

人细胞色素 P450 2C9 cDNA 的克隆、鉴定及真核细胞表达重组质粒的构建

汪爱今 钱 瑛 钱羽力 余应年

浙江医科大学病理生理学教研室及医学分子生物学实验室 杭州 310031

摘要 从人肝组织中提取总 RNA,用 RT-PCR 方法扩增人细胞色素 P450 2C9 的 cDNA。以 T-A 克隆方法将该基因的 cDNA 连接到 pGEM-3Z 质粒上,然后通过内切酶图谱分析及部分序列分析加以鉴定,结果显示克隆片段具有人细胞色素 P450 2C9 内切酶图谱和核苷酸序列,该片段含 5'端和 3'端部分非编码区及完整的编码区。最后将该 cDNA 片段连接到哺乳动物细胞的表达质粒 pREP9 中。为建立表达人细胞色素 P450 2C9 基因的细胞系打下了基础。

关键词 细胞色素 P450;基因克隆;RT-PCR;T-A 克隆

CLONING AND IDENTIFICATION OF HUMAN CYTOCHROME P450 2C9 cDNA AND CONSTRUCTION OF ITS MAMMALIAN CELL EXPRESSION PLASMID

Wang Aijin, Qian Ying, Qian Yuli, and Yu Yingnian

Department of Pathophysiology and Laboratory of Medical Molecular Biology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031

参考文献

- 1 Tomei L, Failla C, Santolini E, et al. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol*, 1993;67:4017
- 2 Takamizawa A, Mori C, Fuke I, et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*, 1991;65:1105
- 3 Bartenschlager R, Ludwina AL, Mous J, et al. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol*, 1993;67:3835
- 4 Metsaranta M, Vuorio E. Transgenic mice as models for heritable diseases. *Ann Med*, 1992;24:117
- 5 胡以平. 生命科学的新体系. 自然杂志, 1990;13:28
- 6 Chool QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989;244:359
- 7 Plageman PGW. Hepatitis C virus. *Arch Virol*, 1991;120:165.
- 8 Honer B, Shoeman RL, Traub P, et al. Human immunodeficiency virus type 1 protease microinjected into cultured human skin fibroblasts cleaves vimentin and affects cytoskeletal and nuclear architecture. *J Cell Science*, 1991;100:799
- 9 Shoeman RL, Honer B, Mothes E, et al. Potential role of the viral protease in human immunodeficiency virus type 1 associated pathogenesis. *Medical Hypotheses*, 1992;37:137
- 10 汪宁. 细胞骨架刚性的调控与癌症的抑制. 见李春培、郭亚军主编. 肿瘤分子生物学研究进展. 北京:军事医学科学出版社, 1996:53
- 11 Koike K, Moriya K, Ishibashi K, et al. Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice. *J Gen Virol*, 1995;76:3031

本研究受国家和浙江省自然科学基金资助,项目编号分别为 39670801 和 396476。

Abstract With reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and DNA recombinant technique, a full-length cDNA encoding the monooxygenase cytochrome P450 2C9 from human liver was cloned into a plasmid pGEM-3Z. The cDNA segment was analyzed by restriction enzyme mapping and DNA sequencing, and was confirmed to be nothing other than CYP 2C9 cDNA. Then the CYP 2C9 cDNA was subcloned into a mammalian expression vector, ready for development of the cell line expressing CYP 2C9.

Key words Human cytochrome P450; cDNA Cloning; RT-PCR; T-A cloning

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450)是由 36 个基因家族组成的超大家族酶系⁽¹⁾。在哺乳类动物中发现有 12 个家族,其中第 1~3 家族是氧化外源性化学物质和代谢活化化学致癌物的主要酶系。在建株细胞中这些基因表达很低或完全不表达^(2,3,4)。在体外研究中,采用大鼠肝微粒体酶系,或肝组织碎片来研究 CYP450 和药物的生物效应。但是,这不可避免地存在如下缺陷。其一,在作用体系中,是多种 CYP450 同工酶的混合体,研究结果难以区分是哪一种同工酶的作用。其二,CYP450 同工酶谱的种族差异很大。种族间所表达 CYP450 酶的种类和量不一致,酶的活性及作用的底物也不一样。因此,研究结果难以超越种族差异而外推于人⁽⁵⁾。本实验室应用 DNA 重组技术,建立了人 CYP450 1A1 和 2B6 的转基因细胞系,并应用到遗传毒理学研究中获得成功。有效地解决了上述两大问题^(6,7)。

