

小鼠 Cdc25B 核输出序列

赵鸿梅^{1,2} 崔 城³ 徐小燕¹ 于秉治^{1*}⁽¹ 中国医科大学生物化学教研室, 沈阳 110001; ² 辽宁省人民医院检验科, 沈阳 110016;³ 中国医科大学生理学教研室, 沈阳 110001)

摘要 为探讨小鼠卵母细胞中 Cdc25B (cell division cycle 25 homolog B)核输出序列在卵母细胞 G₂/M 转换过程中的调控机制, 应用显微注射方法将 Cdc25B 的野生型、N 末端缺失 1~51 位氨基酸片段(Cdc25B-Δ51)、1~65 位氨基酸片段(Cdc25B-Δ65)突变体的 mRNA 和 pEGFP-Cdc25B-WT、pEGFP-Cdc25B-Δ51、pEGFP-Cdc25B-Δ65 的融合质粒显微注射到含有完整生发泡的小鼠卵母细胞中, 观察不同注射组小鼠卵母细胞发生生发泡破裂的情况及蛋白质亚细胞定位。结果显示 Cdc25B-Δ51 及 Cdc25B-Δ65 都丧失了诱导小鼠卵母细胞减数分裂的能力; 同时亚细胞定位研究表明在 G₂ 期野生型 Cdc25B 主要分布在细胞浆中, Cdc25B-Δ51 在核浆均有分布, Cdc25B-Δ65 则主要分布于细胞核中。研究结果表明 Cdc25B 在 52~65 位氨基酸之间存在核输出序列(nuclear export sequence, NES), NES 参与的核转运机制作为一种重要的调控机制控制着细胞的生理进程; N 末端的氨基酸对减数分裂的重启动起促进作用。

关键词 Cdc25B; 减数分裂; 核输出序列; 生发泡

所有哺乳动物的卵母细胞都存在 G₂ 期阻滞, G₂ 期阻滞的卵母细胞有一特征性核结构—生发泡(germinal vesicle, GV), 减数分裂恢复后, GV 破裂(germinal vesicle break down, GVBD), 染色体凝集, 纺锤体形成, 第一极体形成后, 立即进行第二次减数分裂, 在 MII 期阻滞直至受精。有研究证明缺失 Cdc25B(cell division cycle 25 homolog B)的雌性小鼠卵母细胞不能够发生 GVBD, 无法发育成为成熟的卵母细胞, 会导致不孕^[1]。为进一步深入探讨小鼠卵母细胞发生 GVBD 的调控机制, 我们应用了基因重组、显微注射、Western 印迹、荧光显微镜观察等技术初步研究了小鼠卵母细胞中 Cdc25B 的核输出序列的具体位置及其对卵母细胞成熟的影响, 以期能够为研究人类与其他哺乳动物的卵母细胞成熟调控的机制打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 Cdc25B 突变体构建

设计特异性引物(序列见后), 以质粒 pBSK-Cdc25B 为模板, 分别以 a、c/b、c 为引物, 经 PCR 得产物 ac、bc, 分别为编码 Cdc25B N 末端缺失 1~51 和 1~65 个氨基酸的 DNA 片段: Cdc25B-Δ51 和 Cdc25B-Δ65。

Cdc25B-Δ51 上游引物 a: 5'-GCC TCG AGT ATG

GTT ACC ACT CTT ACA C-3'

Cdc25BΔ-65 上游引物 b: 5'-GCC TCG AGT ATA TGG GCA GTG AGC CTC-3'

两者公用下游引物 c: 5'-CGG GAT CCC TCA TCA TCA CTG GTC TTG CAG-3'(划线处为 XhoI 酶切位点 CTCGAG、BamHI 酶切位点 GGATCC 及起始密码子 ATG、终止密码子 TCA)

PCR 反应体系: 5.0 μl 10×PCR 反应缓冲液, 5.0 μl 2 mmol/L dNTP mix, 0.5 μl 5 U/μl Taq DNA 聚合酶, 1.0 μl 10 pmol/μl 引物 a/b, 1.0 μl 10 pmol/μl 引物 c, 10 ng pBSK-cdc25B, 补水至 50 μl, 放入基因扩增仪(杭州博日科技有限公司)进行基因扩增。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 1 min, 然后按照 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 40 s, 进行 29 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物回收和纯化(TaKaRa): 应用 PCR 反应获得目的 DNA 片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 割下含目的基因的琼脂糖胶块, 放入 1.5 ml 离心管中, 吸头捣碎后加入 3 倍胶块体积的溶化液 DR-I 缓冲液, 置 65 °C 水浴 10 min 至胶完全熔化, 加入 1.5 倍胶块体积的溶化液 DR-II 缓冲液, 充分混匀后移入吸附柱中,

