DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.017
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)02-0125-03

论著

FHIT基因真核细胞表达载体的构建与鉴定

田中伟[1,2],宋向凤[2],彭振辉[1] ([1]西安交通大学第二医院皮肤科,西安 710004;[2]河南省新乡医学院免疫学教研室,新乡 453003)

提 要:目的 构建人FHIT基因真核细胞表达载体。方法 采用RT-PCR方法,从人新鲜甲状腺组织的总cDNA中扩增出456 bp的人FHITcDNA片段,然后用*Kpn*Ⅰ和*Bst*XⅠ双酶切后定向克隆到真核细胞表达载体pcDNA3中,用限制性内切酶酶切分析和DNA序列分析鉴定重组质粒;用免疫细胞化学法检测FHIT基因的表达情况。结果 人FHIT基因cDNA已经正确克隆到真核细胞表达载体pcDNA3中;体外转染MM96L细胞后,可见转染细胞胞浆中有较高量的Fhit蛋白表达。结论 本实验所构建的重组质粒为FHIT基因在肿瘤发病机制与防治的研究中提供了有利的分子工具。

关键词:FHIT基因;RT-PCR;基因克隆
中图法分类号:Q782;Q785;R394-33 文献标识码:A

Construction and identification of eukaryotic cell expression vector of human FHIT gene

TIAN Zhong-wei[1,2], SONG Xiang-feng[2], PENG Zhen-hui[1] ([1]Department of Dermatology, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004; [2]Department of Immunology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic cell expression vector of human frangible histone triad (FHIT) gene. Methods A 456-bp cDNA fragment was amplified from the total RNA of normal human thyroid tissue by RT-PCR method and cloned into plasmid pcDNA3. The cloned insert was identified by double digestion of the recombinant plasmid with restriction enzymes *Kpn*Ⅰ and *Bst*XⅠ and sequenced by Sanger-dideoxy-mediated chain termination. The expression of FHIT gene was detected by immunocytochemical methods. Results The results showed that the cDNA fragment included 456 bp entire coding region. The recombinant eukaryotic cell expression vector of pcDNA3-FHIT was constructed, and the sequence of the insert was identical to the published sequence. MM96L cells transfected with the pcDNA3-FHIT plasmid expressed high level of Fhit protein in cytoplasm. Conclusion The recombinant plasmid pcDNA3-FHIT can provide a strong molecular tool for the studies of neoplasm pathogenesis.

Key words: FHIT gene; RT-PCR; gene cloning

脆性组氨酸三联体基因(frangible histine triad, FHIT)是Ohta[1]实验小组于人3p14.2部位发现的一个新的抑癌基因,此基因跨越人类染色体脆性部位FRA3B,在人类多种肿瘤细胞及细胞系中,存在广泛变异,但其抑癌作用的机制仍有许多不明之处。本实验中,我们旨在构建FHIT基因的真核表达载体,为FHIT基因在肿瘤发病机制与防治的研究中提供了有利的分子工具。

1 材料与方法

1.1 材料

pcDNA3购自Invitrogen公司;大肠杆菌DH5α为本室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶*Kpn*Ⅰ和*Bst*XⅠ、T4DNA连接酶、TRIZOL试剂、dNTP等分子生物学试剂购自华美公司;其它生化试剂均为分析纯。

1.3 组织总RNA的提取

取新鲜正常人(志愿者)甲状腺组织100 mg剪碎,按RNA抽提试剂盒提取组织总RNA。

1.4 逆转录反应

在20μl反应体系中加入总RNA溶液(ng/μl)1μl,Oligo(dT)12~18(0.5μg/μl)1μl,dNTP(10 mmol/L)1μl,DEPC处理的灭菌去离子水7μl,70 ℃变性10 min,立即置于冰浴中1 min,加入10×RTBuffer 2μl,DTT(0.1 mol/L)2μl,$MgCl_2$(10 mmol/L)4μl,RNasin(40 U/μl)1μl,混匀后置于42 ℃水浴2 min;加入SuperScriptⅡRT(200 U/μl)1μl,混匀42 ℃温浴50 min,70 ℃、15 min终止反应,冰上冷却,加RNaseH 1μl,37 ℃温育20 min,直接用于PCR反应[2,3]。

