

杜氏盐藻核基质结合区结合蛋白的细胞定位

王鹏举¹, 王天云², 冯英才¹, 刘红涛¹, 薛乐勋^{1*}

(1. 郑州大学 细胞生物学研究室, 郑州 450052; 2. 新乡医学院 生物化学与分子生物学教研室, 河南 新乡 453003)

摘要: 为研究核基质结合区结合蛋白的功能及调控机制, PCR 扩增杜氏盐藻 MBP 的 cDNA 全长序列及 N 端和 C 端序列, 与绿色荧光蛋白基因融合构建真核表达载体, 脂质体转染 CHO 细胞, Western blotting 和荧光显微镜检测基因表达情况和细胞定位。结果显示: MBP 及 N 端和 C 端融合蛋白成功在 CHO 细胞表达, MBP 和 C 端部分定位于细胞核且聚集于核仁, N 端部分分布整个细胞, 说明 MBP 定位于细胞核且细胞定位信号位于 C 端, MBP 可能与 rRNA 前体结合发挥作用。

关键词: 杜氏盐藻; 核基质附着区; 核基质结合区结合蛋白; 真核表达载体; 细胞定位

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)01-0055-04

Cellular localization of MAR binding protein of *Dunaliella salina*

WANG Peng-Ju¹, WANG Tian-Yun², FENG Ying-Cai¹,
LIU Hong-Tao¹, XUE Le-Xun^{1*}

(1. Laboratory of Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)

Abstract: To study the function of Matrix attachment region (MAR) binding protein (MBP), full length, N-terminal and C-terminal of MBP gene from *Dunaliella salina* were amplified by RT-PCR, and fused to the green fluorescence protein gene to construct the eukaryotic vector. Then, the recombinant vectors were transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells by Lipofectamine 2000. Fluorescence microscope and western blotting were performed to determine the expression of the fusion proteins and cellular localization. The results showed that the fusion proteins were expressed in CHO cells, the proteins of MBP and C-terminal part were localized in the nucleus and clearly detected in nucleoli, however, the N-terminal part was distributed into all cells.

Key words: *Dunaliella salina*; matrix attachment region; MAR binding protein; eukaryotic expression; cellular localization

核基质结合区 (matrix attachment region, MAR) 或核骨架结合区 (scaffold attachment region, SAR) 是富含 AT 碱基对的非编码序列, 作为一种边界元件对染色体组装有重要的作用, 而且将 MAR 构建到外源基因表达盒两侧时, 能提高外源基因的转录和表达水平 (王天云等, 2005; Brouwer

等, 2002; Sidorenko 等, 2003; Ascenzi 等, 2003), 但目前关于 MAR 的调控机制还不清楚。序列特异性 DNA 通过其结合蛋白在细胞内行使着基因表达调控的作用, MAR 作为一种顺式 DNA 调控元件, 必需与反式作用蛋白因子结合才能发挥其调控作用。因此, 研究 MAR 结合蛋白 (MAR binding protein,

收稿日期: 2007-09-30 修回日期: 2008-10-22

基金项目: 科技部国际科技合作项目 (2007DFA01240); 国家自然科学基金 (30470030) [Supported by International Science and Technology Cooperation Program of the Ministry of Science and Technology of China (2007DFA01240); the National Natural Science Foundation of China (30470030)]

作者简介: 王鹏举 (1982-), 男, 河南西平人, 在读硕士, 研究方向为细胞生物学, (E-mail) wangpj506@163.com。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: xuelx@371.net)