收稿日期: 2006-12-19 接受日期: 2007-05-23

高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(No.20050159019)

* 通讯作者。Tel: 024-23261253, E-mail: yzbioch@126.com

静置 2 min, 8 000 r/min, 离心 30 s(Kubota), 倒掉废液, 将吸附柱放入同一收集管中, 加入 500 μ l 洗液 A, 8 000 r/min 离心 30 s, 弃废液, 重复此过程, 12 000 r/min 再次离心 1 min, 将吸附柱放入一个干净的离心管中, 加入 700 μ l 洗液 B, 50 $^{\circ}$ C, 静置 2 min 后 15 000 r/min 离心 1 min, 离心管中液体即含目的 DNA 片段, 用于构建 pBSK-Cdc25B 的突变体 pBSK-Cdc25B- Δ 51 和 pBSK-Cdc25B- Δ 65。

反应体系: 5 μ l 2 $\times$ 快速连接缓冲液, 2 μ l PCR 反应产物 ac/bc, 1 μ l pBSK 载体, 1 μ l T4 DNA 连接酶, 1 μ l 双蒸水, 总体积 10 μ l。4 $^{\circ}$ C 反应过夜。所有重组质粒经测序证明正确。

1.2 体外转录

pBSK-Cdc25B-WT、pBSK-Cdc25B- Δ 51、pBSK-Cdc25B- Δ 65 分别取 1 μ g, 经 *Xba*I 酶切线性化后, 应用体外转录的试剂盒(Ambion) (操作方法见 mMSSAGE mMACHINE kit 使用指南)将制备好的线性模板体外转录成 5'-capped mRNA, 溶解于无核酸酶污染的 5 mmol/L Tris 和 0.5 mmol/L EDTA (pH 7.4) 中, 用于显微注射。

1.3 小鼠卵母细胞的采集和培养^[2]

3~4 周龄的昆明种雌性小鼠(中国医科大学实验动物部提供), 腹腔注射 5 IU 孕马血清(PMSG, 天津华孚高新技术生物公司), 自由采食与饮水, 48 h 后颈椎脱臼法处死, 剖腹取出卵巢, 放于含有 125 μ mol/L 二丁烯环一磷酸腺苷 dbcAMP, Sigma)的 M_2 (Invitrogen)培养液中, 在体视显微镜下获得含完整 GV 的裸卵母细胞, 在 M_2 培养液中洗 3 次, 卵母细胞在接受不同形式 mRNA 注射后, 在 MB 培养液(Gibco, 在 Waymouth MB 752/1 培养液的基础上添加 100 mg/ml 丙酮酸钠, 50 U/ml 青霉素, 50 μ g/ml 链霉素)中洗 3 次后转入 12 孔培养板, 每孔加入 200 μ l 预先在培养箱中平衡 2 h 的 MB 培养液, 上覆矿物油, 放入接受相同注射的卵母细胞, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内培养。

1.4 显微注射^[3]

显微注射应用显微操作系统(Eppendorf Transferman), 将 GV 期卵母细胞移入到含 125 μ mol/L dbcAMP 的 M_2 液滴中, 用持卵针将卵母细胞固定, 注射针刺入细胞将 10 pl (0.01 ng) Cdc25B-WT、Cdc25B- Δ 51 及 Cdc25B- Δ 65 的 mRNA 注入卵母细胞胞浆中, 每组注射约 100 个卵母细胞。

1.5 相差显微镜下观察卵母细胞成熟情况

将 Cdc25B-WT、Cdc25B- Δ 51 及 Cdc25B- Δ 65 mRNA 注射组及空白对照组(未注射)卵母细胞分别在 MB 培养液中 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内培养 3 h 后, 相差显微镜下(Nikon)观察, 记录不同 mRNA 注射组及对照组卵母细胞减数分裂恢复情况。

