

# 人 MGMT 基因 cDNA 的克隆表达及表达蛋白修复功能的鉴定

朱玉文 刘建国\* 黎高翔

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

**摘 要** 克隆了 HeLa 细胞 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(MGMT)基因的 cDNA 序列,该序列与国外发表的 cDNA 完全一致。将此 cDNA 插入原核表达载体 pET-21a 后转化大肠杆菌 BL21(DE3)获得表达的重组菌株 pET-21a-MGMT/*E. coli* BL21(DE3),经 IPTG 诱导后产生分子量为 24kD 的蛋白质。烷化类诱变剂致死突变实验表明,MGMT 蛋白的表达能修复受体菌 DNA 分子因烷化类诱变剂导致的突变。

**关键词** O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶,烷化剂,基因克隆表达,DNA 分子修复

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0396-04

O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(EC 2.1.1.63)简称 MGMT,广泛存在于各种生物体的细胞中,主要功能是将甲基化 DNA 分子中鸟嘌呤第 6 位氧原子上的烷基共价转移到酶的活性中心 Cys 残基上,修复 DNA 分子的烷基化损伤。同时因酶自身构象发生变化而失去活性,迅速被细胞内蛋白酶降解<sup>[1,2]</sup>。人编码 MGMT 的基因位于 10 号染色体长臂 26q 上,全长超过 170kb,包括 5 个外显子。转录的成熟 mRNA 为 950bp,编码区 621bp 编码 207 个氨基酸<sup>[3-5]</sup>。人正常细胞表达 MGMT(Mer<sup>+</sup>),而很大一部分肿瘤细胞(1/5)不表达 MGMT 为 Mer<sup>-</sup><sup>[6]</sup>。实验表明,在因接触烷化剂而癌变的细胞和组织中发现其 DNA 分子中 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤是引起 G:C 到 A:T 置换突变的主要原因<sup>[7]</sup>,细胞从 Mer<sup>+</sup> 到 Mer<sup>-</sup> 的转变与细胞早期癌变有关<sup>[8]</sup>。另外,由于 MGMT 酶的自杀性作用机制,细胞内 MGMT 水平能反映细胞对烷化剂的耐受程度,这与恶性肿瘤细胞对烷化剂化疗药物的抗性有着直接的关系。因而 MGMT 在癌症的发生、肿瘤临床化疗及化疗中正常细胞的保护方面都占有重要地位。

本文采用 RT-PCR 技术克隆出人源 MGMT 基因的 cDNA 序列,与国外发表的 cDNA 完全一致<sup>[9]</sup>,并在大肠杆菌中表达了该 cDNA,同时对表达的蛋白因烷化剂致突的 DNA 分子修复功能进行了鉴定。实验表明 MGMT 蛋白的表达能有效提高受体菌对某

些特异性烷化剂的抗性。这为进一步研究该基因的细胞癌变不同阶段的表达及其与细胞癌变的关系和 MGMT 蛋白的作用机理等打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒和细胞

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3),质粒 pBluescript KS 由本组保存,质粒 pET-21a 购自 Novogene 公司。HeLa S3 细胞由中国医科院肿瘤医院林东昕研究员惠赠。

### 1.2 试剂和酶

寡核苷酸引物 p1p2 由上海生工生物工程公司合成。TRIZOL 为 GIBCO 公司产品。反转录酶购自 Boehringer Mannheim 公司。oligo(dT)<sub>15</sub> 购自 Promega 公司。限制酶 *Nde*I 购自 TaKaRa 公司,其余工具酶均购自华美公司。甲基磺酸乙酯(EMS),硫酸二乙酯(DES),亚硝基胍均购自北京化学试剂公司。培养基成分购自 OXOID 公司。其余均为国产分析纯试剂。

### 1.3 方法

**1.3.1 质粒 DNA 的提取、酶切、回收、连接、转化参照文献 [10]。**

**1.3.2 HeLa S3 细胞总 RNA 的提取依照 TRIZOL 试剂盒说明书。**

**1.3.3 RT-PCR 扩增人 MGMT 基因:按已发表的人**

MGMT 基因的 cDNA 序列 ,设计并合成对应于 MGMT 编码区的一对特异性引物。MGMT 基因的 5'引物。

P1 : 5'-GCCGATCCCATATGGACAAGGATGGATT-GTGAAATGA-3'引入了 *Bam*HI 和 *Nde*I 位点。3'引物 P2 :5'-GCCGAATTCTCAGTTTCGCCAGCAGGCGG-3' 引入了 *Eco*RI 位点。

