DOI: 10.11844/cjcb.2013.07.0058

一个可指示核仁定位和柯浩体定位

信号Marker的构建

郑璐平^{1,2} 毛倩卓¹ 林 辰¹ 谢荔岩¹ 吴祖建^{1*} 谢联辉^{1*} (¹福建农林大学,福建省植物病毒学重点实验室,福州 350002; ²福建农林大学,生物农药与化学生物学教育部重点实验室,福州 350002)

摘要 通过RT-PCR获得本氏烟纤维蛋白Fibrillarin2的cDNA,并将其重组到表达载体 pEarley101(黄色荧光蛋白,YFP)和pEarley102(青色荧光蛋白,CFP)上。在本氏烟叶片表皮细胞中瞬 时表达融合蛋白,激光共聚焦显微镜下观察,发现蛋白定位在细胞核仁和柯浩体上,可以作为这两 种细胞器的指示Marker,并通过Western blot检测融合蛋白的表达。该Marker对明确蛋白特别是病 毒编码的蛋白在细胞核中的定位以及功能推测具有重要意义。

关键词 细胞定位;纤维蛋白;核仁;柯浩体

Construction and Application of A Marker Localizing in Nucleolus and Cajal Body

Zheng Luping^{1,2}, Mao Qianzhuo¹, Lin Chen¹, Xie Liyan¹, Wu Zujian^{1*}, Xie Lianhui^{1*}

(¹Key Laboratory of Plant Viology , Fujian Province, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ²Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract cDNA encoding *Nicotiana benthamiana* fibrillarin2 was amplified by RT-PCR and inserted into expressed vectors which include YFP or CFP. Transient expression of these constructs was on leaf epidermal cells of *Nicotiana benthamiana*, these proteins localized in the nucleolus and cajal body, which can be a marker of these two organelles. The expression of these new fusion proteins were also verified by Western blot. This marker maybe play a role on indicating accurate localization in nucleus and forecasting the function of proteins, especially virus-encoded proteins.

Key words cell localization; fibrillarin; nucleolus; cajal body

细胞核是最早被发现存在于真核细胞中的细胞器,由核被膜、核孔、核纤层、染色质、核仁以及次核体等组成。细胞的大多数遗传物质存在于细胞核中,主要用于维持基因的完整性,并借由调节基

Received: March 7, 2013 Accepted: April 27, 2013

因表现来影响细胞活动[1-2]。

核仁是细胞核重要的细胞器之一,其显微结构是一匀质的球体,由rDNA簇围绕而成,称之为核 仁组织区域(nucleolus organizer regions, NORs),是

收稿日期: 2013-03-07 接受日期: 2013-04-27

福建省教育厅科技项目(批准号: JA12120)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 0591-83789265, E-mail: wuzujian@126.com; Tel: 0591-83789439, E-mail: fjxlh@126.com

This work was supported by the Science and Technology Funds from Fujian Education Department (Grant No.JA12120) *Corresponding author. Tel: +86-591-83789265, E-mail: wuzujian@126.com; Tel: +86-591-83789439, E-mail: fjxlh@126.com 网络出版时间: 2013-06-24 16:07 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130624.1607.001.html

rDNA转录, rRNA前体加工、修饰和核糖体前体装配和成熟的场所^[3], 也是RNA加工和修饰、核糖核蛋白复合物、一些信号识别粒子RNA以及microRNAs组装的场所^[4-5]。核仁是细胞合成核糖体RNA(rRNA)的场所, 它调节细胞生命活动的节奏, 是系统的控制中心^[6]。

除核仁外,细胞核内的多种非膜包围的小体——次核体也发挥着重要作用。柯浩体(Cajal body, CB)就是其中一种,该细胞器在1903年由Ramony Cajal发现。在显微镜下,CB呈致密球状结构,直径为0.2~2.0 µm,分布在核仁内部或外围^[7]。CB含有大量剪接的小核糖体蛋白以及一些RNA转录因子,参与RNA的成熟和加工,特别是小核仁RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)和小核RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)和小核RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)和小核RNA(small nuclear RNA, snRNA)的成熟以及组蛋白mRNA的修饰,同时调控一些大分子的组装,包括一些转录因子的预组装等^[8],CB的组分还通过与一些特异基因互作来反馈调控基因的表达^[9]。总之,CB是细胞剪接、组装和转录后修饰的场所^[10]。

