

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00780

• 研究快报 •

野生型和突变型小鼠动力蛋白激活蛋白1真核表达载体的构建及其在小鼠足细胞中的表达

王春花^{1△}, 李林^{2△}, 傅鹏¹, 李金花^{1,3}, 原爱红^{1*}, 孙向华⁴, 蒋晓峰¹, 余晨^{1*}

1. 同济大学附属同济医院肾内科, 上海 200065
2. 第二军医大学长征医院肾内科, 上海 200003
3. 江西省九江市中医医院肾六科, 九江 332000
4. 同济大学附属同济医院中心实验室, 上海 200065

[摘要] **目的** 构建野生型和突变型小鼠动力蛋白激活蛋白1(dynactin-1)真核表达载体,并观察其在小鼠足细胞中表达。**方法** 以总RNA反转录合成的cDNA为模板,通过PCR扩增得到小鼠dynactin-1的全长cDNA,将该片段克隆到真核表达载体pcDNA3.1(+)-FLAG和pEGFP-N1;利用部位特异性突变插入方法构建突变型表达载体,经酶切和测序鉴定;各载体转染小鼠足细胞MPC5后,用蛋白质印迹分析法和免疫荧光显微镜法检测dynactin-1蛋白表达。**结果** PCR扩增得到大小为3.8 kb的小鼠dynactin-1片段,连接到载体后,酶切鉴定电泳结果分别显示pcDNA3.1(+)-FLAG(5.4 kb)、pEGFP-N1(4.7 kb)以及小鼠dynactin-1(3.8 kb)片段,测序分析结果显示克隆的野生型和突变型小鼠dynactin-1序列与数据库序列相同;蛋白质印迹分析法检测到重组dynactin-1的蛋白条带;免疫荧光显微镜观察到dynactin-1主要表达在小鼠足细胞的细胞质。**结论** 成功构建了野生型和突变型小鼠dynactin-1真核表达载体,并在足细胞中表达,为进一步开展细胞生物学研究奠定了实验基础。

[关键词] 动力蛋白激活蛋白1;真核表达载体;足细胞**[中图分类号]** R 349.65 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)07-0780-05

Construction of mouse wide-type and mutant dynactin-1 vectors and their expression in mouse podocytes

WANG Chun-hua^{1△}, LI Lin^{2△}, FU Peng¹, LI Jin-hua^{1,3}, YUAN Ai-hong^{1*}, SUN Xiang-hua⁴, JIANG Xiao-feng¹, YU Chen^{1*}

1. Department of Nephrology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China
2. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
3. The 6th Division of Nephrology, Jiujiang TCM Hospital, Jiujiang 332000, Jiangxi, China
4. Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

[Abstract] **Objective** To construct mouse wide-type and mutant dynactin-1 expression vectors and investigate their expression in mouse podocytes. **Methods** Mouse cDNA was synthesized from mouse total RNA and was used as a template for PCR amplification to obtain full length dynactin-1 cDNA. The DNA fragment was then cloned into pcDNA3.1(+)-FLAG and pEGFP-N1 vector to produce wide-type dynactin-1 vector. The mutant dynactin-1 was obtained by site-direct mutagenesis kit. All the constructs were verified by restriction enzyme digestion, sequenced, and then transfected into mouse podocyte clone 5 (MPC5). Western blotting analysis and immunofluorescence microscopy were employed to determine dynactin-1 protein expression. **Results** The amplified mouse dynactin-1 cDNA fragment was analyzed by agarose gel electrophoresis and a single discrete band of the correct size (3.8 kb) was observed. The vectors containing mouse dynactin-1 were subjected to restriction enzyme digestion and two vector fragments (pcDNA3.1[+]-FLAG(5.4 kb) and pEGFP-N1[4.7 kb] individually) and the 3.8 kb insert fragment were observed by electrophoresis. The result of sequencing showed that the sequence of cloned dynactin-1 was identical to that reported in Genbank. Dynactin-1 protein band with the correct relative molecular weight was detected by Western blotting analysis, and immunofluorescence microscopy showed dynactin-1 protein expression in the cytoplasm of the