以 Oligo ( dT )<sub>5</sub> 为引物和以从培养的 HeLa S3 细胞中提取的总 RNA 为模板 ,反转录酶 60℃反转录合成获得 cDNA 第一条链。以此 cDNA 链为 PCR 扩增模板 P1P2 为引物 ,先 94℃变性 5min ,再以 94℃变性 45s ,56℃复性 1min ,72℃延伸 1.5min 进行 30 个循环反应 ,最后 72℃ 10min 补平的条件进行 PCR 反应。

**1.3.4 MGMT 基因片段的克隆与鉴定** :PCR 扩增产物和质粒 pBluescript KS 分别用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切 ,目的片段经柱离心式胶回收试剂盒回收后 ,经 T4 DNA 连接酶连接构建重组质粒 pBS-MGMT 并转化 *E. coli* DH5α ,经蓝白斑筛选出阳性克隆菌 *E. coli* DH5α/pBS-MGMT。并以 T3、T7 通用引物对阳性克隆质粒的插入 cDNA 片段进行 DNA 序列分析鉴定。

**1.3.5 表达载体的构建与克隆** :对重组质粒 pBS-MGMT 及质粒 pET21α 分别进行 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切 ,凝胶电泳后 ,回收目的片段 ,经 T4 DNA 连接酶连接后 ,转化 *E. coli* BL21 并经 Amp<sup>+</sup> 抗性筛选和限制酶酶谱分析得到阳性克隆菌 *E. coli* BL21/pET-MGMT。

**1.3.6 MGMT 蛋白的诱导表达** :*E. coli* BL21/PET-MGMT 重组菌培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.7 时 ,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 诱导表达 ,分别诱导 0.5、1、2h 后取 1mL 菌液 ,菌体全细胞蛋白在 15% SDS-PAGE 检测鉴定表达产物。

**1.3.7 表达蛋白 DNA 分子修复功能的鉴定** :以带有 pET21α 空质粒的 BL21 菌株为对照 ,*E. coli* BL21/pET-MGMT 重组菌和对照菌经 37℃摇床培养过夜 ,按 1% 菌种量各接种于 2 支含有 LB 培养液的试管中 ,培养至 OD 值为 0.7 时 ,分别取 1 支加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L 进行诱导培养 2h ,各取 10μL 菌液用无菌水稀释至合适浓度 ( 10<sup>-6</sup> ) ,取 50μL 涂布于含有 0.005% ~ 0.013% 不同浓度硫酸二乙酯 ( DES ) 的 Amp 平板 X 及无 DES 的含 Amp 的平板 Y 上 ,37℃温箱培养过夜 ,次日进行菌落平板计数 ,并根据平板 X 与平板 Y 的单菌落数值计算存活率。用存活率的高低定性衡量表达蛋白 DNA 分子修复功能的大小。

存活率( % )=  $\frac{\text{平板 X 上菌落数}}{\text{平板 Y 上菌落数}} \times 100\%$

同时用甲基磺酸乙酯 ( EMS ) 亚硝基胍以同样方法进行对比实验。

2 结 果

**2.1 人 MGMT 基因 cDNA 的克隆及其序列分析**  
按方法 1.2.3 从人 HeLa S3 细胞总 RNA 中 RT-PCR 扩增出的特异性 cDNA 片段 ,大小约为 621bp。按方法 1.2.4 克隆了该 cDNA 片段。经酶切分析得知所克隆的片段为目的基因的 cDNA 序列。经双脱氧法测定得到该片段的 DNA 序列 ,经分析与已报道的人 MGMT 基因 cDNA 序列完全一致<sup>[1]</sup>。

2.2 MGMT cDNA 表达载体的构建

重组质粒 pBS-MGMT 经 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切出 MGMT cDNA 目的片段 ,与同样酶切处理的原核表达载体 pET21α 经 T4 DNA 连接酶连接组成表达质粒 pET-MGMT ( 图 1 ) ,后转化 *E. coli* BL21 菌株 ,并经 Amp 抗性和酶切分析筛选得到阳性克隆 *E. coli* BL21/pET-MGMT。

