

Cloning of Nudel Gene and Its Expression in COS7 Cells

Zijian Zhou¹, Bangyi Wei¹, Siyu Zeng¹, Zhicheng Zou¹, Peng Wang¹, Yao Wang², Jun Chen^{1*}

¹Bioengineering Department, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan Hubei

²Life Science School, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei

Email: *celljun@163.com

Received: Nov. 2nd, 2018; accepted: Nov. 15th, 2018; published: Nov. 22nd, 2018

Abstract

In this study, Nudel gene was cloned and used to construct a eukaryotic expression vector harboring a red fluorescent gene. According to the Gene card data, the RPKM value of Nudel is 7.97 in lung tissue, so the total RNA was extracted from the lung cancer cells A549. The cDNA was made from the RNA and used as template to amplify Nudel gene. Nudel gene was cloned into pMD18-T vector and named as pT-Nudel after being confirmed by sequencing. Then this gene was subcloned to pDsRed-C1 vector which harbors a red fluorescent gene, to achieve the expression vector pRed-Nudel. Ultrapure plasmids pRed-Nudel free of endotoxin were isolated and used to transfect COS7 cells. The expression of Nudel and the impact of tumor suppressor gene Pten on the expression of Nudel were investigated. The results showed that the Nudel gene was successfully cloned and the expression vector pRed-Nudel was successfully constructed by subcloning Nudel gene into the expression vector pDsRed-C1. Nudel was expressed in COS7 cells. Different from the mutated PtenC124S, the wild type Pten restrained the expression of Nudel possibly, which needs further verification.

Keywords

Nudel Gene, cDNA clone, Gene Expression, Tumor Suppressor Gene Pten, COS7 Cell

Nudel基因的克隆及在COS7细胞中的表达研究

周子建¹, 魏邦毅¹, 曾思宇¹, 邹志成¹, 王 鹏¹, 汪 瑶², 陈 俊^{1*}

¹武汉科技大学生物工程教研室, 湖北 武汉

²华中科技大学生命科学学院, 湖北 武汉

Email: *celljun@163.com

*通讯作者。

摘要

本实验克隆并构建了携带红荧光报告基因的Nudel真核表达载体,为后续研究Nudel基因的功能打下基础。查阅Gene card可知,Nudel基因在肺组织中的RPKM值为7.97,本研究以人肺癌细胞A549细胞为材料,提取总RNA并反转录出cDNA,再以cDNA为模板扩增Nudel基因;将目的基因与pMD18-T载体连接,测序鉴定并命名为pT-Nudel;然后再将Nudel基因亚克隆至含红荧光报告基因的载体pDsRed-C1,构建的表达载体命名为pRed-Nudel;提取去内毒素的超纯质粒,转染COS7细胞,检测Nudel的表达情况以及抑癌基因Pten对Nudel表达的影响。结果表明,克隆的Nudel基因经测序鉴定正确;将Nudel基因亚克隆至红荧光表达载体pDsRed-C1,成功构建pRed-Nudel,并在COS7中成功表达。同时观察到与突变型的PtenC124S相比,野生型的Pten有抑制Nudel表达的可能,需要后续的实验进一步验证。