MBP)对研究 MAR 在基因表达中的调节作用有着重要的意义。目前 MBP 的研究主要集中在烟草、番茄、玉米、豌豆等高等绿色植物,一些研究发现 MBP 定位于细胞核(Meier 等,1996;Morisawa 等,2000)。高等植物存在器官组织分化问题,不同的分化组织中细胞基因表达的方式和种类不同,MAR 序列及其结合蛋白也可能存在差别。杜氏盐藻是一种单细胞真核藻类,光合自养,抗逆性极强,无细胞壁,是研究 MAR 及其调控机制的良好材料。前期的研究中,我们从盐藻分离出 3 个能显著提高外源基因表达的 MAR 序列(王天云等,2007;Wang 等,2005,2007),并且分离出 MBP 基因(GenBank accession no.:DQ124215)。本研究在前期研究基础上,根据 GenBank 上登录的杜氏盐藻 MBP 基因 cDNA 序列全长,PCR 扩增序列全长序列以及 N 端和 C 端序列,命名为:MBP,MBPN,MBPC,构建载体 pEGFP-MBP、pEGFP-MBPN、pEGFP-MBPC,研究其在中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary, CHO)中的表达水平和细胞定位,结果成功在 CHO 细胞中表达该蛋白,表达的 MBP 和 C 端序列定位于细胞核,N 端定位于整个细胞,说明 MBP 的细胞定位信号存在于 C 端,这为进一步研究盐藻 MBP 的功能打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)(UTEX 1644)购自美国德州大学;*E. coli* JM109, pEGFP-C1 质粒由本实验室保存;CHO 购自中国典型培养物保藏中心。胎牛血清购自天津 TBD 公司,F12/DMEM 培养基和胰酶购自 HyClone 公司,pMD18-T 载体,各种工具酶、均购自 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂 TRIZOL 和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;各种抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DNA Marker、蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司。引物合成及测序由上海生工公司完成。

1.2 方法

1.2.1 盐藻细胞的培养 盐藻细胞以 5×10^5 mL⁻¹ 的接种量接种在 Ben-Amotz 培养基中,在 26 °C 条件下光照培养(Ben-Amotz 等,1989),光照强度 81 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光暗周期各 12 h。

1.2.2 MBP 基因的克隆及载体的构建 根据 Gen-

Bank 上登录杜氏盐藻 MBP cDNA 序列设计 4 条引物,全长上游引物 P1:5'-CGG AAG CTTGG ATG GTT CTC GTC TTG TTC GAG AC-3',下游引物 P2:5'-CGG GAA TTC TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTC AGC GGC CTT CTT CTT CTT-3',C 端上游引物:PC:5'-CGG AAG CTT ATG CCC TAC GAC AAG ACC AAG C-3',N 端下游引物:PN:5'-CGG GAA TTC TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG GGA TCC ACG CGC GGG CTG CTC CTT GC-3',划线部分分别为引入的 Hind III、EcoRI 酶切位点及六个 His 标签,其中 P1 和 P2,P1 和 PN,PC 和 P2 分别构成 MBP,MBPN,MBPC 的上下游引物。

TRIZOL 试剂提取杜氏盐藻总 RNA,AMV 逆转录酶合成 cDNA 第一链。因目的片段 GC 含量较高,用 2×GC buffer I(或者 2×GC buffer II)扩增。PCR 扩增条件:94 °C 2 min;94 °C 40 s,62 °C 30 s,72 °C 2 min,30 个循环,72 °C 10 min。1%的琼脂糖凝胶电泳检测。以 Hind III、EcoRI 双酶切目的基因片段,T4 连接酶连接到用同样双酶切的 pEGFP-C1 载体上。转化大肠杆菌 JM109,提取质粒酶切鉴定。

1.2.3 转染 CHO 细胞 将 2×10^5 /mL CHO 细胞接种于 6 孔板上,F12/DMEM 新鲜培养基过夜培养。按脂质体 Lipofectamine 2000 说明书分别转染 pEGFP-C1、pEGFP-MBP、pEGFP-MBPN、pEGFP-MBPC,阴性对照孔则加入 500 μL 无血清培养液。37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后收集细胞。

