

◇ 基础医学研究 ◇

肌营养不良蛋白及其衍生物的表达与定位的研究

钱 成, 王蓓华, 徐雪琴, 潘林鑫, 李新颖, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 研究肌营养不良蛋白(DG)及其衍生物 α -DG、 β -DG在真核细胞内的表达与定位。方法 构建pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG和pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 3个真核表达质粒,并分别转染至HEK 293T细胞中;提取总蛋白,Western blot检测表达情况;分别转染至COS7细胞,在荧光显微镜下观察细胞定位情况。结果 成功构建了带有DAG1、DAG1 α 、DAG1 β 基因的真核表达载体,且在HEK 293T细胞中都能有效表达,在COS7细胞中主要分布于细胞质。结论 DG及其衍生物 α -DG、 β -DG在HEK 293T、COS7细胞中均有表达,主要分布在细胞质内,为进一步了解DAG1的功能提供了细胞学基础。

关键词 DAG1; 转染; 基因表达; 定位

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1207-04

肌营养不良是一种临床上比较常见的原发性骨骼肌坏死性疾病,多由遗传因素所导致;以进行性肌无力和运动肌肉变性为典型特征,临床上主要表现为不同程度的进行性加重的骨骼肌萎缩和无力^[1-2]。与肌营养不良发病有关的蛋白称为肌营养不良蛋白(dystroglycan, DG),其是许多细胞外基质分子的受体^[3]。人类的DG是由单一基因DAG1编码,该基因位于染色体3p21上,编码895个氨基酸;DG由位于细胞外的 α -DG和跨膜的 β -DG两个亚基组成^[4]。该研究构建下游带有FLAG标签的pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG、pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG的真核表达质粒,分别转染至HEK 293T和COS7细胞中,研究它们在真核细胞内的表达和定位情况。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 含人DAG1全长cDNA序

2015-03-13 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81201368)

作者单位:安徽医科大学生命科学院生物教研室,合肥 230032

作者简介:钱 成,女,硕士研究生;

刘晓颖,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: liuxi-aoying@ahmu.edu.cn

范礼斌,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

列的质粒由韩家淮院士惠赠;pcDNA3.1真核表达载体、TG1感受态菌株、HEK 293T和COS7细胞株均由本实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器 引物由上海生工生物工程有限公司合成;DNA Polymerase 酶购自日本TaKaRa公司;BamH I、Xba I限制性内切酶、T4 DNA连接酶及Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker均购自加拿大Fermentas公司;AxyPrep DNA Gel Extraction Kit与试剂盒购自美国Axygen公司;DMEM培养基与胎牛血清购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;Lipofectamine 2000 Reagent、Opti-MEM Reduced serum Medium购自美国Invitrogen公司;Western及IP细胞裂解液和一抗、二抗稀释液均购自上海碧云天公司;Monoclonal anti-FLAG M2一抗购自美国Sigma公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG和山羊抗小鼠IgG/TRITC均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL显色试剂盒购自美国Pierce公司;荧光显微镜(Leica DMI 6000型)购自德国Leica公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建 参考文献^[5],设计下游带FLAG标签的DAG1及DAG1 α 和DAG1 β 的引物(表1,带下划线的部分为FLAG标签序列),应用PCR的方法从含人DAG1全长cDNA序列的质粒中扩增出DAG1及其DAG1 α 和DAG1 β ,通过琼脂糖电泳和试剂盒回收,得到其PCR产物;用限制性内切酶EcoR I和Xba I对pcDNA3.1载体和PCR产物分别进行双酶切,用T4 DNA连接酶16℃连接约12 h,转化TG1感受态细胞;待长出克隆后(约10 h),挑取单克隆进行摇菌,37℃恒温培养10 h后抽提质粒,并用EcoR I和Xba I进行酶切鉴定;选择1管鉴定正确的质粒送公司测序。

