

用于双分子荧光互补技术的 Olig1/Id2 基因真核表达载体的构建和鉴定

郭术俊^{1,2}, 赵保明¹, 吕合作¹, 胡建国¹

[摘要]目的:构建 pBiFC-VN173-Olig1 和 pBiFC-VC155-Id2 真核表达质粒,并进行鉴定。方法:以 pEGFP-N3-Olig1 真核表达质粒为模板扩增出 Olig1 基因,与 pBiFC-VN173 载体连接,构建 pBiFC-VN173-Olig1 真核表达质粒;利用 RT-PCR 方法从新生大鼠脊髓中提取 Id2 基因片段,与 pBiFC-VC155 载体连接,构建 pBiFC-VC155-Id2 真核表达质粒。对此 2 种质粒进行酶切鉴定、测序。结果:通过酶切鉴定、测序,证明 pBiFC-VN173-Olig1 和 pBiFC-VC155-Id2 重组质粒序列和编码框均正确构建成功。结论:成功构建了 pBiFC-VN173-Olig1 和 pBiFC-VC155-Id2 真核表达质粒,为进一步在活细胞内研究 Olig1 和 Id2 的相互作用提供了实验基础。

[关键词] 基因;Olig1;Id2;克隆;酶切

[中国图书资料分类法分类号] Q 343.1 **[文献标识码]** A

Construction and identification of eukaryotic expression vectors of Olig1 and Id2 genes for bimolecular fluorescence complementation assay

GUO Shu-jun^{1,2}, ZHAO Bao-ming¹, LÜ He-zuo¹, HU Jian-guo¹

(1. Anhui Key Laboratory of Tissue Transplantation; 2. Department of Immunology,

Key Laboratory of Infection and Immunity in Anhui, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To construct and identify pBiFC-VN173-Olig1 and pBiFC-VC155-Id2 eukaryotic expression plasmid for bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay. **Methods:** Rat olig1 gene from pGFP-N3-Olig1 eukaryotic expression plasmid was amplified by PCR. And rat Id2 gene from RNA of neonatal rat spinal cord was amplified by RT-PCR. The Olig1 gene was inserted into BiFC eukaryotic expression vector pBiFC-VN173 and Id2 gene was inserted into pBiFC-VC155, which were used to construct recombinant expression vector pBiFC-VN173-Olig1 and pBiFC-VC155-Id2, respectively. The recombinant vectors were identified by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. **Results:** The restriction enzyme digestion and DNA sequencing results showed that the sequences and open read frames of the two vectors were completely concordant with experiment design. **Conclusions:** The pBiFC-VN173-Olig1 and pBiFC-VC155-Id2 were successfully constructed. These provide an experimental base for further research on interaction between Olig1 and Id2 *in vivo*.

[Key words] gene; Olig1; Id2; cloning; restriction enzyme digestion

蛋白质之间相互作用的研究对于了解细胞信号转导及转录调控均具有重要意义。目前,研究蛋白质相互作用的手段很多,既有体外实验如免疫共沉淀、蛋白质芯片等,也有酵母双杂交、荧光共振能量转移等体内实验。双分子荧光互补技术 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 是

近年来出现的一种新技术,其能够直观、快速地判断目标蛋白在细胞中的定位和相互作用,填补了在活细胞内观察蛋白质相互作用的空白^[1]。Olig1 属于碱性螺旋-环-螺旋 (basic-helix-loop-helix, bHLH) 转录因子超家族,在神经胶质细胞分化发育过程中发挥重要的调节作用,与少突胶质细胞的分化和成熟有关^[2]。Id2 是一种 DNA 结合抑制因子 (inhibitor of DNA binding, Id), 属于 HLH 蛋白家族,能够与 Olig1 结合抑制其转录活性^[3-4]。本研究拟构建 Olig1 和 Id2 的 BiFC 真核表达载体,以便观察二者在活细胞内的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料 新生大鼠脊髓分离自出生 1 天的 SD 大鼠, -80 °C 保存备用; Trizol 试剂 (Gibco 公司); 氯仿、异丙醇 (重庆化学试剂厂); 焦碳酸二乙酯

[收稿日期] 2010-07-23

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30700439, 81071268); 教育部科学技术研究重点资助项目 (210103); 安徽省第五批 (2010 年度) 优秀青年科技基金资助项目 (10040606Y13); 安徽省教育厅自然科学研究项目 (KJ2010B109)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 组织移植安徽省重点实验室, 2. 免疫学教研室, 感染与免疫安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 郭术俊 (1977 -), 女, 实验师。

