

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

MARF1 是一个 RNA 结合蛋白,不仅调控卵母细胞的减数分裂,而且能够通过维持卵母细胞内 mRNA 的稳态来调控卵母细胞质成熟和反转座子沉默。因此,MARF1 参与调控卵母细胞发育过程中的三大关键环节——减数分裂恢复能力的获得、mRNA 转录后调控和反转座子沉默。鉴于 MARF1 功能在其他模式生物尚未见报道,因此,MARF1 是迄今为止国际上第一个被发现的,能同时调控哺乳动物卵母细胞减数分裂恢复和卵母细胞内反转座子沉默的关键蛋白。

然而 MARF1 在卵母细胞中的表达定位以及其调控卵母细胞发育成熟的机制尚不清楚,急需深入研究。由于目前市面尚缺乏研究所需的 MARF1 商品化抗体,这在很大程度上限制了 MARF1 相关研究的开展。如果通过显微注射的方法实现在卵母细胞内表达荧光标记或带有小分子标签的 MARF1 融合蛋白,就可以通过活细胞成像或者利用抗标签蛋白抗体实现对 MARF1 在卵母细胞内表达与定位的研究。另外,MARF1 属于 RNA 结合蛋白,分离鉴定与其相互作用的蛋白和 mRNA 需要数量相当可观的卵母细胞,这几乎难以实现。而将 MARF1 在体细胞异位过量表达,即可以在一定程度上实现该目标。为此,本文试图克隆小鼠 Marf1 基因,并通过体外转染实现带有 mKate 荧光标签以及小分子量 3DDK 标签的 MARF1 融合蛋白在常用工具细胞系 HEK293T 中稳定表达,以期揭示 MARF1 在该类细胞内的具体定位,并为通过免疫沉淀(IP)和紫外交联免疫沉淀结合高通量测序(HITS-CLIP)途径分离鉴定与 MARF1 相互作用的 mRNA 和蛋白奠定基础,同时也可为进一步深入研究 MARF1 在卵母细胞中的表达定位以及作用机制提供充分条件。

1 材料和方法

1.1 材料

所有实验使用的小鼠品系均为 SPF 级 ICR 小鼠,由南京医科大学实验动物中心提供。动物的使用经南京医科大学伦理委员会同意,并按照相关操作规范执行。小鼠饲养环境温度恒定在 20~22 ℃,光照周期为白昼/黑夜各 12 h 循环,湿度 50%~70%,自由摄取食物。均使用 20~24 日龄(体重 9~12 g)雌性小鼠。人胚胎肾细胞(HEK293T)由本实验室提供。孕马血清(PMSG,又称 eCG,宁波第二激素厂);*Mlu* I、*AsiS* I、Q5 热启动超保真 DNA 聚合酶、cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, 美国);pCMV6-

AC-3DDK、pCMV6-AN-mKate、Megatract 1.0(Origene 公司,美国);PCR 产物纯化试剂盒(Qiagen 公司,德国);In-Fusion 试剂盒(Clontech 公司,美国);感受态 TOP 10(北京天根生化科技);氨苄青霉素(北京索莱宝科技);MEMα、胎牛血清(FBS)(Gibco 公司,美国);谷氨酰胺、青霉素、链霉素、EDTA、鼠抗 Tubulin 抗体、鼠抗 DDK 抗体(Sigma 公司,美国);兔抗 mKate 抗体(evrogen 公司,俄罗斯);兔抗 Tubulin 抗体(Santa Cruz 公司,美国);抗淬灭剂(Antifade)(Life 公司,美国);Alexa Fluor-594 标记驴抗兔 IgG、驴抗鼠 IgG (Invitrogen 公司,美国);Alexa Fluor-488 标记驴抗兔 IgG、驴抗鼠 IgG、山羊抗鼠 IgG 二抗、RIPA buffer、化学发光显色(Thermo 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的收集

20~23 日龄雌性 ICR 小鼠通过注射 5 U PMSG 46~48 h 后,利用连在 1 mL 注射器上的针头小心将大的有腔卵泡戳破然后轻轻挤压,使卵泡中卵丘卵母细胞复合体(cumulus-oocyte cell complexes, COCs)排出^[10]。将 COCs 聚集起来并利用适当口径的吸管轻轻吹打直至将卵丘细胞完全去除,最终只收集形态完好的健康卵母细胞。