在核仁和Cajal body这两个细胞器内含有各种 各样的蛋白,这些蛋白在细胞核乃至整个细胞中发 挥着不可忽略的作用,纤维蛋白Fibrillarin(Fib)就是 其中一种。Fib被认为是一个核仁蛋白,可以同时定 位在核仁和CB上^[11]。因此,本文利用基因融合技术 将本氏烟纤维蛋白(NbFib2)的cDNA与分别带有黄 色荧光蛋白(YFP)和青色荧光蛋白(CFP)的载体进行 融合。在激光共聚焦显微镜下,新融合蛋白定位在 本氏烟叶片表皮细胞的核仁和柯浩体上,可以作为 这两个细胞器的指示Marker,这对明确一些蛋白在 细胞核内的具体位置以及进一步推测和研究蛋白的 功能具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

 1.1.1 植株、菌株和载体 入门载体pDNOR221、 表达载体pEarley101和pEarley102由加拿大农业 部王爱民博士赠送; 35S:GFP表达载体,大肠杆菌 (Escherichia coli) DH5α菌株、农杆菌(Agrobacterium tumefaciens) EHA105菌株以及本氏烟(Nicotiana benthamiana)种子由本实验保存。

1.1.2 试剂 RNA提取试剂盒(EasyPure Plant RNA Kit)、反转录试剂盒(TransScript II First-Strand

cDNA Synthesis SuperMix)、PCR taq酶(TransStart TopTaq DNA Polymerase)、质粒提取试剂盒(EasyPure HiPure Plasmid MaxiPrep Kit)和 胶 回 收 试 剂 盒 (EasyPure Quick Gel Extraction Kit)购于北京全式金 生物技术有限公司,限制性内切酶*Mlu* I购于宝生物 工程(大连)有限公司, BP Clonase[™] II Enzyme Mix和 LR Clonase[™] II Enzyme Mix购于Invitrogen公司,引 物合成及测序工作由南京金斯瑞生物科技有限公司 完成。GFP多克隆抗体购于南京金斯瑞生物科技有 限公司,碱性磷酸酶标记羊抗兔IgG购于Sigma公司, BCIP/NBT显色试剂盒购于成都贝斯特试剂有限公 司。

1.2 方法

1.2.1 本氏烟纤维蛋白(NbFib2)的cDNA ORF的 克隆 取0.1 g本氏烟叶片,迅速放入液氮中,按 试剂盒说明书完成RNA提取。根据GenBank中 报 道 的NbFib2的 序 列(GenBank accession number: AM269909.1)设计一对引物, NbFib2-F: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGT TGC ACC AAC TAG AGG-3', NbFib2-R: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GGC AGC AGC CTT CTG CTT CT-3'(划线部分为同源重 组序列), 以RNA反转录产物cDNA第一链为模板进 行PCR扩增,条件为:94 °C预变性5 min;94 °C变性 30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共35个循环; 最 后72 °C终延伸10 min。扩增产物通过1%琼脂糖凝 胶电泳鉴定,并回收与预期条带大小一致(1000 bp 左右)的条带,通过Gateway重组和克隆技术,按BP Clonase[™] II Enzyme Mix说明书, 将回收条带与入门 载体pDNOR221进行同源重组,并将重组产物转化 到DH5α中,卡那霉素抗性平板筛选培养,挑选单菌 落摇菌并提取质粒,通过PCR和Mlu I酶切鉴定正确 后,进行测序。

