文章编号:1000-5404(2008)11-1021-04

论著

Tet-on 控制的 Luciferase 和 SupF 突变报告基因质粒的构建及其在顺铂致突变作用中的应用研究

李 劲[1],宋 波[1],杨 劲[2],陈志文[1],位全芳[2] (第三军医大学:[1]西南医院全军泌尿外科研究所,[2]基础部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究 TCR 在顺铂导致的细胞内 DNA 损伤和突变过程中的分子机制,并为进一步研究转录偶联修复与突变发生的分子机制提供重要分子生物学依据。方法 首先将 SupF 突变报告基因克隆到带有双向真核启动子的含有 Tet 调控元件 TRE 的表达载体 pBI-L 的多克隆位点(MCS)上,获得 pTCR-1,再将 SV40ori 元件插入 pTCR-1 载体,最终获得 pTCR-2 质粒。酶切和 DNA 测序证实后,用顺铂将 pTCR-2 进行体外 DNA 损伤后瞬时转染至 Tet-on 293 细胞,在 Dox 诱导下培养 48 h,从细胞内提取质粒,纯化后转化 SY204 菌株,蓝白斑筛选挑取白色突变斑,计算突变频率并进行 DNA 测序检测突变频谱。结果 经酶切鉴定和测序分析,插入片段长度和序列正确。在 Dox 诱导下取得了 SupF 报告基因在转录偶联修复途径中的突变频率与频谱。结论 重组的 pTCR-2 质粒具有在真核细胞中 Tet 启动的转录活性,应用于顺铂致突变研究中,使转录条件下的突变情况能够得以反映。

关键词:Tet-on 控制系统;质粒;转录;SupF 突变报告基因;Luciferase 基因;顺铂;突变频率;突变频谱
中图法分类号:R394-33;R394.2;R979.12 文献标识码:A

Construction of bidirectional Tet-responsive promoter plamid and application in the research of cisplatin mediated mutation

LI Jin[1], SONG Bo[1], YANG Jin[2], CHEN Zhi-wen[1], WEI Quan-fang[2] ([1]Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective For the research of the molecular mechanism of TCR process, we constructed a bidirectional Tet-responsive promoter plasmid including two report gene luciferase and SupF gene. This plasmid was used to detect the mutation frequency and spectra mediated by cisplatin in the TCR pathway. Methods SupF gene was cloned into a Tet-responsive plamid PBI-L that contains a bidirectional Tet-responsive promoter, and this subclone was named pTCR-1. Then SV40 ori fragment obtained form pEGFP-1 plasmid was ligated with pTCR-1, and named pTCR-2. The pTCR-2 plasmid was exposed to cisplatin *in vitro* and transfected into Tet-on 293 cell lines, then cultured in the media containing DOX for 48 h. The mutation frequency and spectra of supF gene were finally detected. Results The restriction digestion and sequence analysis demonstrated that the length of pTCR-2 plasmid and the SupF gene sequence were correct. The mutation frequency and spectra were obtained at the present of DOX. Conclusion A new Tet-responsive promoter plasmid has been successfully established and works as expected. It can be used to analyze the mutation frequency and spectra induced by cisplatin.

Key words: Tet-on control system; plasmid; transfection; SupF report gene; luciferase gene; cisplatin; mutation frequency and spectra

细胞正常的 DNA 修复功能是细胞维持遗传稳定性的重要机制,细胞基因组 DNA 受到内源和外源因素损伤后,将通过不同信号途径产生 DNA 修复,旁路复制或凋亡等生物学效应。在众多的 DNA 修复途径和机制中,核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)是主要的修复途径,因为它修复损伤的 DNA 类型最为广泛。NER 由两种亚途径(subpathway)构成,即泛基因组修复(global genomic repair, GGR)和转录偶联修复(transcription-coupled repair, TCR)。其中 TCR 修复途径在转录基因 DNA 损伤的修复和突变中的作用机制并不明确[1,2]。为了研究 TCR 途径和遗传不稳定性发生的关系,我们设计和构建了受 Tet-on 系

