

pEGFP-N1-Mxi1-0 重组质粒的构建与表达

胡圳圳¹, 李璐², 吴小芸², 郑大同^{1,2}, 吴伟玲²

[摘要] **目的:** 构建 Max 作用蛋白 1-0 (Max interacting protein1-0, Mxi1-0) 的真核表达载体, 在小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH/3T3) 中表达, 以为深入研究 Mxi1-0 的作用及机制奠定基础。 **方法:** 通过 RT-PCR 方法从人肿瘤细胞 HepG2 中获得 Mxi1-0 基因的编码片段, 连接至增强绿色荧光蛋白真核表达载体 (pEGFP-N1) 构建成 pEGFP-N1-Mxi1-0。经酶切和测序鉴定重组质粒的正确性; 采用脂质体转染技术将重组质粒瞬时转染 NIH/3T3 细胞, 经荧光显微镜观察和 Western blot 方法检测 Mxi1-0 表达, 免疫荧光法检测 Mxi1-0 在 NIH/3T3 细胞内的定位情况。 **结果:** 经双酶切和核酸序列测定证实含 Mxi1-0 的重组真核表达载体 pEGFP-Mxi1-0 构建成功。重组质粒瞬时转染 NIH/3T3 细胞后, 检测到 Mxi1-0 的成功表达, 并证实 Mxi1-0 主要定位于 NIH/3T3 细胞质中。 **结论:** 成功构建了真核表达载体 pEGFP-N1-Mxi1-0, 并检测到 Mxi1-0 的表达, 实验证明 Mxi1-0 定位于 NIH/3T3 细胞质中。

[关键词] 基因表达; 重组质粒; 细胞定位; Max 作用蛋白 1-0; 小鼠胚胎成纤维细胞

[中图分类号] Q 343.1 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.03.008

Construction and expression of the recombinant plasmid pEGFP-N1-Mxi1-0

HU Zhen-zhen¹, LI Lu², WU Xiao-yun², ZHENG Da-tong^{1,2}, WU Wei-ling²

(1. Center Laboratory; 2. Children's Medical Center, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu 210003, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the recombinant eukaryote expression vector containing Max interacting protein (Mxi) 1-0 gene, and detect the expression of Mxi1-0 in mouse embryo fibroblast (NIH/3T3) cells for providing the basis to explore the effect and mechanism of Mxi1-0. **Methods:** Mxi1-0 gene was cloned by RT-PCR from cancer cells, which was subcloned into enhanced green fluorescent protein eukaryote expression vector (pEGFP-N1) to construct the recombinant vector pEGFP-N1-Mxi1-0. The recombinant vector pEGFP-N1-Mxi1-0 was identified by enzyme digestion and sequencing, which was transfected into the NIH/3T3 cells by liposome. The protein expression of Mxi1-0 in NIH/3T3 cells was detected by Western blot, the intracellular localization of Mxi1-0 was investigated by immunofluorescence. **Results:** The recombinant eukaryote expression vector encoding Mxi1-0 was successfully constructed. The expression of Mxi1-0 in NIH/3T3 cells could be detected by Western blot. The Mxi1-0 localized in the cytoplasm of NIH/3T3 cells. **Conclusions:** The recombinant expression vector pEGFP-N1-Mxi1-0 is successfully constructed. The Mxi1-0 expression in NIH/3T3 cells can be detected, which localizes in the cytoplasm.

[Key words] recombinant plasmid; cellular localization; Max interacting protein 1-0; mouse embryo fibroblast

Max 作用蛋白 1 (Max interacting protein1, Mxi1) 属于 Max 二聚化蛋白 (Max dimerization protein, Mad) 家族成员, 参与原癌基因 c-MYC 转录活性的调节^[1-2]。Mxi1-0 是 Mxi1 的同型异构体, 两者共享数个功能域^[3]。Mxi1-0 在胎盘与新生胎儿组织中大量表达, 在细胞中与 Mxi1 同时表达^[4-5]。目前有