人类细胞色素 P450 2C 亚家族(简称 CYP2C)由 6 个基因组成,其中 CYP2C9 是代谢多种药物的羟化酶^(8,9,10)。本研究用 RT-

PCR 方法从人肝组织中克隆 CYP2C9 的 cDNA,经限制性内切酶图谱和部分序列分析鉴定后,构建真核细胞表达质粒,为建立稳定表达 CYP2C9 的转基因细胞系作准备。

材料和方法

1 材料 总 RNA 提取试剂 TRIzol (GIBCO-BRL 公司),MMLV 逆转录酶,T₄DNA 连接酶,Taq Track sequencing systems,pGEM-3Z 质粒 (promega)。限制性内切酶,Taq 酶,dNTP (华美公司);-32p-dATP (111TBq/mmol,3000Ci/nmol,北京亚辉公司)。真核细胞表达质粒 pREP9(个人赠送)。

2 方法

2.1 引物设计 根据 Romkes 等⁽¹⁰⁾发表的 CYP2C9 cDNA 序列,选择其 5 端和 3 端分别为两侧引物的起始端,扩增 cDNA 片段长度为 1540bp,上、下端引物分别为 32mer 和 28mer;5 端引物从 cDNA 第 1 位碱基开始,3 端引物从 1513 位碱基开始到 1540 位碱基为止,5 端引物设有 KpnI 酶切位点,3 端引物设有 XhoI 酶切位点。见图 .1。

The sequence comparison of 5' primers and related CYP 2C genes :

```
CYP2C8 5' * * * * * * * CT T * * * * * * * A C * * T * * * * * * * * * * * * -3'
5' primer 5' GAG AAG GTA CCA ATG GAT TCT CTT GTG GTC CT-3'
CYP2C9 5' * * * * * * * CT T * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * -3'
CYP2C18 5' * * * * * * * CCT T * * * * * * * TA C * A GC * * * * * CT * * -3'
CYP2C19 5' * * * * * * * CT T * * * * * * * * * * * C * * T * * * * * * * * * * * * * * -3'
```

The sequence comparison of 3' primers and related CYP 2C genes :

CYP2C8 5' AT A C T AACTC T T T -3'
 3' primer 3' CACG TCA GG GAGC TC GA GA GAAA GGA GA-5'
 CYP2C9 5' GC -3'
 CYP2C18 5' T A CT CAA TC TCCC TTAT C-3'
 CYP2C19 5' T GC -3'

Figure 1 Primer design and sequence comparison of related CYP 2C genes.

* :indicates the same base as the primer.

:indicates the pairing base to the primer.

Underlined 5' GGTACC-3': Kpn I cutting site.

Underlined 3' GAGCTC-5': Xho I cutting site.

2.2 人肝组织总 RNA 提取 人肝组织取自手术切除的肝癌旁组织,总 RNA 按 GIBCO-BRL 公司提供的操作程序提取,经紫外分光光度计测定和甲醛变性胶电泳确定所获得 RNA 的浓度,纯度和完整性⁽¹¹⁾。

2.3 RT-PCR 扩增 CYP2C9 cDNA 1μg 总 RNA 经 65 °C 变性 15min,置冰上依次加上 4μl 5 × 逆转录酶缓冲液,3μl 2.5mM dNTP,2μl poly T₁₂ 引物(100ng/μl),1μl MMLV 逆转录酶(200U),加双蒸水至终体积 20μl,37 °C 1h,然后加入 CYP2C9 的两侧引物各 10pmol,1μl Taq 酶(5u/μl),8μl 10 × PCR Buffer,加双蒸水至终体积 100μl。循环参数:94 °C 3min 后 94 °C 1min,59 °C 1min,72 °C 2min。共 35 个循环后,72 °C 10min。取 10μl 反应液在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

2.4 pGEM - 3Z 重组质粒的构建。根据 Holton 等的报道的方法,构建 T - A 载体⁽¹²⁾,以 SmaI 切断环状的 pGEM-3Z 质粒,造成两头平端,然后以 dTTP 和 Taq 酶反应,在双链质粒 DNA 的 3' 端,各加上一个胸腺嘧啶核苷酸“T”。取 PCR 产物(部分产物 3' 端含一个不配对而悬挂的腺嘌呤核苷酸“A”)2μl,“T”载体 50ng,10 × 连接缓冲液,1μl 连接酶(5u/μl),1μl 10mM ATP,加双蒸水到 10μl,15 °C 连接反应 5h。