关键词

Nudel基因, cDNA克隆, 基因表达, 抑癌基因Pten, COS7细胞

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

Nudel 是一类进化上保守的蛋白,在体内参与多个信号通路的调控与疾病的发生。Nudel 与多种蛋白质相互作用,包括 dynein、lissencephaly 1 蛋白(Lis1)、精神分裂症 1 (Disc1)和 14-3-3 ζ [1] [2] [3]。Eva Klinman 等人的研究显示,Nudel/Lis1 复合体通过直接调控动力蛋白的活性,激活异常的 CDK5,进而引起神经轴突的运输中断,而轴突运输的中断与很多神经退行性疾病有关[4]。Moon 等人的研究表明,Nudel 集中于着丝粒附近,调控有丝分裂纺锤体的形成和有丝分裂的过程[5]。另外,Nudel 具有寡肽酶活性,有望作为潜在的精神分裂症的生物分子标记[6]。Nudel 可以与动力蛋白相互作用而影响细胞运动和物质运输,例如溶酶体运输[7]和细胞器的定位[8]。Nudel 也可以不依赖细胞质动力蛋白而参与细胞迁移,它通过与 Cdc42 竞争结合 Cdc42GAP,使 Cdc42 从 Cdc42GAP 上释放而被活化,从而阻止细胞的极化与伪足的形成。除此之外,Nudel 通过与黏着斑蛋白桩蛋白相互作用,而有助于在迁移细胞的前缘形成新的吸附[9]。细胞迁移与肿瘤转移密切相关,Pten 是著名的肿瘤抑制因子,很多研究表明,Pten 是细胞运动的负调控因子[10] [11],在 Pten 突变体中,细胞运动和增殖会加剧,这是细胞癌变的标志[12]。Pten 是细胞骨架的通用开关,通过调控肌动蛋白和微管防止细胞过度增殖[13]。本研究以 A549 细胞为材料,进行 Nudel 基因的克隆、鉴定及在 COS7 细胞中的表达等,并初步检测了抑癌基因 Pten 对 Nudel 表达的影响,为进一步研究 Nudel 基因对及细胞迁移的影响打下基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

A549 细胞、pDsRed-C1 载体、感受态细胞 DH5 α 由本实验室保存;pMD18-T、T4 连接酶购自 TaKaRa

公司；内切酶 *Xho* I、*Bam*H I 购自 Thermo 公司；胶回收试剂盒：E.Z.N.A Gel Extraction Kit(100)试剂盒；质粒提取试剂盒：E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I(100)试剂盒；超纯质粒提取试剂盒：E.Z.N.A Endo-free Plasmid Mini II 试剂盒，Trizol、逆转录试剂盒 M-MLV 购自 Invitrogen 公司；转染试剂 PEI 购自 Proteintech 公司。

2.2. RT-PCR 扩增 Nudel 目的基因

选取生长状态良好的 A549 细胞(培养条件：RPMI 1640 培养基，10%胎牛血清，37℃，5% CO₂)为材料，提取总 RNA。以此 RNA 为模板，参照 Invitrogen 的说明书进行反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板，扩增目的基因 Nudel，扩增体系：ddH₂O 15.5 μL，cDNA 0.5 μL，上下游引物各 0.5 μL，dNTPs (10 mM) 2 μL，10 × EXTaq Buffer，EXTaq 0.5 μL。扩增条件：预变性 95℃ 5 min，95℃ 30 s，50℃ 30 s、72℃ 1 min 30 s，35 个循环，72℃ 10 min，最后 4℃ 保存。扩增 Nudel 的引物，上游引物：5'-ATGGATGGTGAAGATATACCAG-3'，下游引物：5'-TCACACACTGAGAGGCAGCATAC-3'(引物自行设计，由武汉擎科公司合成)。

2.3. 构建 pT-Nudel 和 pDsRed-Nudel 载体

将扩增的目的基因克隆至 pMD18-T 载体上，进行测序鉴定，正确的克隆命名为 pT-Nudel。以测序鉴定后的质粒 pT-Nudel 为模板，采用高保真酶扩增 Nudel 目的基因。扩增体系：ddH₂O 34 μL，pT-Nudel 质粒 DNA 稀释 100 倍取 1 μL (约 50 ng)，上下游引物各 1 μL，dNTPs (2 mM) 5 μL，MgSO₄ (25 mM) 2 μL，10 × KOD buffer 5 μL，KOD Polymerase 1 μL。扩增条件：预变性 95℃ 5 min，95℃ 30 s，50℃ 30 s、68℃ 1 min 30 s，35 个循环，68℃ 10 min，最后 4℃ 保存。扩增 Nudel 的引物，上游引物：5'-CCGCTCGAGATGGATGGTGAAGATATACCAG-3'，引入 *Xho* I 酶切位点，下游引物：5'-CGGGATCCTCACACACTGAGAGGCAGCATAC-3'，引入 *Bam*H I 酶切位点。