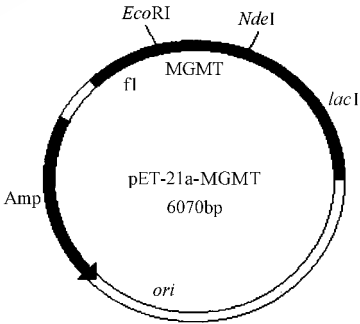


图 1 人 MGMT 基因 cDNA 表达载体 pET-MGMT 的结构  
Fig.1 Structure of the expression vector pET-MGMT

2.3 MGMT cDNA 在大肠杆菌中的表达

阳性克隆菌 *E. coli* BL21/pET-MGMT 于 37℃活化过夜后 ,以 1% 接种量接种于新鲜培养基中 ,37℃摇床培养至对数生长期中 ( OD<sub>600</sub> ≅ 0.7 ) ,加入终浓度为 1mmol/L IPTG 继续培养 4 ~ 6h ,收集菌体进行 SDS-PAGE ( 15% ) 分析 ,考马斯亮蓝 R250 染色显示经 IPTG 诱导后出现 24kD 的一条蛋白带 ( 图 2 )。

2.4 MGMT 蛋白的表达对宿主菌烷化诱变抗性的影响

DES 等诱变剂对大肠杆菌有极强的致死率。选择不同 DES 浓度加入固体培养基中 ,重组菌和对照菌 ( 只含空质粒 ) 分别经 IPTG 诱导后 ,涂布于该固体培养基上 ,培养后平板菌落计数。实验发现预先用

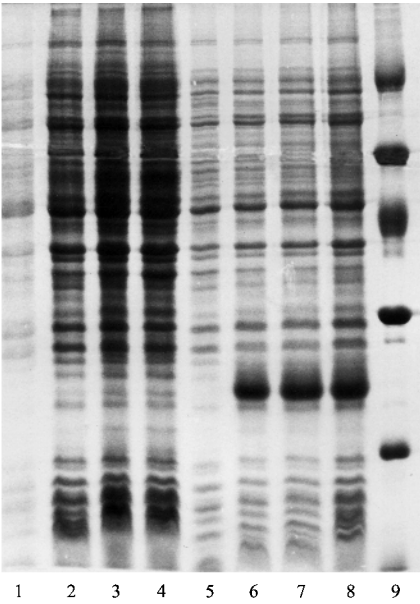


图2 人MGMT基因cDNA表达产物的SDS-PAGE(15%)电泳分析

Fig.2 SDS-PAGE(15%) analysis of the expressing product of human MGMT gene cDNA

1. *E. coli* BL21/pET21a without IPTG ;2,3 *A. coli* BL21a each induced by 0.5mmol/L IPTG at 1,2,3 hours ;5. *E. coli* BL21/pET-MGMT without IPTG ;6,7,8. *E. coli* BL21/pET-MGMT each induced by 0.5mmol/L IPTG at 1,2,3 hours ;9. Protein marker (94.0,67.0,43.0,30.0,21.1,14.4kD).

IPTG 进行诱导表达的重组菌比只有 PET21a 空质粒的对照菌的存活率提高 1 倍多(对照菌在含 0.005% DES 的固体培养基上存活率为 32.5% ,而重组菌的存活率达 70.4% )随着 DES 浓度增加 ,重组菌与对

