

## 小鼠 Gtf2h2 基因的克隆及其在真核细胞中的表达

张心悦,杨光平,时兰英,苏友强\*

(南京医科大学生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:克隆小鼠 Gtf2h2 基因并使其在真核细胞 HEK293 中稳定表达。方法:采用小鼠卵母细胞 cDNA 为模板,经 PCR 扩增 Gtf2h2 后,利用新型 In-Fusion 分子克隆体系将该目的片段克隆至真核表达载体 pCMV6-AC-3DDK 和 pCMV6-AN-mKate 中。所得阳性克隆的质粒 DNA 在经限制性酶切电泳和测序鉴定克隆成功后,转染到 HEK293 细胞中进行表达。表达效果利用抗 DDK 和 mKate 标签的抗体通过免疫荧光以 Western blot 的方法进行检测。结果:质粒 DNA 测序和酶切鉴定证明 Gtf2h2 基因克隆成功;Western blot 检测到 GTF2H2-3DDK 和 GTF2H2-mKate 融合蛋白在转染后的 HEK293 细胞内的表达;免疫荧光显示融合蛋白在转染后的 HEK293 细胞核内定位并呈颗粒状分布。结论:成功克隆了小鼠 Gtf2h2 基因并实现了其在真核细胞 HEK293 中的稳定表达,为进一步研究其功能和作用机制奠定了基础。

**[关键词]** 转录因子;Gtf2h2;In-Fusion 克隆;HEK293

**[中图分类号]** Q785

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)08-1049-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150801

## Mouse Gtf2h2 gene cloning and expression in eukaryotic cells

Zhang Xinyue, Yang Guangping, Shi Lanying, Su Youqiang\*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** Objective: To clone mouse gene Gtf2h2 and have it stably expressed in HEK293 cells. **Methods:** Gtf2h2 was amplified by PCR using mouse oocyte cDNA as template, and was cloned into the eukaryotic cell-expression vector pCMV6-AC-3DDK and pCMV6-AN-mKate using the advanced In-Fusion cloning system. After verification by restriction digestion followed by electrophoresis and sequencing, the correctly cloned plasmid DNA was transfected into HEK 293 cells. The expression of GTF2H2-3DDK and GTF2H2-mKate fusion protein was detected by both immunofluorescence and Western blot using the antibodies of DDK and mKate tag proteins. **Results:** The correct cloning of Gtf2h2 was confirmed by restriction digestion and sequencing, and the expression of GTF2H2-3DDK and GTF2H2-mKate fusion protein was detected by Western blot. GTF2H2 fusion protein was detected in the nucleus in a punctate manner. **Conclusion:** Mouse Gtf2h2 gene was successfully cloned and expressed in HEK293 cells, which lays solid foundation for further studies of its functional roles and mechanisms.

**[Key words]** transcriptional factor; Gtf2h2; In-Fusion cloning; HEK293

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1049-1054]

TFIIH 是一个含有多个亚基的转录起始因子,前期研究发现它在通用转录和 DNA 损伤后核苷酸剪切修复(nucleotide excitation repair, NER)过程中具有不可替代的作用<sup>[1]</sup>。哺乳动物中 TFIIH 亚基组成可分为:核心部分(core)、剪切修复互补群 2

(ERCC2/XPD)和周期蛋白依赖性蛋白激酶激活激酶(CDK-activating kinase, CAK)模块<sup>[2]</sup>。其中核心部分包含剪切修复互补群 3(ERCC3/XPB)、5 个通用转录因子(GTF2H1/p62、GTF2H4/p52、GTF2H2/p44、GTF2H3/p34、GTF2H5/p8/TTDA);CAK 包含 CDK7、cyclin H 和 MAT1,而 XPD 起着连接 core 和 CAK 的桥梁作用<sup>[3]</sup>。

众多临床病症及研究数据显示 TFIIH 及其他 NER 因子与许多重要的人类遗传性疾病密切相关。当亚基 XPB、XPD 及 p8 的编码基因发生突变时会引

**[基金项目]** 国家重大科学研究计划项目(2014CB943200, 2013CB945500);国家自然科学基金面上项目(31471351)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: youqiang.su@njmu.edu.cn

