

文章编号: 1674-8085(2017)05-0029-06

MTERF1 基因真核表达载体的构建及其在 C-33A 细胞中的表达研究

梅 雯¹, 张成桂², 自加吉¹, 孙美涛¹, 杨泽芳¹, 张晓娟³, *熊 伟^{1,2}

(1. 大理大学基础医学院, 云南, 大理 671000; 2. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南, 大理 671000;

3. 大理市第一人民医院呼吸内科, 云南, 大理 671000)

摘 要: 采用 PCR 技术从 pGEM-MTERF1 重组克隆载体中扩增出人 *MTERF1* 基因 cDNA 的开放阅读框序列, 经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后, 以 pcDNA3.1(+) 为真核表达载体, 构建重组质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1*; 通过 PCR、双酶切和 DNA 测序方法对重组子进行鉴定; 将重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 转染 C-33A 细胞, 利用免疫印迹法检测 *MTERF1* 蛋白的表达。结果显示, 重组质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 经双酶切鉴定和菌落 PCR 鉴定均获得大小为 1 200 bp 的目的条带, DNA 测序结果表明该序列与 GenBank 中人 *MTERF1* 基因序列完全相同, 插入基因的大小和方向正确; 免疫印迹结果表明, *MTERF1* 蛋白的表达水平在转染 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 的 C-33A 细胞中表达高于转染 pcDNA3.1(+) 的 C-33A 细胞。通过对人 *MTERF1* 基因的真核表达载体的构建, 为进一步研究人 *MTERF1* 基因的功能奠定了基础。

关键词: 线粒体转录终止因子 1; 克隆; 真核表达载体; 人子宫颈癌 C-33A 细胞株

中图分类号: Q782

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2017.05.007

CONSTRUCTION OF EUKARYOTIC EXPRESSION VECTOR OF HUMAN *MTERF1* AND IT'S EXPRESSION IN C-33A CELLS

MEI Wen¹, ZHANG Chen-gui², ZI Jia-ji¹, SUN Mei-tao¹, YANG Ze-fang¹, ZHANG Xiao-juan³, *XIONG Wei¹

(1. School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali, Yunnan 671000, China;

3. Respiratory Medicine, The First People's Hospital of Dali, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: The human *MTERF1* open reading frame (ORF) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from pGEM-MTERF1 recombinant cloning vector. Selecting pcDNA3.1(+) as eukaryotic expression vector, the recombinant products of the pcDNA3.1(+)-*MTERF1* were gained after double digestion by restriction enzymes *Kpn* I and *Xho* I. The recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-*MTERF1* was identified by colony PCR, dual-enzyme digestion and DNA sequencing. C-33A cells were transfected with the pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(+)-*MTERF1* respectively, and the expression of *MTERF2* protein was detected by Western blotting. A specific band of 1 200 bp was detected from recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-*MTERF1* identified by

收稿日期: 2017-06-12; 修改日期: 2017-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81560458, 31601155); 云南省中青年学术与技术带头人后备人才项目 (第十九批); 云南省教育厅科学研究基金重点项目 (2014Z126, 2016ZDX101, 2016ZDX105); 大理大学大学生创新创业训练计划项目 (CXCY-X-2016-18); 大理大学大学生科研基金项目 (201609)

作者简介: 梅 雯(1990-), 女, 云南曲靖人, 硕士生, 主要从事细胞分子生物学研究(E-Mail:meiwen20@163.com);

张成桂(1979-), 男, 湖南常德人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事昆虫生物医药研究(E-Mail:chuiguizhang@163.com);

自加吉(1980-), 男, 云南大理人, 讲师, 硕士, 主要从事临床病理学研究(E-Mail:dldxjcyxzyj@163.com);

孙美涛(1990-), 女, 山东日照人, 硕士生, 主要从事细胞分子生物学研究(E-Mail:smtshandong@126.com);

杨泽芳(1992-), 女, 云南大理人, 大理大学基础医学院本科生(E-Mail:zefangyang1992@163.com);