基金项目:国家自然科学基金(30471958)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471958)
作者简介:李 劲,男,河北省景县人,博士研究生,主要从事膀胱肿瘤发生机制方面的研究。电话:13896086690,E-mail:jinli1977@tom.com
通信作者:陈志文,电话:(023)68765817,E-mail:zhiwen@tmmmu.com.cn
收稿日期:2008-01-18;修回日期:2008-03-01

统调控、双向启动转录的含有 Luciferase 和 SupF 突变报告基因的质粒，与 Tet-on 293 细胞构成完成的可控基因转录系统，进行定标突变研究（targeted mutation）。具体方法是首先在体外对质粒进行染毒损伤，瞬时转染进 Tet-on 293 细胞，在加入强力霉素（doxycycline，DOX）诱导转录的条件下修复 48 h，然后从细胞中提取质粒 DNA，纯化后转化 SY204 菌株，通过蓝白斑实验筛选突变的白色克隆，获得 TCR 参与的修复过程中突变发生的频率和突变频谱，为进一步研究转录偶联修复途径的分子机制提供重要实验基础和客观依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pBI-L 质粒、pEGFP 质粒、Tet-on 293 细胞和 Dox-free 胎牛血清为 ClonTech 产品，pSupF-G1 质粒由美国 Wayne State University 的 Wang. G 教授提供，DH10B，Sy 204 菌株由生化教研室保存。限制性内切酶 *Xho* Ⅰ、*Mlu* Ⅰ、*Pvu* Ⅱ、*Hind* Ⅲ、*Pvu* Ⅰ、*Dpn* Ⅰ、*Klenow* Ⅰ和 T_4 连接酶为大连 TaKaRa 公司产品；碱性磷酸酶（CIAP）为 Promega 公司产品；质粒提取和胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品；Lipofectamine2000 脂质体为 Invitrogen 公司产品；Luciferase 检测试剂盒为 Promega 公司产品。强力霉素（DOX）为 Promega 公司产品。DMEM 培养基为 Hyclone 公司产品。

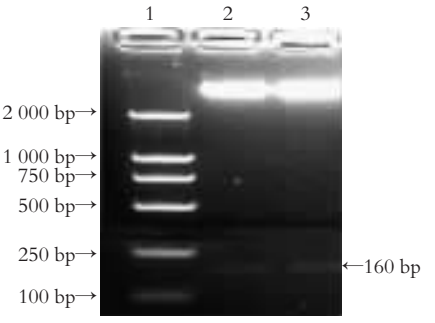
1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 用 *Xho* Ⅰ酶切 pSupF-G1 后用 *Klenow* Ⅰ补平，再用 *Mlu* Ⅰ酶切，回收 SupF 基因片段长约 160 bp；在 pBI-L 质粒多克隆位点选取 *Mlu* Ⅰ，*Pvu* Ⅱ位点，用 *Mlu* Ⅰ，*Pvu* Ⅱ双酶切，回收线性化 pBI-L 质粒长约 6.1 kb；将 SupF 基因片段与线性化 pBI-L 质粒用 T_4 连接酶连接，将连接产物转化大肠杆菌 DH10B，培养克隆，提取质粒，由于 *Pvu* Ⅱ酶切端为平端切口，因而将 SupF 基因定向克隆至 pBI-L 质粒的 PminCMV1 下游。阳性克隆转化大肠杆菌 DH10B，并提取质粒，命名为 pTCR-1 以备亚克隆用。

设计 PCR 引物，带有 *Pvu* Ⅰ酶切位点：正义引物：5′-TCGCGATCGTCAGCAACCAGGTGTGGC-3′，反义引物：5′-TCGCGATCGGACGAGTTCTTCTGAGCG-3′。