发以下3种特殊常染色体遗传疾病:着色性干皮病(XP)、科凯恩综合征(CS)、毛发硫营养不良(TTD)<sup>[4-8]</sup>,并且TTD患者通常伴随不育<sup>[9-11]</sup>。然而,TFIIH的组成亚基在生殖方面起着什么样的作用尚不清楚。为了研究TFIIH亚基GTF2H2在调节女性生殖过程中的作用及机制,本研究构建了表达带有3DDK小分子和mKate荧光蛋白标签的GTF2H2融合蛋白的重组质粒,并对其在真核细胞HEK293中的表达和定位进行了研究。在构建重组质粒过程中,还就常规的双酶切克隆技术与新兴的“In-Fusion”克隆技术进行了比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

所有实验使用的SPF级ICR小鼠由南京医科大学实验动物中心提供。小鼠饲养环境温度恒定在20~22℃,光照周期为12 h/12 h白昼/黑夜循环,湿度为50%~70%,食物自由摄取。均使用22~24日龄(体重11~12 g)雌性小鼠。人胚胎肾细胞(HEK293)由本实验室提供。孕马血清(PMSG,宁波第二激素厂),Q5热启动超保真DNA聚合酶、*Mlu* I、*Asi* S I (New England Biolabs公司,美国),pCMV6-AC-3DDK、pCMV6-AN-mKate、快速连接试剂盒、Megatran 1.0 (Origene公司,美国),cDNA Synthesis Kit(ProtoScript公司,美国),琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒(Qiagen公司,德国),In-Fusion试剂盒(Clontech公司,美国),大肠杆菌TOP10(北京天根生化科技有限公司),氨苄青霉素(北京索莱宝科技有限公司),MEM $\alpha$ 、胎牛血清(FBS)(Gibco公司,美国),鼠抗DDK抗体(Sigma公司,美国),兔抗Tubulin抗体(Santa Cruz公司,美国),Glutamine、Penicillin、Streptomycin、EDTA、鼠抗Tubulin抗体(Sigma公司,美国),兔抗mKate抗体、抗淬灭剂(Antifade)(Life公司,美国),RIPA buffer(Thermo公司,美国),鼠抗GTF2H2蛋白多克隆抗体(Abcam公司,英国),Alexa Fluor-488标记驴抗兔IgG、驴抗鼠IgG及Alexa Fluor-594标记驴抗兔IgG、驴抗鼠IgG(Invitrogen公司,美国),山羊抗鼠IgG二抗(Thermo公司,美国),化学发光显色(Thermo公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 未成熟卵母细胞的收集

20~22日龄雌性ICR小鼠注射5 U PMSG,44~46 h后,利用连在1 mL注射器上的针头小心将卵巢表面可见明显凸起的有腔卵泡戳破,轻轻挤压至

卵泡中卵丘卵母细胞复合体(cumulus-oocyte cell complexes, COCs)排出。将COCs收集起来,并利用直径略窄于卵母细胞直径的吸管反复吹打,直至将卵丘细胞完全去除。最终只收集具有完整生发泡且没有明显受损迹象的卵母细胞。

#### 1.2.2 小鼠Gtf2h2基因的获取

为了获得基因组cDNA,从ICR雌鼠体内取得的卵母细胞中提取RNA,并将其反转录成为cDNA。之后,以此cDNA作为模板利用Q5热启动超保真DNA聚合酶进行PCR扩增。一方面,针对小鼠Gtf2h2基因,设计带有酶切位点的编码区上下游引物通过PCR获取。根据pCMV6-AC-3DDK、pCMV6-AN-mKate多克隆位点及目的基因本身要求,选择5'端为*Asi* S I、3'端为*Mlu* I酶切位点的引物设计。Gtf2h2的PCR扩增引物为:上游5'-GAGGCG-ATCGCCATGGATGAACCTGAGAGAAC-3',下游5'-GCCAGCGGTTTAAATACCTGAAGGAGTTGGGAT3',下划线为酶切位点。另一方面,依据In-Fusion技术的引物设计原理——同源重组原理设计如下,In-Fusion引物:mKate:上游5'-TCCGGACTCAGAGCGA-TCCGCATGGATGAAGAACCTGAGAGAAC-3',下游5'-CGCCCGCTTAAACGCGTTTAAATACCTGAAGGAG-TTGGAT-3';DDK:上游5'-AGATCTGCCGCCGCGA-TCCGCATGGATGAAGAACCTGAGAGAAC-3',下游5'-GCCGCCGCGTACGCGTAATACCTGAAGGAGTTGG-GAT-3'。

