T3 细胞。结果: 大肠癌细胞株 SW480, Lovo, HT29 细胞 mtDNA D-loop 分别有 10, 9, 8 个突变位点。成功克隆 1119 kb 的 mtDNA D-loop 区至表达质粒 pcDNA3.1(+), 并导入 NIH3T3 细胞中。结论: 成功构建了 pcDNA3.1(+)-mtDNA 真核表达重组体, 并成功导入 NIH3T3 细胞中。

【关键词】 线粒体 DNA; D-环区; 突变; 质粒

【中图分类号】 R378.2 **【文献标识码】** A

0 引言

我们用 DNA 自动测序方法, 测定了大肠癌 SW480, Lovo, HT29 细胞株的 mtDNA D-环区基因序列, 检测出分别有 10, 9, 8 位突变点。将突变 mtDNA D-环区基因重组到 pcDNA3.1(+) 质粒中, 采用脂质体转染法将重组体 pcDNA3.1(+)-mtDNA 转染在小鼠 NIH3T3 细胞中, 旨在探讨线粒体基因突变与肿瘤发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 线粒体提取试剂盒购于杭州唯特洁公司; Takara LA Taq, T4 连接酶, 限制性内切酶(BamHI, XhoI) 购于大连宝生生物工程公司; DNA marker 为天为时代公司产品; 凝胶回收试剂盒和超纯质粒中量提取试剂盒购自 Qiagen 公司。大肠杆菌 JM 109 本室保存。pMD18-T 载体, 真核表达质粒 pcDNA3.1(+) 为陈学清惠赠。Lipofectamine2000 为 Invitrogen 公司出产。高糖 DMEM, 胎牛血清购于 haikelong 公司, NIH3T3 购于本校病理生理学教研室。G418 购自 Omega 公司。人大肠癌细胞株 SW480, Lovo, HT29 均为本所冻存, 常规传代培养至对数生长期抽提 mtDNA。

1.2 方法 mtDNA D-环区的 PCR 扩增引物由上海

收稿日期 2005-01-26; 修回日期 2005-03-06

基金项目 广东省自然科学基金(037049)

通讯作者: 肖冰. Tel. (020) 61641543 Email. xiaobing@fmmu.com

作者简介: 宋卫兵(1970-), 女(侗族), 湖南省会同县人, 硕士, 主治医师. Tel. (020) 61641544 Email. swb535@126.com

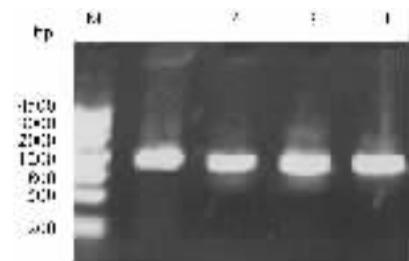
博雅公司合成,上游引物 5'-ATCGGATCCTTCATGGGGAAGCAGATTTGG-3'下游引物:5'-ACGCTCGAGG-GAGGTAAGCTACATAAACTG-3'。PCR 的反应体积是 25 μ L,包括各 1 μ L 的两种引物(20 μ mol/L), $10 \times$ Buffer 1 μ L,12.5 μ L PFU,各 1 μ L 的癌细胞 mtDNA 及作为对照的正常人血白细胞 mtDNA,用 PCR 仪(GeneAmp9600 美国 Perkin Elmer)进行反应。起始变性温度 94 $^{\circ}$ C,2 min,以下过程进行 33 个循环:变性温度 94 $^{\circ}$ C,30 s;复性温度 56 $^{\circ}$ C,30 s;延伸温度 72 $^{\circ}$ C,30 s;结束延伸温度 72 $^{\circ}$ C,2 min。取 2 μ L 的反应产物,在 15 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳,确定 D-环区成功扩增后,用快速 PCR 纯化药盒(Omega,美国)对反应产物进行纯化。送上海博雅公司测序。将肿瘤组织线粒体 DNA D-环区序列与正常组织进行对比,并与基因库数据(<http://www.Infinity.gen.emory.edu/mito-map.html>)对照。当线粒体 DNA D-环区的核苷酸顺序与正常顺序不同时,这种改变为突变;为排除系统误差,用重新合成引物:Primer1 A(bp68):5'-atcATCGGATCCTTCATGGGGAAGCAGATTTGG-3',Primer1 B(bp1205C):5'-acgACGCTCGAGGGAGGTAAGCTACATAAACTG-3'重新扩增线粒体 D-环区,再次测序,证实了突变确实存在。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。反应体系 10 μ L 含 pMD 18-T 载体 1 μ L,目的基因 4 μ L,Buffer(含连接酶)5 μ L,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。CaCl₂ 法制备感受态大肠杆菌 JM 109。将连接产物 10 μ L 加入 100 μ L 感受态菌中,冰浴 30 min,42 $^{\circ}$ C 热休克 90 s,立即静置冰浴 2 min,加入 400 μ L LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 温和振荡 1 h,短暂离心,弃一部分上清,余约 200 μ L 与菌体混匀,全部用无菌铺菌棒均匀涂布于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 选择平板上,室温平放 30 min 后,置 37 $^{\circ}$ C 温箱倒置培养 14~16 h。从 LB 选择平板上挑取单克隆于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡过夜,按试剂盒操作说明,小量抽提质粒,用 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切和 PCR 法检测,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性质粒。阳性质粒送北京奥科公司测序。目的基因定向亚克隆构建 pcDNA3.1(+)mtDNA 真核表达质粒 pMD18-T 和 pcDNA3.1(+)质粒均用 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切后低熔点琼脂糖凝胶回收目的基因线粒体 DNA D-环区和 pcDNA3.1(+)酶切片段,T4 连接酶连接,转化 JM 109 菌株,筛选阳性克隆,双酶切和 PCR 鉴定,方法同前。阳性质粒送北京奥科公司测序。将阳性质粒 SW480-pcDNA3.1(+),Lovo-pcDNA3.1(+),HT29-pcDNA3.1(+),及