[收稿日期] 2012-05-29 **[接受日期]** 2012-06-25**[基金项目]** 上海市自然科学基金(09ZR1434800). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (09ZR1434800).**[作者简介]** 王春花, 硕士生. E-mail: jiaohuazhu@sina.com; 李林, 博士, 主治医师. E-mail: lilin_616@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-66111069, E-mail: aihongyuanxn00@126.com; Tel: 021-66111062, E-mail: yuchen2001@hotmail.com

mouse podocytes. **Conclusion** We have successfully constructed wide-type and mutant dynactin-1 vectors and expressed them in mouse podocytes, which provides a foundation for future research on dynactin-1.

[Key words] dynactin-1; eukaryotic expression vectors; podocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(7): 780-784]

动力蛋白激活蛋白(dynactin)是一个重要的微管相关的马达蛋白,是由5个大小不同亚单位所构成的复合体,它通过激活动力蛋白(dynein)而参与细胞核迁移、有丝分裂纺锤体定位、细胞骨架再组装以及细胞内物质输送等重要的细胞生命活动。动力蛋白激活蛋白1(dynactin-1),又名p150^{Glued},是一种相对分子质量为150 000的动力蛋白激活蛋白重要亚单位^[1]。研究表明,神经元的dynactin-1功能低下是神经变性疾病的直接原因^[2-4]。比较生物学发现神经元和肾小球足细胞在形态、生理功能方面有很多相同点^[5-7]。我们的前期研究(待发表)发现糖尿病肾病中足细胞dynactin-1表达显著下降,提示足细胞dynactin-1功能紊乱与糖尿病肾病发病有关。本研究利用基因重组技术,构建小鼠dynactin-1野生型和突变型真核表达载体,并观察其在小鼠足细胞中的表达,为进一步探究dynactin-1在糖尿病肾病足细胞损伤中的作用奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达质粒pcDNA3.1(+)-FLAG(5.4 kb)和pEGFP-N1(4.7 kb)由日本名古屋大学医学部黄哲博士提供。NEB 5 α 感受态大肠杆菌购自NEB公司,限制性内切酶购自Fermentas(Thermo)公司,快速连接试剂盒购自NEB公司,PfuUltra II高保真DNA聚合酶购自Stratagene(Agilent)公司,SuperScript III反转录酶购自Invitrogen公司,Wizard[®]SV凝胶及PCR纯化系统购自Promega公司,小鼠脊髓总RNA购自Clontech(TaKaRa)公司,小鼠足细胞株MPC5由复旦大学附属华山医院肾内科郝传明教授赠予,位点特异性突变导入试剂盒购自TOYOBO公司,多位点点突变试剂盒购自Stratagene(Agilent)公司,PCR引物由Invitrogen公司合成,转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,兔抗dynactin-1(H300)多克隆抗体购自Santa Cruz公司,小鼠抗FLAG-M2单克隆抗体购自Sigma公司,兔抗 α -tubulin单克隆抗体购自Cell Signaling公司,小鼠抗GAPDH单克隆抗体购自Millipore公司,Alexa Fluor 594标记的驴抗兔IgG二抗购自Invitrogen公司,ECL Prime蛋白质印迹检测系统购自GE Healthcare公司。