#### 1.2.3 含有Gtf2h2基因的重组质粒的构建

传统方法克隆时,先将pCMV6-AC-3DDK、pCMV6-AN-mKate载体DNA和Gtf2h2的PCR产物用*Mlu* I和*Asi* S I双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收(所得片段大小分别为6 000 bp、6 600 bp和1 188 bp),利用快速连接试剂盒连接。In-Fusion方法克隆时,扩增出的Gtf2h2片段直接与回收的线性化质粒利用In-Fusion试剂盒连接。连接后的DNA转化入大肠杆菌TOP10并铺在氨苄霉素抗性琼脂平板生长。之后挑取单个阳性克隆,摇菌并提取质粒。所获质粒DNA在经酶切和电泳初步鉴定后,最终进行测序验证。克隆成功的质粒分别命名为pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2、pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2。

#### 1.2.4 HEK293细胞培养及转染

HEK293细胞培养在MEM $\alpha$ (含有10% FBS、146 mg/mL glutamine,63.2 mg/mL青霉素和50 mg/mL链霉素)培养液中,在细胞生长密度至约80%时,根据Megatran1.0试剂盒操作步骤将重

组质粒转染进细胞,同时设空载转染和未转染细胞作为对照。

### 1.2.5 Western blot 检测 GTF2H2 融合蛋白在 HEK293 细胞中的表达

HEK293 细胞在转染后 24 h 经 PBS 漂洗 2 次后,于 RIPA buffer 中裂解提取蛋白。SDS-PAGE 分离,转膜,于 5%脱脂奶粉溶液中 1:500 稀释鼠抗 GTF2H2 蛋白的多克隆抗体,4℃摇床孵育过夜。次日用 TBS(含 0.1% Tween)洗去未结合一抗,1:5 000 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠 IgG,室温孵育 1 h。最后经 TBS(含 0.1% Tween)洗 3 次,每次 15 min,随后于化学发光显色液中浸泡 5 min 后,检测信号并拍照。实验重复 3 次。

### 1.2.6 免疫荧光检测重组质粒表达与定位

HEK293 细胞转染 24 h 后,2%多聚甲醛溶液中固定 30 min,细胞洗涤液(10 μL FBS 溶于 10 mL PBS)中洗涤 15 min,再于氯化铵溶液(0.03 g NH<sub>4</sub>Cl、10 μL FBS 溶于 10 mL PBS)浸泡 15 min,透膜封闭液(10 μL Triton X-100、1 mL FBS 溶于 9 mL PBS)中浸泡 15 min(以上步骤均在室温进行),最后按如下设计在一抗溶液中于 4℃孵育过夜:pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 转染的细胞:一抗分别为 1:200 的鼠抗 DDK 抗体和 1:400 的兔抗 Tubulin 抗体;pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 转染的细胞:一抗分别为 1:1 000 兔抗 mKate 抗体和 1:400 的兔抗 Tubulin 抗体。抗体稀释液为含 5% FBS 的 PBS。次日,PBS(10% FBS)洗涤 3 次,每次 15 min,对应于一抗的荧光标记的二抗(1:1 000 的 Alexa Fluor-488 标记驴抗兔 IgG、驴抗鼠 IgG 及 Alexa Fluor-594 标记驴抗兔 IgG、驴抗鼠 IgG)溶液中 37℃孵育 3 h(以下步骤均严格避光,以防荧光淬灭)。最后 PBS(10% FBS)中洗涤 3 次,每次 15 min,利用 Antifade(含 DAPI)封片,在 Zeiss Axio Vert A1 荧光显微镜下观察并用 ZEN 2014 软件拍照。