[通讯作者] 胡建国, 男, 博士, 研究生导师, 副教授, E-mail: jghu_hzlz@yahoo.com

(DEPC, Sigma 公司); 大肠埃希菌 (DH5 α 菌) 为本室保存; cDNA 合成试剂盒 (Fermentas 公司); 引物 (上海生工生物工程技术服务公司合成); 限制性内切酶、Prime STARTTM HS DNA Polymerase 及 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司); 质粒纯化试剂盒及胶回收试剂盒 (上海赛百盛基因技术有限公司); pBiFC-VC155 载体和 pBiFC-VN173 载体 (美国普渡大学胡长灯教授惠赠); pEGFP-N3-Olig1 真核表达载体参见文献[2]。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 Olig1 基因扩增 以 pEGFP-N3-Olig1 真核表达质粒为模板进行 PCR 扩增。上游引物: 5'-CCG GAA TTC TAG CTC CCG CGA CCA TGT TG-3', 在 5' 端引入 *EcoR* I 的酶切位点; 下游引物: 5'-GGG GTA CCA TCT TGG AGA ACT GAG CCT GCA C-3', 在 5' 端引入 *Kpn* I 的酶切位点。循环条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.2.2 大鼠 Id2 基因的 RT-PCR 扩增 用 Trizol 试剂抽提新生大鼠脊髓总 RNA, 并反转录为 cDNA, 以该 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。上游引物: 5'-GAA GAT CTT TCC TCC TAC GAG CAG CA-3', 在 5' 端引入 *Bgl* II 的酶切位点; 下游引物: 5'-GGG GTA CCC CCA CAG AGT ACT TTG CTG-3', 在 5' 端引入 *Kpn* I 的酶切位点。循环条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.2.3 pBiFC-VN173-Olig1 的构建和鉴定 Olig1 PCR 产物经胶回收纯化后与 pBiFC-VN173 载体分别以 *EcoR* I、*Kpn* I 进行双酶切。将酶切后的目的基因与载体经 T4 DNA 连接酶于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜, 并转化感受态 DH5 α 菌。挑取阳性克隆经摇菌后提取质粒, 以 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定, 酶切鉴定符合的克隆送南京测序公司进一步测序鉴定。

1.2.4 pBiFC-VC155-Id2 的构建和鉴定 PCR 产物经胶回收纯化后与 pBiFC-VC155 载体分别以 *Kpn* I、*Bgl* II 进行双酶切。将酶切后的目的基因与载体经 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 并转化感受态 DH5 α 菌。挑取阳性克隆经摇菌后提取质粒, 以 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切鉴定, 酶切鉴定符合的克隆送南京金斯瑞生物科技有限公司进一步测序鉴定。

2 结果

2.1 大鼠 Olig1 和 Id2 基因的 PCR 结果 以 pEGFP-N3-Olig1 真核表达质粒为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示, 在预期的位置出现一条约 747 bp 的条带 (见图 1)。新生大鼠脊髓总 RNA 应用上述 Id2 特异性引物经 RT-PCR 扩增后, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示, 在预期的位置出现一条约 421 bp 的条带。

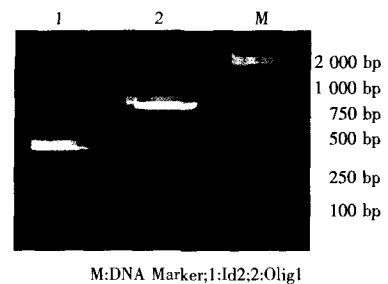


图 1 Olig1 和 Id2 基因 PCR 产物琼脂糖电泳结果

2.2 pBiFC-VN173-Olig1 表达质粒的构建和鉴定 PCR 扩增的片段经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切后, 克隆到同样经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切的真核表达质粒 pBiFC-VN173 中。转化 DH5 α 菌后筛选出对氨苄西林具有抗性的阳性克隆, 少量制备质粒, 用 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切鉴定重组质粒, 可切出约 747 bp 和 5.2 kbp 的片段, 同预期的长度和 Olig1 PCR 结果均一致 (见图 2)。测序结果经比对与 GenBank 报道的序列完全一致, 说明 Olig1 基因已成功克隆至 BiFC-VN173 载体中。

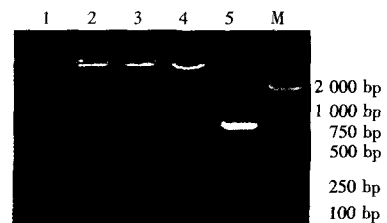
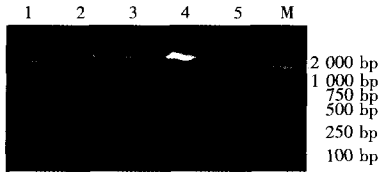