1.2 cDNA合成 以Oligo(dT)₁₈为引物,用Su-

perScript III反转录酶将总RNA反转录合成cDNA。
1.3 野生型小鼠dynactin-1载体的构建 以合成的cDNA为模板,用PfuUltra II高保真DNA聚合酶进行PCR扩增。PCR引物(大写划线部分为酶切位点)分别为:mus-dynactin-1-Forward(*Kpn* I):5'-tta aGG TAC Cgc cac cat ggc cca gag cag gag gca-3'; mus-dynactin-1-Reverse(*Xho* I):5'-taa tCT CGA Gat gga gat gag gcg act gtg aag c-3'; mus-dynactin-1-Forward(*Xho* I):5'-tta aCT CGA Ggc cac cat ggc cca gag cag gag gca-3'; mus-dynactin-1-Reverse(*Eco*R I):5'-taa tGA ATT CGg gag atg agg cga ctg tga agc-3'。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,用Wizard[®]SV凝胶及PCR纯化系统回收和纯化PCR产物,然后用*Xho* I和*Eco*R I酶切PCR产物及载体pEGFP-N1,用*Kpn* I和*Xho* I酶切PCR产物及载体pcDNA3.1(+)-FLAG,用快速连接试剂盒进行连接反应。转化感受态大肠杆菌,取阳性克隆菌落抽提质粒,进行*Xho* I-*Eco*R I或*Kpn* I-*Xho* I双酶切鉴定及测序。测序用8个不同阶段的小鼠dynactin-1引物,由CEQ 8000型DNA分析系统(Beckman Coulter公司)进行。所构建的载体命名为pcDNA3.1-FLAG/mus-dynactin-1(wt)或pEGFP-N1/mus-dynactin-1(wt)。

1.4 突变型(G59S)小鼠dynactin-1载体的构建 利用位点特异性突变导入试剂盒把小鼠dynactin-1-cDNA第460个碱基G改变成A,PCR引物(大写划线部分为突变碱基)为:mus-dynactin-1(G59S) primer F:5'-Acg tga ttc tgg atg aag caa aag g-3'; mus-dynactin-1(G59S) primer R:5'-cca ccc att tgc cag tgg caa aga g-3'。用T7引物(5'-taa tac gac tca cta tag gg-3')和CMV-F引物(5'-cgc aaa tgg gcg gta ggc gtg-3')分别对pcDNA3.1-FLAG/mus-dynactin-1(G59S)或pEGFP-N1/mus-dynactin-1(G59S)进行测序。

1.5 表达载体的转染及其表达 用Lipofectamine 2000试剂盒进行细胞转染。实验组用pcDNA3.1-FLAG/mus-dynactin-1(wt或G59S)或pEGFP-N1/mus-dynactin-1(wt或G59S)转染小鼠足细胞MPC5;对照组用pcDNA3.1(+)-FLAG或pEGFP-N1转染MPC5;空白组不转染。各种重组载体转染48 h后,提取总蛋白,进行蛋白质印迹分析,用兔抗dynactin-1(H300)多克隆抗体(1:200)、小鼠抗

FLAG-M2 单克隆抗体(1 : 1 000)、小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1 : 1 000)分别在 4℃ 孵育过夜,HRP 二抗(1 : 5 000)室温孵育 1 h,然后用 ECL Prime 化学发光试剂进行显色,X 光胶片曝光,检测各组蛋白表达;pEGFP-N1/mus-dynactin-1(wt 或 G59S)转染 48 h 后,用 4% 多聚甲醛固定 25 min,0.25% Triton X-100 浸透处理 5 min,5% BSA 溶液封闭 40 min,兔抗 α -tubulin 单克隆抗体(1 : 1 000)4℃ 孵育过夜,Alexa Fluor 594 标记的驴抗兔 IgG 二抗(1 : 1 000)室温孵育 1 h,封片后在荧光显微镜下观察表达与分布情况。

2 结果

2.1 小鼠 dynactin-1 cDNA 片段的 PCR 扩增 以小鼠脊髓 cDNA 为模板,利用含小鼠 dynactin-1 阅读框架(ORF)头尾序列和相应酶切位点的 PCR 引物和 PfuUltra II 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 反应,在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,可见大小为 3.8 kb 的相应目的 DNA 片段。

2.2 重组表达载体的酶切鉴定 用限制性内切酶 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切经纯化后的 PCR 产物和 pcDNA3.1(+)-FLAG,质粒再经脱磷酸后,进行连接反应得到 pcDNA3.1-FLAG/mus-dynactin-1(wt) 载体;用限制性内切酶 *Xho* I、*EcoR* I 双酶切经纯化后的 PCR 产物和 pEGFP-N1,质粒再经脱磷酸后,进行连接反应得到 pEGFP-N1/mus-dynactin-1(wt) 载体。经感受态大肠杆菌转化,筛选阳性克隆后提取质粒,再双酶切和经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,得到目的载体和插入片段(图 1)。