关 Mxi1-0 的许多生物学功能和其发挥效应的机制尚未完全明了, 值得深入研究。本研究旨在构建 Mxi1-0 的真核表达载体, 为深入探索 Mxi1-0 的作用及机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 NIH/3T3 细胞 (中国科学院上海细胞库); 增强绿色荧光蛋白真核表达载体 (pEGFP-N1) 和大肠埃希菌 DH5 α 由本实验室保存。PCR 试剂盒 (瑞士 Roche 公司); 胶回收试剂盒和质粒纯化试剂盒 (德国 Macherey-Nagel 公司); 限制性核酸内切酶 EcoR I、BamH I (美国 NEB 公司); 卡那霉素 (美国 Sigma 公司); TRIzol、T4 连接酶、转染试剂 LipofectamineTM (美国 Invitrogen 公司); GFP 抗体

[收稿日期] 2014-05-31

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81301822); 南京医科大学科技发展基金重点资助项目 (2012NJMU088); 南京医科大学大学生殖医学国家重点实验室开放基金 (SKLRM-KF-1202)

[作者单位] 南京医科大学第二附属医院 1. 中心实验室; 2. 儿童医学中心, 江苏南京 210003

[作者简介] 胡圳圳 (1985 -), 男, 硕士研究生, 实习研究员。

[通信作者] 吴伟玲, 副主任医师。E-mail: wlv0210@aliyun.com

(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 目的片段的 PCR 扩增 根据 GeneBank 中 Mxi1-0 基因 mRNA 全长序列 (NM130439.3), 采用 Accelrys DS Gene1.5 软件进行引物设计, 引物序列如下: 上游引物 5'-CCG GAA TTC GCC ACC ATG GGC AAA CGC GG-3' (下划线表示 *EcoR* I 的酶切位点); 下游引物 5'-CGC GGA TCC CGT GAA GTG AAT GAA AGT TTG ACA-3' (下划线表示 *BamH* I 的酶切位点)。目的片段产物长度为 911 bp。PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。Trizol 法提取人肝癌细胞株 HepG2 的总 RNA, 反转录成 cDNA, 用上述设计好的引物进行 PCR 扩增, 具体反应条件如下: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 30 s, 56.8 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 6 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用胶回收试剂盒回收目的基因片段。

1.2.2 重组质粒 pEGFP-N1-Mxi1-0 的构建及鉴定

将 PCR 产物和 pEGFP-N1 载体分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *BamH* I 进行双酶切, 酶切产物用 T4 连接酶于 16 °C 连接过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞。37 °C 培养 18 h 后挑取单克隆菌落培养扩增, 提取质粒进行酶切鉴定, 鉴定为阳性的重组质粒交由上海美吉生物医药科技有限公司测序验证。测序正确的质粒命名为 pEGFP-N1-Mxi1-0。

1.2.3 pEGFP-N1-Mxi1-0 重组质粒转染 NIH/3T3 细胞 NIH/3T3 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 转染前 24 h 将处于对数生长期 NIH/3T3 细胞以 3×10^5 细胞/孔接种至 6 孔细胞培养板中, 于 37 °C 5% CO₂ 培养 24 h, 使转染当天细胞处于 80% 的汇合率。转染步骤如下: 在 1 支无菌 EP 管中分别加入 100 μ l Opti-MEM 培养液、2 μ g 的质粒、4 μ l Plus 试剂, 混匀, 室温下孵育 15 min; 在另 1 支 EP 管中分别加入 100 μ l Opti-MEM 培养液和 10 μ l 脂质体, 混匀。将 2 支 EP 管中溶液混合, 室温下孵育 15 min。用 PBS 洗细胞 2 次后加入 0.8 ml Opti-MEM 培养液。将 pEGFP-N1-Mxi1-0-脂质体混合液逐滴加入培养孔内。37 °C 孵育 5 h 后吸出混合液, 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基替换。转染 48 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况。实验中以转染空载体为对照。

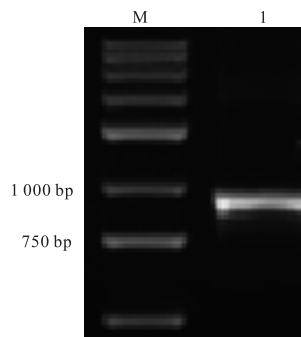
1.2.4 Western blot 检测细胞中 Mxi1-0 表达

转染 48 h 后收集细胞加入 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白, 蛋白浓度用 BCA 比色法测定。加 6 \times 上样缓冲液, 煮沸 10 min 使其变性。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 经湿转法转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, 一抗 anti-GFP 抗体 (抗体稀释浓度 1:1 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 二抗羊抗鼠 IgG-HRP (抗体稀释浓度 1:1 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 暗室中加入 ECL 液后曝光和显影。

