

Marf1 基因的克隆及其在真核细胞中的表达

张小云,曹广义,殷虹,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 211166)

[摘要] 目的:克隆小鼠的 Marf1 基因并使其在真核细胞 HEK293T 中异位表达,以研究 MARF1 蛋白在细胞中的表达和定位。方法:运用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)扩增并获得 Marf1 基因编码序列,再利用新型分子克隆体系 In-Fusion 将该目的片段克隆至 pCMV6-AC-3DDK 和 pCMV6-AN-mKate 两个真核表达载体中,由此所得融合质粒经限制性内切酶酶切电泳和测序筛选鉴定,将所得到的阳性质粒转染到 HEK293T 细胞中进行表达,然后利用 DDK 和 mKate 标签抗体通过 Western blot 或免疫荧光的方法检测目的蛋白 MARF1 的表达和定位。结果:DNA 测序鉴定证明 Marf1 基因克隆成功;Western blot 检测到 MARF1-3DDK 和 MARF1-mKate 融合蛋白在转染的 HEK293T 细胞内的表达;免疫荧光显示融合蛋白在转染后的 HEK293T 细胞质呈颗粒状分布,并与纺锤体共定位。结论:成功克隆了小鼠 Marf1 基因并实现了其在真核细胞 HEK293T 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] Marf1;In-Fusion 克隆;HEK293T

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-818-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170707

Cloning of Marf1 gene and its expression in eukaryotic cells

Zhang Xiaoyun, Cao Guangyi, Ying Hong, Shi Lanying, Su Youqiang*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To clone mouse Marf1 gene and let it ectopically express in HEK293T cells, for studying its expression and mechanism. **Methods:** Marf1 coding sequence was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 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 HEK293T cells. The expression of MARF1-3DDK and MARF1-mKate fusion protein in the transfected HEK293T cells was assessed by both Western blot and immunofluorescence using the antibodies against DDK and mKate tag proteins. **Results:** The correct cloning of Marf1 was confirmed by restriction digestion and sequencing, and the expression of MARF1-3DDK and MARF1-mKate fusion protein was detected by Western blot. MARF1 fusion protein was detected to be localized either in the cytoplasm in a punctate manner or on the mitotic spindles. **Conclusion:** Mouse Marf1 gene was successfully cloned and expressed in HEK293T cells, which lays solid foundation for further studies on its functions and the related mechanisms.

[Key words] Marf1; In-Fusion cloning; HEK293T

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07):818-822]

卵子质量的优劣决定着女性的生育能力,是优生优育的关键。卵子的质量在很大程度上取决于卵母细胞能否正常恢复和完成减数分裂,能否正常受

[基金项目] 国家重大科学研究计划(2014CB943200, 2013CB945500);国家自然科学基金面上项目(31471351, 31271538);江苏省自然科学基金(BK20140061)

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

精并支持胚胎发育,以及能否维持其基因组的完整性。本课题组在前期研究中发现并命名了一个能够调控上述与卵子质量密切相关的关键事件的全新基因——Marf1(meiosis arrest female 1)^[1-2],并发现携带该基因单位点突变和基因捕获(gene trap)突变的小鼠均表现出同样的雌性不孕而雄性正常的表型,其导致雌性不孕的直接原因是雌鼠卵母细胞不能恢复减数分裂而排出未成熟的卵。进一步研究发现

内切酶酶切电泳初步鉴定带有目的克隆片段后,再进行测序验证。克隆成功的质粒分别命名为 pCMV6-AC-Marf1-3DDK 和 pCMV6-AN-mKate-Marf1。

1.2.4 HEK293T 细胞培养及转染

HEK293T 细胞培养在 MEM α (含有 10%FBS, 63.2 mg/mL 青霉素, 50 mg/mL 链霉素和 146 mg/mL 谷氨酰胺)培养液中,培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$, 当细胞生长密度至 60%~70%时,根据 Megatran1.0 试剂盒操作步骤将重组质粒转染入细胞,同时将转染空载体和未转染细胞作为对照^[15]。