1.2.2 重组表达载体pEarley101-NbFib2、pEarley102-NbFib2的构建 将测序正确的质粒pDNOR221-NbFib2进行*Mlu* I单酶切,回收条带大小为2 700 bp 左右的条带,按LR Clonase[™] II Enzyme Mix说明书,将回收条带分别与pEarley101和pEarley102进行同 源重组,并将重组产物转化到DH5α中,卡那霉素抗 性平板筛选培养,挑取单菌落摇菌并提取质粒,通过 PCR鉴定。将鉴定正确的重组质粒通过液氮冻融法 转化到EHA105中,卡那霉素和利福平抗性平板筛选 培养,挑取单菌落,进行菌落PCR鉴定。

1.2.3 pEarley101-NbFib2、pEarley102-NbFib2在 本氏烟叶片表皮细胞中的瞬时表达与定位 将鉴 定正确的农杆菌pEarley101-NbFib2和pEarley102-NbFib2分别在28 ℃条件下,在含有50 μg/μL卡那霉 素和50 μg/μL利福平的LB液体培养基中培养至对 数生长期, 各取1 mL菌液12 000 r/min离心1 min, 弃 菌液,底部菌体用悬浮液(10 mmol/L MES pH5.6, 10 mmol/L MgCl₂和150 µmol/L乙酰丁香酮)悬浮2 次后,用悬浮液调整菌液浓度至D600在0.6~0.8范围 内,室温放置3h。用1mL注射器吸取适量菌液,一 手按住叶片,一手用无针头的针管从本氏烟叶片背 部将菌液慢慢注入叶片组织空隙中,浸润接种的植 株于25 ℃暗培养, 48 h后在激光共聚焦显微镜下 (Microsystems CMS GmbH Leica TCS SP5)观察融合 蛋白的亚细胞定位结果。同时, 通过DAPI染色法来 进一步确定细胞核的位置。

1.2.4 本氏烟总蛋白提取及Western blot检测 取 接种3 d的本氏烟叶片0.5 g,用液氮研磨成细粉(同 时设健株为对照),加入2 mL蛋白提取蛋白缓冲液 (50 mmol/L phosphate pH8.0, 10 mmol/L Tris pH8.0, 500 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20, 0.1% β-巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF, Roche Protease inhibitor cocktail MINI tablet 1片/10 mL),研磨数分钟,移入1.5 mL离 心管,4 °C、12 000 r/min离心10 min,吸上清至新离 心管中,4 °C、12 000 r/min离心10 min,吸上清至新 离心管,完成总蛋白的提取。

取适量提取纯的蛋白在12% SDS-PAGE上进 行电泳,电泳结束前20 min,将PDVF膜在甲醇中浸 润10 s后,转移至电转缓冲液中浸润20 min,待电泳 结束后,将凝胶转移到膜上,通过湿转转膜仪进行 转膜(80 V,45 min),电转结束后,取出PDVF膜,用 1×PBST清洗3次(5 min/次),加入封闭液(5%脱脂奶 粉),37 °C,50 r/min,1 h,用1×PBST清洗PDVF膜3次, 加入GFP抗体孵育(37 °C,50 r/min,1 h),用1×PBST 清洗膜3次,加入二抗(羊抗兔)孵育(37 °C,50 r/min, 1 h),用1×PBST清洗膜3次,参照BCIP/NBT显色试剂 盒,在AP碱性磷酸反应缓冲液中加入等量底物显色 溶液BCIP/NBT避光显色(10~20 min)。

2 结果

2.1 本氏烟纤维蛋白(NbFib2)的cDNA ORF的克隆

以NbFib2-F/NbFib2-R为引物,以本氏烟RNA反转录的cDNA为模板,扩增得到条带大小为1000 bp的条带(图1),与预期大小一致,回收该条带与入门载体pDNOR221同源重组,图2A表明重组克隆子经PCR鉴定,大小为1000 bp左右,与预期一致。图2B表明重组质粒经Mlu I单酶切后,有2700 bp和900 bp左右的条带,证明NbFib2基因片断已经重组到pDNOR221上,测序结果也表明序列正确,将该质粒命名为pDNOR221-NbFib2。