1.3.2 细胞培养 蛋白表达实验中,对HEK 293T细胞进行正常传代,并重新接种适当密度的细胞至培养皿中,继续培养约24 h后进行转染。在荧光定位实验中,取一片盖玻片(已经过高压蒸汽灭菌处理)放入培养皿中,加入适当浓度的多聚赖氨酸溶液浸泡约5 min,然后弃去溶液,充分晾干,同时,对

COS7 细胞进行正常传代,并接种适当密度至含有盖玻片的培养皿中,待转染。37 ℃,5% CO₂ 培养过夜。

表1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')
DAG1	F: GGAATTCCATGAGGATGCTCTGT R: GCTCTAGAGCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGT AGTCAGGTGGGACAT
DAG1 α	F: GGAATTCCATGAGGATGCTCTGT R: GCTCTAGAGCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGT AGTCGCCCCGGGTGAT
DAG1 β	F: GGAATTCCATGTCATCGTCGTCCTTGT R: GCTCTAGAGCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGT AGTCAGGTGGGACAT

1.3.3 质粒转染 蛋白表达实验中,待前1 d重新接种的 HEK 293T 细胞长至 80% ~ 90% 的密度时开始转染。首先分别用 Opti-MEM 稀释质粒和 Lip2000 脂质体,静置 5 min 后,将二者充分混合;静置 20 min 后加入细胞中,继续培养,定时换液;定位实验中,转染时 COS7 细胞只需长至 40% 的密度,转染方法同上,只是质粒的量有所减少。

1.3.4 Western blot 法检测 参考文献^[6],转染后约 48 h,细胞裂解液冰上裂解 HEK 293T 细胞约 0.5 h 后,收集细胞;4 ℃ 14 000 r/m 离心 10 min,收集上清液;取出部分上清液与等量 2 × SDS 上样缓冲液混合,沸水浴 5 min;冰浴冷却后进行垂直电泳(100 V,约 2 h),然后进行湿转(100 V,约 1 h)。取出 PVDF 膜进行丽春红染色以确定转膜是否成功,成功后用 TBST 洗去染液,并用封闭液室温封闭 1 ~ 2 h,TBST 洗膜(5 min,3 次),适当浓度 FLAG 单抗溶液孵育过夜(4 ℃);次日 TBST 洗膜(10 min,3 次),用适当浓度的二抗(HRP 标记)室温孵育 1 h,TBST 洗膜(20 min,3 次)后进行暗室显影。

1.3.5 免疫荧光 参考文献^[7],转染后约 24 h,轻轻取出 COS7 细胞爬片,用 PBS 清洗残留的培养基后,滴加甲醇(-20 ℃ 冷藏)固定细胞 2 ~ 3 min,继续用乙醇(70%)固定细胞 5 min。PBS 清洗细胞(5 min,3 次),然后用 BSA 封闭 30 ~ 60 min;并用 FLAG 单抗室温孵育 1.5 ~ 2 h,然后用封闭液清洗细胞(5 min,3 次)。用 TRITC 荧光标记的二抗室温孵育 1 h,PBS 清洗细胞(5 min,4 次);再用 DAPI 溶液室温染核 2 ~ 3 min,PBS 清洗细胞(5 min,4 次);最后用封片胶将盖玻片的细胞面封于洁净的载玻片上,4 ℃ 保存待观察。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -

FLAG、pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 真核表达载体的构建 对抽提的质粒 pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG、pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 分别进行 EcoR I 和 Xba I 双酶切鉴定,结果如图 1 所示;以上质粒都被切出两条亮带,经过 Marker 和 PCR 产物的横向比较,发现 1 条亮带大小约为 5 400 bp,与载体 pcDNA3.1 的大小基本一致;另一条分别与各自的目的片段大小一致(DAG1-2 688 bp、DAG1 α -1 959 bp、DAG1 β -729 bp),表明连接成功,后续的测序结果表明质粒构建正确。

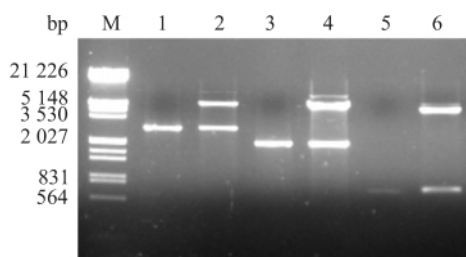


图1 重组质粒 pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG、pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 的酶切鉴定