1.2.5 Western blot 检测融合蛋白的表达

转染 HEK293T 细胞 36 h 后经 PBS 漂洗 2 次,于 RIPA buffer 冰上裂解提取总蛋白并用 BCA 法测定蛋白浓度,然后用 7.5% SDS-PAGE 分离,转膜,5%脱脂奶粉封闭。1:1 000 稀释抗 DDK、抗 mKate 抗体,摇床 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,去除未结合一抗,然后用 1:5 000 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗 IgG 室温孵育 1 h。最后经 TBST 洗 3 次,每次 15 min,随后于化学发光显色液中浸泡 5 min 后拍照。实验重复 3 次。

1.2.6 免疫荧光检测重组质粒的定位

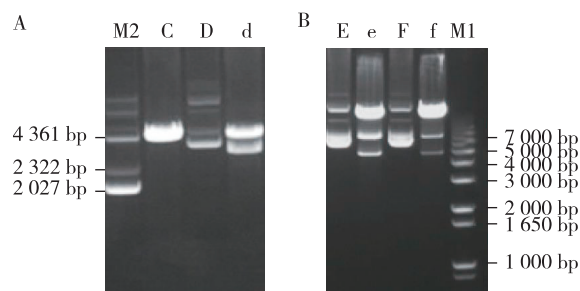
转染 HEK293T 细胞 36 h 后,4%多聚甲醛溶液室温固定 30 min,细胞洗涤液(10 mL PBS 含 10 μ L FBS)中洗 15 min,再于氯化铵溶液(10 mL PBS 含 0.03 g NH $_4$ Cl、10 μ L FBS)中浸泡 15 min,封闭液(9 mL PBS 含 10 μ L Triton X-100、1 mL FBS)中浸泡 1 h(以上步骤均在室温进行),最后用 PBS(1 mL PBS 含 50 μ L FBS) 稀释一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;pCMV6-AC-3DDK-Marf1 转染组:一抗分别为鼠抗 DDK(1:500)和 1:500 的兔抗 Tubulin 抗体;pCMV6-AN-mKate-Marf1 转染组:一抗分别为 1:500 兔抗 mKate 抗体和 1:500 的鼠抗 Tubulin 抗体。次日,用 PBS(9 mL PBS 含 1 mL FBS)洗涤 3 次,每次 15 min,对应于一抗的荧光标记二抗(1:1 000 的 Alexa Fluor-488 标记驴抗兔 IgG 和驴抗鼠 IgG 及 Alexa Fluor-594 标记驴抗兔 IgG 和驴抗鼠 IgG) 溶液中室温孵育 1.5 h (严格避光)。用 PBS(9 mL PBS 含 1 mL FBS)洗涤 3 次,每次 15 min。再用 Hoechst33342(10 μ g/mL)室温孵育 15 min,最后用 Antifade 封片,在 Zeiss AxioVert A1 观察荧光显微镜下观察并用 confocal 软件拍照。

2 结果

2.1 Marf1 的克隆与鉴定

采用新型 In-Fusion 克隆方法构建 MARF1-

3DDK 和 MARF1-mKate 融合蛋白的质粒(pCMV6-AC-Marf1-3DDK 和 pCMV6-AN-mKate-Marf1)。pCMV6-AC-Marf1-3DDK 在经 *Mlu* I 和 *Asi*S I 双酶切后,0.8%~1.0%的琼脂糖电泳检测到大小为 5 980 bp 和 4 674 bp 的 2 个条带,它们分别属于线性化后的 pCMV6-AC-3DDK 载体 DNA 和 Marf1-ORF,而对照空载体只出现 5 980 bp 大小的线性载体条带(图 1A),说明重组质粒构建正确。同样 pCMV6-AN-mKate-Marf1 重组质粒在经 *Mlu* I 和 *Asi*S I 双酶切后,琼脂糖电泳检测到大小为 6 622 bp 和 4 674 bp 的 2 个条带,它们分别属于线性化后的 pCMV6-AN-mKate 载体 DNA 和 Marf1-ORF 的 DNA;而对照空载体只出现 6 622 bp 大小的线性载体条带(图 1B),说明该质粒也构建正确。两种重组质粒中 Marf1 基因测序结果与 MGI 上序列完全一致(图 2)。



M1, M2: 分别为 1, 23 kb DNA ladder, Marf1 为 4 674 bp; C: 空质粒酶切样品; D~F: 连接后质粒未经酶切样品; d~f: 连接后质粒酶切样品。