2.4. Nudel 基因在真核细胞中 COS7 中的表达

制备去内毒素的超纯 pDsRed-Nudel 质粒，检测 DNA 的浓度与纯度，转染到 COS7 细胞，并在荧光显微镜下进行观察。细胞转染：采用 PEI 转染试剂进行转染，12 孔板种细胞过夜贴壁，DNA 与转染试剂比例 1:3 (μg:μL)，转染步骤参照 PEI 说明书进行，转染后 30 小时置于显微镜下检测。

3. 结果与分析

3.1. A549 细胞总 RNA 的提取与 Nudel 基因的扩增

培养 A549 细胞，选取生长状态良好的 A549 细胞为材料，提取总 RNA。RNA 浓度测定表明，1 号样品浓度为 730 ng/μL，A260/280 比值为 1.98，2 号样品浓度为 695 ng/μL，A260/280 比值为 1.97，说明提取的 RNA 纯度比较高。提取的 RNA 进行电泳检测，结果见图 1(A)。可以看到清晰的三条带，分别是 28 S，18 S 和 5.8 S，表明提取的 RNA 完整性良好，可以用于反转录。

以总 RNA 为模板，反转录获得 cDNA，再以 cDNA 为模板，扩增目的基因 Nudel。扩增结果见图 1(B)，电泳条带单一，对比 DNA Marker，扩增的目的条带大小在 1000 bp 附近，与 NCBI 数据库里提供的 Nudel 基因(1038 bp)大小一致，初步判断扩增产物是目标产物，也说明 A549 细胞中 Nudel 基因有较高的表达水平。

3.2. 构建 pT-Nudel 和 pDsRed-Nudel 载体

将 Nudel 基因插入 pMD18-T 载体中，转化大肠杆菌 DH5α，通过菌落 PCR 筛选阳性克隆，菌落 PCR 扩增结果见图 2(A)，在对应 Maker1000 bp 的位置有条带出现，与 cDNA 做模板扩增的条带大小一致。

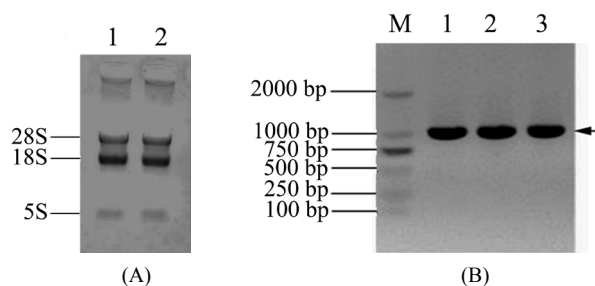


Figure 1. Amplification Nudel gene by RT-PCR. (A) The total RNA was extracted from A549 cells: 1 & 2 samples were the total RNA extracted from A549 cells; (B) Amplification of Nudel gene from the cDNA: M: DNA marker; 1, 2 & 3 samples were Nudel gene fragments amplified from the cDNA (about 1000 bp)

图 1. RT-PCR 扩增 Nudel 基因。(A) A549 细胞总 RNA 提取电泳检测: 1 & 2 样品均为提取的 A549 细胞总 RNA; (B) 从 A549 细胞 cDNA 中扩增 Nudel 基因: M: DNA marker; 1、2、3 均为扩增的 Nudel 基因片段

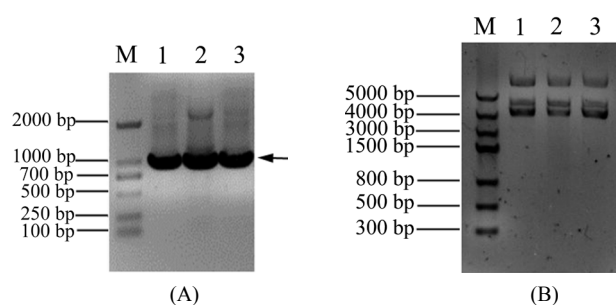


Figure 2. Construction the recombinants of pT-Nudel. (A) Identification the recombinant pT-Nudel by cloning PCR: M: DNA marker, 1, 2 & 3 samples were the cloning PCR of recombinant pT-Nudel; (B) Isolation the recombinant plasmid pT-Nudel: M: DNA marker, 1, 2 & 3 samples were the recombinant pT-Nudel plasmids