PCR 扩增 pEGFP-1 质粒中 SV40ori/Neo/Kan 抗性基因片段长约 978 bp，回收 SV40ori/Neo/Kan 抗性基因片段，用 *Pvu* Ⅰ酶切酚/氯仿抽提后，无水乙醇沉淀回收备用；用 *Pvu* Ⅰ（单酶切位点）酶切 pTCR-1 后胶回收，CIAP 进行 5′端去磷酸化，降低自身环化率，反应产物用酚/氯仿抽提后，无水乙醇沉淀回收，用 T_4 连接酶连接去磷酸化的 pTCR-1 和 SV40ori/Neo/Kan 抗性基因片段，16 ℃过夜。获得最终质粒命名为 pTCR-2，全长 7.0 bp。因 SV40ori/Neo/Kan 抗性基因片段为独立功能区域，故插入可不考虑方向性。将连接产物转化大肠杆菌 DH10B，挑选克隆提取质粒。

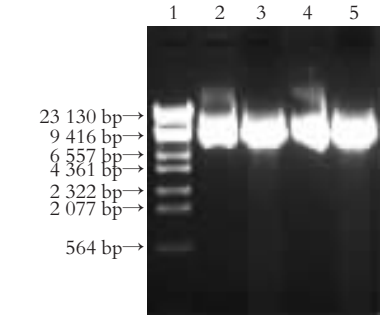
1.2.2 酶切鉴定 用 *Mlu* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ双酶切 pTCR-1 质粒，20 μl 反应体系，质粒约 1 μg，37 ℃ 2 h，1.5 % 琼脂糖凝胶电泳，100 V，40 min，可得到长约 160 bp 和 6 kb 两条带，与理论分析相符（图 1）。



1：DNA 分子标准（DL2000）；2、3：pTCR -1 双酶切产物

图 1 pTCR -1 酶切鉴定

选 *Hind* Ⅲ（单酶切位点）酶切 pTCR-2 质粒，20 μl 反应体系，质粒约 1 μg，37 ℃ 2 h，1.0% 琼脂糖凝胶电泳，100 V，40 min。得到长度为 7.0 kb 左右单一清晰条带，与理论分析相符（图 2）。



1：DNA 分子标准（*Hind* Ⅲ）；2－5：pTCR-2 单酶切产物

图 2 pTCR-2 酶切鉴定

1.2.3 测序分析 分别测定两插入片段：SupF 基因片段和 SV40ori/Neo/Kan 抗性基因片段，与原始序列一致，说明克隆成功。

1.2.4 功能鉴定 Luciferase 基因表达测定，Tet-on 293 细胞铺 6 孔板，1×10^4 细胞/孔，10% Tet-free FBS，DMEM 培养液，37 ℃培养 48 h，至 85% 左右长满。实验组为转染后的 Tet-on 293 细胞，同时设立两组对照：U2-OS LUC control 细胞作为阳性对照，非转染质粒的 Tet-on 293 细胞为阴性对照，各组细胞又细分为两组：a 为加药组，b 不加药组。Lipofectamine2000 瞬时转染各组细胞，按说明书步骤进行。其中 a 组加入终浓度为 1 μg/ml 的 DOX（强力霉素）诱导基因表达，继续培养 48 h 后，裂解细胞检测 Luciferase 基因表达情况，按 Promega Luciferase 检测试剂盒说明书操作。

SupF 基因检测，SY204 菌为 *LacZ* 基因（β-半乳糖酸酐酶）琥珀酸突变菌株，SupF 基因可以修复 Laz 基因的琥珀酸突变，在含有 IPTG 和 X-gal 的抗性琼脂板上呈现蓝色菌落。pTCR-2 质粒转化 SY204 菌，按分子克隆第 3 版步骤进行，铺抗性板（Kan 100 μg/ml，IPTG 80 μg/ml，X-gal 0.5 mmol/ml），37 ℃过夜培养。

1.2.5 SupF 基因的定标突变研究

1.2.5.1 质粒损伤 100 μg pTCR-2 质粒溶于 200 μl 终浓度为 50 μg/ml 的 cisplatin 溶液中，室温静置 3 h，造成质粒 DNA 的体外损伤。3 h 后反应液中加入等体积的 酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1）溶液抽提，离心后小心吸取上层水相，加入 2 倍