## 2 结果

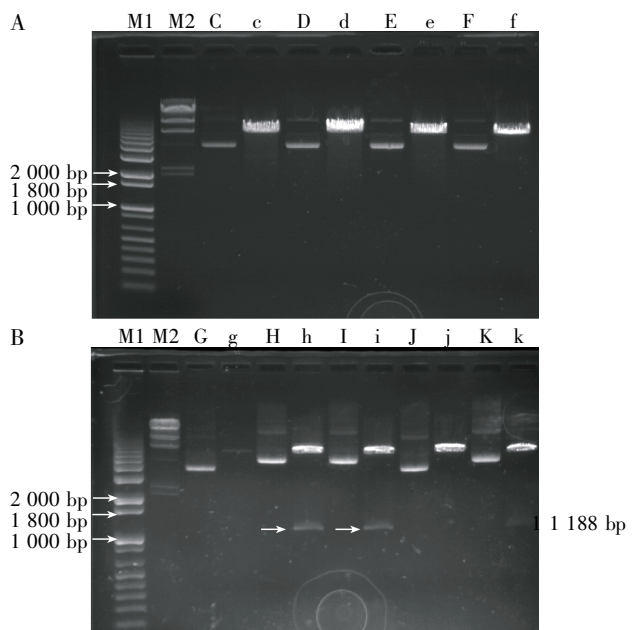
### 2.1 Gtf2h2 目的基因的克隆

为了构建能够表达 GTF2H2-3DDK 和 GTF2H2-mKate 融合蛋白的质粒,先后采用了酶切-连接克隆和 In-Fusion 克隆方法。将克隆结果进行对比发现,平均每次连接步骤中,酶切-连接法克隆成功率约为 10%,而 In-Fusion 法克隆成功率高达 57%,两者比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

### 2.2 重组质粒 pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2、pCMV6-

### AN-mKate-Gtf2h2 的鉴定及测序

重组质粒 pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 在经 *Asi*S I 和 *Mlu* I 双酶切后,0.8%的琼脂糖电泳检测到大小为 6 000 bp 和 1 188 bp 的 2 个条带,它们分别属于线性化后的 pCMV6-AC-3DDK 载体 DNA 和 Gtf2h2-ORF 的 DNA;而对照空载体只出现 6 000 bp 大小的线性载体条带(图 1),说明重组质粒构建正确。同样 pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 重组质粒在经 *Asi*S I 和 *Mlu* I 双酶切后,0.8%的琼脂糖电泳检测到大小为 6 600 bp 和 1 188 bp 的 2 个条带,它们分别属于线性化后的 pCMV6-AN-mKate 载体 DNA 和 Gtf2h2-ORF 的 DNA;而对照空载体只出现 6 600 bp 大小的线性载体条带(图 1),说明该质粒也构建正确。2 种重组质粒中 Gtf2h2 基因测序结果与 GenBank 上登录序列完全一致(图 2)。



M1、M2:分别为 1 kb、23 kb DNA ladder,可见 M2 条带从下至顶各条带大小依次为:2 027、2 322、4 361、6 557、9 416、23 000 bp。Gtf2h2 为 1 188 bp;C、G:空质粒未经酶切样品;c、g:空质粒酶切样品;D、E、F、H、I、J、K:连接后质粒未经酶切样品;d、e、f、h、i、j、k:连接后质粒酶切样品。

图 1 *Asi*S I、*Mlu* I 酶切鉴定酶切-连接技术(A)和 In-Fusion 技术(B)构建的部分重组质粒

Figure 1 Verification of the plasmids constructed using the digestion-ligation(A) and the In-Fusion(B) methods by restriction digestion with *Asi*S I and *Mlu* I

### 2.3 Western blot 法鉴定 GTF2H2-3DDK 和 GTF2H2-mKate 融合蛋白在 HEK293 细胞中的表达

分别取 pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2、pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 重组质粒转染后 48 h 的 HEK293 细

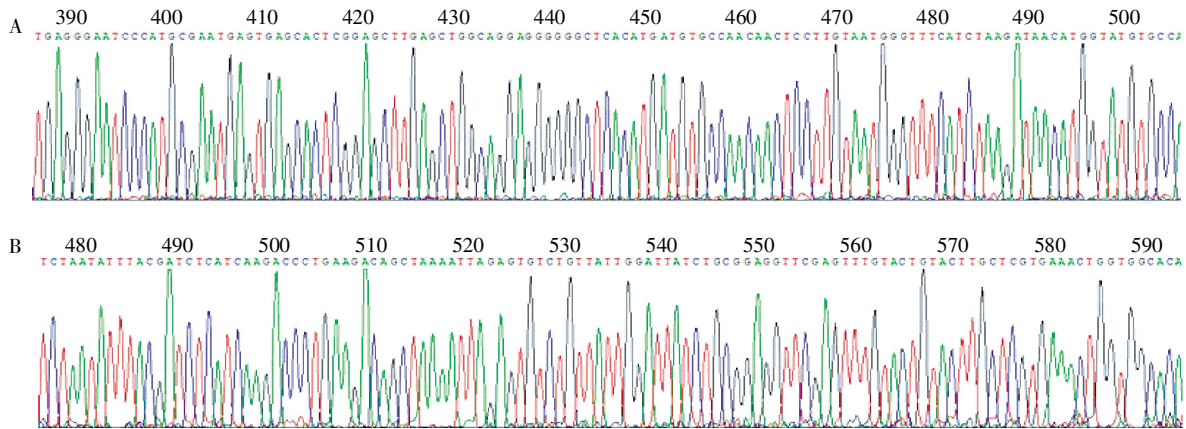


图 2 重组质粒 pCMV-AC-3DDK-Gtf2h2 (A)、pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 (B) 部分测序结果