1.5 引物设计和PCR产物的扩增

根据Genebank中人FHIT基因序列,设计合成一对引物,引物中设计*Kpn*Ⅰ和*Bst*XⅠ二酶酶切位点。以合成的cDNA为模板进行PCR,反应参数为:94 ℃预变性3 min,94 ℃变性45 s,56 ℃退火45 s,72 ℃延伸60 s,三步组成35个循环,最后72 ℃

作者简介:田中伟(1971-),男,河南省驻马店市人,博士研究生,讲师,主要从事皮肤肿瘤及分子免疫病理学方面的研究,发表论文5篇。电话:13119123236,E-mail:zhonwt@163.com

收稿日期:2003-05-12;修回日期:2003-11-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

延伸5 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.6 FHITcDNA克隆与鉴定

将PCR产物纯化后，用*Kpn*Ⅰ和*Bst*XⅠ酶切纯化的PCR产物，再用此二酶酶切pcDNA3，然后回收目的基因和质粒pcDNA3。目的基因与质粒DNA按一定比例混合进行连接反应，10 μl反应体系中，加入5× 连接Buffer 2 μl，pcDNA3 0(经*Kpn*Ⅰ、*Bst*XⅠ酶切)2 μl，酶切(*Kpn*Ⅰ、*Bst*XⅠ酶切)回收的PCR目的片段2 μl，T_4DNA连接酶1 μl(1 U/μl)，灭菌水3 μl，混匀后静止14 ℃水浴中过夜。取5 μl连接产物转化大肠杆菌DH5α，培养过夜，在含有氨苄青霉素的LB固体培养基上随机挑选单个菌落，摇菌培养，试剂盒小提质粒DNA，进行初筛，然后用*Kpn*Ⅰ和*Bst*XⅠ双酶切及PCR扩增方法对重组子进行筛选和鉴定[2,3]。

1.7 目的基因的部分DNA序列测定和分析

扩增阳性重组质粒pcDNA-FHIT，用碱裂解法提取重组质粒DNA作模板，进行目的基因的DNA序列测定。

1.8 人类黑素瘤细胞MM96L的转染和表达

细胞转染采用质脂体介导的转染方法，其过程参照试剂盒说明书介绍的方法进行。转染后用G418选择培养基筛选阳性克隆，继续培养，采用免疫细胞化学方法分析Fhit蛋白的表达。

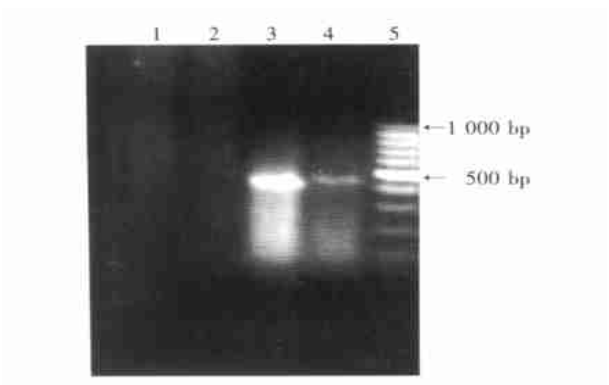
2 结果

2.1 RT-PCR结果

组织总RNA提取后，测A_{260}/A_{280}值为1.8，表明提取的总RNA较纯；经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳，清晰可见18 s和28 sRNA条带，表明提取的RNA没有降解，可用于RT-PCR。以cDNA为模板，用设计的两条引物进行PCR扩增，所产生的条带位于100 bp DNA Markers的400 bp和500 bp之间见图1，与预期的456 bp目的片段大小接近，表明扩增片段是我们所需的目的基因片段。

2.2 重组质粒的鉴定

将筛选得到的重组质粒扩增后提取质粒DNA，用*Kpn* Ⅰ和*Bst*XⅠ双酶切产生2个条带，大小分别约为5.4 kb和456 bp；另外，PCR扩增也显示出特异性扩增条带，证明重组质粒插入了FHIT基因片段，见图2。