图 2. 构建重组质粒 pT-Nudel。(A) 重组质粒 pT-Nudel 菌落 PCR 鉴定: M: DNA marker, 1、2&3 为 pT-Nudel 菌落 PCR; (B) 提取 pT-Nudel 重组质粒 DNA: M: DNA marker, 1、2&3 为提取的重组质粒 pT-Nudel

提取重组质粒 DNA, 电泳检测重组质粒大小, 结果见图 2(B), 提取的质粒呈现 3 条带, 中间的条带为质粒的线性条带, 对比 Marker, 该线性条带在 3000 bp 和 5000 bp 之间, pMD18-T 质粒大小为 2692 bp, Nudel 基因大小为 1038 bp, 重组质粒理论大小为 3730 bp, 从电泳结果判断, 所提取的重组质粒大小正确, 将正确的克隆进一步进行测序定。将测序结果在 NCBI 中用 BLAST 进行比对分析, 本实验从 A549 肺泡细胞中所克隆的 Nudel 基因序列与 NCBI 数据库中的 Nudel 基因匹配度为 100%, 序列完整, 并且没有发生碱基突变。

在此基础上, 进一步将 Nudel 基因亚克隆至携带红荧光的真核表达载体 pDsRed-C1 上, 亚克隆的限制性酶切位点为 *Xho* I 和 *Bam*H I, 构建重组质粒 pDsRed-Nudel。提取重组质粒, 电泳检测见图 3(A), pDsRed-C1 载体大小为 4700 bp, Nudel 基因大小 1038 bp, 那么重组质粒 pDsRed-Nudel 的大小为 5738 bp, 由图 3(A) 中性条带大小判断, 所提取的重组质粒大小正确。将提取的重组质粒 pDsRed-Nudel 用 *Xho* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定, 电泳结果显示(见图 3(B)), 在 1000 bp 和 5000 bp 的位置分别有条带出现, 与预期相符, 1000 bp 附近的是 Nudel 基因片段, 5000 bp 附近的是载体片段。由此可见, Nudel 基因成功的亚克隆到了红荧光表达载体上, 构建了 pDsRed-Nudel 载体。

3.3. 重组质粒 pDsRed-Nudel 转染 COS7 细胞

利用 PEI 转染试剂, 将重组质粒 pDsRed-Nudel 转染 COS7 细胞, 检测其表达情况。结果如下(见图 4), 在平行转染条件下, pDsRed-C1 空载体转染 COS7 细胞(见图 4(B)), 转染效率较重组质粒 pDsRed-Nudel 要高(见图 4(D))。重组质粒 pDsRed-Nudel 转染 COS7 细胞的效率虽然较低, 但是仍然观测到了荧光, 初

步判断 pDsRed-Nudel 在 COS7 细胞中能够表达。

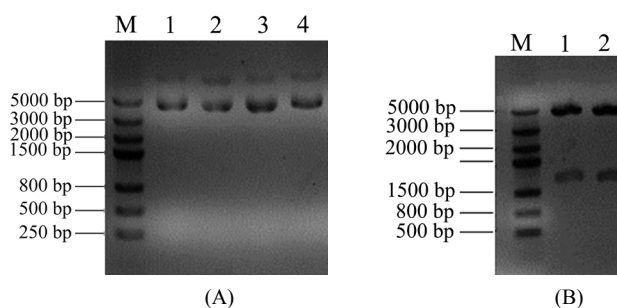


Figure 3. Construction the eukaryotic expression vector pRed-Nudel: (A) Isolation the recombinant pRed-Nudel plasmids: M: DNA marker; 1, 2, 3 & 4 samples were the recombinant pRed-Nudel plasmids; (B) Digestion the recombinant pRed-Nudel by restriction enzyme *Xho* I and *Bam*H I: M: DNA marker; 1 & 2 samples were the recombinant pRed-Nudel digested by *Xho* I and *Bam*H I