1.6 Western 印迹

培养 3 h 后, 收集卵母细胞, 每组 200 个, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 20 μ l 蛋白质提取缓冲液, 于液氮中反复冻融, 置于 -20 $^{\circ}$ C 备用。电泳前, 加入 2.0 μ l 十二烷基硫酸钠(SDS)样品缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 12% SDS-PAGE 电泳(Bio-Rad)分离蛋白质, 然后将蛋白质转至硝酸纤维素膜上, 用含 5% 小牛血清白蛋白(BSA)的 TBS(pH 7.4)将滤膜室温摇动温育 1 h 进行封闭, 再将滤膜与 CDC2-Tyr15 磷酸化抗体(中杉公司)(稀释比为 1:500)4 $^{\circ}$ C 温育过夜, 经 PBST 洗涤后, 用羊抗兔的 IgG 作为二抗(Santa Cruz)(稀释比为 1:2 000)室温温育 2 h, 化学发光法显影成像后扫描(Bio-Rad)。

1.7 pEGFP-Cdc25B- Δ 51 和 pEGFP-Cdc25B- Δ 65 的构建

反应体系: 5 μ l 2 $\times$ 快速连接缓冲液, 2 μ l PCR 反应产物 ac/bc, 1 μ l pEGFP 载体, 1 μ l T4 DNA 连接酶, 1 μ l 双蒸水, 总体积 10 μ l。4 $^{\circ}$ C 反应过夜。所有重组质粒经测序证明正确用于显微注射。

1.8 Cdc25B 的亚细胞定位观察

将 pEGFP-Cdc25B(本室保存)、pEGFP-Cdc25B- Δ 51、pEGFP-Cdc25B- Δ 65 质粒注射组的卵母细胞分别在 MB(含 500 μ mol/L dbcAMP)培养液中于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内培养 30 h, 利用荧光显微镜(Olympus)观察绿色荧光信号分布并照相, 以获得融合蛋白在细胞内的定位信息。

2 结果

2.1 PCR 获得目的 DNA 片段

以 pBSK-Cdc25B 为模板, 应用 PCR 方法获得目的 DNA 片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙啶染色后扫描成像(图 1)。扩增出长度约为 1 600 bp 及 1 650 bp DNA 片段, 分别为缺失 N 端 1~65 和 1~51 位氨基酸的 Cdc25B- Δ 65 和 Cdc25B- Δ 51。

2.2 pBSK-Cdc25B- Δ 51 和 pBSK-Cdc25B- Δ 65 的酶切鉴定

pBSK-Cdc25B- Δ 51 和 pBSK-Cdc25B- Δ 65 经 *Xho*I 和 *Bam*HI 酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见 3 000

bp 处的载体片段, 1 650 bp 和 1 600 bp 左右的目的片段, 经测序证明突变体构建成功(图 2)。

2.3 Cdc25B-WT 及突变体对卵母细胞减分裂恢复的作用

不同 mRNA 注射组卵母细胞中发生 GVBD 的百分率结果(图 3)显示, 与对照组(未注射组)相比(7.5%), 野生型 Cdc25B 的 mRNA 注射组 GVBD 发生的百分率(35%)与对照组相比结果有显著差异($P <$

0.05), 证明野生型 Cdc25B 对卵母细胞的成熟有促进作用。Cdc25B- Δ 51 和 Cdc25B- Δ 65 mRNA 注射组小鼠卵母细胞 GVBD 的发生率(分别为 8.0%, 7.0%), 与对照组相比, 无显著差异性($P > 0.05$), 说明注射的 mRNA 对卵母细胞的成熟无促进作用, 缺失的氨基酸序列使 Cdc25B 对卵母细胞减数分裂恢复的诱导功能丧失。每组实验至少重复 4 次。

2.4 CDC2-Tyr15 磷酸化抗体检测

成熟促进因子(MPF)的催化亚基 CDC2-Tyr15 去磷酸化状态时, MPF 有活性。我们检测了不同 mRNA 注射组的卵母细胞 CDC2-Tyr15 的磷酸化状态(图 4)。结果显示野生型注射组(3 泳道)只检测出微弱磷酸化的 CDC2-Tyr15, PBSK-Cdc25B- Δ 51、PBSK-Cdc25B- Δ 65 mRNA 注射组的卵母细胞同对照组的 CDC2-Tyr15 一直处于磷酸化状态, 间接反映 Cdc25B- Δ 51 和 Cdc25B- Δ 65 对成熟促进因子无活化作用。

2.5 绿色荧光蛋白融合质粒的鉴定

pEGFP-Cdc25B- Δ 51 和 pEGFP Cdc25B- Δ 65 经 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切后, 1% 琼脂糖电泳, 可见 4 700 bp 处的载体片段, 1 650 bp 和 1 600 bp 左右的目的片段(图 5), 证明亚克隆成功。