体积的无水乙醇,－20 ℃ 沉淀 4 h,高速离心回收质粒沉淀,70% 乙醇洗一次,室温下晾干,加入 40 μl 无核酸水溶解备用。

1.2.5.2　质粒转染　　染毒后的质粒用脂质体法(Lipofectamine2000)瞬时转染 Tet-on 293 细胞,步骤同前,同时以未染毒质粒作为阴性对照以获取 supF 的基础突变率。8 h 后更换完全培养液,加入终浓度为 1 μg/ml 的 DOX,继续培养 48 h 使质粒 DNA 得以充分复制和修复。

1.2.5.3　质粒提取与转化　　按 Seidman 等[5] 于 1985 年提出的方法进行,无水乙醇沉淀后 *Dpn* Ⅰ 酶切消化掉未复制的质粒 DNA 模板,转化 SY204 菌株,铺抗性板(Kan 100 μg/ml,IPTG 80 μg/ml,X-gal 0.5 mmol/ml),37 ℃过夜培养。

1.2.5.4　蓝白斑筛选白色突变克隆,计算突变频率 = 突变菌落数/总菌落数,同时进行突变克隆的测序,由上海生工生物有限公司代为进行。

2　结果

2.1　各组细胞 Luciferase 表达情况

各组细胞均重复实验 4 次,汇总 4 次数据计算均值与标准差。

实验组:DOX(+) 5 700.00 ± 173.88、DOX(－) 85.00 ± 7.33,有显著差异($P < 0.01$);阳性对照组:DOX(+) 9 671.00 ± 168.97、DOX(－) 273.00 ± 16.50,有显著差异($P < 0.01$);阴性对照组:DOX(+) 120.00 ± 7.83、DOX(－) 116.0 ± 5.44,无明显差异($P > 0.05$)。

强力霉素(DOX)为四环素类药物,在本实验的表达系统中,只有当 DOX 存在时,Luciferase 基因才可以表达,阳性对照采用的 U2-OS LUC control 细胞,为稳定转染了 pTet-on 和 pTRE-LUC 质粒的人骨肉瘤细胞株,通过检测 Luciferase 基因的表达情况来监测 Tet-on 系统是否工作。由本次实验结果可以看到,加入 DOX 后的实验组和阳性对照组 Luciferase 基因表达明显增高,说明重组质粒 pTCR-2 的 Tet-on 应答系统是能够正常工作的。

2.2　SupF 基因检测

pTCR-2 中插入的 SupF 基因是突变检测的靶基因,其突变后修复宿主菌 SY204 *LacZ* 基因琥珀酸突变的功能丧失,呈白斑,通过蓝白斑实验可以很方便的挑取突变克隆进行分析。本次实验没有对 SupF 基因进行损伤处理,因此菌落几乎全部为蓝斑,说明 SupF 基因已经被正确插入。

2.3　SupF 基因突变率

突变率的计算由 3 次独立的实验完成,每次均统计 10 000 个总菌落,从中挑出白色突变克隆计算突变率,以未损伤质粒为阴性对照组,计算基础突变率。

染毒后质粒突变菌落数 50 ± 1.5,总菌落数 5 000 ± 0,诱发突变率:$(10 \pm 1.5) \times 10^{-3}$。

未损伤质粒突变菌落数 7.3 ± 1.5,总菌落数 5 000 ± 0,基础突变率:$(7.3 \pm 1.5) \times 10^{-4}$。两组对比,有显著统计学意义($P < 0.01$),说明顺铂损伤可以使 SupF 基因突变率增加。