1.2.2 目的基因 Marf1 的获取

将收集的卵母细胞加入 RLT buffer 提取 RNA,并将其反转录成为全基因组 cDNA。一方面,针对小鼠的 Marf1 基因,设计带有酶切位点的编码区上下游引物。根据 pCMV6-AC-3DDK 和 pCMV6-AN-mKate 多克隆位点及目的基因本身要求,选择 *Mlu* I 和 *AsiS* I 酶切位点的引物设计。另一方面,依据 In-Fusion 技术的引物设计原理——同源重组原理设计引物如下:mKate:F:5'-TCCGGACTCAGAGCGAT-CGCCATGGAAGGGAAAGGAAGCTGA-3',R:5' -CGG-CCGCTTAACGCCGTTAAAGCTTGGTACAGGTGCA-AA-3';DDK:F:5' -AGATCTGCCGCCGATCGCAT-GGAAGGGAAAGGAAGCTGA-3',R:5' -GCGGCCGC-GTACCGCTAACGCTTGGTACAGGTGCAA-3'。

1.2.3 构建 Marf1 基因的重组质粒

扩增的 Marf1 基因产物以 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化后直接利用 In-Fusion 试剂盒将 Marf1 片段与 pCMV6-AC-3DDK 和 pCMV6-AN-mKate 载体连接。再将连接后的重组质粒转化入感受态 TOP10 中并接种在含有氨苄青霉素抗性的琼脂平板上,在 37 ℃培养箱中培养 14~16 h 后挑取单个阳性克隆,摇菌并提取质粒^[11-14]。所获质粒的 DNA 在经限制性

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 °C, 5%CO₂, 当细胞生长密度至 60%~70% 时, 根据 Megatranc1.0 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, 摆床 4 °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

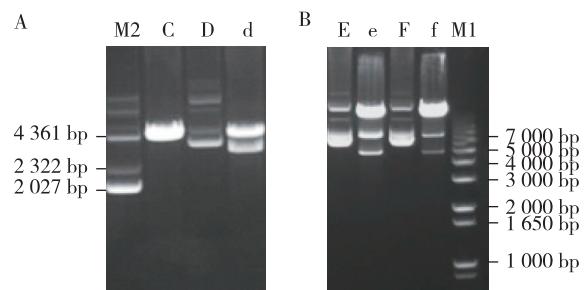
转染 HEK293T 细胞 36 h 后, 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min, 细胞洗涤液(10 mL PBS 含 10 μL FBS) 中洗 15 min, 再于氯化铵溶液(10 mL PBS 含 0.03 g NH₄Cl、10 μL FBS) 中浸泡 15 min, 封闭液(9 mL PBS 含 10 μL Triton X-100、1 mL FBS) 中浸泡 1 h(以上步骤均在室温进行), 最后用 PBS(1 mL PBS 含 50 μL FBS) 稀释一抗 4 °C 孵育过夜; pCMV6-AC-3DDK-Marf1 转染组: 一抗分别为鼠抗 DDK(1:500) 和 1:500 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 μg/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 *AsiS* 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 *AsiS* 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: 空载体酶切样品; 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 pCMV6-AN-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

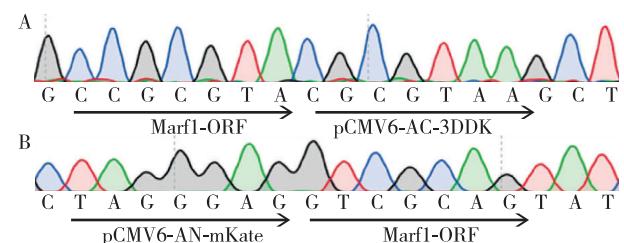


图 2 重组质粒 pCMV6-AC-Marf1-3DDK (A) 和 pCMV6-AN-mKate-Marf1(B)部分测序结果

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

2.2 融合蛋白的表达

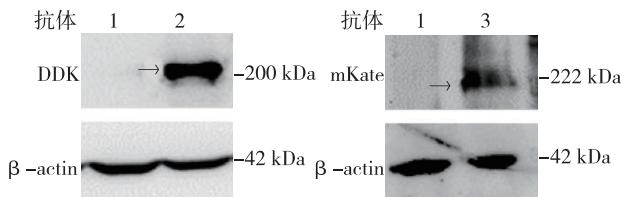
用 pCMV6-AC-Marf1-3DDK、pCMV6-AN-mKate-Marf1 重组质粒和相应的空载体转染入 HEK293T