张晓娟(1984-), 女, 云南大理人, 护师, 主要从事内科护理研究(E-Mail:791372366@qq.com);

*熊 伟(1982-), 男, 湖南株洲人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事细胞分子生物学研究(E-Mail:xwailp@163.com).

digestion of *Kpn* I and *Xho* I and PCR. DNA sequencing and identification showed that homology between this sequence and the human *MTERF1* gene sequence in GenBank was 100%, and the size and the direction of the inserted gene were right. *MTERF1* protein expression in C-33A cells transfected with pcDNA3.1(+)-*MTERF1* was significantly higher than that in C-33A cells transfected with pcDNA3.1(+). pcDNA3.1(+)-*MTERF1* eukaryotic expression vector was successfully constructed and expressed effectively in C-33A cells, which laid a foundation of further research on the function and mechanism of human *MTERF1*.

Key words: mitochondrial transcription termination factor 1; clone; eukaryotic expression vector; human cervical cancer C-33A cell

引言

线粒体转录终止因子 (mitochondrial transcription termination factor, *MTERF*) 蛋白家族, 是一类存在于多细胞生物学中的高度保守的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 结合蛋白, 具有相似的亮氨酸拉链结构的基因表达调控因子^[1]。目前, 线粒体转录终止因子仅在后生动物及植物中存在, 在真菌中仍未发现与其同源的蛋白质^[2]。随着对线粒体基因转录机制和人类线粒体疾病的深入研究, *MTERF* 蛋白家族的研究已成为一个新的热点, 尤其是对人类 *MTERF* 蛋白家族各个成员的性质与功能的研究^[3]。人类 *MTERF* 蛋白家族包括 4 个成员, 分别为 *MTERF1*~*MTERF4*, 各成员主要参与线粒体 DNA 复制、转录、翻译过程的调控^[4-6]。

人 *MTERF1* 基因位于 7 号染色体 (7q21.2), 包含 5 个外显子, 其编码的蛋白质由 399 个氨基酸构成^[7]。研究显示, 哺乳动物 *MTERF1* 是一种线粒体蛋白质, 调控线粒体 DNA 的复制和转录水平, 进而影响细胞的氧化磷酸化活性及其能量代谢^[8]。目前, 人 *MTERF1* 基因在肿瘤发生发展中的作用机制还不清楚。前期研究中的预实验发现, 在人子宫颈癌的细胞株中 (Siha, HeLa, Caski, C4-1, C-33A), C-33A 细胞株 *MTERF1* 的表达量最低。本实验拟利用 PCR 法克隆人 *MTERF1* 基因编码序列, 构建 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 真核表达载体, 并转染到人子宫颈癌 C-33A 细胞株中进行有效表达, 为进一步在分子水平探讨 *MTERF1* 基因的生物学功能及相关活性提供重要的研究基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和载体

人子宫颈癌 C-33A 细胞株由中国医学科学院昆明生物医学研究所廖国阳研究员赠予; 大肠杆菌 TOP10 感受态细胞购自 TransGen 公司; pGEM-*MTERF1* 重组克隆载体购自美国 Gene Copoeia 公司; pcDNA3.1(+)真核表达载体购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 试剂

高糖 DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司); 兔抗人 α -tubulin 单克隆抗体、兔抗人 *MTERF1* 多克隆抗体、山羊抗兔 IgG 二抗 (Abcam 公司); 转染试剂 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 公司); DL2000 DNA Maker、限制性核酸内切酶 *Kpn* I、*Bam* H I (Takara 公司); *Taq* DNA 聚合酶、dNTP (Promega 公司); T4 DNA 连接酶、6× DNA Loading Buffer、DuRed 核酸染料 (TransGen 公司); 质粒提取纯化试剂盒 (BioTeke 公司); DNA 凝胶回收试剂盒 (Omega 公司); 琼脂糖 (西班牙进口分装); 其余化学试剂均为国产分析纯; PCR 引物合成和 DNA 测序由昆明硕擎生物技术有限公司完成。