1.2.5 免疫荧光检测 Mxi1-0 在 NIH/3T3 细胞内的定位 细胞转染 48 h 后, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min。预冷 PBS 洗涤 3 次, 细胞用 0.2% TritonX-100 处理 5 min。预冷 PBS 洗涤 3 次之后细胞用 1% BSA 封闭 1 h, 一抗 anti-GFP 抗体 (抗体稀释浓度 1:200) 4 °C 孵育过夜, 预冷 PBS 洗涤 3 次, FITC-羊抗鼠 IgG (抗体稀释浓度 1:200) 37 °C 避光孵育 1.5 h, 预冷 PBS 洗涤 3 次, 用封片剂封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 目的基因 Mxi1-0 的扩增 以 HepG2 细胞 RNA 反转录产物为模板, 用 Mxi1-0 引物, PCR 扩增 Mxi1-0 基因, 并进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果如图 1 所示, 可见在 911 bp 左右位置有单一特异性条带, 与 Mxi1-0 实际片段大小相符合。



M:DNA 标准; 1:Mxi1-0

图1 Mxi1-0基因PCR扩增电泳图

2.2 重组质粒 pEGFP-N1-Mxi1-0 的鉴定 重组质粒用双酶切, 产生大小 2 个片段 (见图 2 A), 分别代表载体 pEGFP-N1 和 Mxi1-0 基因片段, 初步表明载体构建成功。部分测序报告结果显示, pEGFP-N1 载体的部分序列, *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切位点, 起始密码子 ATG 以及 Mxi1-0 基因 N 端和 C 端的部分序列。使用 DNASIS MAX 软件进行同源性比较分析发现, 克隆的基因序列与 GeneBank 上所公布的

Mxi1-0 基因序列一致,说明 Mxi1-0 以正确的阅读框插入真核表达载体 pEGFP-N1 中(见图 2B)。

2.3 重组质粒 pEGFP-N1-Mxi1-0 在 NIH/3T3 中的表达 使用脂质体法将空载体和重组质粒 pEGFP-N1-Mxi1-0 转染 NIH/3T3 细胞,转染 48 h 后,荧光显微镜下可观察到绿色荧光表达(见图 3)。

2.4 Western blot 法检测 Mxi1-0 的表达 转染 48 h 后裂解细胞提取总蛋白,用 Western blot 鉴定 GFP 和 Mxi1-GFP 重组蛋白的表达。结果表明,转染空载体 pEGFP-N1 和重组质粒 pEGFP-N1-Mxi1-0 的两个细胞株分别显示相对分子量为 27 000 和 59 000

的蛋白条带(见图 4),与预期蛋白分子量大小一致。2.5 Mxi1-0 在 NIH/3T3 细胞中的定位 免疫荧光实验结果显示,空载体 pEGFP-N1 在细胞中呈弥散性分布表达,而重组质粒 pEGFP-N1-Mxi1-0 转染细胞核周围有绿色荧光表达(见图 5)。

3 讨论

Mxi1 是 1 种肿瘤抑制基因,参与 c-MYC 功能调节。其羧基末端的碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链结构域和 c-MYC 竞争结合 Max,抵消 c-MYC 的促转