图 1 In-Fusion 技术构建的重组质粒 pCMV6-AC-Marf1-3DDK(A)和 pCMV6AN-mKate-Marf1(B)

Figure 1 Verification eukaryotic cell-expression vector pCMV6-AC-3DDK-Marf1 (A) and pCMV6-AN-mKate-Marf1 (B) constructed using In-Fusion method

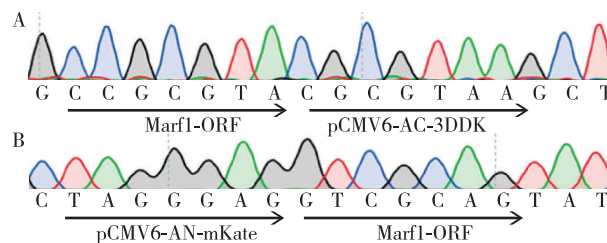


图 2 重组质粒 pCMV-AC-Marf1-3DDK (A) 和 pCMV6-AN-mKate-Marf1(B)部分测序结果

Figure 2 Parts of the sequencing results of pCMV-AC-Marf1-3DDK(A) and pCMV6-AN-mKate-Marf1(B)

2.2 融合蛋白的表达

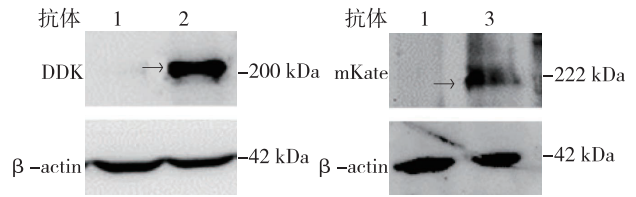
用 pCMV6-AC-Marf1-3DDK、pCMV6-AN-mKate-Marf1 重组质粒和相应的空载质粒转染入 HEK293T

细胞中 36 h 后提取蛋白,利用抗 DDK、mKate 标签的抗体通过 Western blot 检测内源性 MARF1-3DDK 以及 MARF1-mKate 融合蛋白的表达。已知 MARF1、DDK 及 mKate 蛋白的分子量分别为 192、2.9 和 30 kDa,因此 pCMV6-AC-Marf1-3DDK 转染组表达产物分子量大小为 200 kDa、pCMV6-AN-mKate-Marf1 转染组为 222 kDa(图 3)。

2.3 重组质粒在细胞中的定位

为了研究 MARF1 在体细胞中的定位,用抗 DDK 和抗 mKate 抗体间接免疫荧光显示 MARF1 与纺锤体共定位(图 4A),并且融合蛋白在转染后的 HEK293T 细胞胞质中定位,呈颗粒状分布(图 4B),荧光信号分布的特点与胞质 mRNA 处理体(p-body)很相似,这种分布在有丝分裂的间期尤为明显,而在

分裂期表达很少。



1: 经空载质粒转染的 HEK293T; 2: 经 pCMV6-AC-3DDK-Marf1 质粒转染的 HEK293T; 3: 经 pCMV6-AN-mKate-Marf1 质粒转染的 HEK293T。

图 3 Western blot 检测 MARF1-3DDK 和 mKate-MARF1 融合蛋白在 HEK293T 细胞中表达

Figure 3 Western blot analysis shows the expressions of MARF1-3DDK and mKate-MARF1 in HEK293T cells