2.2 融合表达载体pEarley101-NbFib2、pEarley102-NbFib2的获得

回收图2B中的2 700 bp大小的条带,将其分别 与pEarley101和pEarley102重组,并转化到DH5α中, 图3A表明克隆子经PCR鉴定,大小为1 000 bp左右,



M: DNA分子量标准; 1,2: NbFib2基因。 M: DNA marker; 1,2: NbFib2 cDNA. **图1 NbFib2基因的扩增**

Fig.1 Amplification of NbFib2 gene



A: 1,2: 重组质粒pDNOR221-*NbFib2*; M: DNA分子量标准; B: 1,2: pDNOR221-*NbFib2 Mlu* I单酶切。

A: 1,2: recombinant plasmid pDNOR221-*NbFib2*; M: DNA marker; B: 1,2: pDNOR221-*NbFib2* digested with *Mlu* I.

图2 重组质粒pDNOR221-NbFib2的PCR及酶切鉴定 Fig.2 Identification of recombinant plasmid pDNOR221-NbFib2 by PCR and enzyme digestion 与预期相符。正确的克隆子经摇菌提取质粒后转化 到EHA105中,图3B表明单菌落经PCR鉴定,大小为



A: M: DNA分子量标准; 1: 重组质粒pEarley101-NbFib2(大肠杆菌 DH5α中); 2: 重组质粒pEarley102-NbFib2(大肠杆菌DH5α中); 3: CK; B M: DNA分子量标准; 1: 单克隆子pEarley101-NbFib2(农杆菌EHA105 中); 2: 单克隆子pEarley102-NbFib2(农杆菌EHA105中); 3: CK。

A: M: DNA Marker; 1: recombinant plasmid pEarley101-NbFib2(in *E.coli* DH5 α); 2: recombinant plasmid pEarley101-NbFib2(in *E.coli* DH5 α); 3: CK; B: M: DNA Marker; 1: single clone pEarley101-NbFib2 (in *A. tumefaciens* EHA105); 2: single clone pEarley102-NbFib2 (in *A. tumefaciens* EHA105); 3: CK.

图3 重组子pEarley101-NbFib2和pEarley102-NbFib2的 PCR鉴定

Fig.3 Identification of recombinant pEarley101-NbFib2 and pEarley102- NbFib2 by PCR

1 000 bp, 证明质粒已经成功转化到农杆菌EHA105 菌株中。

2.3 NbFib2在本氏烟叶片表皮细胞中的定位

摘取浸润48 h后的本氏烟叶片在激光共聚焦显 微镜下观察,图4结果表明,NbFib2与带YFP的表达 载体融合后,新融合蛋白能清晰地定位在核仁和柯 浩体上,呈黄色荧光;NbFib2与带CFP的表达载体融 合后,新融合蛋白能清晰地定位在核仁和柯浩体上, 呈青色荧光。这2个新融合蛋白均可以明确地指示 核仁和柯浩体,可作为这两种细胞器的指示Marker。 同时,DAPI染色实验表明,NbFib2定位在细胞核内 (图5)。

2.4 Western blot检测

以GFP多克隆抗体为一抗,以碱性磷酸酶标 记羊抗兔为二抗来检测本氏烟叶片中GFP、YFP、 CFP的表达,图6表明,仅表达GFP的本氏烟(图6泳 道4)在约为30 kDa处有一明显条带,大小与GFP的 大小一致。在接种pEarley101-NbFib2和pEarley102-NbFib2的本氏烟中(图6泳道2和3),在70 kDa处有一 单一的明显条带,该条带大小与YFP/CFP和NbFib2 融合后产生的新蛋白大小一致。而对照健康植株 (图6泳道1)在30 kDa和70 kDa均没有特异条带,说 明这些特异条带是GFP、pEarley101-NbFib2和 pEarley102-NbFib2特异表达的,并且这些蛋白得到



A: pEarley101-NbFib2; B: 透射光; C: A和B的叠加; D: pEarley102-NbFib2; E: 透射光; F: C和E的叠加。NO: 核仁; CB: 柯浩体。 A: pEarley101-NbFib2; B: bright field; C: overlay of A and B; D: pEarley102-NbFib2; E: bright field; F: overlay of C and E. NO: nucleolus; CB: cajal body.