照菌的存活率都发生递减 ,但在含相同浓度 DES 的固体培养基上 ,重组菌明显比对照菌有更高的存活率(图 3) 。DES 主要作用于鸟嘌呤的 O<sup>6</sup> 位和胸腺嘧啶 O<sup>4</sup> 位使其乙基化<sup>[10]</sup> ,本实验发现表达的 MGMT 蛋白能有效降低 DES 引起 DNA 突变损伤的致死率 ;说明 MGMT 除具有将鸟嘌呤第 6 位 O 原子上的乙基共价转移到酶的活性中心上 ,修复引起的 DNA 烷基化损伤的能力外 ,还对 O<sup>4</sup>-烷基胸腺嘧啶引起的突变损伤也有修复作用。同时用 EMS ,亚硝基胍等其他诱变剂进行突变致死实验 ,发现 MGMT 蛋白的表达并不能提高重组菌的存活率(表 1) 。EMS 虽为烷基化试剂 ,只对 DNA 分子中鸟嘌呤 N<sup>7</sup> 位进行甲基化<sup>[11]</sup> ,而亚硝基胍则为非烷基化试剂 ;这说明表达的 MGMT 具有酶特有的底物特异性 ,只对某些烷基化试剂引起的 DNA 分子损伤有修复作用。

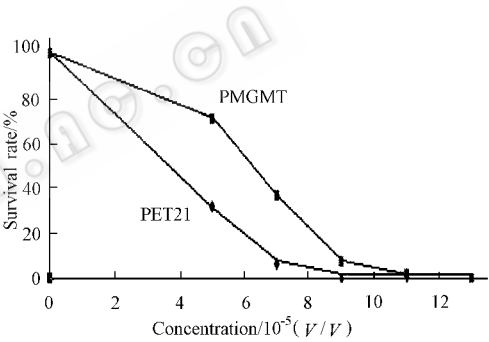


图3 重组菌和对照菌在不同 DES 浓度作用下存活率的比较  
Fig.3 Comparison of survival rate between recombinant and control in different concentration of DES

表 1 重组菌和对照菌在甲基磺酸乙酯和亚硝基胍平板上存活率

Table 1 Survival rate of recombinant and control on plates containing ethyl methylsulfate or nitrosoguanidine			
Treatment	Strains/Plasmids	IPTG induction	Survival rate/%
0.01% ethyl methylsulfate	<i>E. coli</i> BL21/pET21a	Without induction	32.4
0.01% ethyl methylsulfate	<i>E. coli</i> BL21/pET21a	induction	30.9
0.01% ethyl methylsulfate	<i>E. coli</i> BL21/pET-MGMT	Without induction	33.5
0.01% ethyl methylsulfate	<i>E. coli</i> BL21/pET-MGMT	induction	33.5
0.005% nitrosoguanidine	<i>E. coli</i> BL21/pET21a	Without induction	47.3
0.005% nitrosoguanidine	<i>E. coli</i> BL21/pET21a	Induction	45.8
0.005% nitrosoguanidine	<i>E. coli</i> BL21/pET-MGMT	Without induction	48.1
0.005% nitrosoguanidine	<i>E. coli</i> BL21/pET-MGMT	Induction	46.9

3 讨 论

人 MGMT mRNA 的含量因个体、组织及细胞类型不同而异 ,我们选择 MGMT 表达量较高的 HeLa S3 细胞为材料 ,RT-PCR 扩增出人 MGMT cDNA 片段 ,并克隆到原核表达载体 PET21a 中 ,在 *E. coli* BL21

中诱导表达出分子量 24kD 的蛋白 ,与 Mathew A W 所报道的大肠杆菌重组蛋白和人天然 MGMT 蛋白分子量一致 ,且重组蛋白与人天然蛋白的氨基酸序列一致<sup>[12]</sup> ,说明 MGMT 蛋白在人体中不存在翻译后剪切加工形式。另有报道发现在转人 MGMT 基因小鼠表达的人 MGMT 蛋白分子量为 22kD<sup>[13]</sup> ;其分子