1.3 仪器

细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf AG 公司); BT423S 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); 半干转膜仪、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); DYY-12C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); 生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司); TAZ-84A 台式恒温培养箱 (上海实验仪器总厂); TGL-16C 台式高速离心机 (上

海安亭科学仪器厂); HH-4 恒温水浴锅(上海国华电器有限公司); 微量移液器(上海大龙医疗器械有限公司); LDZX-50FA 立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂)。

1.4 方法

1.4.1 引物设计

搜索 GenBank 数据库得到人 *MTERF1* 基因(GI: 667667724)的转录本, PCR 引物设计参照人 *MTERF1* 基因序列完整的转录本 1(NM_006980.4)。上游引物 P1(引入 *Kpn* I 酶切位点): 5'-CGGGTACCATGCAGAGCCTTTCC TTAG-3', 下游引物 P2(引入 *Xho* I 酶切位点): 5'-CGCTCGAGTTAGGCAAATCTGCTTAAC-3', 下划线部分为酶切位点, 之前为 2 个保护碱基。预期的 DNA 扩增片段长度约为 1 200 bp。

1.4.2 PCR 扩增和纯化

以重组克隆质粒 pGEM-MTERF1 为模板, 利用 P1/P2 引物进行 PCR 扩增人 *MTERF1* 基因 cDNA 片段, 反应体系为 25 μ L, 其中模板 DNA 1 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, dNTP 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, 10 $\times$ *Taq* buffer 2.5 μ L, ddH₂O 18.3 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测, 按照 DNA 凝胶电泳回收试剂盒说明书进行目的片段回收操作。

1.4.3 真核表达载体的构建

将人 *MTERF1* 基因的 PCR 产物经过回收纯化后, 与真核表达质粒 pcDNA3.1(+) 分别用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并经过 DNA 凝胶回收纯化试剂盒回收酶切产物。将目的基因和真核表达载体用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 *E.coli* TOP10 感受态细胞, 然后取 200 μ L 菌液涂布于含氨苄青霉素 100 μ g/mL 的 LB 固体培养基中。次日, 随机挑取 8 个单菌落, 分别接种于 3 mL 含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养液中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养 14 h, 收集菌体, 使用质粒提取试剂盒提取质粒。

1.4.4 真核表达载体的鉴定

采用 PCR、双酶切及 DNA 测序鉴定重组的

真核表达载体。取提取的质粒进行 PCR 扩增以鉴定是否存在插入片段, PCR 引物为 P1/P2, 反应体系 25 μ L, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。取 3 μ L PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以确定扩增产物大小。另外, 将提取的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-MTERF1 同时用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 和双酶切鉴定插入方向正确且没有突变的重组真核表达质粒进行 DNA 测序鉴定。

1.4.5 细胞培养

人宫颈癌 C-33A 细胞培养在含 10 % 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 孵育箱培养。0.25 % 胰酶+0.02% EDTA 消化传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.4.6 C-33A 细胞转染

将人宫颈癌 C-33A 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞生长融合度达到 70%~80%, 换为 Opti-MEM 无血清培养基。取 150 μ L 无血清培养基于一支灭菌的 1.5 mL 的离心管中, 加入 LipofectamineTM 2000 Reagent 10 μ L 充分混匀, 静置 5 min, 再加入 pcDNA3.1(+)-MTERF1 质粒 4 μ g, 混匀后静置 15 min, 将混合液小心滴入 Opti-MEM 无血清培养基的细胞中, 培养 4~6 h 后更换为 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基, 继续培养 48 h。以转染 pcDNA3.1(+) 的 C-33A 细胞作为对照组。

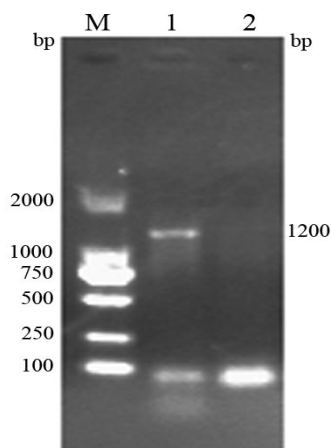
1.4.7 免疫印迹法检测 MTERF1 蛋白在宫颈癌 C-33A 细胞中的表达