2.4　SupF 基因突变频谱

挑取 20 个突变克隆突变克隆的测序结果与 SupF 基因原始序列比对分析突变频谱的特征(图 3)。

(1)突变类型:本次检测的 20 个突变全部为单碱基置换;(2)碱基置换类型:G → T 颠换共 10 个占总数的 50%;G → A 转换共 4 个占总数 20%;C → A 颠换共 4 个占总数 20%;C → T 转换共 2 个占总数 10%;(3)突变热点(hot-spot):突变主要集中在 5′-GG-3′ 和 5′-GC-3′区域,与文献报道的 Pt-DNA 复合物形成的链间或链内交联的高发点相一致。

3　讨论

四环素正调节的基因表达系统,称为 Tet-on 基因表达系统[3]。在没有四环素的情况下表达水平为零,而在加入四环素衍生物强力霉素(doxycycline,Dox)后目的基因高效表达。由调节质粒和反应质粒组成,调节质粒包含一个四环素调控的反式激活子(reverse Tet-controlled transactivator,rtTA),反应质粒中含有目的基因,并受四环素反应元件(tet-responsive element,TRE)的操纵,TRE 包含有操纵基因(tet operator,TetO)的 42 个碱基的 7 次正向重复序列,它的上下游各有 1 个人巨细胞病毒的最低限度启动子(minimal CMV promoter,PminiCMV),当有 Dox 存在时,rtTA 可与 TetO 结合启动上下游基因的转录[4]。

```
  1  CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGAA TTCGAGAGCC CTGCTCGAGC
                                                                   TA
 61  TGTGGGGGGG TTCCCGAGCG GCCAAAGGGA GCAGACTCTA AATCTGCCGT CATCGACTTC
        T       A                 TA                    A
                                  T                     T
                                  T                     T
121  GAAGGTTCGA ATCCTTCCCC CCCCACCACC CCCTCCCCCT CGGCCGAAAT TCGGTACCCG
       TC                    A                     AT
       TA                                          TT
       A
181  GATCCTTAGC GAAAGCTAAG GATTTTTTTT ACGCGTGAGC TC
             A
```

共 20 个突变克隆测序,图中下部的字母表示突变的碱基

图 3　顺铂导致的 supF 基因突变频谱

SupF 基因又称为琥珀型抑制 tRNA，为抑制性 tRNA（suppressor tRNA）的一种。其发挥作用的机制是：mRNA 分子上密码子的突变可造成其所编码的蛋白质结构的改变，进而导致蛋白质功能的丧失；tRNA 反密码子的突变使其可识别突变的密码子，蛋白质的结构不发生变化；后一种突变为前一种突变的抑制突变[5]。*LacZ* 基因琥珀型突变的菌株，最初用于检测 supF 的活性。基因转录后，1 个本该编码酪氨酸的密码子变成了终止信号，致使翻译中断，不能生成完整的 β-半乳糖苷酶（β-galactosidase），当带有 SupF 基因的质粒被引入细菌后，质粒中 supF 基因所编码的 tRNA，其抑制突变型的反密码子，能识别宿主菌 *LacZ* 基因的琥珀型突变，产生正常的 β-半乳糖苷酶，在含 β-半乳糖苷酶底物 X-gal（5-bromo-4-chloro-3-in-doyl-β-D-galactoside）和 *LacZ* 操纵子诱导物 IPTG（isopropyl-β-D-thioglactoside）以及相应抗性的 LB 指示平板上，其菌落呈现蓝色。当 SupF 基因发生突变，影响或完全丧失其所编码的 tRNA 功能时，其菌落呈现淡蓝色或白色。突变子经重新划板，扩增，提取质粒，质粒纯化、DNA 测序分析，来确定突变形成的分子机制和突变发生的冷热点（cold spot，hot spot）[6]。

转录偶联修复（transcription-coupled repair，TCR）为核苷酸切除修复（nucleotide excision repair，NER）的亚途径，其主要修复具有高转录活性基因的损伤，其特点是作用迅速，具有转录特异性，而 NER 的另一亚途径泛基因组修复（global genomic repair，GGR）主要修复非转录区域基因的损伤，与 TCR 相比其作用要缓慢的多。研究表明在非分裂细胞如神经元细胞中 GGR 途径水平很低，主要由 TCR 途径修复，TCR 途径的异常可能与癌症的发生以及年龄相关性疾病有密切关系[7]。目前发现 CSA、CSB 基因是 TCR 途径中非常重要的因子，其他如 RNA polymerase Ⅱ、BRCA1、HMLH1、HMLH2 等均参与 TCR 途径。目前对于 TCR 的分子机制并不十分清楚，同时 TCR 与 GGR 两者的关系亦不明朗[8]。