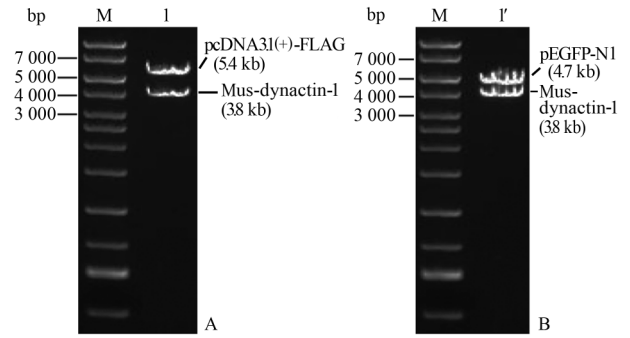


图 1 酶切重组质粒

Fig 1 Restriction endonuclease digestion of the recombinant plasmid

M: Marker; 1: Digestion with *Kpn* I -*Xho* I; 2: Digestion with *Xho* I -*EcoR* I. A: pcDNA3.1-FLAG/mus-dynactin-1(wt); B: pEGFP-N1/mus-dynactin-1(wt)

2.3 重组表达载体的测序鉴定 所构建的载体分别用 8 个不同阶段的小鼠 dynactin-1 引物进行测序,结果与 GenBank 数据库(Accession: NM_007835)进行对比(BLAST),发现有 6 个密码子的突变,因此用多位点点突变试剂盒进行修补,使构建的序列与 GenBank 序列相一致。

2.4 突变型(G59S)小鼠 dynactin-1 的鉴定 以 pcDNA3.1-FLAG/mus-dynactin-1(wt) 和 pEGFP-N1/mus-dynactin-1(wt) 为模板,利用突变引物和位点特异性突变导入试剂盒进行突变,测序结果表明成功把小鼠 dynactin-1-cDNA 第 460 个碱基 G 改变成 A,使 dynactin-1 第 59 个谷氨酸(Gly: GGC)变为丝氨酸(Ser: AGC),结果见图 2,表明插入突变成功。