M: Marker; 1: DAG1 的 PCR 产物; 2: pcDNA3.1-DAG1-FLAG 的酶切鉴定产物; 3: DAG1 α 的 PCR 产物; 4: pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG 的酶切鉴定产物; 5: DAG1 β 的 PCR 产物; 6: pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 的酶切鉴定产物

2.2 DAG1 及其蛋白在哺乳动物细胞中的表达情况 Western blot 结果显示转染了 pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG、pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 的 HEK 293T 细胞裂解液都能检测到条带,通过与预染的蛋白 Marker 对比,过表达 pcDNA3.1-DAG1-FLAG 组的条带大小约为 115 ku,过表达 pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG 组的条带大小约为 75 ku,过表达 pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 组的条带大小约为 40 ku,各条带大小分别与 DG、 α -DG 和 β -DG 的蛋白分子量基本一致;而转染了 pcDNA3.1 空载体的 HEK 293T 细胞裂解液中均未检测到条带,表明 DG 及其 α -DG 和 β -DG 在 HEK 293T 细胞中能够正常表达。见图 2。

2.3 DAG1 及其 DAG1 α 和 DAG1 β 在 COS7 细胞中的定位 细胞爬片经过 TRITC 染色后,通过荧光显微镜($\times 1\ 000$)拍摄 pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG、pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 在 COS7 细胞中的定位情况,结果表明 3 者均主要定位在细胞质中,细胞核内几乎没有,且在细胞质中靠近核膜一侧的定位更加明显。见图 3。

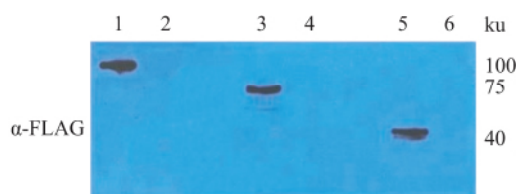


图2 Western blot 检测 DG、 α -DG 和 β -DG 蛋白表达

1、3、5: 分别转染 pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG、pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 的 HEK 293T 细胞裂解液; 2、4、6: 都转染 pcDNA3.1 的 HEK 293T 细胞裂解液

3 讨论

本研究通过构建 pcDNA3.1-DAG1-FLAG、pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG、pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG 的真核表达质粒, 并将其分别转染至 HEK 293T、COS7 等真核细胞内; 利用 Western blot 和间接免疫荧光技术, 研究 DG 及其 α -DG、 β -DG 在真核细胞内的表达和定位情况; 考虑到有文献^[8]报道标签在上游有可能对蛋白表达产生一定影响, 所以在基因的下游引入了 FLAG 标签。在做蛋白表达实验时, 转染 48 h 后开始收细胞, 并对细胞裂解液进行 Western blot 分析, 结果表明 DG、 α -DG 和 β -DG 都能正常表达, 且 DG 和 β -DG 表达的蛋白大小与文献^[9]报道的一致, DG 约为 115 ku, β -DG 约为 43 ku, 而 α -DG 表达的蛋白大小约为 72 ku, 这与其 cDNA 序列预测的分子

量大小一致, 并未发现文献^[9]报道的 α -DG 因糖基化等修饰导致蛋白, 这可能与所用的细胞系不同有关, 所以在接下来可以选择其他细胞系或组织进行对比研究。在做荧光定位的实验中, 选用甲醇溶液作为固定剂, 因为其固定时间快、细胞收缩小、细胞核保存完整、结构清晰、染色鲜艳、且对抗原有一定的保护作用, 但其对人体和细胞有一定的毒性, 所以固定时间不宜过久。荧光显微镜拍摄结果显示, DG、 α -DG 和 β -DG 蛋白主要均定位在细胞质中, 而且在细胞质中靠近核膜的一侧表达量明显高于其他区域; 根据位置推测, 可能与内质网和高尔基体有着密切关系, 所以今后可利用内质网染料刀豆球蛋白 A 和高尔基体染料麦胚凝集素对 DG、 α -DG 和 β -DG 蛋白的具体定位进行深入研究。