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

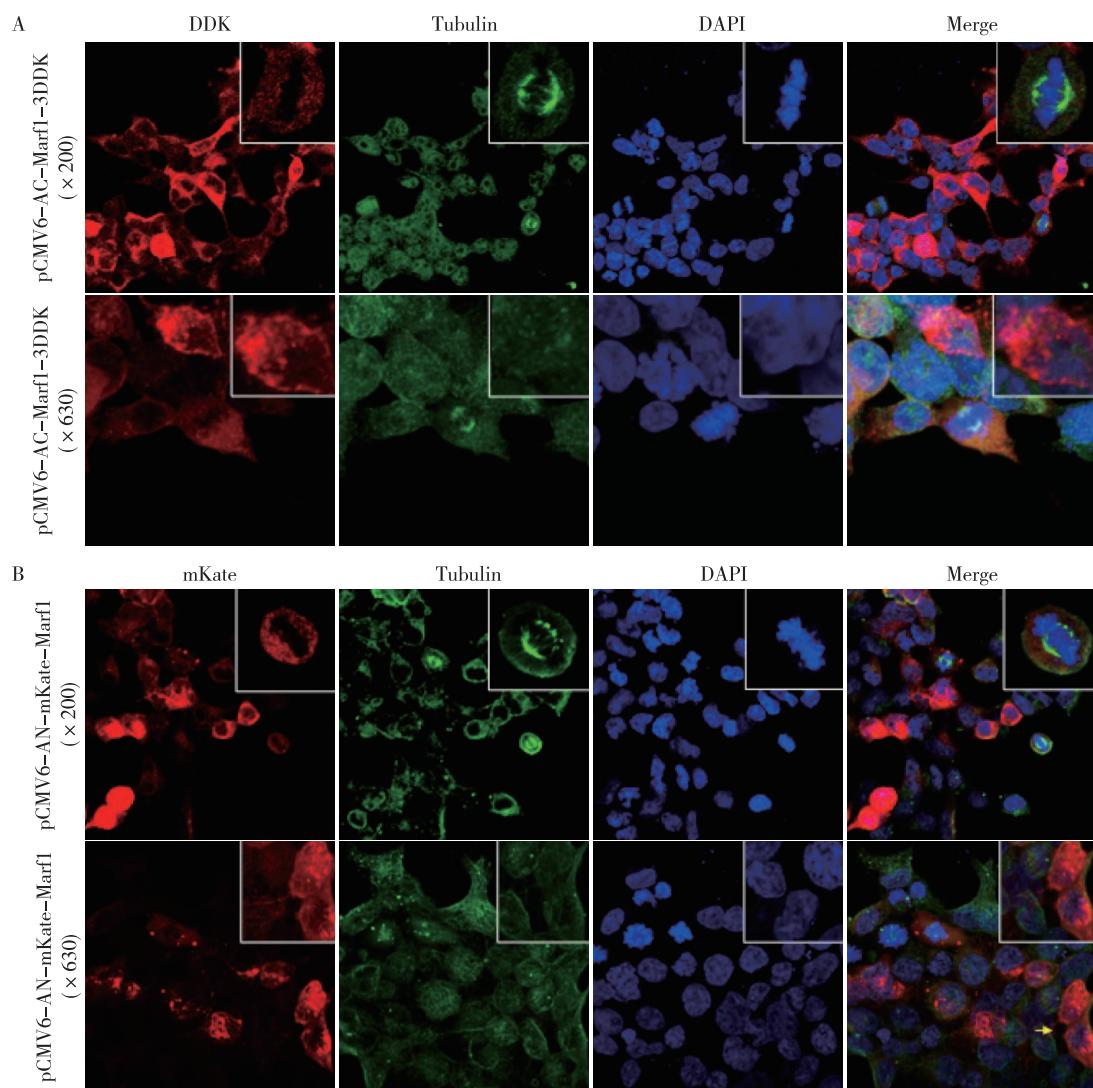


图4 免疫荧光检测经pCMV6-AC-Marf1-3DDK(A)和pCMV6-AN-mKate-Marf1(B)质粒转染36 h后MARF1在HEK293T细胞中的定位

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] Meteigner 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