细胞转染 48 h 后去掉细胞培养基, 用 DPBS 洗涤细胞 3 次, 加入细胞裂解液冰上裂解 30 min 后收集细胞, 12000 r/min 离心 30 min 后收取上清, BCA 法进行蛋白质浓度测定。采用 12% SDS-PAGE 进行蛋白质分离, 接着将蛋白质用半干法(20 V, 50 min)转移至 PVDF 膜。将 PVDF 膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液, 于室温封闭膜 2 h, 分别滴加一抗(按 1:1000 稀释), 与 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 洗膜结束后滴加二抗, 室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min。最后采用 ECL 化学发光液显影并采集图像。

2 结果

2.1 人 *MTERF1* 基因的 PCR 产物电泳分析

利用 PCR 从 pGEM-MTERF1 克隆载体扩增得到人 *MTERF1* 基因完整的开放阅读框片段。人 *MTERF1* 基因扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 200 bp 处可见清晰、单一的扩增条带, 与预期的片段大小一致 (图 1)。



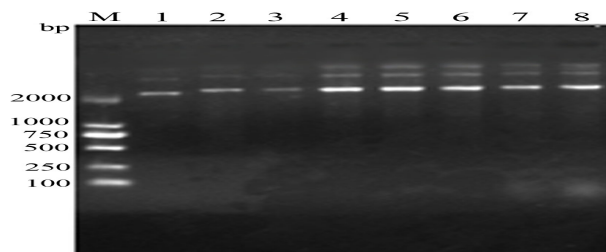
注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 人 *MTERF1* 基因片段; 2: 阴性对照

图 1 人 *MTERF1* 基因 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR of human *MTERF1*

2.2 重组质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 的构建

目的基因和 pcDNA3.1(+)空载体经 T4 DNA 连接酶连接后, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 挑取单克隆扩大培养, 并采用碱裂解法提取重组质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1*, 用空载体作为对照进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2)。结果显示, 提取的重组质粒质量良好, 纯度较高, 无蛋白质和 RNA 的污染。



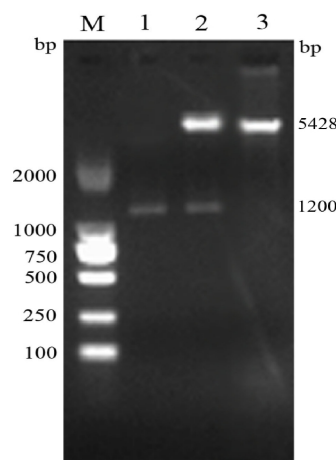
注: M: DL2000 DNA Marker; 1: pcDNA3.1(+)空质粒; 2-8: pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 重组质粒

图 2 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 重组质粒电泳图

Fig.2 Analysis of recombinant vector pcDNA3.1(+)-*MTERF1*

2.3 重组质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 的鉴定

重组表达载体 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 的 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示在 1 200 bp 处可见一条特异性的目的条带。提取纯化的重组表达载体 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳检测可见大小约为 5 428 bp 的载体条带与 1 200 bp 的目的条带两个片段。空载体 pcDNA3.1(+)经双酶切后, 仅见一条 5 428 bp 的载体条带 (图 3)。酶切结果鉴定正确的重组子进行 DNA 序列分析鉴定, 测序结果与 GenBank 检索到的编码序列 (NM_015942.4) 完全一致 (图 4)。



注: M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR 产物; 2: 重组载体双酶切; 3: pcDNA3.1(+)空载体双酶切