Figure 2 Parts of the sequencing result of pCMV-AC-3DDK-Gtf2h2 (A) and pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 (B)

胞提取蛋白，分别利用抗 DDK 和 mKate 标签蛋白以及 GTF2H2 的抗体通过 Western blot 的方法检测 GTF2H2-3DDK、GTF2H2-mKate 融合蛋白以及内源性 GTF2H2 蛋白的表达。如图 3 所示，抗 DDK 和 mKate 标签蛋白的抗体分别只在转染 pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 和 pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 重组质粒的细胞样品中检测到对应的融合蛋白，而在空载体转染的样品组中未检测到信号（已知 GTF2H2、DDK 及 mKate 蛋白的分子量分别为 44 000、2 900 和 30 000）；而抗 GTF2H2 的抗体在不同的样品中则检测到大小不同的蛋白表达，分别为：空载体转染的样品组为 44 000、pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 转染组为 46 900、pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 转染组为 74 000。

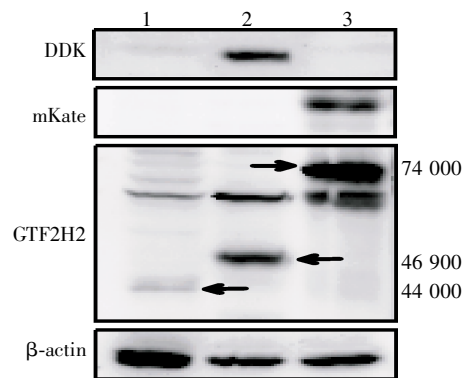
### 2.4 免疫荧光检测重组质粒定位

免疫荧光显示转染后 24 h 即可见标签蛋白的表达，并且融合蛋白在转染后的 HEK293 细胞核内定位并呈颗粒状分布(图 4)，这与 TFIIF 作为转录因子的功能相一致；而在少数处于分裂时期的细胞中，标签蛋白与 Tubulin 共定位，提示 GTF2H2 可能参与细胞周期调控以及纺锤体的组装。

## 3 讨论

重组 DNA 的构建是分子生物学领域的常用技术，质粒构建的成功与否直接影响到后续实验工作的开展。传统的“酶切-连接”技术及平滑末端克隆技术等因其可保证插入外源片的方向，并且可以防止载体自连的优势在很长一段时间被广泛采用。但是，随着科技日益进步和对实验技术的精益求精，传统克隆技术逐渐显现出连接效率低、耗时较长并且需要特定限制性酶切位点等急需改进的缺点。

最近备受欢迎的革新技术——In-Fusion 技术



1: 经空质粒转染的 HEK293; 2: 经 pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 质粒转染的 HEK293; 3: 经 pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 质粒转染的 HEK293。

图 3 Western blot 检测 pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 质粒和 pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 质粒在 HEK293 细胞中表达

Figure 3 Western blot analysis shows the expression of pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 and pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 in HEK293 cells

能够快速、准确地整合 DNA 片段。扩增的 DNA 片段和线性化载体通过两端的 15 bp 同源序列进行识别、连接，而非特定限制性酶切位点。此 15 bp 同源序列可通过引物设计添加至特定 DNA 片段两端，引物设计原则为：一方面，引物的 5' 末端必须包含与载体末端相同的 15 个碱基序列；另一方面，引物的 3' 末端必须包含与目的基因片段相互补的特异碱基序列。之后，只需将纯化后的目的片段和线性化载体与配套的预混合酶试剂混合即可。

在本研究中特地选择 In-Fusion 技术与酶切-连接技术进行比较。研究结果证明：相较于酶切-连接技术，In-Fusion 克隆方法不仅克隆成功率高，而且操作简便、省时省力。其具体优势主要体现在如下几点：①只要载体末端和插入片段具有 15 bp 同源碱基，In-Fusion 技术就可以将任意 PCR 片段插入任意



