

东亚三角涡虫*RhoA*基因的原核表达及组织定位

聂 敏 赵博生*

(山东理工大学生命科学院发育与进化生物学实验室, 淄博 255049)

摘要 为了表达东亚三角涡虫RhoA蛋白, 采用温控表达载体pBV220-IL1, 构建了原核表达重组质粒pBV220-IL1-RhoA, 转化到*E.coli* DH5 α 中, 利用42 °C热激诱导表达, 并进行了分离纯化和Western杂交鉴定, 利用荧光免疫组织化学技术检测了在涡虫体内的分布。SDS-PAGE电泳表明诱导表达的融合蛋白约为18 kDa, Western杂交结果显示是目的蛋白, 荧光免疫组织化学结果表明RhoA蛋白在东亚三角涡虫神经系统处表达。

关键词 东亚三角涡虫; RhoA; 基因表达; Western杂交; 荧光免疫组织化学

*Rho*家族(Ras-homologous)是*Ras*超家族中的一员, 编码的蛋白为GTP结合蛋白并具有GTP酶活性, 简称小G蛋白^[1]。*RhoA*基因是*Rho*家族中研究较多的一种^[2], 最早在海兔腹部神经基因组文库中发现^[3], 大量研究表明其参与多种信号通路, 在信号转导中起分子开关的作用, 它的活性受鸟苷酸分离抑制因子(Guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)、鸟苷酸交换因子(Guanine nucleotide exchange factors, GEFs)和GTP酶激活蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)的调节, RhoA蛋白在非活性GDP结合形式和活性GTP结合形式之间循环, 与GDP结合形式游离于细胞浆中, 与GTP结合形式则作用于细胞内的效应因子, 其效应蛋白主要为: 肌动蛋白核酸促进因子(N-WASP、WAVE)、接头蛋白(IQGAP1、IQGAP2、Par6)、激酶类(MRCK、ROCK)和脚手架蛋白Scaffold (Was、Diaph)等^[4], 通过其参与的多种信号通路, 调节多种细胞生命过程, 其中包括细胞骨架重组、细胞黏附、细胞运动、细胞周期进展、细胞分裂、细胞极性、基因转录、胚胎发育以及细胞凋亡等^[5-8]。

RhoA蛋白广泛存在于由低等到高等的生物体中。无脊椎动物及脊椎动物的RhoA蛋白具有极高的保守性, 在不同物种间同源性很高, 但各物种间仍具有一定的特异性, 从而其在不同物种中的功能也不尽相同。在果蝇、蟾蜍、斑马鱼、鸡、鼠及人类等模式生物中的研究已有报道^[9-16]。在果蝇中研究发现, *Rho1*在果蝇胚胎期与原肠胚的发育、背部的闭合、眼的发育及组织极性确定有关^[9-10]; 在蟾蜍中研究发

现, *RhoA*基因通过调节细胞粘着、头的形成和体轴形成来影响胚胎发育^[11]; 在斑马鱼中发现它调控神经嵴的形成^[12], 在胚胎期将*RhoA*基因沉默, 将会导致细胞凋亡, 斑马鱼的胚胎不能正常地发育^[13]; 在对鸡的研究中, 发现它可以通过调节神经胶质米勒细胞的形成来调控视网膜的形成, 从而影响眼的发育^[14]; 在小鼠胚胎中研究发现, *Rho*家族蛋白影响三胚层的分化和伪足的形成, 同时, 它可以激活一系列跟基因转录有关的酶来影响基因的转录^[15]; 在人类中, 对它与癌症的关系进行了大量的研究, 其中包括乳腺癌、食道癌及喉癌等, 研究发现RhoA蛋白在肿瘤的形成、转化、生长、浸润以及转移中起重要作用^[16-17]。其广泛存在性和较高的同源性表明该基因在物种发育、进化及保持生物体正常生理功能方面具有重要的作用。

涡虫, 隶属扁形动物门, 首次出现两侧对称体制、三胚层和最原始的梯状神经系统, 同时也具有极强的再生能力, 目前已经成为研究发育、再生及干细胞的模式生物^[18-19]。本文通过构建东亚三角涡虫*RhoA*基因的原核表达载体、诱导融合蛋白表达、蛋白鉴定和定位分析等, 以期今后研究该蛋白在涡虫体内的性质、功能以及相关蛋白的调控机制奠定基础。