将连接液转化受体菌 DH5⁺,在含 x-gal 和 IPTG 的氨苄青霉素 LB 平板上筛选白色阳

性克隆。

2.5 克隆片段的限制性内切酶酶切图谱(以下简称酶切图谱)和部分序列分析鉴定:应用计算机对 CYP2C9 cDNA 的序列分析发现在距 5' 端 646 位有一 BamH I 的酶切位点。而在 pGEM-3Z 的多克隆位点也有一 BamH I 切点,距 CYP2C9 cDNA 克隆位点(Sma I)下游 4 个 bp。因此,如果顺向插入,该重组质粒被 BamHI 切割后可获得-898bp 的片段。反向插入,则为 650bp 的片段。在 CYP2C9 cDNA 上,距 5' 端 866 位上还有 - Hind III 的酶切位点,在 pGEM - 3Z 的 Sma I 位点下游 33bp 处也有 Hind III 位点。该重组体如被 Hind III 切后,正向插入时,可获 708bp 的片段,反向插入时,则是 900bp 的片段。在酶切图谱分析的基础上,用 Taq Track Sequencing Systems 试剂盒,以 T7 和 SP6 引物对其两端进行了部分序列分析。

2.6 重组表达质粒的构建 真核细胞表达质粒 pREP9 的多克隆位点从 5' 端开始含有 Kpn I 和 Xho I 的位点,RT-PCR 扩增的产物 5' 端有一 Kpn I 切点,3' 端有一 Xho I 切点,将 pREP9 质粒和获得的重组质粒分别经这两个内切酶切割后,电泳回收,连接重组。转化感受态受体大肠杆菌 Top10⁽¹³⁾,pREP9 质粒上含有 Amp^r 基因,阳性克隆经扩增提取重组质粒,用 Kpn I 和 Xho I 切割后,1% 的凝胶电泳检测。

结 果

1 RT-PCR 产物的电泳分析结果

从人肝组织提取的总 RNA 在甲醛变性凝胶电泳上可清晰见到 18s 及 28s RNA。获得的 RT-PCR 产物在电泳胶上呈现出单一清晰特异性条带,该片段在大小约 1.5kb,与设计产物大小相等。结果见图 .2。



Figure 2 RT-PCR product band of CYP2C9 in agarose gel. Lane 1: RT-PCR product of CYP2C9, lane 2, DNA/ Hind Marker.

2 CYP2C9 cDNA 的克隆及酶切鉴定

重组质粒在含 X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板上呈白色菌落。挑选一些白色菌落,接种到培养管中,培养后,提取质粒,经凝胶电泳检测,获得了比空 pGEM-3Z 载体 DNA 大 1.5kb 的重组质粒。用 Kpn I 和 Xho I 酶切所得的片段,凝胶电泳上显示和 RT-PCR 产物大小一致,然后将该重组体在受体菌内进行大规模扩增提取质粒。作酶切图谱分析。经 BamH I 切后,得约 650 的片段,Hind I 切割后,得一约 900bp 的片段,提示,在该重组质粒中,CYP2C9 cDNA 是反向插入的。并将重组质粒命名为 pGEM-3Z-2C9。结果见图 .3,4。

3 部分序列分析

用 T₇ promoter 和 SP₆ promoter,分别阅读重组质粒的两端序列,所克隆的 cDNA 片段近引物的两端各 50 个 bp 的序列与 CYP2C9 cDNA 的序列完全相符。

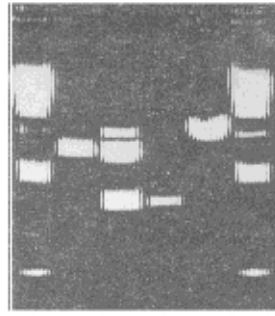


Figure 3 Recombinant pGEM-3Z-2C9 cut with Kpn I and Xho I.

Lanes 1 and 6: DNA/ Hind Marker, lane 2, pGEM-3Z vector cut with Kpn I; lane 3, pGEM-3Z-2C9 was cut with Kpn I and Xho I; lane 4, RT-PCR product of CYP2C9; lane 5, pGEM-3Z-2C9.