1，2：Positive controls；3，4：RT-PCR product；5：100 bp DNA markers

图1 PCR产物凝胶电泳结果

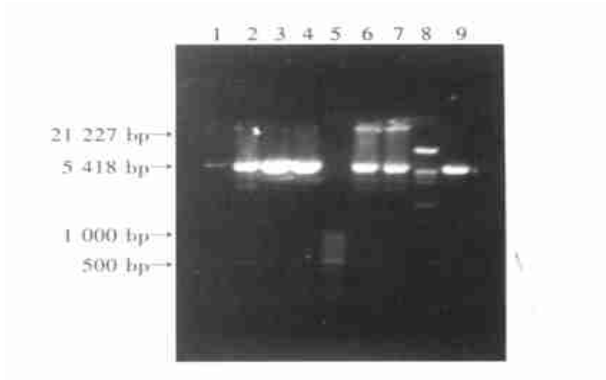
Fig 1 Agarose gel electrophoretic map of PCR products

2.3 目的基因部分DNA序列分析

目的基因的序列测定结果与文献报道的人FHITcDNA序列完全一致。

2.4 免疫细胞化学染色

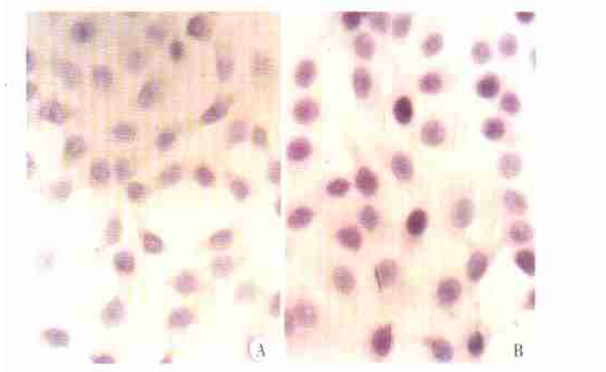
免疫细胞化学染色结果表明：转染重组质粒pcDNA3-FHIT的MM96L细胞在胞浆中可见表达了Fhit蛋白，而转染空载体pcDNA3的MM96L细胞未表达Fhit蛋白，见图3。



1，3，4，9：pcDNA3；2，6，7：pcDNA3-FHIT；5，8：DNA markers

图2 重组质粒**pcDNA3-FHIT**的酶切分析结果

Fig 2 Restriction map of recombinant plasmid pcDNA3-FHIT



A：MM96L cells transfected with pcDNA3-FHIT；B：MM96L cells transfected with pcDNA3

图3 **Fhit**蛋白在**MM96L**细胞中的表达 (免疫细胞化学二步法×40)

Fig 3 Expression of Fhit protein in MM96L cell

(Immunocytochemical Envision System×40)

3 讨论

FHIT基因是新发现的一种候选抑癌基因，此基因cDNA包含10个外显子，它们的缺失与突变将导致Fhit蛋白的表达异常，从而引起功能的改变。FHIT基因包含有FRA3B脆性位点和t(3;8)移位的断裂位点，其编码的蛋白质属于一种AP3A水解酶类，能水解ApnA而产生AMP，其在体内的功能尚不十分清楚。其编码的蛋白为具有三价组氨酸结构域的HIT家族，所以

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

命名为脆性组氨酸三联体(FHIT 基因)。HIT 蛋白家族的共性是在多肽顺序 C 端具有保守的组氨酸三联体氨基酸序列表位(HisXHisXHis), 是高度保守的酶家族, Fhit 蛋白为其家族成员之一, 由 FHIT 基因 E5 ~E9 编码生成, 可能参与体内很多关键性而普遍的生化反应。文献[4~7] 报道, FHIT 基因在多种肿瘤细胞系中存在缺失与重排, 如头颈部癌、肺癌、胃癌、白血病等肿瘤中都存在较高频率的杂合性丢失与纯合性缺失。但 FHIT 基因究竟通过何种途径而发挥对瘤细胞的抑制作用, 这有待做更进一步的研究。为了进一步研究 FHIT 与肿瘤发生发展的关系, 探讨肿瘤的发生机制与治疗新方法, 我们构建了能在哺乳动物细胞内表达的含有人 FHIT 基因的 pcDNA3-FHIT 真核表达载体。

根据 GenBank 中人 FHIT 基因序列, 我们自行设计一对引物, 分别引入了 KpnI 和 BstXI 酶切位点, 并添加了保护碱基, 可扩增包括目的基因的全部序列, 使目的基因正确插入载体。经酶切及序列分析证实重组质粒构建正确, 无缺失、插入及移码等突变, 通过免疫细胞化学法证实: 体外转染 MM96L 真核细胞后, FHIT 基因可以在转染细胞中稳定表达, 为进一步研究 FHIT 基因抑癌机制及肿瘤基因治疗提供了有效的分子工具。

参考文献:

[1] Ohta M, Inoue H, Cotticelli M G, *et al*. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. Cell, 1996, 84(4): 587－597.