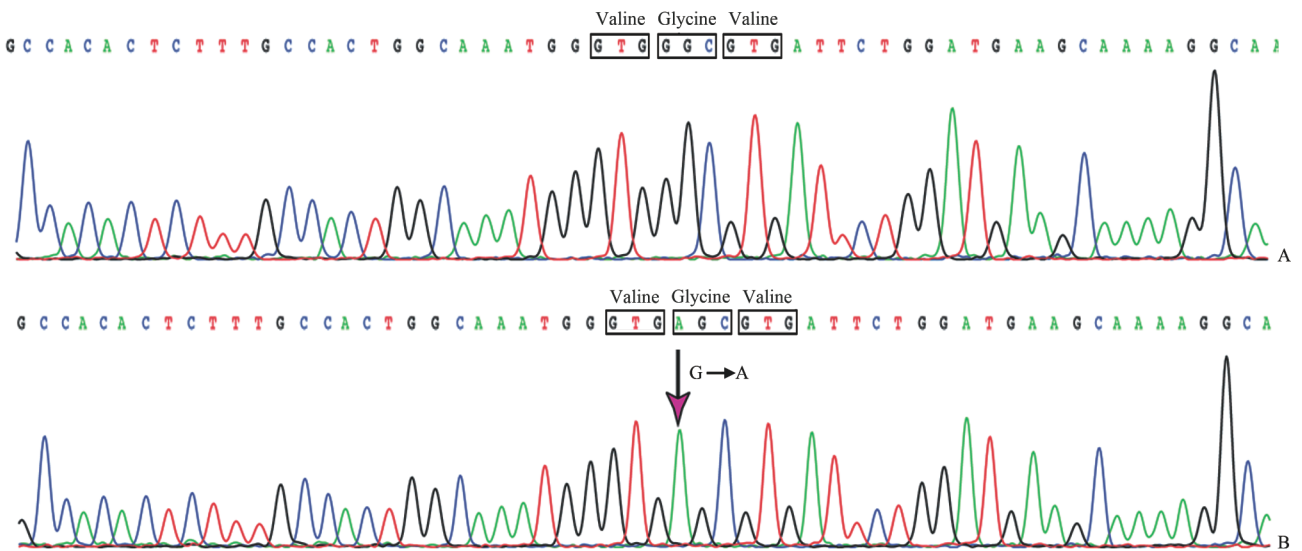


图 2 重组质粒的测序结果

Fig 2 Sequencing result of recombinant plasmids

A: Partial nucleotide sequence of the wild-type mus-dynactin-1 plasmid; B: Mutated mus-dynactin-1 plasmid. The mutation G→A at nucleotide 459 is indicated by an arrow

2.5 重组表达载体在小鼠足细胞 MPC5 中的表达 各种重组载体转染小鼠足细胞 MPC5 48 h 后, 提取总蛋白, 进行蛋白质印迹分析。pcDNA3.1-FLAG/mus-dynactin-1 转染细胞, 用 dynactin-1 抗体检测时, 内源性 dynactin-1 和外源性 dynactin-1-FLAG 融合蛋白都在同一条带中, 因为 FLAG 标签蛋白只有 24 个氨基酸, dynactin-1-FLAG 融合蛋白无法与内源性 dynactin-1 分开, 用 FLAG 抗体则检测到相对分子质量约 150 000 的 dynactin-1-FLAG 融合蛋白。pEGFP-N1/mus-dynactin-1 转染细胞, 用 dynactin1 抗体检测时, 检测到相对分子质量约 150 000 的内源性 dynactin-1 和相对分子质量为 177 000 的外源性 dynactin-1-EGFP 融合蛋白(图 3)。

pEGFP-N1/mus-dynactin-1 (wt 或 G59S) 转染 48 h 后, 再用 α -tubulin 抗体进行免疫荧光染色, 在荧光显微镜下观察表达与分布情况, 可见野生型 (wt) 广泛表达在细胞质, 呈丝状分布, 突变型 (G59S) 表达在细胞质, 并有明显的蛋白凝聚(图 4)。

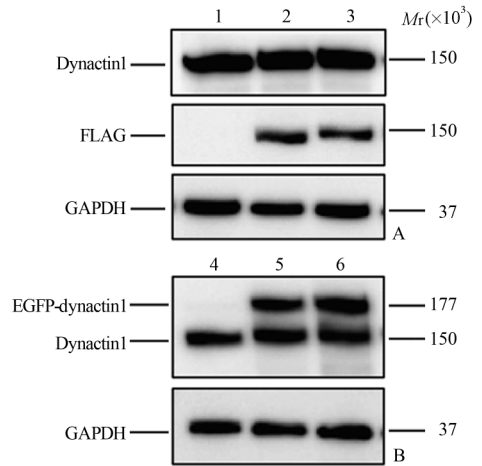


图 3 蛋白质印迹分析法检测 dynactin-1 在小鼠足细胞 MPC5 中的表达

Fig 3 Western blotting analysis of dynactin-1 (wt or G59S) expression in mouse podocyte clone 5 (MPC5)

1, 4: Control; 2: pcDNA-FLAG-dynactin-1 (wt); 3: pcDNA-FLAG-dynactin-1 (G59S); 5: pEGFP-dynactin-1 (wt); 6: pEGFP-dynactin-1 (G59S). A: pcDNA3.1-FLAG/mus-dynactin-1 (wt and G59S); B: pEGFP-N1/mus-dynactin-1 (wt and G59S)