图 2 pBiFC-VN173-Olig1 重组质粒限制性酶切结果

2.3 pBiFC-VC155-Id2 表达质粒的构建和鉴定 PCR 扩增的片段经 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切后, 克隆到同样经 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切的真核表达质粒 pBiFC-VC155 中。转化 DH5 α 菌后筛选出对氨苄西林具有抗性的阳性克隆, 少量制备质粒, 用 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切鉴定重组质粒, 可切出 421 bp 和 4.0 kbp 的片段, 同预期的长度和 Id2 PCR 结果均一致 (见图 3)。

测序结果经比对与 GenBank 报道的序列完全一致,说明 Id2 基因已成功克隆至 pBiFC-VC155 载体中。



M:DNA Marker;1:pBiFC-VC155-Id2;2:pBiFC-VC155-Id2 BglII;3:pBiFC-VC155-Id2 KpnI;4:pBiFC-VC155-Id2 BglII + KpnI;6:Id2 PCR

图3 pBiFC-VC155-Id2 重组质粒限制性酶切结果

3 讨论

Olig 基因包括 Olig1、Olig2 和 Olig3 基因,属于 bHLH 转录因子超家族。其中,Olig1 和 Olig2 在神经系统发育过程中与少突胶质细胞前体细胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs) 的分化密切相关^[5]。Id 因子为 HLH 转录因子家族成员之一,该类分子能够与 bHLH 的成员(如 Olig1)结合形成异二聚体,但缺少与 DNA 结合的结构域,因此是 bHLH 蛋白的负调控分子^[3]。在哺乳动物细胞中发现有 4 个 Id 家族成员,即 Id1、Id2、Id3 和 Id4,其中 Id2 和 Id4 被证明可以通过与 Olig1 和 Olig2 相互作用调控 OPCs 的分化方向^[4]。但是,这些发现建立在非活细胞水平的观察,迄今没有相关活细胞水平的研究报道。

目前传统的研究蛋白质相互作用的方法主要有免疫共沉淀、免疫荧光、酵母双杂交技术等。这些方法虽然能够反映蛋白质间相互作用的重要信息,但也存在一定的缺陷:如免疫共沉淀技术要求必须破碎细胞,不能进行亚细胞定位;免疫荧光虽然能够进行细胞定位,但其结果只能表示 2 种分子能够共表达,而无法证明它们是否相互结合;双杂交技术虽然能够证明 2 种蛋白相互结合,但只能检测细胞核内的相互作用,对相互作用强弱蛋白质的鉴定也需要裂解细胞进行检测。因此,这些方法都不能够在活细胞条件下对细胞内蛋白质间相互作用进行动态研究^[6]。

BiFC 技术是由 Hu 等^[7]首创的一种直观、快速地判断目标蛋白在细胞中的定位和相互作用的新技

术。其关键是将拟观察的目标蛋白克隆到相应的载体,分别与不发荧光的荧光蛋白片段融合。若目标蛋白之间可以相互作用,彼此靠近,荧光蛋白片段则可重新形成具有活性的荧光蛋白,可以在活细胞内直接观察目标分子之间的相互作用和定位^[8]。该方法已经成功地应用到多种蛋白分子之间的相互作用研究,但迄今尚没见应用于 Olig1 和 Id2 相互作用的报道。在本研究中,我们以 pEGFP-N3-Olig1 真核表达质粒为模板扩增出 Olig1 基因,与 pBiFC-VN173 载体连接,构建 pBiFC-VN173-Olig1 真核表达质粒;利用 RT-PCR 方法从新生大鼠脊髓中提取 Id2 基因片段,与 pBiFC-VN173 载体连接,构建 pBiFC-VC155-Id2 真核表达质粒。通过酶切鉴定测序证明,我们成功构建了大鼠 Olig1 基因和 Id2 基因的 BiFC 真核表达载体 pBiFC-VN173-Olig1 和 pBiFC-VC155-Id2,为今后通过 BiFC 技术观察二者的相互作用奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 樊晋宇,崔宗强,张先恩. 双分子荧光互补技术[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008,24(8):767-774.
- [2] 吕合作,邹健,王艳霞,等. Olig1 过表达对大鼠神经干细胞向少突胶质细胞分化的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2010,26(2):201-205.
- [3] O'Toole PJ, Inoue T, Emerson L, et al. Id proteins negatively regulate basic helix-loop-helix transcription factor function by disrupting subnuclear compartmentalization[J]. J Biol Chem, 2003,278(46):45770-45776.
- [4] Samanta J, Kessler JA. Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation[J]. Development, 2004,131(17):4131-4142.
- [5] Zhou Q, Wang S, Anderson DJ. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors[J]. Neuron, 2000,25(2):331-343.
- [6] 严晶,霍克克. 双分子荧光互补技术及其蛋白质相互作用研究中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006,33(6):589-595.
- [7] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. Mol Cell, 2002,9(4):789-798.
- [8] Kerppola TK. Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation[J]. Chem Soc Rev, 2009,38(10):2876-2886.