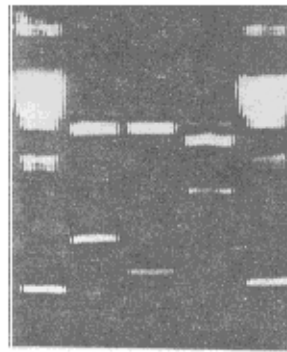


Figure 4 Recombinant pGEM-3Z-2C9 cut with BamH I or Hind I.

Lanes 1 and 5, DNA/ Hind Marker, lane 2, cut with Hind I; lane 3, cut with BamH I; lane 4, cut with Kpn I and Xho I.

4 真核细胞表达重组体的构建

用 Kpn I 和 Xho I 双酶切 pGEM-3Z-2C9,回收目的片段,与经 Kpn I 和 Xho I 双酶切的 pREP9 载体 DNA 相连接,获得了重组体 pREP9-2C9,后者经 Kpn I 和 Xho I 双酶切后,1%凝胶电泳显示,所得片段和 RT-PCR 扩增的产物大小一致,结果见图 .5。

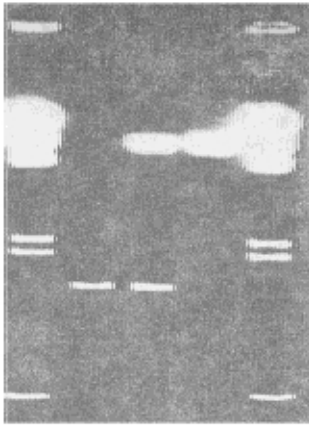


Figure 5 Recombinant expression plasmid pREP9-2C9 cut with Kpn I and Xho I.

Lane 1 and 5, DNA/ Hind III Marker; lane 2 RT-PCR product of CYP2C9, lane 3: pREP9-2C9 cut with Kpn I and Xho I, lane 4: pREP9 (without CYP2C9) cut with Kpn I and Xho I.

讨论

CYP2C 亚家族由 CYP2C8、2C9、2C10、2C17、2C18 和 2C19 组成^(9,10)。克隆 2C9 时, 必须将它与其它 5 个基因加以区别鉴定。CYP2C8 和 2C9 核苷酸序列有 81% 的相同。77% 的氨基酸相同。在人肝组织中也有 CYP2C8 的表达。但是, 本研究采用的 5' 端引物, 有 6 个碱基与 2C8 序列不配, 3' 端引物有 14 个碱基不配 (图 . 1), 理论上讲, 用这对引物难以扩增到 CYP2C8 cDNA。CYP2C9 序列的 866 位有一个 Hind III 酶切位点其序列为 AAGCTT, 而 CYP2C8 相应部位的序列为 AAAGTT, 不能被 Hind III 切开, 所获得的 RT-PCR 产物可被 Hind III 所切断及对克隆片段两端的序列分析结果排除了 CYP2C8 的可能。CYP2C10 的序列和 2C9 的编码区有两个碱基不同, 但都有酶的活性, 推测可能是 CYP2C9 的多态型。

CYP2C18 的序列, 虽然在 Hind III 和 BamH I 酶切位上和 CYP2C9 完全一致。但在 5' 端有 12 个碱基和 5' 端引物不同。3' 端序列有 18 个碱基与 3' 端引物序列不同 (图 . 1),

因此, 不可能扩增到 2C18 的 cDNA 片段。CYP2C17 和 2C19 有 95% 的序列相同。这两个基因与 CYP2C9 有 90% 以上相同序列。其 5' 端序列有 5 个碱基与引物不配, 3' 端序列有 3 个与引物不配。Hind III 和 BamH I 酶切位点序列和 CYP2C9 相同。因此, 2C19 和 2C17 有可能被扩增。经对序列的内切酶谱分析, 未发现合适的内切酶能将 2C9 与 2C17 和 2C19 区别开。只能用序列分析方法加以区别。近 CYP2C9 两端引物 50bp 序列之内, 与 CYP2C17 和 2C19 比较, 只有三个碱基不同。近 5' 端处一个, 近 3' 端 2 个。2C19 和 2C17 在 1579 到 1580 位的碱基为 5' CA-3', 而在同一位置 CYP2C9 的序列为 5' AG-3'。如图 . 6 所示, 所克隆的片段在该位置序列和 2C9 完全一样, 在 5' 端的一个碱基序列也和 CYP2C9 一致。因此, 排除了克隆 CYP2C17 和 2C19 的可能。

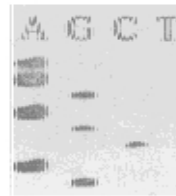


Figure 6 Partial sequence of CYP2C9. The CYP2C9 sequence of 1579 and 158 are AG (AAGAGCAG). The sequence of CYP2C17 and 2C19 at these two sites are CA.