2.6 Cdc25B 的亚细胞定位

不同的融合质粒经显微注射到 GV 期卵母细胞中, 培养 30 h 后, 经荧光显微镜观察并照相, 结果显示 pEGFP-Cdc25B-WT 绿色荧光信号主要分布于胞

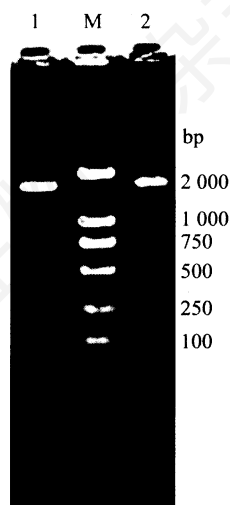


图1 Cdc25B- Δ 51 和 Cdc25B- Δ 65 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

1: Cdc25B- Δ 65; M: DL2000 marker; 2: Cdc25B- Δ 51。

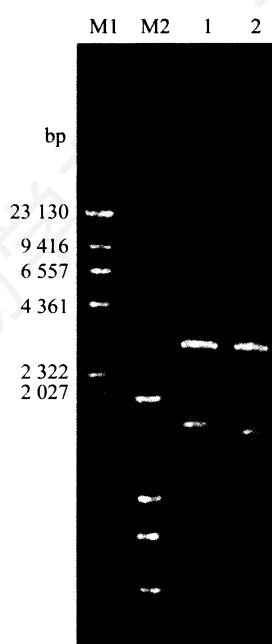


图2 pBSK-Cdc25B- Δ 51 和 pBSK-Cdc25B- Δ 65 质粒 DNA 双酶切鉴定结果

M1: *Hind*III; M2: DL2000 marker; 1: pBSK-Cdc25B- Δ 51; 2: pBSK-Cdc25B- Δ 65。

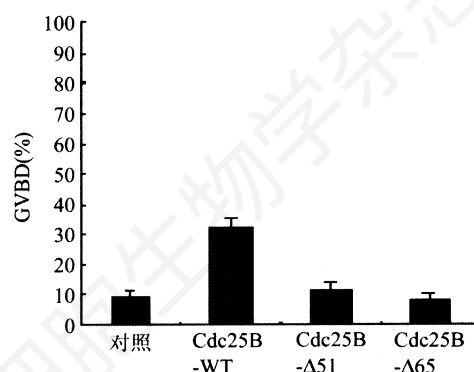


图3 不同mRNA注射组及对照组卵母细胞发生GVBD百分率



图4 CDC2-Tyr15 磷酸化状态的检测

1: 注射 Cdc25B- Δ 51mRNA 的卵母细胞; 2: 注射 Cdc25B- Δ 65 mRNA 的卵母细胞; 3: 注射 Cdc25B-WT mRNA 的卵母细胞; 4: 未注射组卵母细胞。

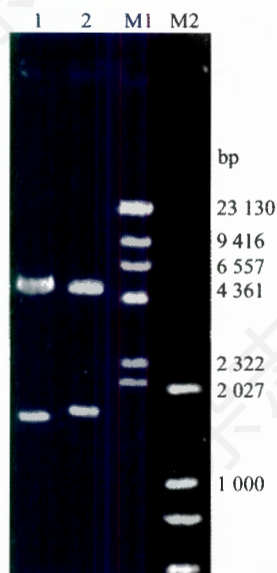


图5 重组质粒双酶切鉴定结果

1: pEGFP-Cdc25B-Δ65; 2: pEGFP-Cdc25B-Δ5; M1: *Hind*III; M2: DL2000 marker。

浆(图6A); pEGFP-Cdc25B-Δ51的荧光信号在胞浆及核中都有分布(图6B); pEGFP-Cdc25B-Δ65绿色荧光信号主要分布于胞核中(图6C)。说明Cdc25B缺失N端51个氨基酸后出现核滞留,不过仍有核输出序列发挥作用,但核输出功能减弱;而缺失N端65个氨基酸后则无出核,提示无核输出功能。