> 图4 融合蛋白的亚细胞定位 Fig.4 Subcellular localization of fusion protein



A: DAPI荧光染色; B: pEarley101-NbFib2; C: A和B的叠加; D: DAPI荧光染色; E: pEarley102-NbFib2; F: D和E的叠加。NO: 核仁; CB: 柯浩体。 A: DAPI fluorescence stain; B: pEarley101-NbFib2; C: merge of A and B; D: DAPI fluorescence stain; E: pEarley102-NbFib2; F: merge of E and F. NO: nucleolus; CB: cajal body.





1: CK(健康株); 2: pEarley101-NbFib2; 3: pEarley102-NbFib2; M: 蛋 白分子标准量; 4: 35S:GFP。

1: CK (healthy plant); 2: pEarley101-NbFib2; 3: pEarley102-NbFib2; M: protein marker; 4: 35S:GFP.

图6 Western blot检测本氏烟叶片中蛋白表达情况

Fig.6 Western blot analysis of proteins expression in Nicotiana benthamiana leaves

了正确的表达。

3 讨论

Fibrillarin是一个已知定位在核仁和Cajal body 上的细胞核仁蛋白,本文将本氏烟的Fib2基因与 YFP和CFP分别进行融合,并通过Western blot检测 和确认融合蛋白的表达,激光共聚焦显微镜观察显 示,这两个新融合蛋白可以作为核仁和CB的指示 Marker。本文所采用的农杆菌接种方法能使融合蛋 白在本氏烟叶片中得到表达,为了得到较好和稳定的表达,对于植株大小和农杆菌菌液溶度有一定的要求。其中,本氏烟植株大小以6叶期为佳,若植株太小,接种后容易萎焉甚至死亡;若植株太大(如开花期),农杆菌不易渗入表皮细胞,因此表达量较低,接种的农杆菌D600在0.6~0.8之间为佳,接种后植株不宜强光照。

Fib与病毒编码的蛋白之间的研究逐渐成为一 个热点,因此,该融合蛋白的成功构建对于研究病毒 如何侵染模式植物本氏烟也具有一定意义。植物病 毒往往在细胞核中完成病毒核糖核蛋白的合成和运 输,病毒通过招募细胞的核蛋白进行病毒核糖核蛋 白粒子的装配、病毒的复制和移动以及阻碍寄主 对病毒的防御作用等^[12]。花生丛簇病毒(Groundnut rosette virus, GRV)编码的ORF3蛋白亚细胞定位在 核仁和CB上,它先借助于CB进入核仁[13],再与核仁 蛋白Fib互作,从而达到系统侵染的目的^[14]。同样地, 马铃薯卷叶病毒(Potato Leaf Roll Virus, PLRV)编码 的外壳蛋白(coat protein, CP)也定位在核仁, 该病毒 也无法系统侵染Fibrillarin基因沉默的植株^[15]。可见, 寄主的核蛋白在病毒的系统侵染过程中发挥着重要 作用,研究还发现病毒编码的很多蛋白都可以在核 仁中检测到,这种定位有利于病毒复制以及输送病 毒RNAs^[16]。寄主面对病毒侵染时,往往会进行主动 防御,而病毒在面对寄主防御时,往往会编码基因沉 默抑制子来应对,其中有一部分沉默抑制子的亚细 胞定位在核仁、CB上。马铃薯A病毒(Potato virus A, PVA)编码的NIa/VPg蛋白沉默抑制子的活性需要依 赖于VPg蛋白定位在核仁和CB这一亚细胞定位特 征^[17],黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV) 编码的沉默抑制子2b蛋白同样也定位在细胞核的核 仁上^[18]。在植物细胞中,核仁还被认为是RNA沉默 发生的始点^[19],因此,定位在核仁上的病毒编码的蛋 白很可能与RNA沉默相关,定位在细胞核/核仁的病 毒编码的蛋白还很可能参与阻碍寄主的防御过 程^[20]。总之,病毒与核仁和CB之间存在着直接 或者间接的作用。