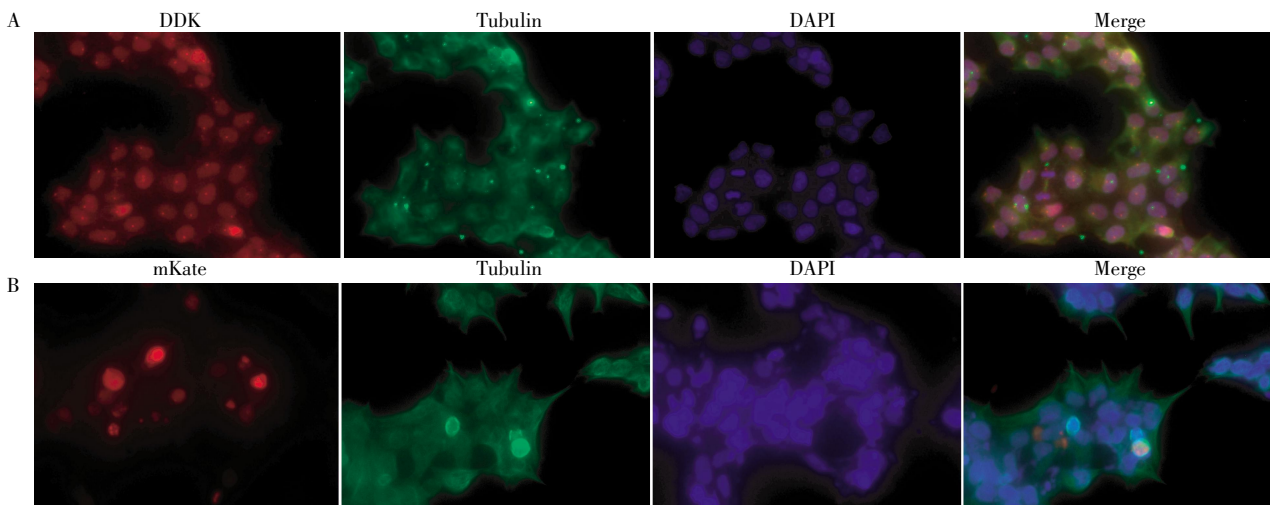


图 4 免疫荧光检测经 pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 质粒转染(A)和经 pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2 质粒转染(B)后 24 h HEK293 细胞中 GTF2H2 的定位( $\times 400$ )

Figure 4 Detection of the localization of GTF2H2 in HEK293 cells 24 h after transfection with pCMV6-AC-3DDK-Gtf2h2 (A) and pCMV6-AN-mKate-Gtf2h2(B) plasmids by immunofluorescence( $\times 400$ )

线性化载体中,不受载体类型和来源的限制;②In-Fusion 技术不受限制性酶切位点的限制,因此在目的片段及使用的载体中即使不存在合适的酶切位点并不会妨碍克隆,极大地拓宽了载体的可选择范围;③In-Fusion 技术能够在一次反应中同时克隆多个片段,无需进行亚克隆;④In-Fusion 技术能够高效克隆 0.05~15.00 kb DNA 片段,很大程度上解决了传统克隆方法对于大片段克隆效率较低的问题;⑤In-Fusion 技术是基因定向克隆技术,因此无需进行目的基因片段正确插入的克隆的筛选;⑥In-Fusion 技术是无缝克隆,不会附加任何多余碱基序列。此外,In-Fusion 技术已经成功用于多项高通量克隆工程,改善了中型和大规模克隆工程难实行的情况。

上世纪 80 年代后期,研究人员从酵母菌分离出来一个通用转录因子(general transcription factor- $\delta$ <sup>[12]</sup>/basic transcription factor 2<sup>[13]</sup>),因其在细胞转录过程中有至关重要的作用而将其最终被命名为 GTFIIH。该蛋白因包含 2 个与 DNA 修复相关的蛋白(XPB、XPD)<sup>[1,14]</sup>而被证实与 DNA 损伤修复过程相关<sup>[15]</sup>。此后众多研究发现在哺乳动物细胞中,GTFIIH 不仅是一个必须的通用转录因子和重要的 DNA 损伤修复蛋白,也是一个细胞周期调控因子。其某些组成亚基(诸如 XPB 和 XPD)突变会导致着色性干皮病、利凯恩综合征和毛发硫营养不良等严重人类临床疾病<sup>[2]</sup>。