收稿日期: 2010-12-16 接受日期: 2011-03-01

山东省自然科学基金(No.ZR2009DM029)和教育部重点项目(No.08077)资助项目

*通讯作者。Tel: 0533-2781832, E-mail: zhaobosheng@sdu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 涡虫 东亚三角涡虫(*Dugesia japonica*)采自山东省博山区,于实验室室温培养,每周喂食猪肝一次,实验所用涡虫一周前停止喂食。

1.1.2 载体与质粒 表达载体pBV220-IL1为山东理工大学胡巍教授惠赠,含有目的基因*RhoA*的重组质粒pDNR-LIB-RhoA为本实验室构建,东亚三角涡虫*RhoA*基因的登录号为:HM622159。

1.1.3 培养液 LB培养液中Tryptone、Yeast Extract为英国Oxoid公司生产,氯化钠为国产分析纯试剂。

1.1.4 主要试剂 氨苄青霉素、T4 DNA连接酶以及*Xba* I、*Xho* I等限制性内切酶和各种Marker、Taq酶、胶回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;所用引物的合成由上海Songon公司完成;序列测定是由上海博尚测序公司完成;*RhoA*抗体及对应的二抗购自北京博奥森生物技术有限公司;BSA购自Sigma公司;脱脂奶粉购自Klontech公司;DAB显色液购自博士德生物工程有限公司;其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增*RhoA*基因 根据东亚三角涡虫*RhoA*基因设计上游引物和下游引物,引物S: 5'-CCG CTC GAG CGA TCA ACA CTT GCA CTT AT-3'(下划线表示*Xho* I酶切位点);引物A: 5'-GCT CTA GAT TCT GCC ATT GCT TTA CCA T-3'(下划线表示*Xba* I酶切位点),以pDNR-LIB-RhoA质粒为模板进行PCR扩增。反应程序为94 °C预变性5 min,循环程序为94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min,共35个循环;72 °C再延伸10 min,冷却至4 °C。PCR反应结束后,取PCR反应液5 μL加1 μL上样缓冲液>Loading Buffer)在1%琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.2.2 连接与转化 将PCR得到的*RhoA*基因片段和pBV220-IL1质粒载体分别用*Xho* I酶和*Xba* I酶进行双酶切,DNA回收试剂盒分别回收纯化,T4 DNA连接酶4 °C连接过夜,连接产物转化*E.coli* DH5α感受态细胞。

1.2.3 重组质粒的筛选与鉴定 将转化完毕的感受态细胞涂布于含有氨苄青霉素的LB平板上于37 °C倒置培养过夜,挑取阳性克隆进行菌液PCR鉴定,同时使用*Xho* I酶和*Xba* I酶进行双酶切鉴定,并交由上

海博尚测序公司进行测序,将鉴定正确的阳性克隆命名为pBV220-IL1-RhoA。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达 将含有重组质粒pBV220-IL1-RhoA的工程菌*E.coli* DH5α接种于含100 μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中。220 r/min,37 °C振荡至对数期,此时调温度至42 °C诱导表达2 h、4 h、6 h及8 h。以未诱导的重组菌作对照。离心收集菌体沉淀,SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析。

1.2.5 重组蛋白的分离纯化 大量诱导重组蛋白表达,离心收集细菌沉淀,超声裂解,分别取上清与沉淀,检测其在上清中或沉淀中。

经检测为包涵体表达,首先提取包涵体,用200 mL诱导表达的菌液,离心,弃上清,并用PB缓冲液悬浮沉淀,超声波破碎,弃上清,用1 mol/L氯化钠洗涤沉淀,并用PB缓冲液洗涤两次,弃上清,用双蒸水使其悬浮。配制60 mL 15%分离胶,20 mL 4%的浓缩胶,进行SDS-PAGE电泳检测,电泳结束后,垫以坐标纸,以0.3 cm为单位将胶横向切开。用研钵将各胶条依次研碎,分装入10 mL离心管中加去离子水3 mL浸泡过夜。SDS-PAGE电泳检测。