图 3. 构建真核表达载体 pRed-Nudel。 (A) 提取重组质粒 pRed-Nudel: M: DNA marker; 1、2、3&4 为提取的 pRed-Nudel 重组质粒; (B) 双酶切鉴定重组质粒 pRed-Nudel: M: DNA marker; 1&2 为重组质粒 pRed-Nudel 双酶切

3.4. 抑癌基因 Pten 及其突变体对 Nudel 基因表达的影响

本实验克隆 Nudel 的目的, 是为了考察 Nudel 对肿瘤细胞迁移的影响, 而 Pten 基因是著名的肿瘤抑制基因, 因此本实验将野生型的 Pten 和突变型的 Pten 即 C124SPten (Pten 第 124 位的氨基酸 C 突变成 S), 分别与 Red-Nudel 共转染 COS7 细胞, 并在荧光显微镜下进行观察。结果发现, 与突变型的 C124SPten 相比(见图 5(D)), 野生型的 Pten 与 Red-Nudel 共转染(见图 5(B)), 红荧光更少, 推测 124 位的突变对 Nudel 的表达存在一定的影响。

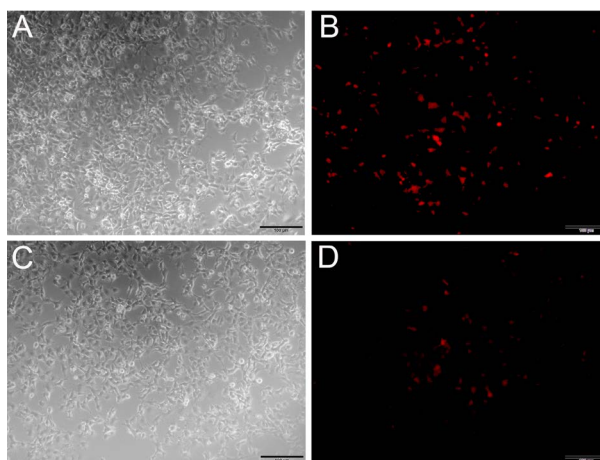


Figure 4. Transfection the expression vector pRed-Nudel into COS7 cells. (A) (B) Transfection the vector pDsRed-C1 into COS7 cells, (A) At common optical path; (B) At fluorescence optical path; (C) (D) Transfection the expression vector pRed-Nudel into COS7 cells, (C) At common optical path; (D) At fluorescence optical path; Note: bar = 100 μ m

图 4. 重组质粒 pRed-Nudel 转染 COS7 细胞。 (A) (B) pDsRed-C1 转染 COS7 细胞, (A) 图为白光, (B) 图为激发光; (C) (D) pRed-Nudel 转染 COS7 细胞, (C) 图为白光, (D) 图为激发光; 注: 图中比例尺为 100 μ m

4. 讨论

本实验以 A549 细胞为材料, 成功获得目的基因 Nudel, 并构建携带红荧光报告基因的真核表达载体 pRed-Nudel。查阅 Gene card 可知, Nudel 基因在骨髓普遍高表达, RPKM 值为 18.6, 其次是肾上腺, RPKM

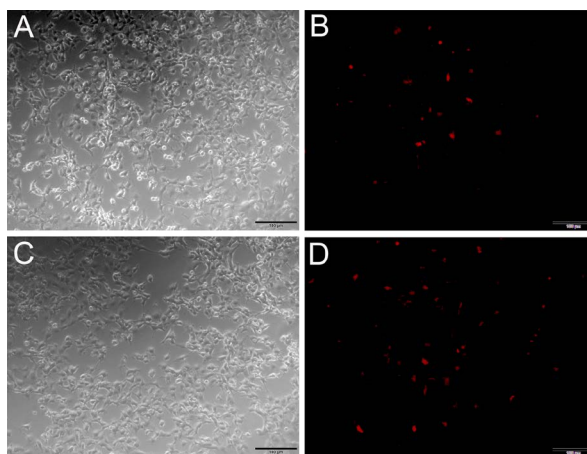


Figure 5. Co-transfection Pten or PtenC124S and pRed-Nude into COS7 cells. (A) (B) Co-transfection Pten and pRed-Nude into COS7 cells, (A) At common optical path; (B) At fluorescence optical path; (C) (D) Co-transfection PtenC124S and pRed-Nude into COS7 cells, (C) At common optical path; (D) At fluorescence optical path; Note: bar = 100 μm