本实验中，我们将 SupF 基因检测系统与 Tet-on 基因表达系统相结合，构建出独特的可控基因表达工具，其具有以下特点：①基因的表达可以通过 Tet-on 系统精确调控，Tet-on 293 细胞为稳定转染 pTet-on 质粒的 HEK293 细胞株，可稳定表达 rtTA 蛋白，pTCR-2 质粒含有 TRE 操控的双向 miniCMV 启动子，在 DOX 存在下可以诱导上下游基因转录。②双报告基因，pTCR-2 中的 TRE 元件分别操控上游 Luciferase 基因和下游 SupF 基因的转录，通过检测 Luciferase 基因的表达可以明确 SupF 基因是否得以转录，进而明确是否诱发 TCR 途径。③穿梭质粒，pTCR-2 中含有原核细胞复制子 Col E1 和真核细胞复制子 SV40ori，可以在细菌和哺乳动物细胞中存活和复制，使得在哺乳动物细胞中发生的遗传学事件，能很方便地在细菌中得到报道。④supF 基因很小，遗传背景清楚，通过 DNA 测序来定位突变热点及上下游序列变得相对容易。

将该独特穿梭质粒与 Tet-on 293 细胞构成完整的 Tet 控制的 SupF tRNA 转运系统，通过定标性突变研究获得顺铂导致的 SupF 报告基因在转录偶联修复过程中产生的突变频谱和突变频谱，实验结果表明，顺铂能够诱导 DNA 发生突变，TCR 参与这一过程，文献[9]报道顺铂产生的链间交联损伤部位多发生在 5′-GG-3′ 5′-AG-3′，这与本实验检测到的突变热点是一致的。本实验利用独特的穿梭质粒实验模型，初步检测和分析了顺铂损伤后转录偶联修复途径修复过程中产生的突变频率和频谱的一般特点，为进一步研究转录偶联修复在顺铂致突变过程中的作用提供了一种高效、可用的实验工具和初步的检测资料，对阐述 DNA 修复以及肿瘤耐药的分子机制奠定了实验基础。

参考文献：

[1] Nouspikel T. DNA repair in differentiated cells：some new answers to old questions[J]. Neuroscience，2007，145(4)：1213－1221.

[2] Surralles J，Ramirez M J，Marcos R，*et al*. Clusters of transcription-coupled repair in the human genome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2003，99(16)：10571－10574.

[3] Gossen M，Freundlieb S，Bender G，*et al*. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells[J]. Science，1995，268(5218)：1766－1769.

[4] Mizuguchi H，Hayakawa T. The Tet-off system is more effective than the Tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector[J]. J Gene Med，2002，4(3)：240－247.

[5] Seidman M M，Dixon K，Razzaque A，*et al*. A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells[J]. Gene，1985，38(1－3)：233－237.

[6] Choi J H，Pfeifer G P. The role of DNA polymerase eta in UV mutational spectra[J]. DNA Repair (Amst)，2005，4(2)：211－220.

[7] Chen Z，Xu XS，Yang J，*et al*. Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis[J]. Carcinogenesis，2003，24(6)：1111－1121.

[8] Sarker A H，Tsutakawa S E，Kostek S，*et al*. Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG，CSB，and TFIIH：insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome[J]. Mol Cell，2005，20(2)：187－198.

[9] Hovhannisyan G G，Haroutunyan T S，Arutyunyan R M. Evaluation of cisplatin-DNA crosslinks formation with UV-C application by the alkaline Comet-assay[J]. Exp Oncol，2004，36(3)：240－242.

（编辑 龙 亮）