α -DG 与 β -DG 之间通过非共价键相连, α -DG 是 DG 的胞外区域, 是一种糖基化程度很高的蛋白, 其 N 端与层粘连蛋白相结合; β -DG 是 DG 的跨膜区域, 其抗肌萎缩蛋白或肌营养相关蛋白相结合。在 α -DG 的 C 端存在着酪氨酸序列, 它能够结合位于胞内的多种信号分子, 通过磷酸化酪氨酸激活多种信号转导途径, 参与调节细胞极性、细胞分化以及细胞凋亡等^[11-12]。DG 在医学的很多领域中都有涉及, 如癌症、遗传性疾病、感染等^[13], DG 的表达异常与癌症的发生发展以及转移侵袭都有着密不可分的

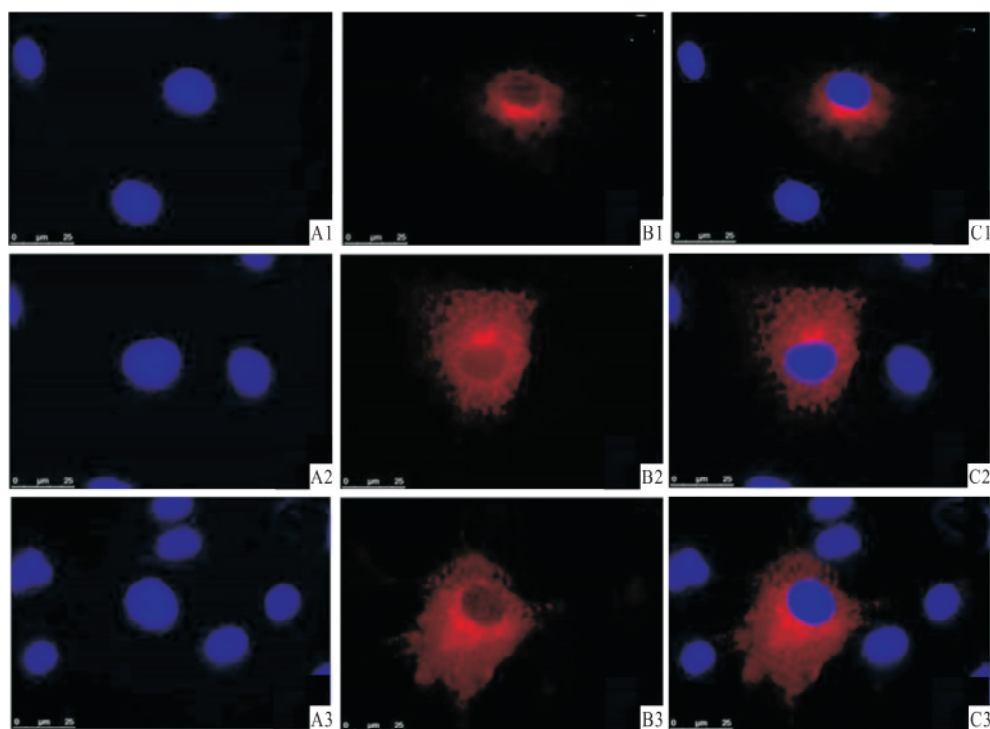


图3 DG 及其 α -DG 和 β -DG 蛋白在 COS7 细胞中的定位 $\times 1\ 000$

A: DAPI 染色示细胞核; B: TRITC 标记的目的蛋白的定位; C: A 和 B 叠加图; 1: DG; 2: α -DG; 3: β -DG

联系^[14]。在乳腺癌和直肠癌的组织中,发现 α -DG的蛋白表达量显著低于正常的上皮细胞,而且 β -DG也发生了异常表达。在前列腺癌中,随着肿瘤的发展,也发现了 α -DG的蛋白表达量逐渐降低的现象。在癌症组织中, α -DG的表达量降低通常和高增殖指数、高肿瘤分期、低成活率有着密切的关系。另外,许多肌营养不良症与 α -DG的翻译后加工缺陷有关,研究^[15]表明,肢带型肌营养不良和重度精神发育迟缓与DAG1的一个突变体(T192M)有着密切的关系。