综上所述, 在比较 CYP2C 亚家族基因序列的基础上, 进行内切酶图谱分析及部分序列分析, 证实了所克隆的片段为 CYP2C9, 并构建成真核细胞表达质粒, 为导入哺乳类细胞, 建立表达 CYP2C9 的细胞系打下了基础。

References

- 1 Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession number, early trivial names of enzymes and nomenclature: name methods. *DNA and Cell Biol*, 1993;12:1-15
- 2 Gonzles FJ. the Molecular biology of cytochrome p450. *Pharmacol Rev*, 1989;40:243
- 3 Weterman MR, Hildebrand M. Assessment of the use of sir-

HeLa - MLH1⁻ 细胞的生物学特性检测

张芸** 钱瑛 余应年 汪爱今 罗建红

浙江医科大学病理生理学教研室 浙江省医学分子生物学实验室 杭州 310031

摘要 对本实验室构建的错配修复功能缺陷细胞 HeLa - MLH1⁻ 的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (hprt) 基因自发突变率进行检测,发现相对于无 hMLH1 缺陷的对照细胞 HeLa - R9 和 HeLa 而言,其突变率分别提高了 8.78 倍和 3.53 倍 ($P < 0.01$),此表型改变与本实验室已构建的另一错配修复功能缺陷细胞 HeLa - MSH2⁻ 相同。本实验室还证明 HeLa - MLH1⁻ 细胞存在甲基硝基亚硝基胍 (methyl-nitro-nitroso-guanidine, MNNG) 耐受,这与我们在 HeLa - MSH2⁻ 细胞实验中的发现不同,提示不同的错配修复基因功能缺陷对细胞表型影响不尽相同。

关键词 脱氧核糖核酸修复;次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶;突变;N-甲基-N⁺硝基-N-亚硝基胍

THE DETECTION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HELA-MLH1⁻ CELL

Zhang Yun*, Qian Ying, Yu Yingnian, Wang Aijin, Luo Jianhong

Department of Pathophysiology Zhejiang Medical University and Provincial key Laboratory of Medical Molecular Biology, Hangzhou 310031

- gle cytochrome P450 enzymes in drug reseach. Springer-Verlag (Berlin Heidelberg), 1994:23
- 4 Yu Yingnian, Zhang Liyan, Sun Lu. Induction of cytochrome p450 isozymes in human amnion FL cells and its application to the biological detection of Mutation. *Chin Med Sci J*, 1991;6:226
 - 5 Gonzalez F, Crespi CL, and Gelboin HV. cDNA expressed human cytochrome p450s: a new age of molecular toxicology and human risk assessment. *Mutat Res*, 1991;247:113-127
 - 6 吴健敏,余应年,陈星若. 人细胞色素 P450B6 在哺乳类细胞中的稳定表达. *中国药理学与毒理学杂志*, 1996, 10: 131 - 135
 - 7 董海涛,余应年,蔡朱男. 细胞色素 P450 1A1 cDNA 表达质粒的构建及转基因细胞系的建立. *中国病理生理学杂志*, 1996, 12: 225 - 230
 - 8 Waterman MR, Hildebrand M. Assessment of the use of single cytochrome P450 enzymes in drug research. Springer-Verlag (Berlin Heidelberg), 1994:26
 - 9 Ged C, Umbenhauer DR, Bellow TM, et al. Characterization of cDNA, mRNAs and proteins related to human liver microsomal cytochrome P-450 (S)-mephenytoin 4⁺-hydroxylase. *Biochemistry*, 1988;27:6929
 - 10 Romes M, Faletto MB, Blaisdell JA, et al. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450 C family. *Biochemistry*, 1991;30:3247
 - 11 Sambrook J, Fritsh EF and Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual* (2nd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:7. 40
 - 12 Holton TA, Graham MW. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acid Res*, 1990; 19:1156
 - 13 Sambrook J, Fritsh EF and Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual* (2nd Ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:1. 82

国家自然科学基金资助项目(编号 39570303)

** 浙江医科大学 93 级七年制学生