[2] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 10.

[3] 许福明, 马文煜, 项秉懿, 等. 淋球菌 IgA 蛋白酶基因中的表位片段的克隆、表达与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(11): 1077－1079.

[4] Hallas C, Albitar M, Letofsky J, *et al*. Loss of FHIT expression in acute lymphoblastic leukemia[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(9): 2409－2414.

[5] Alexeev V, Yoon K. Gene correction by RNA-DNA oligonucleotides[J]. Pigment Cell Res, 2000, 13(2): 72－79.

[6] Cho J Y. A transporter gene (sodium iodide symporter) for dual purposes in gene therapy: imaging and therapy[J]. Curr Gene Ther, 2002, 2(4): 393－402.

[7] Audouy S A, de Leij L F, Hoekstra D, *et al*. *In vivo* characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy[J]. Pharm Res, 2002, 19(11): 1599－1605.

(编辑　刘洪娥)

(上接 121 页)

表 2　餐后 TG 动态变化结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	平均峰值 (mmol/L)	达峰时间 (h)	TG-AUC (mmol/L)
老年组	3.44±1.44 *	4.02±1.58	10.9±5.56
对照组	2.71±1.00	3.12±1.20	9.18±4.06

与对照组比较, *: $P<0.05$

2.2　餐后 TC、HDL-C、LDL-C 反应

表 1 结果显示餐后 TC 在 2~4 h 内略有下降, 6~8 h 恢复至空腹水平。对照组 HDL, LDL 均在 2~4 h 轻度下降, 8 h 恢复至空腹或略有升高的趋势, 但都无统计学意义($P>0.05$)。两组间空腹及餐后 TC、HDL、LDL 结果的差别均无显著性意义($P>0.05$)。

3　讨论

本研究餐后 TG 的动态变化均提示老年人餐后脂肪廓清能力下降, 其达峰时间相对后移, 8 h 复原能力下降和 TG-AUC 的增加, 这可能是老年人 TG 升高的重要原因。TG 在血循环中的高浓度状态使其致动脉粥样硬化的机制得以充分发挥, 成为老年人心脑血管疾病发生、发展的重要因素之一。目前, 甘油三酯与动脉粥样硬化的关系得到了进一步的认识, 高 TG 血症是心脑血管疾病的一种独立的危险因素。

餐后 8 h 持续升高现象提示空腹血清 TG 不能完全反映机体脂肪代谢的状态。因此脂肪耐量试验可弥补空腹 TG 的不足, 特别是对餐后高 TG 的人更有其潜在的应用前景。已有研究表明, 餐后高 TG 预测冠心病的准确率高于空腹 TG 及低 HDL[2]。

餐后 TC 的变化趋势, 与李氏等[3,4] 报道相似。该结果证实了 TG 升高可致 HDL-C 减少的现象, 高 TG 时, HDL 和 LDL 中的胆固醇酯与 TRL 中 TG 交换, 而使其中的胆固醇减少, 导致 HDL-C、和 LDL-C 减低。

关键词: 血清; 甘油三酯; 胆固醇; 脂蛋白; 脂肪负荷试验
中图法分类号: R446.11　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Reznik Y, Pousse P, Herrou M, *et al*. Postprandial lipoprotein metabolism in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetic patients: influence of apolipoprotein E polymorphism[J]. Metabolism, 1996, 45(1): 63－71.

[2] Cabezas M C, de Pbruin T W, Jansen H, *et al*. Impaired chylomicron remnant clearance in familial combined hyperlipidemia[J]. Arterioscler Thromb, 1993, 13(6): 804－814.

[3] 李健斋. 正常人脂肪餐后血脂反应的初步观察[J]. 中华医学检验杂志, 1997, 20(5): 278－280.

[4] 潘大虎, 吴　辉, 胡保平. 健康人与高脂血症病人甘油三酯耐量试验比较[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(6): 339.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net