1.2.6 Western杂交分析 15%的SDS-PAGE凝胶电泳后,转PVDF膜,用3% BSA 37 °C封闭1 h,PBST室温洗膜,加入兔抗大鼠*RhoA*多克隆抗体(1:300,购自北京博奥森生物技术有限公司),室温孵育2 h,PBST室温洗膜,加入辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗(1:500),室温孵育1 h,PBST室温洗膜,加底物DAB显色。

1.2.7 荧光免疫组织化学 2%盐酸将涡虫杀死,4 °C静置5 min,去除体表粘液,4%多聚甲醛4 °C固定4 h,梯度甲醇30%、50%脱水各5 min,甲醇与二甲苯1:1混合,4 °C静置30 min,PBST清洗5 min,10%脱脂奶粉室温孵育2 h,兔抗大鼠*RhoA*多克隆抗体稀释200倍,37 °C孵育5 h,PBST清洗约30 min,二抗稀释100倍,4 °C孵育过夜,PBST清洗,激光共聚焦显微镜观察。

2 结果

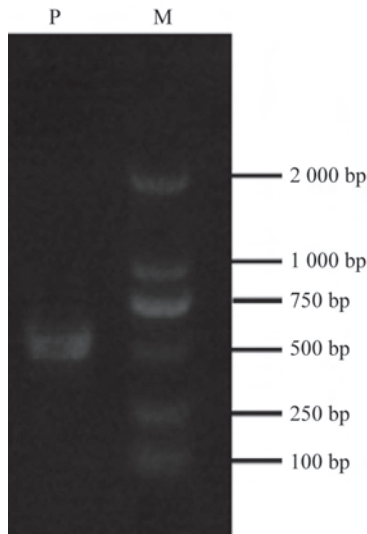
2.1 利用PCR扩增技术得到含有*Xho* I和*Xba* I酶切位点的*RhoA*基因片段

用PCR基因扩增法得到含有*Xho* I和*Xba* I酶切位点的*RhoA*片段,结果为一条约500 bp的条带,条带大小合适且特异,说明扩增后得到了目的基因片段

(图1)。

2.2 重组质粒pBV220-IL1-RhoA菌液PCR鉴定及测序

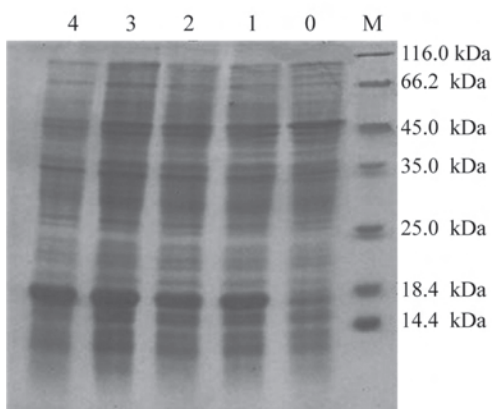
重组质粒经菌液PCR检测,得到一条约为500 bp的条带(图2A),与目的基因大小一致。连接后的重组质粒经双酶切产生两条分子量分别约为500 bp和4 000 bp的条带(图2B),这与目的基因*RhoA*片段及



M: 2 000 bp DNA Marker; P: PCR产物。

M: 2 000 bp DNA Marker; P: PCR product.

图1 PCR得到含有*Xho* I和*Xba* I酶切位点的*RhoA*基因片段
Fig.1 PCR amplification of the *RhoA* gene from planarian include *Xho* I and *Xba* I RE sites



M: 蛋白Marker; 0: 含重组质粒的未诱导菌, 即对照; 1-4: 分别诱导2 h、4 h、6 h、8 h后所取菌样。

M: protein Marker; 0: total cellular extracts from *E.coli* DH5 α containing pBV220-IL1-RhoA without induction; 1-4: total cellular extracts from *E.coli* DH5 α containing pBV220-IL1-RhoA induced after 2 h, 4 h, 6 h, 8 h at 42 °C.