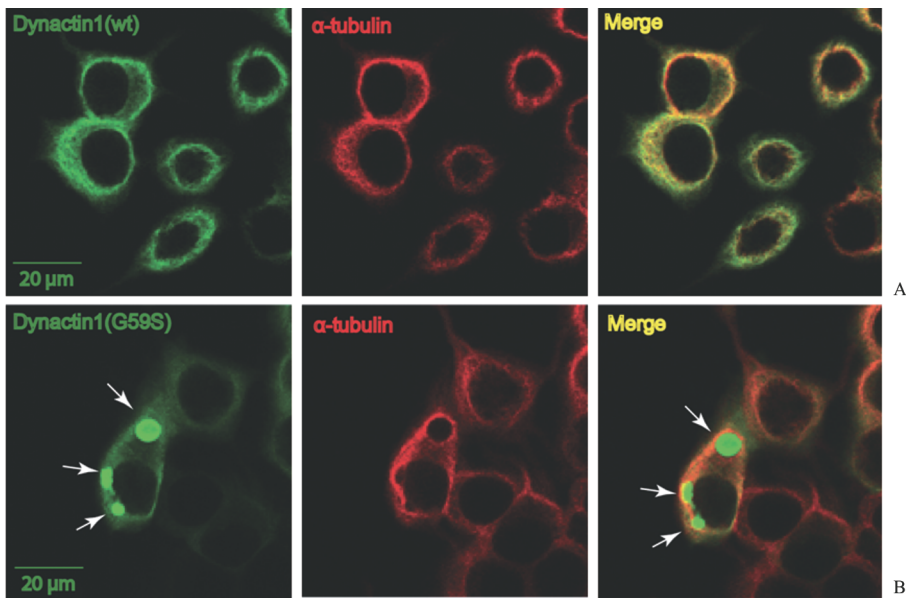


图 4 免疫荧光法检测 dynactin-1 在小鼠足细胞 MPC5 中的表达

Fig 4 Expression of dynactin-1 (wt or G59S) in mouse podocyte clone 5 (MPC5) as observed by immunofluorescence

A: pEGFP-N/mus-dynactin-1 (wt); B: pEGFP-N/mus-dynactin-1 (G59S). Arrows indicate the inclusion bodies

3 讨论

dynactin-1 (又名 p150^{Glued}) 是相对分子质量为 150 000 的动力蛋白激活蛋白重要亚单位, 由 1 278 个氨基酸组成, 有微管结合结构域 (domain)、马达结合结构域和货物结合结构域^[1]。微管结合结构域中 CAP-Gly (cytoskeleton-associated protein glyceric-rich) 模体 (motif) 具有高度保守的特性^[8-10], 为很

多神经变性疾病的突变部位^[2,11]。人和小鼠的 dynactin-1 之间具有 90% 同源性, 第 59 个甘氨酸及其周围的氨基酸序列完全相同^[2], 研究表明神经特异性 dynactin-1 突变 (G59S) 敲入小鼠^[12] 和人 dynactin-1 突变型 (G59S) 转基因小鼠^[13-14] 中出现运动神经元变性病变。因此第 59 个甘氨酸突变型可作为 dynactin-1 的病理型, 用于体外细胞模型的研究。

本研究首先将总 RNA 反转录成 cDNA 后, 通

过 PCR 方法扩增得到全长小鼠 dynactin-1 的 cDNA,我们先后反转录了小鼠大脑、脊髓、肝脏、肾脏及骨骼肌的总 RNA,并利用 4 种高保真 PCR 酶进行扩增,最终以脊髓 cDNA 为模板,用 PfuUltra II 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,得到预期的片段。这说明不同组织里存在不同的变异体(variant),在脊髓里 dynactin-1 的表达较多。PCR 产物与载体连接后,酶切鉴定表明载体中含有相应的片段插入;进而用 8 个不同阶段引物进行测序,与 GenBank 数据库对比后发现 6 个碱基突变,随后利用多位点突变试剂盒修补,最终得到正确的序列。