本实验分别研究了DG及其 α -DG、 β -DG在真核细胞内的表达和定位情况,结果表明DG及其 α -DG、 β -DG在HEK 293T细胞中能够正常表达,在COS7细胞中主要定位在细胞质中,这将为本课题组以后研究蛋白质的相互作用提供依据。

参考文献

- [1] Gintjee T J, Magh A S, Bertoni C. High throughput screening in duchenne muscular dystrophy: from drug discovery to functional genomics[J]. *Biology (Basel)*, 2014, 3(4): 752–80.
- [2] Bushby K, Finkel R, Birnkrant D J, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis and pharmacological and psychosocial management [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(1): 77–93.
- [3] Winder S J. The complexities of dystroglycan[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(2): 118–24.
- [4] Winder S J. The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 1997, 18(6): 617–29.
- [5] 潘林鑫,李新颖,徐南,等. 人RB1及其突变体的表达与定位[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(8): 853–8.
- [6] 乔正,赵健,潘林鑫,等. 人RACK1蛋白在HEK-293T和BL21细胞中的表达及COS7细胞的定位[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9): 1189–92.
- [7] 李春雨,潘林鑫,刘晓颖,等. 人类胞内氯离子通道蛋白3在原核细胞及真核细胞内的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9): 1202–5.
- [8] 巨红妹,张霞,王云华. 新型蛋白标签在分子生物学中的应用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2011, 6(8): 632–4.
- [9] Herzog C, Has C, Franzke C W, et al. Dystroglycan in skin and cutaneous cells: beta-subunit is shed from the cell surface[J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122(6): 1372–80.
- [10] Dekkers L C, van der Plas M C, van Loenen P B, et al. Embryonic expression patterns of the Drosophila dystrophin-associated glycoprotein complex orthologs[J]. *Gene Expr Patterns*, 2004, 4(2): 153–9.
- [11] Sgambato A, Brancaccio A. The dystroglycan complex: from biology to cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 205(2): 163–9.
- [12] Spence H J, Chen Y J, Batchelor C L, et al. Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by beta-dystroglycan[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(15): 1657–68.
- [13] Michele D E, Campbell K P. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18): 15457–60.
- [14] Brennan P A, Jing J, Ethunandan M, et al. Dystroglycan complex in cancer[J]. *Eur J Surg Oncol (EJSO)*, 2004, 30(6): 589–92.
- [15] Godfrey C, Foley A R, Clement E, et al. Dystroglycanopathies: coming into focus[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2011, 21(3): 278–85.

The localization and expression of dystroglycan and its derivative

Qian Cheng, Wang Beihua, Xu Xueqin, et al

(Dept of Biology Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression and localization of DG and its derivative α -DG, β -DG in eukaryotic cells. **Methods** To construct three eukaryotic expression plasmids pcDNA3.1-DAG1-FLAG, pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG and pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG. The plasmids were transfected into HEK 293T cells respectively and the expression was checked by Western blot. Their expressions in COS7 cells were detected by fluorescence microscopy. **Results** The expression plasmids of pcDNA3.1-DAG1-FLAG, pcDNA3.1-DAG1 α -FLAG and pcDNA3.1-DAG1 β -FLAG were constructed successfully, which could be effectively expressed in HEK 293T and COS7 cells, and the localization of (DG and α -DG, β -DG) mainly in the cytoplasm. **Conclusion** DG and its derivative α -DG, β -DG can express efficiently in HEK 293T and COS7 cells, and all of them are mainly distributed in the cytoplasm, which provide cellular basis to further understand the function of DAG1 gene.

Key words DAG1; transfection; gene expression; localization