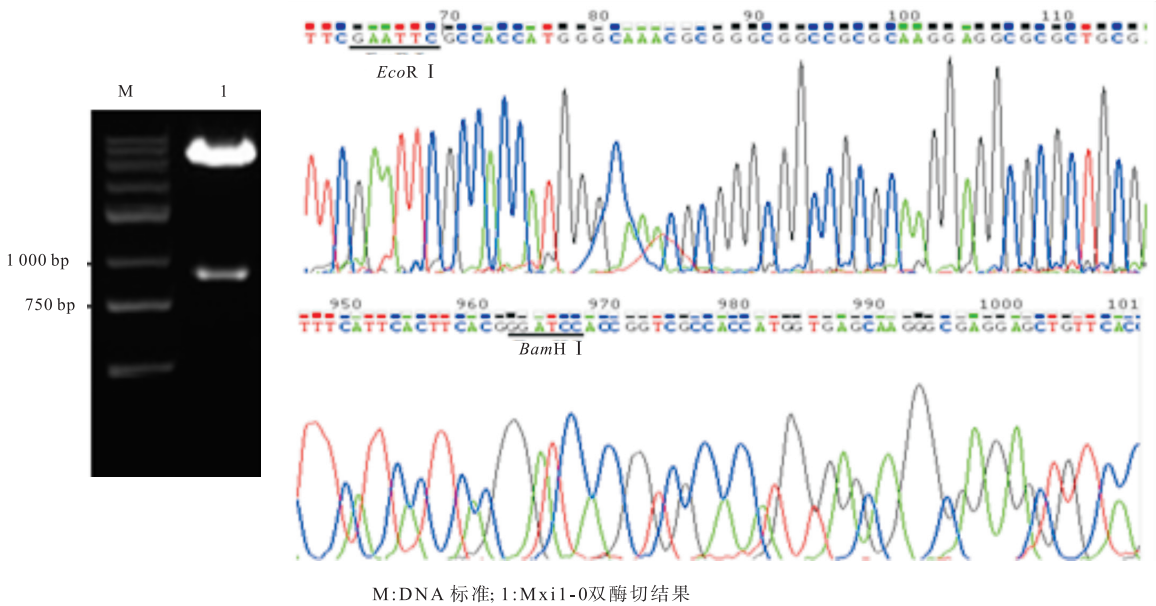


图2 重组质粒 pEGFP-N1-Mxi1-0 *EcoR* I、*BamH* I 双酶切鉴定及部分测序结果

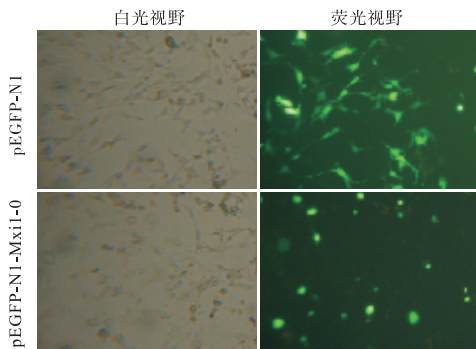
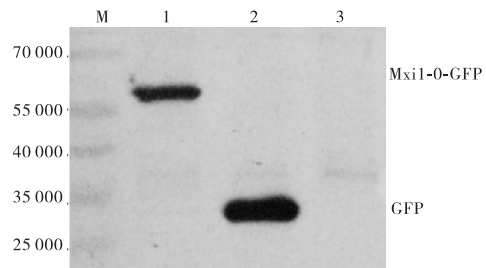


图3 GFP在转染的NIH/3T3细胞中的荧光表达

录作用。Mxi1 的氨基末端有 Sin3 结合位点-SID,当 Mxi/Max 二聚体附着至 DNA 的 E-box 后,二聚体上 Mxi 的 Sin3 募集组蛋白去乙酰化酶导致染色体固缩从而抑制转录,干扰 c-MYC 的促转录作用^[2]。Mxi1-0 是 Mxi1 的同型异构体基因^[4-5],两者除第 1 个外显子外,其后连续的 5 个外显子序列完全一致,均有 Sin3 结合位点-SID。研究^[6-7]表明,Mxi1-0 虽



M:蛋白标准; 1: pEGFP-N1-Mxi1-0 转染组; 2: pEGFP-N1 空载体转染组; 3: 未转染组

图4 EGFP重组蛋白在NIH/3T3细胞中的表达

然可以和 Max 形成异源二聚体并募集 Sin3,但是它并不能像 Mxi1 一样抑制 c-MYC 依赖性的转录,提示 Mxi1-0 可能与 Mxi1 有着不同的生物学功能。

蛋白质分子在细胞内的定位决定该分子能否发挥活性及功能的特异性,增加细胞中 Mxi1-0 的表达并了解其亚细胞定位情况是必要且势在必行的。本研究课题的前期生物信息学分析提示 Mxi1-0 可能