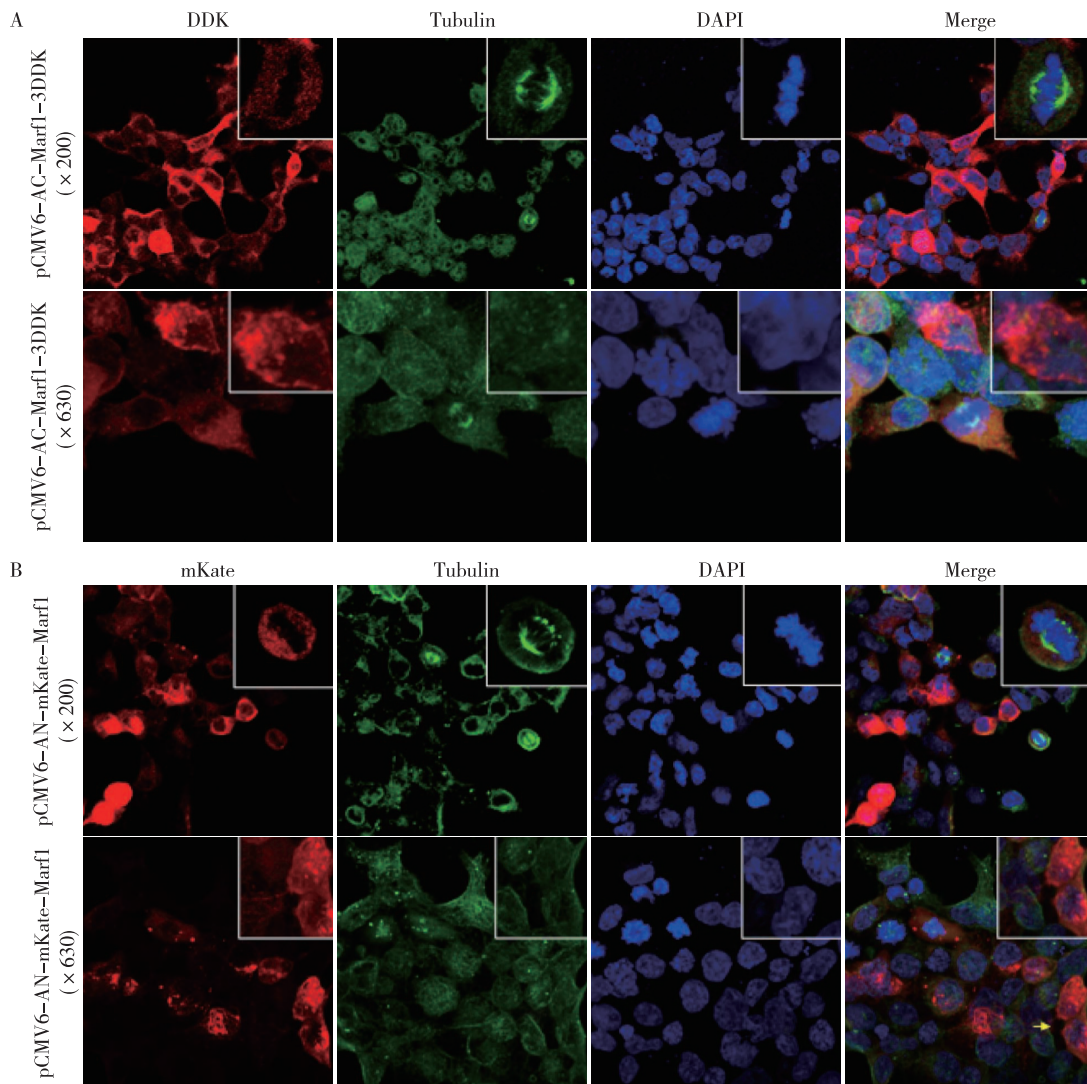


图 4 免疫荧光检测经 pCMV6-AC-Marf1-3DDK(A)和 pCMV6-AN-mKate-Marf1(B)质粒转染 36 h 后 MARF1 在 HEK293T 细胞中的定位

Figure 4 Detection of the localization of MARF1 in HEK293T cells 36 h after transfection with pCMV6-AC-Marf1-3DDK (A) and pCMV6-AN-mKate-Marf1(B) plasmids by immunofluorescence

3 讨论

Marf1 是近期首次发现并命名的一个小鼠卵母细胞内特异性表达的 Riken 基因。本实验采用新型的 In-Fusion 克隆技术,成功克隆鼠源 Marf1 基因,并且将重组质粒 DNA 转染至 HEK293T 细胞使其能成功表达带有 3DDK/mKate 标签的 MARF1 融合蛋白。通过间接免疫荧光法,本研究发现 MARF1 与纺锤体共定位,这提示 MARF1 可能参与细胞周期的调控和纺锤体的组装。