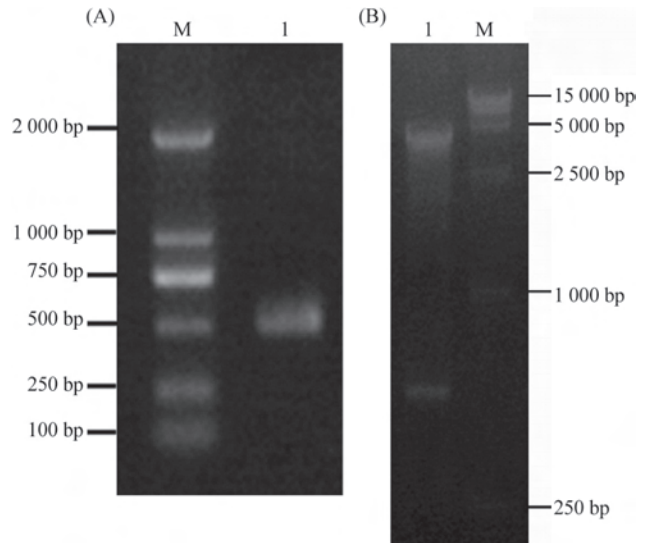
图3 重组蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis the expression of RhoA protein (5% concentration gel, 15% separation gel)

双酶切后的线性化质粒大小一致。交由上海博尚测序公司进行测序,质粒测序结果比对后,发现序列完整、正确。说明目的基因*RhoA*片段已成功连接到表达载体上,表达载体构建成功。

2.3 重组蛋白的表达

重组菌在42 °C诱导表达,分别诱导2 h、4 h、6 h及8 h后取样,跟未经诱导的重组菌作对照,在诱导2 h



A: M, 2 000 bp DNA Marker; 1, PCR产物; B: M, 15 000 bp DNA Marker; 1, 重组质粒双酶切后目的基因*RhoA*和pBV220-IL1质粒片段。

A: M, 2 000 bp DNA Marker; 1, PCR product; B: M, 15 000 bp DNA Marker; 1, digested *RhoA* gene and plasmid fragment.

图2 重组质粒pBV220-IL1-RhoA的PCR鉴定(A)及酶切鉴定(B)

Fig.2 Electrophoretic analysis of recombinant pBV220-IL1-RhoA digested by *Xho* I, *Xba* I and amplified by PCR

后已有目的蛋白表达,并且表达量已较高(图3),大小约为18 kDa,这与融合表达的RhoA蛋白理论分子量相吻合,同时目的蛋白条带清晰,且表达量较足,说明该蛋白经诱导能够高效表达,为大量纯化蛋白提供了可行性。

2.4 重组蛋白的纯化及Western杂交鉴定

对诱导后的菌液离心,超声破碎,分别取上清及沉淀(含有包涵体)进行SDS-PAGE电泳检测,结果表明在上清中含量很少,因此主要为包涵体表达,用切胶纯化的方法得到了目的蛋白,对纯化后的蛋白进行Western杂交,结果都表明为目的蛋白(图4)。

2.5 荧光免疫组织化学定位

用兔抗大鼠的RhoA抗体,检测了RhoA蛋白在

涡虫体内的分布情况, 与对照组进行比较, 结果表明, RhoA蛋白在东亚三角涡虫神经部位表达(图5), 与特异的涡虫神经系统标记蛋白anti-SYNORF1结果相一致^[20]。

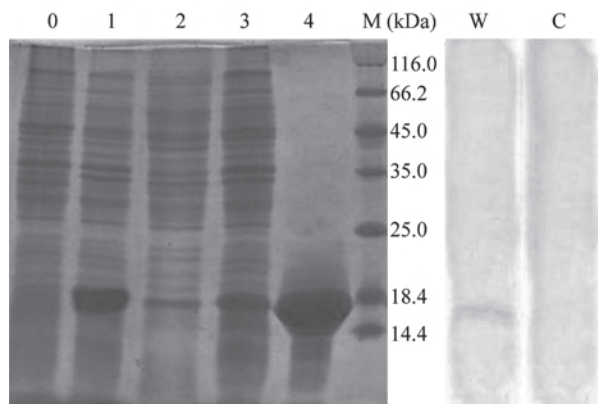


图4 SDS-PAGE检测RhoA蛋白的表达及Western杂交
Fig.4 SDS-PAGE analysis the expression of RhoA protein and Western blot analysis (5% concentration gel, 15% separation gel)

M: 蛋白Marker; 0: 含重组质粒的未诱导菌; 1: 超声破碎后取沉淀即包涵体检测; 2: 超声破碎后取上清检测; 3: 含重组质粒诱导4 h的菌样; 4: 切胶纯化的蛋白; W: Western杂交结果; C: Western杂交对照。
 M: protein Marker; 0: total cellular extracts from *E.coli* DH5 α containing pBV220-IL1-RhoA before induction; 1: the inclusion body of ultrasonic disintegrated cellular extracts; 2: the supernatant of ultrasonic disintegrated cellular extracts; 3: total cellular extracts from *E.coli* DH5 α containing pBV220-IL1-RhoA induced after 4h in 42 °C; 4: the purified RhoA protein; W: Western blot of RhoA; C: control.