图 5. Pten 和 PtenC124S 与 pRed-Nude 共转染 COS7 细胞。(A) (B) Pten 和 pRed-Nude 共转染 COS7 细胞, (A) 图为白光, (B) 图为激发光; (C) (D) PtenC124S 和 pRed-Nude 共转染 COS7 细胞, (C) 图为白光, (D) 图为激发光; 注: 图中比例尺为 100 μm

值为 13.4。在另外的 25 种组织中均不同程度检测到 Nudel 的表达, 具体表达情况见图 6, 在肺组织中的 RPKM 值约为 7.97 左右, RPKM 值的大小显示的是该基因在相应的组织中表达量的高低。本实验所用的是 A549 细胞, 该细胞为人肺泡上皮细胞。实验结果表明, Nudel 基因在 A549 细胞中有表达, 因此成功扩增到了该基因, 测序结果显示, 该基因在 A549 细胞株中, 没有突变。

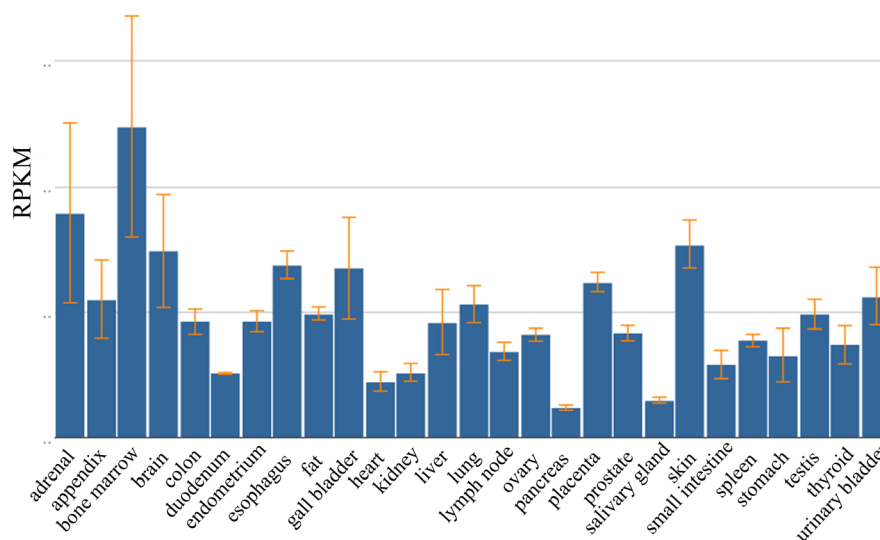


Figure 6. The Nudel gene expression level in different tissue

图 6. Nudel 基因在不同组织中的表达水平

Nudel 是一种保守的中心体蛋白质, 在细胞中绝大部分分布于细胞质, 但在间期在中心体上有较强的定位, 在有丝分裂期分布于整个纺锤体[14]。在体内, Nudel 对于细胞运动的关键蛋白—胞质动力蛋白发挥功能至关重要, 包括细胞内运输、有丝分裂和细胞迁移等。Nudel 通过与 Cdc42 竞争结合 Cdc42GAP, 使得 Cdc42 释放而被活化, 进而促进细胞迁移[9]。本实验初步尝试将野生型 Pten 和突变型 PtenC124S 与

Red-Nudel 共转染, 观察到与突变型 PtenC124S 相比, 野生型 Pten 对 Red-Nudel 的表达有抑制作用, 需要进一步实验证实, 如果 Pten 下调 Nudel 的表达, Nudel 水平降低, 则 Nudel 竞争结合 Cdc42GAP 水平降低, 那么 Cdc42GAP 与 Cdc42 结合增加, 则细胞迁移降低。也就是说, Pten 通过下调 Nudel 进而抑制细胞迁移, 这与 Pten 抑癌基因的功能是相符的[15]。

