

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)24-2251-03

人 *bit1* cDNA 基因的克隆、测序及表达邢小红^{1,2} 吴元明³ 王哲² 王文勇² 黄高昇²(第四军医大学:¹ 西京医院烧伤科,² 基础部病理学教研室,³ 基础部生物化学教研室 陕西 西安 710033)Cloning, sequencing and expression of human *bit1* cDNA geneXING Xiao-Hong^{1,2}, WU Yuan-Ming³, WANG Zhe², WANG Wen-Yong², HUANG Gao-Sheng²¹Department of Burn, Xijing Hospital, ²Department of Pathology,³Department of Biochemistry, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】AIM: To clone the human *bit1* cDNA gene and express it in *E. coli*. METHODS: Total RNA was extracted from fresh placenta tissue and reverse transcribed to single chain cDNA. By using it as the template, the human *bit1* cDNA gene was amplified. The cDNA gene was then cloned into pUC19. After the sequence was verified, the cDNA gene was subcloned into pGEX-4T3 for expression. RESULTS: The human *bit1* cDNA gene was amplified by using the designed primer and the gene was expressed in *E. coli* induced by IPTG. The expressed protein accounted for 40.6% of the total amount of protein. CONCLUSION: The human *bit1* cDNA gene is amplified and expressed in *E. coli*, which is important for the study on the function of human *bit1* protein.

【Keywords】 DNA, complementary; cloning, molecular; sequence analysis; gene expression

【摘要】目的: 克隆并在大肠杆菌中表达人 *bit1* cDNA 基因。方法: 从新鲜的胎盘组织中提取总 RNA, 经反转录成单链 cDNA, 以此为模板扩增出人 *bit1* cDNA 基因, 将该基因克隆入载体 pUC19 中, 测序正确后亚克隆入表达载体 pGEX-4T3 中进行表达。结果: 利用所设计的引物扩增出完整的人 *bit1* cDNA 基因。以大肠杆菌为宿主在 IPTG 的诱导下获得表达, 激光薄层扫描显示表达蛋白占总蛋白的 40.6%。结论: 获得了人 *bit1* cDNA 基因及其原核表达产物, 对研究人 Bit1 蛋白的功能具有重要的意义。

【关键词】 DNA 互补; 克隆分子; 序列分析; 基因表达

【中图分类号】 R392.11 **【文献标识码】** A

收稿日期 2004-09-09; 修回日期 2004-09-28

作者简介 邢小红(1973-), 女(汉族), 陕西省西安市人, 硕士生(导师 黄高昇), Tel.(029) 83374551 Ext. 8 Email. wuyun@fmmu.edu.cn

0 引言

凋亡, 又称程序性细胞死亡, 是机体细胞的一种不可逆的生理过程。机体内存在多种影响细胞凋亡过程的因素。Bcl-2 就是机体内最重要的凋亡调节因子之一。Jan 等^[1]通过 bcl-2 基因启动子来筛选能调节 bcl-2 基因表达的细胞分子时获得了 *bit1* (bcl-2 inhibitor of transcription 1) 基因。*bit1* 基因定位于 17q23.2, 其 mRNA 长约 1 kb, 编码 179 aa 的蛋白质, Bit1 蛋白 M_r 约 27 000。Bit1 蛋白的 N 端为一线粒体定位序列, C 端为一未知功能结构域 UPF0099。Northern 杂交显示 *bit1* 基因在前列腺、骨骼肌、肝脏高表达, 而在心脏、脾、结肠低表达。人胸腺及外周血白细胞中几乎检测不到它的表达。Bit1 存在于线粒体中, 如果释放到胞质中, 就和 AES (amino-terminal enhancer of split)^[2] 结合并促进细胞凋亡。纤粘连素和细胞的结合可以抑制这种凋亡。虽然 Bit1 蛋白可以促进细胞凋亡, 但其具体的信号转导通路还不清楚。我们拟从人胎盘组织中克隆人 *bit1* cDNA 基因, 并在大肠杆菌中进行表达, 为进一步研究 *bit1* 基因的功能及其与肿瘤发生的关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol(r) Reagent 为 Gibco BRL 公司产品; Superscript II 反转录试剂盒购自 invitrogen 公司; Pfu DNA 聚合酶为鼎国公司产品; 限制性内切酶, IPTG, dNTP, DL2000 DNA Marker 购自 Takara 公司; 凝胶 DNA 纯化试剂盒为赛百盛公司产品; RNase A 及其他分子生物学常用试剂均为华美公司产品。Top10 菌种由第四军医大学病理学实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 单链 cDNA 模板的制备 用 TRIzol(r) Reagent 从新鲜的胎盘组织中提取总 RNA, 提取的 RNA 用紫外分光光度计进行定量。按照 Superscript II 反转录试剂盒的说明将提取的总 RNA 反转录为单链 cDNA。