3 讨论

本实验成功构建了重组表达载体pBV220-IL1-RhoA, 在42 °C下, 以诱导时间为梯度, 对含重组质粒的大肠杆菌进行诱导表达, 发现诱导时间2 h时已经有目的蛋白表达且表达量较多, 随着时间的延长至8 h时蛋白的表达量并没有较大的变化。本实验选择4 h为最佳诱导表达时间, 大量诱导表达后离心菌液并超声破碎, 分别取上清和沉淀, 经SDS-PAGE电泳检测后, 结果表明, 上清中目的蛋白表达量较少, 主要为包涵体表达, 包涵体形式表达的蛋白生物活性会受到影响, 但包涵体形式存在的目的蛋白纯化过程中不影响抗原的免疫原活性, 对Western杂交没有影响。由于涡虫该蛋白同大鼠的同源性为65%, 因此选用兔抗大鼠RhoA多克隆抗体作一抗进行了Western杂交和荧光免疫组织化学定位, 同对照组进行比较可以发现, 该蛋白在涡虫神经系统处表达。

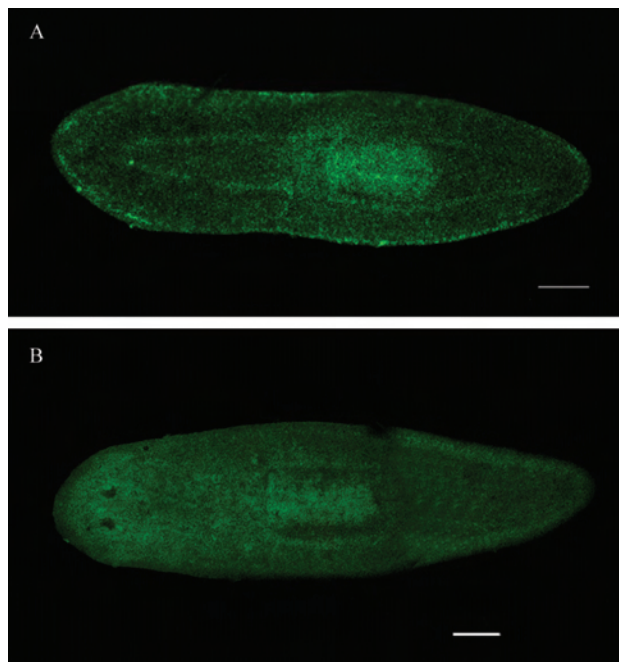


图5 荧光免疫组织化学检测RhoA蛋白在涡虫体内的分布
Fig.5 Expression pattern of RhoA protein, analyzed by whole-mount immunofluorescence

A: RhoA蛋白在涡虫神经系统处表达; B: 对照。标尺=100 μ m。
 A: RhoA is located in the nervous system of planarian; B: control. Scale bars=100 μ m.

由于涡虫特殊的进化地位和强大的再生能力, 目前已经成为研究发育、再生及干细胞的模式动物, 随着涡虫基因组和cDNA文库的构建, 大量基因在各地的实验室进行了研究, 仅报道的在涡虫神经系统表达的基因就达千余种^[21], 但是对它们之间相互调控的分子机理尚缺乏更加深入的研究。RhoA既普遍存在, 又高度保守, 是维持生物体细胞活性必不可少的调控因子。本实验表达出RhoA蛋白, 并进行了纯化, 荧光免疫组织化学结果显示RhoA蛋白在涡虫神经系统表达。期望能以此不断探索其生物学功能, 弄清楚在维持生物功能方面与其他分子间的具体调控机理, 为RhoA在结构和功能方面研究奠定基础, 同时也为确定涡虫的特殊进化地位提供一定的实验支持。

参考文献(References)

- 1 Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: Regulation, effectors and functions *in vivo*. *Bioessays* 2007; 29(4): 356-70.
- 2 Wennerberg K, Der CJ. Rho-family GTPases: It's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 2004; 117(8): 1301-12.