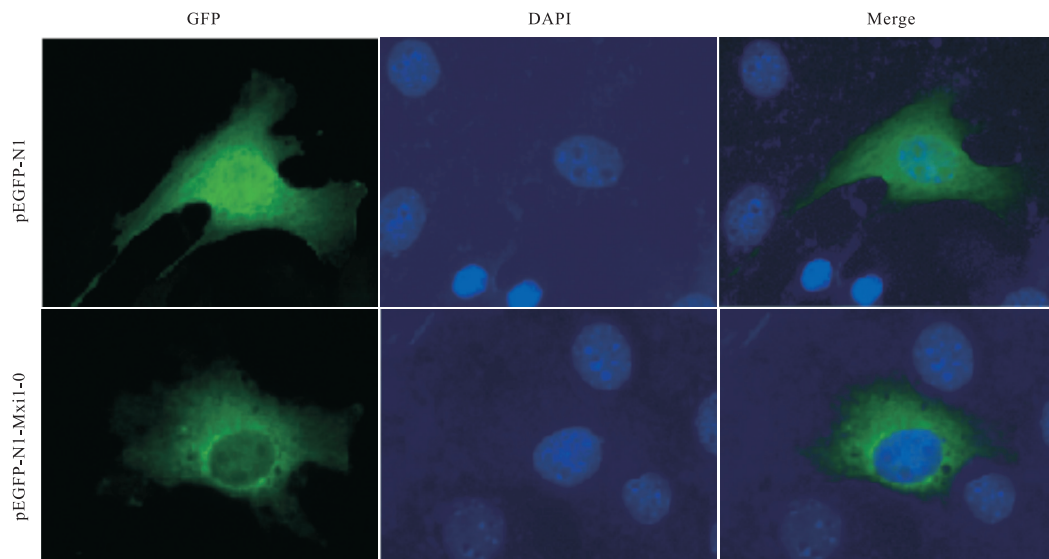


图5 Mxi1-0在NIH/3T3细胞中的定位

定位于细胞质,故 Mxi1-0 不一定如 Mxi1 一样定位于细胞核。为明确并验证其亚细胞定位情况,本研究选用 pEGFP-N1 为载体,将 Mxi1-0 基因插入 pEGFP-N1 载体中,通过酶切测序等验证,成功构建真核表达载体 pEGFP-N1-Mxi1-0,并将其以脂质体介导的方法体外瞬时转染 NIH/3T3 细胞,转染后利用荧光显微镜观察,可见转染 pEGFP-N1 空载体的 NIH/3T3 细胞,其 GFP 蛋白弥漫分布于整个细胞;而转染 pEGFP-N1-Mxi1-0 重组质粒的 NIH/3T3 细胞,其融合蛋白则集中表达于细胞质,这与我们前期的生物信息学分析结果相符。

总之,我们利用基因克隆技术成功构建了含 Mxi1-0 基因的真核表达载体 pEGFP-N1-Mxi1-0,并转染至 NIH/3T3 细胞,结果提示 Mxi1-0 在 NIH/3T3 细胞中可能主要在细胞质中发挥作用。pEGFP-N1-Mxi1-0 载体的成功构建为该基因的进一步生物学作用研究奠定了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Gallant P. Myc/Max/Mad in invertebrates: the evolution of the Max network[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 302(1): 235 - 253.
- [2] Grinberg AV, Hu CD, Kerppola TK. Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(10): 4294 - 4308.
- [3] Dugast-Darzacq C, Purity M, Blanck JK, *et al.* Mxi1-SR α : a novel Mxi1 isoform with enhanced transcriptional repression potential [J]. *Oncogene*, 2004, 23(55): 8887 - 8899.
- [4] Engstrom LD, Youkilis AS, Gorelick JL, *et al.* Mxi1-0, an alternatively transcribed Mxi1 isoform, is overexpressed in glioblastomas[J]. *Neoplasia*, 2004, 6(5): 660 - 673.
- [5] Armstrong MB, Mody RJ, Ellis DC, *et al.* N-Myc differentially regulates expression of MXI1 isoforms in neuroblastoma [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(12): 1363 - 1370.
- [6] Dugast-Darzacq C, Grange T, Schreiber-Agus NB. Differential effects of Mxi1-SR α and Mxi1-SR β in Myc antagonism[J]. *FEBS J*, 2007, 274(17): 4643 - 4653.
- [7] Delpuech O, Griffiths B, East P, *et al.* Induction of Mxi1-SR β by FOXO3a contributes to repression of Myc-dependent gene expression[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(13): 4917 - 4930.

(本文编辑 刘畅)

医学论文设立对照的方法(三)

3 同时自身对照

前面所述各种对照,除了前后对照可以在自身进行外,其他对照都要在不同的个体或群体之间进行。同时自身对照是一种难得的常见对照方法,因其在同一个体上进行,误差可较小。