致 谢

感谢湖北省自然科学基金资助项目(2015CFB490)的资助; 感谢全国大学生创新创业大赛项目(201710488013)的资助。

参考文献

- [1] Chansard, M., Hong, J.H., Park, Y.U., *et al.* (2011) Ndel1, Nudel (Noodle): Flexible in the Cell? *Cytoskeleton*, **68**, 540-554. <https://doi.org/10.1002/cm.20532>
- [2] Vallee, R.B., McKenney, R.J. and Ori-McKenney, K.M. (2012) Multiple Modes of Cytoplasmic Dynein Regulation. *Nature Cell Biology*, **14**, 224-230. <https://doi.org/10.1038/ncb2420>
- [3] Bradshaw, N.J., Hennah, W. and Soares, D.C. (2013) NDE1 and NDEL1: Twin Neurodevelopmental Proteins with Similar “Nature” but Different “Nurture”. *Biomolecular Concepts*, **4**, 447-464. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0023>
- [4] Klinman, E. and Holzbaur, E.L. (2015) Stress-Induced CDK5 Activation Disrupts Axonal Transport via Lis1/Ndel1/Dynein. *Cell Reports*, **12**, 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.032>
- [5] Moon, H.M., Youn, Y.H., Pemble, H., *et al.* (2014) LIS1 Controls Mitosis and Mitotic Spindle Organization via the LIS1-NDEL1-Dynein Complex. *Human Molecular Genetics*, **23**, 449-466. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt436>
- [6] Bradshaw, N.J. and Hayashi, M.A. (2017) NDE1 and NDEL1 from Genes to (mal) Functions: Parallel but Distinct Roles Impacting on Neurodevelopmental Disorders and Psychiatric Illness. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **74**, 1191-1210. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2395-7>
- [7] Zhang, Q., Wang, F., Cao, J., *et al.* (2009) Nudel Promotes axonal Lysosome Clearance and Endo-Lysosome Formation via Dynein-Mediated Transport. *Traffic*, **10**, 1337-1349. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00945.x>
- [8] Lam, C., Vergnolle, M.A., Thorpe, L., *et al.* (2010) Functional Interplay between LIS1, NDE1 and NDEL1 in Dynein-Dependent Organelle Positioning. *Journal of Cell Science*, **123**, 202-212. <https://doi.org/10.1242/jcs.059337>
- [9] Shen, Y., Li, N., Wu, S., *et al.* (2008) Nudel Binds Cdc42GAP to Modulate Cdc42 Activity at the Leading Edge of Migrating Cells. *Developmental Cell*, **14**, 342-353. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.001>
- [10] Iijima, M. and Devreotes, P. (2002) Tumor Suppressor PTEN Mediates Sensing of Chemoattractant Gradients. *Cell*, **109**, 599-610. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00745-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00745-6)
- [11] Liliental, J., Moon, S.Y., Lesche, R., *et al.* (2000) Genetic Deletion of the Pten Tumor Suppressor Gene Promotes Cell Motility by Activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Current Biology*, **10**, 401-404. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00417-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00417-6)
- [12] Mester, J. and Eng, C. (2013) When Overgrowth Bumps into Cancer: The PTEN-Opathies. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, **163**, 114-121. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31364>
- [13] Kath, C., Goni-Oliver, P., Müller, R., *et al.* (2018) PTEN Suppresses Axon Outgrowth by Down-Regulating the Level of Detyrosinated Microtubules. *PLoS One*, **13**, e0193257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193257>
- [14] Wang, S., Ketcham, S.A., Schön, A., *et al.* (2013) Nudel/NudE and Lis1 Promote Dynein and Dynactin Interaction in the Context of Spindle Morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, **24**, 3522-3533. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-05-0283>
- [15] Brandmaier, A., Hou, S., Demaria, S., *et al.* (2017) PTEN at the Interface of Immune Tolerance and Tumor Suppression. *Frontiers in Biology (Beijing)*, **12**, 163-174. <https://doi.org/10.1007/s11515-017-1443-5>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org