1.2.2 引物设计 上游引物: 5'GGAATTCGCCCTC-CAAATCCTTGTTATG 3', 含 EcoRI 识别位点; 下游引物: 5'CGGGATCCGATGGAGGGTTGTTGCATA 3', 含

*Bam*HI 识别位点;

1.2.3 人 *bit1* cDNA 基因的扩增 以单链 cDNA 为模板进行人 *bit1* cDNA 基因的扩增。在 50 μ L 反应体系中,加入 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L (41.68 mkat/L), dNTP 1 μ L (10 mmol/L) 引物各 1 μ L (20 μ mol/L), cDNA 模板 1 μ L, 灭菌去离子水 40 μ L, 混匀并短暂离心后进行循环反应。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 45 s, 61 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 38 个循环, 末次循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察, 回收 DNA 条带, 用赛百盛试剂盒按说明纯化扩增产物。

1.2.4 人 *bit1* cDNA 基因的克隆 PCR 扩增产物与 pUC19 载体均用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 37 $^{\circ}$ C 双酶切 3 h, 酶切产物行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳及凝胶 DNA 回收。人 *bit1* 基因片段与 pUC19 载体片段按 5:1 摩尔比例, 在 T4 DNA 连接酶催化下, 于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h。连接产物转化 Top10 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 45 min 后涂布于 LB 平板(含氨苄青霉素 100 mg/L), 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 36~48 h。随机挑选 6 个白色菌落(蓝白筛选), 分别接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 参照文献 [3] 以碱裂解法小量提取质粒 DNA, 经酶切及序列测定鉴定阳性克隆。阳性克隆质粒命名为 pUC19-Bit1。

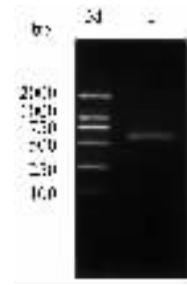
1.2.5 人 *bit1* cDNA 基因在大肠杆菌中的表达^[4] 用 *Eco*R I 和 *Sal* I 两个酶切位点将 pUC19-Bit1 中的 *bit1* 基因片段亚克隆入 pGEX-4T3 载体。阳性克隆质粒命名为 pGEX-4T3-Bit1。将含重组表达质粒 pGEX-4T3-Bit1 的单个菌落接种于含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 次日按 20 mg/L 转接于 2 mL LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 $A_{600nm}=0.4\sim 0.6$, 加入 IPTG 至终浓度为 2 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导 3 h。取 1.5 mL 诱导表达菌液离心, 得到菌体沉淀, 以 2X 凝胶加样缓冲液 20 μ L 及灭菌去离子水 20 μ L 悬浮, 煮沸 10 min, 离心 10 min 后取 3 μ L 上清在 Bio-Rad 电泳仪上进行 120 g/L SDS-PAGE, 用考马斯亮蓝染色观察。

2 结果

2.1 人 *bit1* cDNA 基因的扩增 从新鲜的胎盘组织中提取总 RNA 经反转录为单链 cDNA, 以此为模板扩增出人 *bit1* cDNA 基因, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳证实扩增片段与理论大小(585 bp)一致(Fig 1)。

2.2 人 *bit1* cDNA 基因的克隆 将两端带有 *Eco*R I 和 *Bam*H I 的人 *bit1* 基因片段克隆入载体 pUC19 中, 得到 pUC19-Bit1, *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶消化可

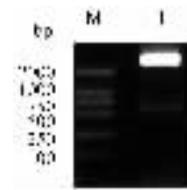
得到 596 bp 的 DNA 片段(Fig 2) 经测序证实所获得的基因片段序列与 GenBank 数据库所收录的 *bit1* 基因序列(登录号为 NM_016077)完全一致。



M: DNA marker DL2000; 1: Amplification of human *bit1* cDNA gene.