1.2.4 细胞定位 用日本 Nikon 公司显微荧光摄像/照相系统检测杜氏盐藻的 MBP 的融合蛋白的细胞定位。观察绿色荧光的荧光滤色块参数为:Excitation Filter 435/10(MBE34232),Dichroic Mirror DM455 (MBE34270),Barrier Filter NBA480 (MBE34535)。

1.2.5 Western blotting 检测 空转染质粒提取的蛋白和重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳之后,将胶上的蛋白通过半干转的方式转移到硝酸纤维素膜上,用鼠抗组氨酸标签的抗体为一抗,山羊抗鼠抗体为二抗进行 Western blotting 分析,并用 β -actin 作对照。

2 结果

2.1 MBP 基因的克隆及载体的鉴定

PCR 结果显示,扩增出的 DNA 特异条带片段大小约在 1 600、1 200、400 bp,与预期结果相符(图

1)。将扩增出的片段回收、纯化,连接 pMD18-T 载体并测序,结果 BLAST 分析,与 GenBank 登录序列完全一致。对构建的阳性表达载体用双酶切及测序进行鉴定,读码框正确。

2.2 MBP 的细胞定位

将空质粒和 pEGFP-MBP、pEGFP-MBPN、pEGFP-MBPC 转染 CHO 细胞,24 h 后荧光显微镜下观察。转染空质粒 pEGFPC1 和 pEGFP-MBPN 的 CHO 细胞,绿色荧光分布在整个细胞,而转染 pEGFP-MBP 和 pEGFP-MBPC 重组质粒的 CHO 细胞,绿色荧光定位于细胞核且聚集于核仁(图 2)。

2.3 重组蛋白的 Western blotting 分析

用鼠抗组氨酸标签的抗体作为一抗,山羊抗小鼠 IgG 抗体作为二抗进行 Western blotting 分析,

同时用 β -actin 作阳性对照。结果显示在 90~117、49~90、35~49 KD 处有特异条带,证明含有 6 个组

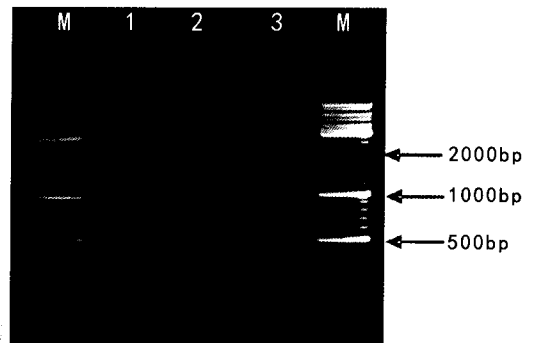


图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of PCR

1,2,3:扩增的目的片段(The products of PCR); M;DNA marker

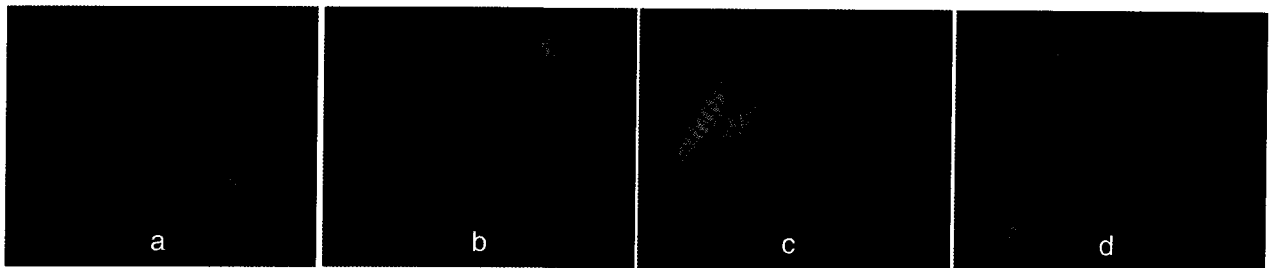


图 2 MBP 细胞定位结果

Fig. 2 The results of cellular localization of MBP

a,c:转染空质粒 pEGFPC1 和重组质粒 pEGFPC-MBPN,绿色荧光分布整个细胞($\times 400$);

b,d:转染重组质粒 pEGFPC-MBP 和 pEGFPC-MBPC,绿色荧光定位于细胞核($\times 400$)。

a,c: Transfection of pEGFPC1 and pEGFPC-MBPN, green fluorescence was distributed into all cells;

b,d: Transfection of pEGFPC-MBP and pEGFPC-MBPC, MBP was localized in the nucleus.