已有研究表明,核苷酸剪切修复因子编码基因参与生殖细胞的发育过程<sup>[16]</sup>,而 GTF2H2 在女性生殖过程中的作用,特别是和卵母细胞之间的关系尚

未明确。此外,研究表明 GTF2H2 与 XPD 的羧基端相作用<sup>[17-18]</sup>,因此本文推测 GTF2H2 可能通过影响基因组完整性从而影响卵母细胞的发育。本实验采用新型的 In-Fusion 克隆技术,成功构建含有 Gtf2h2 及标签蛋白(DDK、mKate)编码基因的重组质粒,并且转染重组质粒后的 HEK293 细胞能同时表达 GTF2H2 与标签蛋白(DDK、mKate)。这些都为进一步研究 GTF2H2 在卵母细胞生长过程中的作用机制奠定了基础,有助于更深入地了解卵母细胞发育缺陷的原因,为诊断卵母细胞质量和治疗不孕不育提供理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Singh A,Compe E,Le May N,et al. TFIIF subunit alterations causing xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy specifically disturb several steps during transcription[J]. Am J Hum Genet,2015,96(2): 194-207
- [2] Badjatia N,Nguyen TN,Lee JH,et al. Trypanosoma brucei harbours a divergent XPB helicase paralogue that is specialized in nucleotide excision repair and conserved among kinetoplastid organisms[J]. Mol Microbiol,2013,90(6): 1293-1308
- [3] Compe E,Egly JM. TFIIF:when transcription met DNA repair[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2012,13(6): 343-354
- [4] Nonnekens J,Perez-Fernandez J,Theil AF,et al. Mutations in TFIIF causing trichothiodystrophy are responsible for defects in ribosomal RNA production and processing[J]. Hum Mol Genet,2013,22(14): 2881-2893
- [5] Stettler K,Li X,Sandrock B,et al. A Drosophila XPD

- model links cell cycle coordination with neurodevelopment and suggests links to cancer[J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(1):81-91
- [6] Li G, Liu J, Abu-Asab M, et al. XPB induces C1D expression to counteract UV-induced apoptosis[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(6): 885-895
- [7] Hashimoto S, Egly JM. Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(R2): R224-230
- [8] Sethi M, Lehmann AR, Fawcett H, et al. Patients with xeroderma pigmentosum complementation groups C, E and V do not have abnormal sunburn reactions[J]. *Br J Dermatol*, 2013, 169(6): 1279-1287
- [9] Scott RJ, Itin P, Kleijer WJ, et al. Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex in two patients; absence of skin tumors despite severe deficiency of DNA excision repair [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1993, 29(5 Pt 2): 883-888
- [10] Orioli D, Compe E, Nardo T, et al. XPD mutations in trichothiodystrophy hamper collagen VI expression and reveal a role of TFIIH in transcription derepression [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(6): 1061-1073
- [11] Arseni L, Lanzafame M, Compe E, et al. TFIIH-dependent MMP-1 overexpression in trichothiodystrophy leads to extracellular matrix alterations in patient skin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(5): 1499-1504
- [12] Itin PH, Sarasin A, Pittelkow MR. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2001, 44(6): 891-920
- [13] Cleaver JE. Splitting hairs—discovery of a new DNA repair and transcription factor for the human disease trichothiodystrophy [J]. *DNA Repair*, 2005, 4(2): 285-287
- [14] Fishburn J, Tomko E, Galburt E, et al. Double-stranded DNA translocase activity of transcription factor TFIIH and the mechanism of RNA polymerase II open complex formation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(13): 3961-3966
- [15] Abdulrahman W, Iltis I, Radu L, et al. ARCH domain of XPD, an anchoring platform for CAK that conditions TFIIH DNA repair and transcription activities [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(8): E633-642
- [16] Gu A, Ji G, Zhou Y, et al. Polymorphisms of nucleotide excision repair genes may contribute to sperm DNA fragmentation and male infertility [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(5): 602-609
- [17] Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, et al. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor [J]. *EMBO J*, 1994, 13(10): 2388-2392
- [18] Kuper J, Braun C, Elias A, et al. In TFIIH, XPD helicase is exclusively devoted to DNA repair [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(9): e1001954

[收稿日期] 2015-01-23

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆  
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
审理情况。