图 3 重组质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 的 PCR 鉴定和双酶切鉴定图

Fig.3 PCR of *MTERF1* and double-enzyme digestion of pcDNA3.1(+)-*MTERF1*

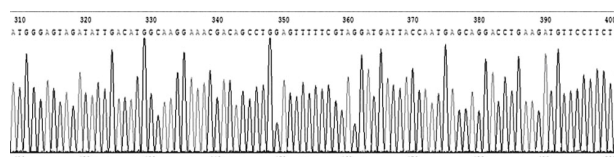


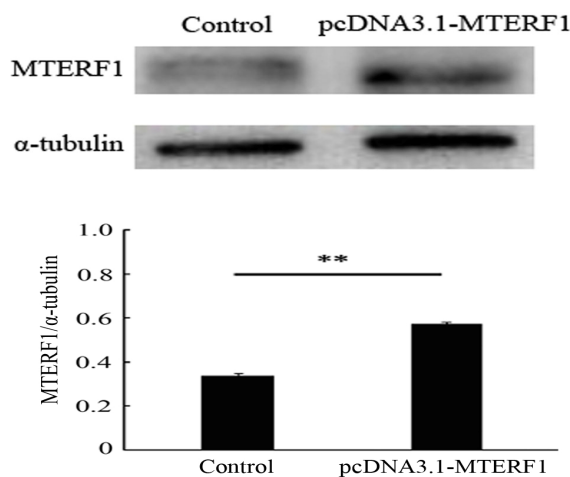
图 4 重组质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 测序验证 (部分结果)

Fig.4 Test of recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-*MTERF1* by DNA sequencing

2.4 重组质粒在 C-33A 细胞中的表达

通过脂质体介导的基因转染方法, 分别将构建的重组质粒 pcDNA3.1(+)-*MTERF1* 和空质粒 pcDNA3.1(+)转染 C-33A 细胞, 使用兔抗人 *MTERF1* 多克隆抗体进行蛋白质免疫印迹检测。利用 Photoshop 图像处理软件和 SPSS21.0 统计软

件对条带灰度值进行分析,结果显示:在转染了真核表达载体 pcDNA3.1(+)-MTERF1 的 C-33A 细胞内, MTERF1 蛋白的表达水平显著高于转染 pcDNA3.1(+)空质粒的 C-33A 细胞(图 5)。提示真核表达载体 pcDNA3.1(+)-MTERF1 已经成功地构建,并能在 C-33A 细胞中正确的表达 MTERF1 蛋白。



注: MTERF1: pcDNA3.1(+)-MTERF1 载体; 空白对照: pcDNA3.1(+) 载体; **表示存在显著性差异 $P < 0.01$ 。

图 5 Western blot 检测 pcDNA3.1(+)-MTERF1 在 C-33A 细胞中的表达

Fig.5 Efficiency of pcDNA3.1(+)-MTERF1 detected by Western blot in C-33A cells

3 讨论

线粒体转录终止因子蛋白家族的成员有 2 个显著的特征,即定位于线粒体和存在不定重复数的 MTERF 结构域^[9]。其中, MTERF1 蛋白是 MTERF 蛋白家族中发现最早的蛋白质, Kruse 等首次是人类细胞中分离纯化到 1 个促进 mtDNA 转录终止的 DNA 结合蛋白质,该蛋白质与 mtDNA 上 16S rRNA 基因和 tRNA 基因分界处的 28 bp 序列(即线粒体 DNA 转录终止位点)特异结合,从而提前终止重链的转录^[10]。近年的研究显示,哺乳动物 MTERF1 除了与 mtDNA 的转录终止位点特异结合外,同时还与 mtDNA 重链上基因转录启动子 1 (heavy strand promoter 1, HSP1) 结合,进而在 2 个结合位点之间形成一个 rDNA 环的转录单元^[11]。因此, MTERF1 蛋白控制了 mtDNA 上 HSP1 到 16S rRNA 的转录,产生

1 个 mtDNA-loop,有助于促进转录因子的重复利用和转录的反复进行,提高转录速度,导致上游基因的转录水平较下游基因的转录水平高出 30~50 倍,同时也更加容易促进转录起始^[12]。

Hwarinen 等研究发现,在人胚肾 293T 细胞内过表达 MTERF1 基因,将抑制 mtDNA 的复制水平,降低 mtDNA 拷贝数,并在协调 mtDNA 的复制和转录中发挥作用^[13]。近年来的研究还发现,在多种恶性肿瘤中 mtDNA 含量和线粒体呼吸链酶活性降低,这提示肿瘤中参与线粒体基因表达调控的蛋白因子可能存在着表达异常^[14-15]。但人 MTERF1 基因在恶性肿瘤细胞发生发展中的具体作用及其分子机制仍不明确。