氨酸标签的融合蛋白已经表达(图 3)。

3 讨论

MAR 是真核生物染色质上的一段富含 A/T 的 DNA 序列,近年来研究发现,MAR 能使染色质形成环状结构,还可以作为 DNA 复制的起始点或调控基因的转录。将 MAR 构建载体能提高外源基因的表达水平,降低转化体之间表达水平的差异(王天云等,2005),但不同的 MAR 序列对基因表达水平的影响不同,并且关于 MAR 的调控机制还不清楚。研究 MAR 的调控功能必须分离和研究 MBP。目前一些 MBP 已经从植物中克隆出来,它们被分为 MFP (Meier 等,1996),AHM (Morisawa 等,2000)和 Nop 家族等。还有一些蛋白质,如:高迁移



图 3 Western blotting 结果

Fig. 3 The results of Western blotting

1,pEGFPC1; 2,3,4 依次为 MBP、MBPN、MBPC 的融合蛋白; 5,6,7,8; β -actin。

Lane 1, the cell extract of CHO transfected using pEGFPC1. Lane 2,3 and 4, the cell extracts of CHO expressing MBP, MBPN, MBPC fusion proteins, respectively. Lane 5,6,7 and 8: the positive control β -actin.

率非组蛋白,组蛋白 H1 和 nucleoin 也属于 MBP。

前期研究中,我们分离出 3 个杜氏盐藻 MAR

及 MBP, 研究发现杜氏盐藻 MBP 同 Nop5/Sik 家族中其他成员一样 C 端含有多个 KKK 基序, 并且和来自酵母的 Nop5 类蛋白的一级序列很相似, 且其中有很多长于 10 个氨基酸残基的共有模体如 LLDDLDKELNTYAMRVREWYGFHFPE 模体。为进一步研究杜氏盐藻 MBP 经过 BLAST 分析, 杜氏盐藻 MBP 含有 Nop 家族的结构域。因此, 本文的 MBP 可能属于 Nop 家族。有研究表明, Nop 家族中的组分如 Nop1p 和 Nop5p(Nop58p) 是小核仁核糖蛋白复合体(snoRNP)的组分与 RNA 的剪切相关。Nop5 类 MBP 已经被证实和 rRNA 前体结合(Gautier 等, 1997)。豌豆中的 Nop58 类 MBP 能结合 MAR DNA(Hatton 等, 1999)。

为进一步研究杜氏盐藻 MBP 的功能, 本实验构建了盐藻 MBP 真核表达载体并在 CHO 细胞中进行基因表达定位, 结果显示盐藻 MBP 主要在细胞核中表达。考虑到本实验中表达的绿色荧光蛋白融合蛋白清楚地定位于细胞核和与 Nop5 类 MBP 的结构相似性, 可能杜氏盐藻 MBP 也参与 rRNA 的加工。作为细胞核的蛋白质分子进入细胞核通常拥有一个单价或双价的由碱性氨基酸组成的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)。它可以结合在特定的 NLS 受体 importin- α 上从而进入细胞核(Fagerlund 等, 2002)。烟草中的 Nop5 类 MBP 在 C 末端含有一个由碱性氨基酸组成的核定位序列(Fujiwara 等, 2002), 本实验显示杜氏盐藻 MBP 定位于细胞核且 C 末端也富含碱性氨基酸, 且根据 <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/> 在线预测, PKKKKKE 和 KKKAEAGAADGGAAE-EAPKKKKK 为核定位信号序列。其中 PKKKKK 与第一个被确定的病毒 SV40 的 T 抗原的 NLS (PKKKRKV)(Dingwall 等, 1982) 相似。下一步实验是缺失突变或关键碱性氨基酸残基点突变后的蛋白突变体是否改变原有的野生型蛋白的定位模式, 进一步确定这个潜在核定位信号与核转运受体蛋白交互作用的结构基础。

致谢 本工作在河南省分子医学重点学科开放实验室完成, 特此感谢!