3 讨论

Cdc25B是Cdc25磷酸酶家族的一员,是有丝分裂的激活剂,在 G_2/M 期通过对周期依赖性激酶2(cycle dependent kinase 2, CDC2)的Tyr15和Thr14去磷酸化而激活CDC2/细胞周期蛋白B复合物(MPF)促进细胞分裂。在爪蟾卵母细胞中,Cdc25的Ser287位点在PKA作用下的磷酸化失活^[4],使卵母细胞停滞在 G_2 期^[5]。小鼠卵母细胞中Cdc25B的321位点对应于爪蟾卵母细胞287位点,高PKA水平能够抑制卵母细胞减数分裂的恢复,我们已经证明野生型Cdc25B对小鼠卵母细胞的成熟起促进作用^[6]。

哺乳动物的Cdc25磷酸酶包括3种亚型:Cdc25A、Cdc25B、Cdc25C,在细胞分裂过程中发挥各自的功能。Cdc25B功能的发挥与其细胞内定位有重要关系。在HeLa细胞中, G_2 期Cdc25B的323位丝氨酸磷酸化后与14-3-3结合,主要是定位于细胞浆中,蛋白质处于非活化状态,323位丝氨酸去磷酸化后Cdc25B活化,则定位于细胞核中^[7]。与该结果相似,在 G_2 期阻滞的卵母细胞中,Cdc25B似乎静止地存在

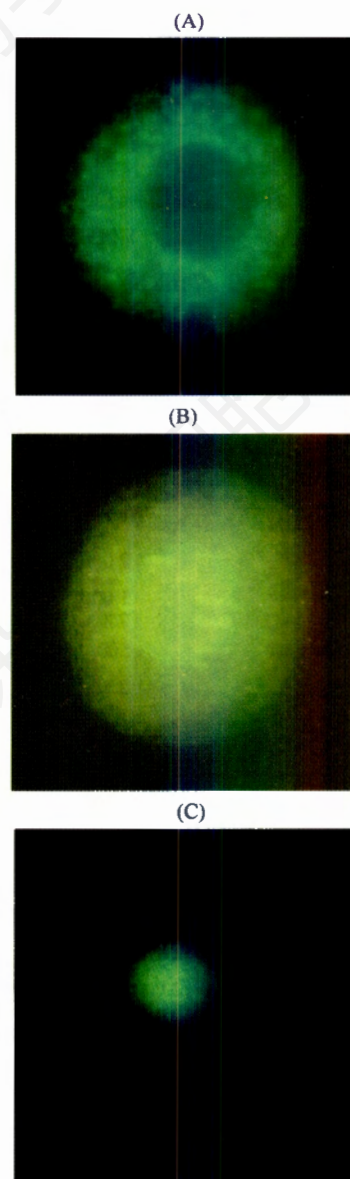


图6 Cdc25B的亚细胞定位

A: pEGFP-Cdc25B-WT 荧光信号主要分布于胞浆; B: pEGFP-Cdc25B-Δ51 的荧光信号分布于胞浆及胞核中,提示存在核滞留; C: pEGFP-Cdc25B-Δ65 荧光信号主要分布于胞核。

胞浆中,其321位丝氨酸(对应于人类323位点)突变体Cdc25B-S321A则定位于胞核,提示 G_2 期,Cdc25B处于出核与入核的动态平衡^[6]。此外,Cdc25B在细胞中的定位还受其他多种因素调节:exportin-1,核定位序列(nuclear localization sequence, NLS),核输出序列(NES),细胞周期蛋白B等^[8,9]。在HeLa细胞系中Cdc25B的NES位于54~67位氨基酸之间,它的突变会使Cdc25B丧失对有丝分裂的诱导功能^[10]。

为进一步明确Cdc25B是否存在某些结构域与该蛋白质的卵母细胞内的定位有关,我们应用Psor II和Target P软件对Cdc25B的细胞内定位进行预测

分析,提示小鼠 Cdc25B 存在 NES 和 NLS, NES 是一段位于 52~65 位点(VTTLTQTMHNLGL)富含亮氨酸等疏水氨基酸残基的模体,但关于该段序列对小鼠卵母细胞成熟的调控功能尚无研究报道。应用出核的抑制剂来普霉素 B(leptomycinB, LMB)处理 G₂ 期卵母细胞,蛋白质则分布于核中,说明 Cdc25B 的确由 NES 介导出核^[11]。本实验中 Cdc25B-Δ51 及 Cdc25B-Δ65 两种突变体都丧失了对减数分裂的诱导作用。同时, Western 印迹结果间接证明两种突变体都不能有效的活化有 MPF。尽管试验结果再一次证明 Cdc25B 的 N 末端的氨基酸序列对减数分裂的恢复起促进作用,但尚不能证明该序列确有诱导蛋白质出核的功能。