我们可以利用本文构建好的Marker, 通过农杆 菌共注射、共定位的方法, 先初步确定蛋白, 特别是 一些具有核定位信号的蛋白在细胞核中的定位。如 果可以与该Marker共定位, 就可以推测病毒编码蛋 白特别是未知功能的蛋白可能具有的一些功能(如 参与病毒的复制、移动的过程、沉默抑制子等), 从 而进行下一步的研究, 当然, 也可以借助该Marker确 定其他蛋白在细胞核中的具体位置。

致谢

感谢福建中医药大学医学实验中心对DAPI染 色实验的指导和帮助。

参考文献 (References)

- Schneider R, Grosscheldl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organisation, and gene expression. Genes Dev 2007; 21(23): 3027-43.
- 2 Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. Nuclear functions in space and time: Gene expression in a dynamic, constrained environment. FEBS Lett 2008; 582(14): 1960-70.
- Pederson T. The nucleolus. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;
 3(3): a000638.
- 4 Pederson T. The plurifunctional nucleolus. Nucleic Acids Res 1998; 26(17): 3871-6.
- 5 Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS. The nucleolus: A site of

ribonucleoprotein maturation. Curr Opin Cell Biol 2003; 15(3): 318-25.

- 6 Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DL. The nucleolus: Structure/function relationship in RNA metabolism. Wiley Interdiscip Rev RNA 2010; 1(3): 415-31.
- 7 Dundr M, Hebert MD, Karpova TS, Stanek D, Xu HZ, Shpargel KB, *et al. In vivo* kinetics of Cajal body components. J Cell Biol 2004; 164(6): 831-42.
- 8 Gall JG. Cajal bodies: the first 100 years. Annu Rev Cell Dev Biol 2000; 16(1): 273-300.
- 9 Matera, AG. Of coiled bodies, gems, and salmon. J Cell Biochem 1998; 70(2): 181-92.
- 10 Nizami Z, Deryusheva S, Gall JG. The cajal body and histone locus body. Cold spring Harb Perapect Biol 2010; 2(7): a000653.
- 11 Rakitina DV, Taliansky M, Brown JW, Kalinina NO. Two RNAbinding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. Nucleic acids Res 2011; 39(20): 8869-80.
- 12 Shaw P, Brown J. Nucleoli: Composition, function, and Dynamics. Plant Physiol 2012; 158(1): 44-51.
- 13 Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, Rakitina DV, Gillespie T, MacFarlane S, *et al.* Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. EMBO J 2007; 26(8): 2169-79.
- 14 Kim SH, Macfarlane S, Kalinina NO, Rakitina DV, Ryabov EV, Gillespie T, *et al.* Interaction of a plant virus encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(26): 11115-20.
- 15 Haupt S, Stroganova T, Ryabov E, Kim SH, Fraser G, Duncan G, et al. Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. J Gen Virol 2005; 86(10): 2891-6.
- 16 Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Nucleolus: the fascinating nuclear body. Histochem Cell Biol 2008; 129(1): 13-31.
- 17 Pontes O, Pikaard CS. siRNA and miRNA processing: New functions for Cajal bodies. Curr Opin Genet Dev 2008; 18(2): 197-203.
- 18 González I, Martínez L, Rakitina DV, Lewsey MG, Atencio FA, Llave C, et al. Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: Their significance to RNA silencing suppressor activity. Mol Plant Microbe Interact 2010; 23(3): 294-303.
- 19 Pontes O, Li CF, Nunes PC, Haag J, Ream T, Vitins A, *et al.* The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. Cell 2006; 126(1): 79-92.
- 20 Shaw P, Brown J. Nucleoli: Composition, function, and Dynamics. Plant Physiol 2012; 158(1): 44-51.