Fig 1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis

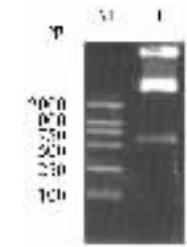
图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析



M: DNA marker DL2000; 1: pUC19-Bit1 digested with *Eco*RI and *Bam*HI.

Fig 2 Identification of recombinant plasmid pUC19-Bit1 by *Eco*RI and *Bam*HI digestion

图 2 重组质粒 pUC19-Bit1 的酶切鉴定

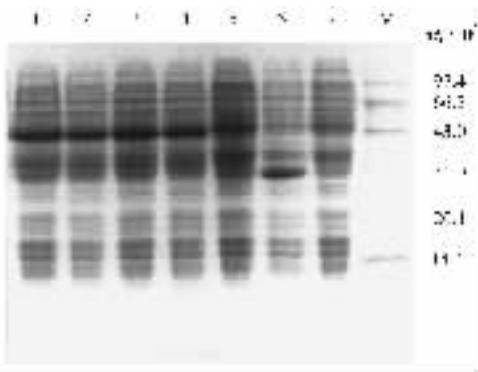


M: DNA marker DL2000; 1: pGEX-4T3-Bit1 digested with *Bam*HI.

Fig 3 Identification of recombinant plasmid pGEX-4T3-Bit1 by *Bam*HI digestion

图 3 重组质粒 pGEX-4T3-Bit1 的酶切鉴定

2.3 人 *bit1* cDNA 基因在大肠杆菌中的表达 利用 *Eco*R I 和 *Sal* I 将人 *bit1* 基因片段亚克隆入表达载体 pGEX-4T3 中, 用 *Bam*HI 进行酶切鉴定(Fig 3)。将含重组表达质粒 pGEX-4T3-Bit1 的菌液于 37 $^{\circ}$ C 用 2 mmol/L IPTG 诱导表达, 120 g/L SDS-PAGE 电泳, 在 M_r 45 000 左右有一条新的蛋白带(如箭头所示), 而诱导的空载体菌则无此蛋白表达带(Fig 4)。随着加入 IPTG 后诱导时间的延长(1, 2, 3 h), 蛋白表达逐渐增高, 3 h 时达到最高, 4 h 后开始下降。通过激光薄层扫描分析, 表明 IPTG 诱导时间为 3 h 时蛋白表达带占细菌总蛋白量的 40.6%。



M: Low molecular weight protein marker; 1~4: Bacteria bearing pGEX-4T3-Bit1 induced by IPTG for 1, 2, 3 and 4 h respectively; 5: Non induced bacteria bearing pGEX-4T3-Bit1; 6: Induced bacteria bearing pGEX-4T3; 7: Non-induced bacteria bearing pGEX-4T3.

Fig 4 SDS-PAGE of human Bit1 fusion protein expressed in *E. coli*
图4 在大肠杆菌中诱导表达的人 Bit1 融合蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳

3 讨论

从细菌到人 *bit1* 基因在生物界中非常保守, 并与凋亡发生有关。Bit1 从线粒体中释放至胞质中以后, 可以与 AES 结合, 从而引起不依赖于 caspase 的细胞凋亡。bit1 基因的发现对于研究凋亡的发生与调节提供了新的途径。胞质内 Bit1 浓度的升高可以明显促进 anoikis 的发生, 而其浓度的降低可以降低 anoikis 的发生。AES 属于 TLE (Transducin-like enhancer of split) 家族成员, TLE1 可以促进细胞存活基因的转录, 而 Bit1 与 AES 的结合可以关闭这种基因的转录, 因而促进细胞凋亡的发生。TLE1 的上调表达已经作为淋巴瘤的一个诊断标记^[5]。那么, Bit1 和淋巴瘤或其他肿瘤之间的关系值还需我们进一步研究。