增强型绿色荧光蛋白(EGFP)是一种分子量为 27 kDa 的绿色荧光蛋白,一般不影响外源蛋白的构象和功能,且无细胞毒性,可以在活细胞内长期表达。因此,可通过 EGFP 产生的荧光观察外源蛋白质在细胞内的表达、迁移及定位情况^[12]。pEGFP-Cdc25B-Δ51 和 pEGFP-Cdc25B-Δ65 显微注射到 GV 期卵母细胞中观察细胞内蛋白质的定位,结果表明 Cdc25B 在卵母细胞中确实存在核浆穿梭, pEGFP-Cdc25B-Δ65 发出的荧光信号主要位于核中,说明缺失 65 个氨基酸的蛋白已经不包含 NES 而不能出核; pEGFP-Cdc25B-Δ51 发出的荧光信号在胞核及胞浆中均有分

布,提示该 Cdc25B 突变体尚包含有 NES 及 NLS,还存在核输出及核输入,但由于缺失 N 末端 51 个氨基酸而功能受损,致使入核速率增加,出核速率减慢而出现核滞留,由此可以推断 52~65 位的氨基酸确有诱导 Cdc25B 出核的功能。Cdc25B 是在细胞浆中活化 CDC2/ 细胞周期蛋白 B 恢复减数分裂, Cdc25B 的亚细胞定位同它是否能正常发挥生物学功能密切相关。目前,我们正对 NES 中关键氨基酸的功能及 NLS 的确认作进一步研究。

总之,有多种机制参与 Cdc25B 对卵母细胞成熟的调控, NES 所参与的转运过程与蛋白质功能的发挥密切相关,核转运可作为一种重要的调控方式控制着细胞的生理过程。

参考文献(References)

- [1] Lincoln A J *et al.* *Nat Genet*, 2002, **30**: 446
- [2] Chesnel F *et al.* *Dev Biol*, 1994, **161**: 285
- [3] Tang T S *et al.* *Development*, 2000, **127**: 1141
- [4] Karlsson, C *et al.* *J Cell Biol*, 1999, **146**: 573
- [5] Duckworth BC *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 16794
- [6] 张 阳等. *生殖与避孕*, 2005, **25**: 195
- [7] Yaffe MB *et al.* *Cell*, 1997, **277**: 1501
- [8] Arne Lindqvist *et al.* *J Cell Sci*, 2004, **117**: 4979
- [9] Schmitt A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 4361
- [10] Davezac N *et al.* *Oncogene*, 2000, **19**: 2179
- [11] Sekimoto T *et al.* *Cytok Growth Factor Rev*, 1998, **9**: 205
- [12] Milon B *et al.* *FEBS Lett*, 2001, **507**: 241

The Nuclear Export Sequence Cdc25B in Mouse

Hong-Mei Zhao^{1,2}, Cheng Cui³, Xiao-Yan Xu², Bing-Zhi Yu^{1*}

(¹Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001, China; ²Medical Laboratory, Liaoning Province People's Hospital, Shenyang 110016, China; ³Department of Physiology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Aim to study the function of nuclear export sequence of cell division cycle 25 homolog B (Cdc25B) during mouse oocytes G₂/M transition. mRNA of Cdc25B-WT, Cdc25B-Δ51, Cdc25B-Δ65 and fused plasmids of pEGFP-Cdc25B-WT, pEGFP-Cdc25B-Δ51, pEGFP-Cdc25B-Δ65 were microinjected into germinal vesicle stage mouse oocytes, the occurrence of germinal vesicle break down and subcellular localization of ectopic Cdc25B were observed. Results demonstrated that Cdc25B-Δ51 and Cdc25B-Δ65 all abrogated the function as meiosis inducer; Cdc25B-WT distributed mainly in cytoplasm while Cdc25B-Δ51 distributed in nuclear and cytoplasm, Cdc25B-Δ65 distributed in nuclear. Results suggested that a functional nuclear export sequence were amino acids between 52–65 in the N terminal region of Cdc25B.

Key words Cdc25B; meiosis; nuclear export sequence; germinal vesicle

Received: December 19, 2006 Accepted: May 23, 2007

This work was supported by the Special Scientific Research Fund of College Doctor Discipline Spot (No.20050159019)

*Corresponding author. Tel: 86-24-23261253, E-mail: yzbioch@126.com