作为对照的正常人血白细胞-pcDNA3.1(+),空质粒 pcDNA3.1(+)用 Qiagen 公司的中量超纯质粒提取试剂盒提取,用脂质体法(lipofectamine 2000),按脂质体试剂盒说明方法转染 NIH3T3 细胞,并经 G418(500 μ g/L)筛选获得阳性克隆,扩增培养。

2 结果

2.1 测序结果

我们抽提的线粒体 DNA 质量良好,未降解。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,其大小与理论预期值相符,为 1119 bp 片段。经 DNA 正反向自动测序,获得大肠癌细胞 D-环区全序列长 1119 bp(Fig 1)。SW480,Lovo,HT29 细胞株的 mtDNA D-环区基因序列检测出分别有 10,9,8 位突变点。将肿瘤组织线粒体 DNA D-环区序列与正常组织的进行对比,并与基因库数据对照。当肿瘤组织线粒体 DNA D-环区的核苷酸顺序与正常组织的相同,但与基因库记载的不同时,这种改变为新的多态性变化,如 Lovo 细胞的 72 位,C-T,SW480 细胞 16298 位,C-T,HT 细胞 73 位 A-G。当肿瘤组织线粒体 DNA D-环区的核苷酸顺序与正常组织的不同时,这种改变为突变,我们检测到不同癌细胞株中检测到相同的突变位点,如 Lovo 细胞与 SW480 细胞均有 16224 位,T-C,16311 位,T-C。SW480 细胞与 HT29 细胞均有 114 位,C-T,498 位,C-T,16234 位,C-T。



M:DNA marker;1:SW480;2:Lovo;3:HT29;4:Normal human WBC.

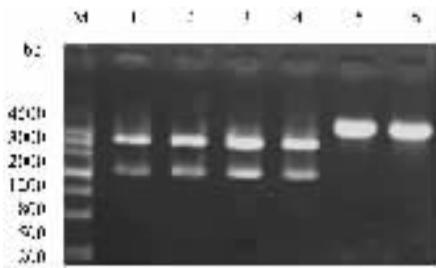
Fig 1 mtDNA D-loop region of SW80,Lovo,HT29,normal human white blood cells analyzed by PCR