量差异可能是由于其 MGMT 蛋白发生剪切加工引起的。

为研究表达的 MGMT 蛋白对烷化 DNA 分子的修复作用,采用了比较含有 MGMT cDNA 的重组菌与不含有 MGMT cDNA 但遗传背景完全一致的 *E. coli* BL21/pET21a 菌株,对 DES 等常用的烷化诱变剂作用存活率高低的方法,来检测表达的 MGMT 蛋白对某些烷化剂使 DNA 分子突变损伤后的修复作用,并初步研究了 MGMT 酶促反应的底物特异性。实验结果表明:表达的 MGMT 蛋白不仅对  $O^6$ -烷基化鸟嘌呤的 DNA 烷化损伤有修复作用,而且对  $O^4$ -烷基化胞嘧啶也有修复合活性,这一结果与 Mitra S 等报道的结果一致<sup>[14]</sup>。同时,本实验发现表达的 MGMT 蛋白对 EMS 和亚硝基胍引起的 DNA 分子突变没有修复作用,进一步说明 MGMT 具有酶特有的底物特异性。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Pieper R O , Costello J F , Fustsher B W *et al.* Direct correlation between methylation status and expression of the human O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene. *Cancer Commun* ,1991 **2** :13 ~ 20
- [ 2 ] Demple B , Sengulick B , Robins P *et al.* Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci* ,1985 **82** :2688 ~ 2692
- [ 3 ] Nakatsu Y , Kazue Hattori , Hayakawa H *et al.* Organization and expression of the human gene for  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase. *Mutat Res DNA repair* ,1993 **265** :9563 ~ 9566
- [ 4 ] Natarajan A T , Vermeulen S , Darroudi F *et al.* Chromosomal localization of human  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by *in situ* hybridization. *Mutagenesis* ,1992 **7** :83 ~ 85
- [ 5 ] Sklar R , Strauss B. Removal of O-methylguanine from DNA of normal and xeroderma pigmentosum derived lymphoblastoid lines. *Nature* , 1998 **289** :417 ~ 420
- [ 6 ] Ellison K S , Dogliotti E , Connors T D *et al.* Site-specific mutagenesis by O-alkylguanine located in the chromosomes of mammalian cell. *Proc Natl Acad Sci* ,1989 **86** :3620
- [ 7 ] Samson L , Derfler B , Waldstein E A *et al.* Suppression of human DNA alkylation-repair defects by *Escherichia coli* DNA-repair genes. *Proc Natl Acad Sci* ,1986 **83** :5607 ~ 5610
- [ 8 ] Istvan B , Chilakamarti V R , Zhenping Chen *et al.* Regulation of expression of the DNA repair gene O-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase c-mediated signaling. *Cancer Res* ,1998 **58** :3950 ~ 3956
- [ 9 ] Bjorn Rydberg , Nigel Spurr , Peter Karran. cDNA cloning and chromosomal assignment of the human  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase. *J Biol Chem* ,1990 **265** :9563 ~ 9569
- [ 10 ] Bignami M , Vitelli A , Muccio A D *et al.* Relationship between specific alkylated bases and mutations at two gene loci induced by ethylnitrosourea and diethylsulfate in CHO cells. *Mutat Res* ,1988 **193** :43 ~ 51
- [ 11 ] SUN N H (孙乃恩) , SUN D X (孙东旭) , ZHU D X (朱德熙). *Molecular Genetics* (分子遗传学) , Nanjing : Nanjing University Publishing Company (南京大学出版社) ,1995
- [ 12 ] Mathew A von , Susumu Shiota , Keizo Tano *et al.* Structural and immunological comparison of indigenous human  $O^6$  methylguanine-DNA methyltransferase with that encoded by a cloned cDNA. *J Biol Chem* , 1991 **15** :1064 ~ 1070
- [ 13 ] Lili Liu , Xiusheng Qin , Gerson S L. Reduced lung tumorigenesis in human methylguanine DNA-methyltransferase transgenic mice achieved by expression of transgene within the target cell. *Carcinogenesis* , **20** :279 ~ 284
- [ 14 ] Mitra S , Kaina B. Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* ,1993 **44** :109 ~ 142

## Cloning and Expression of MGMT cDNA and Analysis of the DNA Repair Activity of the Recombinant Protein

ZHU Yu-Wen LIU Jian-Guo\* LI Gao-Xiang

( Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract** A cDNA encoding human  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) was cloned from Hela S3 cells and the sequence is identical with the published data. The MGMT cDNA was inserted into the expression vector pET-21a and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). A 24 kD protein was expressed after IPTG induction. Essays using lethal dose of alkylating agents indicate that expression of MGMT protein can repair the DNA mutations of the recombinant bacteria produced by alkylating agents.

**Key words**  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), alkylating agents DNA repair, gene cloning and expression

Received : November 30 , 2000

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (39990570)

\* Corresponding author. Tel 86-10-62550184 Fax 86-10-62560912 E-mail jlg@sun.im.ac.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>