本研究用 dynactin-1 抗体和标签蛋白抗体(FLAG 和 GFP)进行蛋白质印迹分析,检测所构建的各种表达载体转染小鼠足细胞 MPC5 后的表达情况和分布,结果均有相应蛋白表达。利用免疫荧光显微镜观察转染 pEGFP-N1/dynactin-1 (wt 或 G59S),可见野生型广泛表达在细胞质,呈丝状分布;突变型表达在细胞质,并出现蛋白凝聚,与文献报道一致^[3,15]。

本研究成功构建了野生型和突变型小鼠 dynactin-1 真核表达载体,并在小鼠足细胞中表达,为进一步探究 dynactin-1 在糖尿病肾病足细胞损伤中的细胞分子机制和为下一步开展体外研究奠定实验基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

(志谢 本研究在引物设计、工具质粒的提供、质粒的测序、分子生物学技术等方面得到了日本名古屋大学医学部黄哲博士的大力帮助与指导,在此表示感谢!)

[参考文献]

[1] Schroer T A. Dynactin[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 759-779.
 [2] Puls I, Jonnakuty C, LaMonte B H, Holzbaur E L, Tokito M, Mann E, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease[J].

Nat Genet, 2003, 33: 455-456.
 [3] Levy J R, Sumner C J, Caviston J P, Tokito M K, Ranganathan S, Ligon L A, et al. A motor neuron disease-associated mutation in p150^{Glued} perturbs dynactin function and induces protein aggregation[J]. J Cell Biol, 2006, 172: 733-745.
 [4] Levy J R, Holzbaur E L. Cytoplasmic dynein/dynactin function and dysfunction in motor neurons[J]. Int J Dev Neurosci, 2006, 24(2-3): 103-111.
 [5] Rastaldi M P, Armelloni S, Berra S, Calvaresi N, Corbelli A, Giardino L A, et al. Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles[J]. FASEB J, 2006, 20: 976-978.
 [6] Kobayashi N, Gao S Y, Chen J, Saito K, Miyawaki K, Li C Y, et al. Process formation of the renal glomerular podocyte; is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? [J]. Anat Sci Int, 2004, 79: 1-10.
 [7] Kobayashi N. Mechanism of the process formation; podocytes vs neurons [J]. Microsc Res Tech, 2002, 57: 217-223.
 [8] Weisbrich A, Honnappa S, Jaussi R, Okhrimenko O, Frey D, Jellesarov I, et al. Structure-function relationship of CAP-Gly domains[J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14: 959-967.
 [9] Sun S, Siglin A, Williams J C, Polenova T. Solid-state and solution NMR studies of the CAP-Gly domain of mammalian dynactin and its interaction with microtubules[J]. J Am Chem Soc, 2009, 131: 10113-10126.
 [10] Ahmed S, Sun S, Siglin A E, Polenova T, Williams J C. Disease-associated mutations in the p150^{Glued} subunit destabilize the CAP-gly domain[J]. Biochemistry, 2010, 49: 5083-5085.
 [11] Farrer M J, Hulihan M M, Kachergus J M, Dächsel J C, Stoessl A J, Grantier L L, et al. DCTN1 mutations in Perry syndrome [J]. Nat Genet, 2009, 41: 163-165.
 [12] Lai C, Lin X, Chandran J, Shim H, Yang W J, Cai H. The G59S mutation in p150^{glued} causes dysfunction of dynactin in mice[J]. J Neurosci, 2007, 27: 13982-13990.
 [13] Laird F M, Farah M H, Ackerley S, Hoke A, Maragakis N, Rothstein J D, et al. Motor neuron disease occurring in a mutant dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking[J]. J Neurosci, 2008, 28: 1997-2005.
 [14] Chevalier-Larsen E S, Wallace K E, Pennise C R, Holzbaur E L. Lysosomal proliferation and distal degeneration in motor neurons expressing the G59S mutation in the p150^{Glued} subunit of dynactin[J]. Hum Mol Genet, 2008, 17: 1946-1955.
 [15] Dixit R, Levy J R, Tokito M, Ligon L A, Holzbaur E L. Regulation of dynactin through the differential expression of p150^{Glued} isoforms[J]. J Biol Chem, 2008, 283: 33611-33619.

[本文编辑] 商素芳