为了研究 *bit1* 基因的功能及在肿瘤中的分布情况, 我们成功地从人胎盘组织中克隆得到了人 *bit1* cDNA 基因, 并在大肠杆菌中得以表达, 这为下一步实验奠定了基础。

【参考文献】

【参考文献】

- [1] Jan Y, Matter M, Pai JT, et al. A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors [J]. *Cell*, 2004, 116(5): 751-762.
- [2] Paroush Z, Finley RJ, Kidd T, et al. Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins [J]. *Cell*, 1994; 79(5): 805-815.
- [3] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 金冬雁、黎孟枫译. 分子克隆 [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 582.
- [4] 吴元明, 陈苏民, 陈南春, 等. 人 Era 蛋白在大肠杆菌中的高效表达及纯化 [J]. 第四军医大学学报, 2001; 22(19): 1766-1769. Wu YM, Chen SM, Chen NC, et al. High expression of human Era protein and its purification [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2001; 22(19): 1766-1769.
- [5] Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning [J]. *Nat Med*, 2002, 8(1): 68-74.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)24-2253-01

左腋下直切口动脉导管结扎术 28 例

蔡莉萍¹, 武艳¹, 王军¹, 曹艳¹, 向英², 王警卫¹, 陈小茜¹ (¹武警陕西省总队医院麻醉手术科, 陕西 西安 710054; ²第四军医大学预防医学系卫生勤务学教研室, 陕西 西安 710033)

【关键词】动脉导管 结扎术 手术配合

【中图分类号】R654.2 【文献标识码】B

1 临床资料 动脉导管未闭(PDA) 28 例, 男 9 例, 女 19 例, 平均年龄 7.5 岁。在静吸复合全麻气管插管下, 取右侧卧位, 采用左腋下直切口经第 3 肋间开胸, 左腋下直切口 5~7 cm, 开胸后, 在降主动脉表面, 迷走神经后方, 纵向切开纵膈胸膜, 钝、锐交替游离动脉导管, 用沾有石蜡油的 10 号缝线加垫(垫用长

1~4 cm, 宽 0.5~0.7 cm 涤纶片卷成)或不加垫双重结扎。游离和结扎过程用硝普钠每分钟 3~10 g/kg, 控制收缩压在 12 kPa 以下进行。结扎后使血压降至原水平, 检查震颤消失, 查对器械, 纱布无误后, 置胸腔引流管, 逐层关胸。术后随访, 无 1 例复发。

2 讨论 动脉导管未闭的闭合手术方法有: 单纯结扎、多重结扎、钳闭、切断缝合、经导管阻塞和胸腔镜下闭合等^[1,2]。目前外科闭合 PDA 的方法较统一, 效果良好, 并发症少, 死亡率低。至今, 腋下切口加垫或不加垫结扎术仍是常规手术方法, 该手术的优点是: 美观、患者易接受、组织损伤少, 对上肢功能影响小; 术中失血少, 手术时间短。在手术过程中必须: 操作轻柔, 特别是分离动脉导管后壁组织时, 切忌暴力撕脱, 游离导管过程均在收缩压低于 12 kPa 以下进行, 对导管直径 > 1 cm 者一定要加垫。

【参考文献】

- [1] Stokhof AA, Sreeram N, Wovekamp WT. Transcatheter closure of patent ductus arteriosus using occluding spring coils [J]. *J Vet Intern Med*, 2000, 14: 452.
- [2] Tsukamoto S, Shindo S, Obana M, et al. Closure of calcified patent ductus arteriosus [J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 6: 46-54.

编辑 许昌泰

收稿日期 2004-11-05; 修回日期 2004-11-19

作者简介 蔡莉萍(1965-), 女, 汉族, 陕西省西安市人, 副主任护师。

Tel. (029) 82245807 Email: 50369@sina.com