本实验中选择的真核表达载体 pcDNA3.1(+) 比病毒载体安全性更高,载体上含有多克隆位点,便于目的基因插入至载体。同时,载体上含有氨苄青霉素抗性和新霉素抗性标记使得重组质粒易于筛选,且构建好的重组真核表达载体能够稳定在宿主细胞内复制和高效表达^[16]。目前,国内外尚未见 MTERF1 基因真核表达的构建及其在 C-33A 细胞中的表达情况的报道,本研究成功地克隆出 MTERF1 基因,将其插入到 pcDNA3.1(+) 载体的 CMV 启动子下游,成功构建了高表达人 MTERF1 蛋白的真核表达载体,为研究 MTERF1 的功能提供了必要条件。

此外,我们通过脂质体法将重组真核表达载体转染入子宫颈癌 C-33A 细胞株,通过 Western blot 的方法检测到 MTERF1 基因蛋白水平的过度表达,为下一步构建稳定表达的细胞系打下基础。总之,人 MTERF1 表达载体的构建及其表达分析不仅为下一步纯化获得靶蛋白提供可能,也为进一步探讨人 MTERF1 的表达调控对子宫颈癌发生发展的影响奠定了基础。

参考文献:

- [1] 余敏,伍红,谭德勇. 线粒体转录终止因子蛋白家族研究进展[J]. 生命科学, 2007, 19(5): 496-499.
- [2] Roberti M, Polosa P L, Bruni F, et al. The MTERF family proteins: mitochondrial transcription regulators and beyond[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787(5): 303-311.

- [3] 熊伟,余敏,左绍远. 线粒体转录终止因子蛋白家族在线粒体基因表达中的调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(3): 223-231.
- [4] Roberti M, Polosa P L, Bruni F, et al. MTERF factors: a multifunction protein family[J]. *BioMol Concepts*, 2010, 1(2): 215-224.
- [5] 黄淑颜,丘式浚,陈家逸,等. 线粒体转录终止因子(mTERF)蛋白家族的研究进展[J]. 生命科学研究, 2016, 20(5): 455-459.
- [6] 杨勇琴,孙美涛,李月,等. 基于生物信息学分析人类线粒体转录终止因子 1 基因启动子[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(4): 348-352.
- [7] Chen G, Dai J, Tan S, et al. MTERF1 regulates the oxidative phosphorylation activity and cell proliferation in C-33A cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2014, 46(6): 512-521.
- [8] Daga A, Micol V, Hess D, et al. Molecular characterization of the transcription termination factor from human mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(11): 8123-8130.
- [9] Kruse B, Narasimhan N, Attardi G. Termination of transcription in human mitochondria: Identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination[J]. *Cell*, 1989, 58(2): 391-397.
- [10] Fernandez-Silva P, Martinez-Azorin F, Micol V, et al. The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interaction[J]. *EMBO J*, 1997, 16(5): 1066-1079.
- [11] Matrin M, Cho J, Cesare A J, et al. Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis[J]. *Cell*, 2005, 123(7): 1227-1240.
- [12] Hwarinen A K, Kumanto M K, Marjavaara S K, et al. Effect on mitochondrial transcription of manipulating mTERF protein levels in cultured human HEK293 cells[J]. *BMC Mol Biol*, 2010, 11(9): 72-78.
- [13] 李海霞, 张淑兰. 线粒体 DNA 在妇科恶性肿瘤中的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2009, 36(1): 53-56.
- [14] 韩铮波, 李凡, 杨雪飞, 等. 胃癌线粒体 DNA 拷贝量的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(2): 258-261.
- [15] 蔡翠霞, 刘心蕊, 王涵多, 等. SUSD2 基因真核表达载体的构建及其在 H322 细胞中的表达[J]. 生物技术, 2016, 26(5): 421-425.