图 1 SW480,Lovo,HT29,正常人血 mtDNA D-环区 PCR 结果

2.2 pMD18-T-mtDNA 重组质粒的鉴定观察

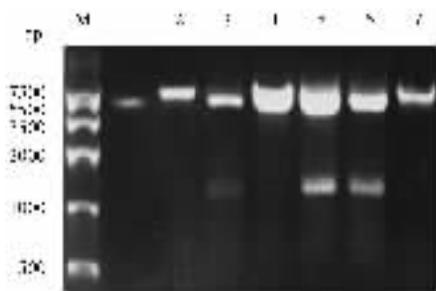
10 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见重组质粒 pMD 18-T-mtDNA 比空 pMD 18-T 质粒明显滞后,重组质粒经 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切得到两个片段,pMD 18-T 质粒片段和 1119 bp 的目的 mtDNA D 片段,而空 pMD 18-T 质粒经 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切后只得一条片段(Fig 2)。DNA 测序结果表明,pMD 18-T-mtDNA D 质粒中的插

人片段序列与测过的突变的人大肠癌基因组的基因序列完全一致。



M : DNA marker ; 1 ~ 6 : pMD18-T- SW480 ; - normal WBC ; Lovo ; - HT29 ; SW480 ; - HT29.

Fig 2 Plasmids pMD18-T-mtDNA digested by *Xho*I and *Bam*HI
图 2 pMD18-T-mtDNA 重组质粒酶切结果



M : DNA marker ; 1 : pcDNA3. 1(+) ; 2 : pcDNA3. 1(+)-SW480 ; 3 : Plasmid pcDNA3. 1(+)-SW480 ; 4 : pcDNA3. 1(+)-T-Lovo ; 5 : pcDNA3. 1(+)-T-Lovo ; 6 : pcDNA3. 1(+)-T- normal WBC ; 7 : pcDNA3. 1(+)-T-normal WBC digested by *Hind* III and *Bam*HI.

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of plasmids pcDNA3. 1(+)-mtDNA digested by *Hind* III and *Bam*HI

图 3 真核表达质粒 pcDNA3. 1(+)-mtDNA 重组质粒酶切结果

2.3 真核表达质粒 pcDNA3. 1(+)-mtDNA 的鉴定 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测可见 pcDNA3. 1(+)-mtDNA D 比空 pcDNA3. 1(+)质粒滞后, 两者经 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切分析可见, pcDNA3. 1(+)-mtDNA D 经双酶切后得到两条清晰条带, 一条为 5.0 kb 的空 pcDNA3. 1(+)载体条带, 一条为目

的 mtDNA D 条带, 而 pcDNA3. 1(+)空质粒只有 1 条 5.0 kb 的条带, pcDNA3. 1(+)-mtDNA D 重组质粒 PCR 结果, 得到一清晰的 1119 bp 目的基因条带, 而空 pcDNA3. 1(+)质粒 PCR 结果无条带出现 (Fig 3). DNA 测序结果表明, pcDNA3. 1(+)-mtDNA D 质粒中的插入片段序列与测过的突变的人大肠癌基因组的基因序列完全一致. 将阳性质粒用脂质体法 (lipofectamine 2000), 按方法转染 NIH3T3 细胞, 并经 G418 (500 μ g/L) 筛选获得稳定的阳性克隆.

3 讨论

mtDNA 是核外遗传物质, 不受组蛋白保护, 修复系统功能不完善, 比核 DNA 更易受诱变因素的损伤^[1], 其突变与细胞癌变之间的关系已引起重视^[2]. Beretta 等^[3]提出, D-环区是突变发生的热点. 我们在 SW480, Lovo, HT29 细胞株分别检测到 10, 9, 8 个突变. 我们发现大肠癌细胞株线粒体 DNA D-环区具有多态性和突变性, 不同癌细胞株中检测到相同的突变位点, 考虑为特征性改变, 可能和大肠癌的易感性有关. 我们将人大肠癌细胞株突变的 mtDNA D-环区片段转染到 NIH3T3 细胞中, 为以后的研究如成瘤实验, 及动态观察成瘤过程中 mtDNA 的突变与核内肿瘤相关癌基因, 抑癌基因及其他相关分子蛋白表达的特点奠定基础.

【参考文献】

- [1] Takeuchi H, Fujimoto A, Hoon DS. Detection of mitochondrial DNA alterations in plasma of malignant melanoma patients [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1022: 50-54.
- [2] Hansel DE, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2003; 4: 237-256.
- [3] Beretta S, Mattavelli L, Sala G *et al.* Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in hybrid cell lines [J]. *Brain* 2004, 127: 2183-2192.

编辑 甄志强