- 3 Madaute P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell* 1985; 41(1): 31-40.
- 4 Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001; 11(12): 471-7.
- 5 Nakayal Y, Sukowati EW, Wu YP, Sheng GJ. RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat Cell Biol* 2008; 10(7): 765-75.
- 6 Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1-2): 65-76.
- 7 Bhadriraju K, Yang M, Alom Ruiz S, Pirone D, Tan J, Chen CS. Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension. *Exp Cell Res* 2007; 313(16): 3616-23.
- 8 Ridley AJ. The GTP-binding protein Rho. *J Biochem Cell* 1997; 29(11): 1225-9.
- 9 Baek SH, Kwon YC, Lee H, Choe KM. Rho-family small GTPases are required for cell polarization and directional sensing in *Drosophila* wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 488-92.
- 10 Lu Y, Settleman J. The role of Rho family GTPases in development: Lessons from *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999; 1(2): 87-94.
- 11 Wünnenberg-Stapleton K, Blitz IL, Hashimoto C, Cho KW. Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development* 1999; 126(23): 5339-51.
- 12 Salas-Vidal E, Meijer AH, Cheng X, Spaank HP. Genomic annotation and expression analysis of the zebrafish Rho small GTPase family during development and bacterial infection. *Genomics* 2005; 86(1): 25-37.
- 13 Zhu S, Korzh V, Gong Z, Low BC. RhoA prevents apoptosis during zebrafish embryogenesis through activation of Mek/Erk pathway. *Oncogene* 2008; 27(11): 1580-9.
- 14 Rupp PA, Kulesa PM. A role for RhoA in the two-phase migratory pattern of post-otic neural crest cells. *Dev Biol* 2007; 311(1): 159-71.
- 15 Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakav K, Hashimoto R, Otani H, *et al.* Rac1 is for the proper formation of the three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 1988; 17(26): 3427-33.
- 16 吕新玲, 孙振柱. Rho亚家族与乳腺癌的研究进展. *医学综述* 2008; 14(9): 1328-31.
- 17 侯艳鹏, 王 铁. RhoA蛋白在喉癌组织中的表达及意义. *临床肿瘤学杂志* 2010; 15(7): 646-8.
- 18 Alvarado AS. The freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*: Embryogenesis stem cells and regeneration. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 438-44.
- 19 Pellettieri J, Fitzgerald P, Watanabe S, Mancuso J, Green DR, Alvarado AS. Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol* 2010; 338(1): 76-85.
- 20 Francesc Cebrià. Regenerating the central nervous system: How easy for planarians! *Dev Genes Evol* 2007; 217: 733-48.
- 21 Cebrià F, Kudome T, Nakazawa M, Mineta K, Ikeo K, Gojobori T, *et al.* The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. *Mech Dev* 2002; 16(1-2): 199-204.

Prokaryotic Expression of *RhoA* Gene and Its Tissue Location in Planarian *Dugesia japonica*

Nie Min, Zhao Bosheng*

(Laboratory of Developmental and Evolutionary Biology, School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract To investigate the certain function of RhoA in planarian *Dugesia japonica*, the *DjRhoA* gene was cloned into prokaryotic expression vector pBV220-IL1 using the methods of PCR, restriction digest and sequencing. The recombinant vector was then transferred into *E.coli* DH5 α . The fusion protein RhoA expression was induced by 42 °C and purified to detect with SDS-PAGE. The results indicated that the *DjRhoA* gene expressed as inclusion bodies in *E.coli* DH5 α , and its molecular weight was estimated to be approximately 18 kDa. Western blot showed that the antibody reacted with the protein. Based on immunofluorescence analyses, RhoA was mainly expressed in the nervous system of planarian.

Key words *Dugesia japonica*; RhoA; gene expression; Western blot; immunofluorescence analysis

Received: December 16, 2010 Accepted: March 1, 2011

This work was supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation (No.ZR2009DM029) and the Key Project of Ministry of Education of China (No.08077)

*Corresponding author. Tel: 86-533-2781832, E-mail: zhaobosheng@sdut.edu.cn