参考文献:

Ascenzi R, Ulker B, Todd JJ, et al. 2003. Analysis of trans-silencing interactions using transcriptional silencers of varying strength and targets with and without flanking nuclear matrix

- attachment regions[J]. *Transgenic Res*, **12**(3):305-318
- Ben-Amotz A, Shaish A, Avron M. 1989. Mode of action of the massively accumulated beta-Carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation[J]. *Plant Physiol*, **91**:1 040-1 043
- Brouwer C, Bruce W, Maddock S, et al. 2002. Suppression of transgene silencing by matrix attachment regions in maize: a dual role for the maize 5' ADH1 matrix attachment region[J]. *Plant Cell*, **14**:2 251-2 264
- Dingwall C, Sharnick SV, Laskey RA. 1982. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus[J]. *Cell*, **30**:449-458
- Fagerlund R, Melen K, Kinnunen L, et al. 2002. Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin $\alpha 5$ [J]. *J Biol Chem*, **277**(33):30 072-30 078
- Fujiwara S, Matsuda N, Sato T, et al. 2002. Molecular properties of a matrix attachment region-binding protein located in the nucleoli of tobacco cells[J]. *Plant Cell Physiol*, **43**(12):1 558-1 567
- Gautier T, Bergès T, Tollervy D, et al. 1997. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, **17**:7 088-7 098
- Hatton D, Gray JC. 1999. Two MAR DNA-binding proteins of the pea nuclear matrix identify a new class of DNA-binding proteins[J]. *Plant J*, **18**:417-429
- Meier I, Phelan T, Gruissem W, et al. 1996. A novel plant filament-like protein with affinity for attachment region DNA[J]. *Plant Cell*, **8**:2 105-2 115
- Morisawa G, Han-yama A, Moda I, et al. 2000. AHM1, a novel type of nuclear matrix-localized, MAR binding protein with a single AT hook and a J domain-homologous region[J]. *Plant Cell*, **12**:1 903-1 916
- Sidorenko L, Bruce W, Maddock S, et al. 2003. Functional analysis of two matrix attachment region(MAR) elements in transgenic maize plants[J]. *Transgenic Res*, **12**(2):137-154
- Wang TY, Hou WH, Chai YR, et al. 2005. Nuclear matrices and matrix attachment regions from Green alga: *Dunaliella salina* [J]. *Acta Genet Sin*, **32**(12):1 312-1 318
- Wang T, Xue L, Hou W, et al. 2007. Increased expression of transgene in stably transformed cells of *Dunaliella salina* by matrix attachment regions[J]. *Appl Microbiol Biotech*, **76**(3): 651-657
- Wang TY(王天云), Tian F(田芳), Zhang SL(张胜利), et al. 2005. Matrix attachment regions increased stable integrated CAT reporter gene expression level in NIH3T3 cell(核基质结合区提高稳定整合的 CAT 报告基因在 NIH3T3 细胞中的表达)[J]. *Chin J Cell Biol*(细胞生物学杂志), **27**(2):183-186
- Wang TY(王天云), Xue LX(薛乐勋), Ji X(姬祥), et al. 2007. Matrix attachment region increased reporter gene expression in stably transformed *Dunaliella salina*(核基质结合区提高报告基因在稳定转化的杜氏盐藻中的表达)[J]. *Chin J Biochemistry Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学学报), **23**(8):692-695