其次,在重组质粒 DNA 转染的体细胞胞质中发现颗粒状信号,这与近期报道的 LMKB(Limkain B^[3], 又称 LKAP, KIAA0430)的细胞定位相似^[4]。MARF1 在小鼠和人高度保守,人的 Marf1 同源基因为 LMKB。2013 年, Bloch 等^[3]对 LMKB 的研究发现 LMKB 定位在 p-bodys 并且可能通过和 Ge-1 直接相互作用,参与 mRNA 的调控。p-body 的组成成分对于 mRNA 新陈代谢具有重要的作用,它参与 mRNA 的降解以及 microRNA 对基因转录后沉默的调控^[5]。另外, p-body 的组成成分在神经元的信息传递^[6]、病毒感染的抵抗^[7]、基因组完整性的维持^[8]以及胚胎早期发育^[9]等过程中发挥调控作用。本文发现 MARF1 在胞质中呈现颗粒状分布,与已报导的 LMKB 定位方式极其相似,这提示 MARF1 可能是 p-body 中新的组成成分。据此,本文推测 MARF1 可能通过调控细胞周期相关过程以及基因组的完整性来发挥对卵母细胞发育成熟的调控作用。

综上,本文成功克隆了小鼠 Marf1 基因,并顺利实现了 MARF1 融合蛋白在 HEK293T 细胞的表达。这为进一步研究 MARF1 的作用原理以及揭示调控卵母细胞生长发育成熟的关键机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Su YQ, Sugiura K, Sun F, et al. MARF1 regulates essential oogenic processes in mice [J]. *Science*, 2012, 335 (6075): 1496-1499
- [2] Su YQ, Sun F, Handel MA, et al. Meiosis arrest female1 (MARF1) has nuage-like function in mammalian oocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (46): 18653-18660
- [3] Bloch DB, Li PC, Bloch EG, et al. LMKB/MARF1 localizes to mRNA processing bodies, interacts with Ge-1, and regulates IFI44L gene expression [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (4): e94784
- [4] Dunster K, Lai FP, Sentry JW. Limkain b1, a novel human autoantigen localized to a subset of ABCD3 and PXF

marked peroxisomes [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 140 (3): 556-563

- [5] Meteignier LV, Zhou J, Cohen M, et al. NB-LRR signaling induces translational repression of viral transcripts and the formation of RNA processing bodies through mechanisms differing from those activated by UV stress and RNAi [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(8): 2353-2366
- [6] Pradhan SJ, Nesler KR, Rosen SF, et al. The conserved P body component HPat/Pat1 negatively regulates synaptic terminal growth at the larval *Drosophila* neuromuscular junction [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(24): 6105-6116
- [7] Corcoran JA, Johnston BP, McCormick C. Viral activation of Mk2-hsp27-p115RhoGEF-RhoA signaling axis causes cytoskeletal rearrangements, p-body disruption and ARE-mRNA stabilization [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11 (1): e1004597
- [8] Dutko JA, Kenny AE, Gamache ER 5'to 3'mRNA decay factors colocalize with Ty1 gag and human APOBEC3G and promote Ty1 retrotransposition [J]. *J Virol*, 2010, 84 (10): 5052-5066
- [9] Pepling ME, Wilhelm JE, O'hara AL. Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbianibody [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(1): 187-192
- [10] Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro [J]. *Biol Reprod*, 1989, 41(2): 268-276
- [11] Leguèbe M, Notarangelo MG, Twarogowska M, et al. Mathematical model for transport of DNA plasmids from the external medium up to the nucleus by electroporation [J]. *Math Biosci*, 2016, 285(1): 1-13
- [12] Hancock SJ, Phan MD, Peters KM. Identification of IncA/C plasmid replication and maintenance genes and development of a plasmid multi-locus sequence-typing scheme [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 61(2): e01740-16
- [13] Tuo D, Shen W, Yan P. Rapid construction of stable infectious full-length cDNA clone of papaya leaf distortion Mosaic virus using In-Fusion cloning [J]. *Viruses*, 2015, 7 (12): 6241-6250
- [14] Park J, Throop AL, LaBaer J. Site-specific recombinational cloning using gateway and in-fusion cloning schemes [J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015, 110(1): 1-23
- [15] Lu Y, Wan Z, Zhang X. PRDM14 inhibits 293T cell proliferation by influencing the G1/S phase transition [J]. *Gene*, 2016, 595(2): 180-186

[收稿日期] 2016-12-23