

人源跨膜蛋白43(TMEMP43)的检测、 细胞内定位及体外真核表达

张海霞^{1,2} 李倩³ 王丹⁴ 赵克学³ 韩玉梅³ 王兴陇³ 梁浩勤³ 邓盈盈³
佟春微³ 李向茸¹ 马忠仁^{1,2} 冯若飞^{1,2*}

(¹西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室, 兰州 730030; ²甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 兰州 730030; ³西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030; ⁴兰州民海生物工程有限公司, 兰州 730030)

摘要 为探究人源跨膜蛋白43(TMEMP43)基因含量、定位分布及体外真核表达情况, 利用RT-PCR及Western blot方法分别检测内源MRC-5和HEK293细胞内TMEMP43基因及其蛋白表达情况, 采用间接免疫荧光实验进一步分析其在MRC-5细胞内的分布; 构建重组表达载体pcDNA3.1-EGFP-TMEMP43, 转染至HEK293细胞内检测外源TMEMP43在HEK293细胞内的基因和蛋白表达情况。结果显示, 基因水平TMEMP43在MRC-5细胞内的表达明显高于HEK293细胞, 蛋白水平仅能检测到MRC-5细胞内TMEMP43的表达。重组表达质粒pcDNA3.1-EGFP-TMEMP43转染HEK293细胞后, 基因水平TMEMP43表达显著升高, Western blot可检测到转染后细胞内TMEMP43蛋白成功表达。结果表明, 不同细胞表达TMEMP43含量存在差异, 肺来源细胞内TMEMP43的表达明显高于肾来源的细胞; 构建的重组载体pcDNA3.1-EGFP-TMEMP43可成功转染HEK293细胞并表达。该研究为TMEMP43结构及功能、与疾病相关机理的进一步探究提供了实验依据。

关键词 跨膜蛋白43; 真核表达载体; 间接免疫荧光实验

Detection, Intracellular Localization and Eukaryotic Expression *In Vitro* of TMEMP43 Gene of Human

Zhang Haixia^{1,2}, Li Qian³, Wang Dan⁴, Zhao Kexue³, Han Yumei³, Wang Xinglong³, Liang Haoqin³,
Deng Yingying³, Tong Chunwei³, Li Xiangrong¹, Ma Zhongren^{1,2}, Feng Ruofei^{1,2*}

(¹Key Bio-Engineering and Technology Laboratory of the Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China;
²Gansu Engineering Research Center for Animal Cell, Lanzhou 730030, China; ³Life Science and Engineering College of
Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; ⁴Lanzhou Minhai Bioengineering Co. Ltd, Lanzhou 730030, China)

Abstract The purpose of this research was to study the content, location, distribution, and expression of human transmembrane protein 43 (TMEMP43) gene. TMEMP43 gene and protein expression in MRC-5 and HEK293 cells were analyzed by RT-PCR and Western blot, respectively. TMEMP43 protein distribution in MRC-5 cells was examined through indirect immunofluorescence assay (IFA). Then construction and transfection of pcDNA3.1-EGFP-TMEMP43 into HEK293 cells were performed in order to detect the expression of TMEMP43 gene and protein. The results showed that gene expression of TMEMP43 in MRC-5 cells was significantly higher than in HEK293 cells with protein expres-

收稿日期: 2018-06-21 接受日期: 2018-10-26

国家自然科学基金(批准号: 31460665)、国家民委中青年英才计划[批准号: (2018)98]和教育部“长江学者和创新团队发展计划”(批准号: IRT17R88)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-2928315, E-mail: fengruofei@xbmu.edu.cn

Received: June 21, 2018 Accepted: October 26, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31460665), Young Talent of SEAC [Grant No.(2018)98] and Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (Grant No.IRT17R88)

*Corresponding author. Tel: +86-931-2928315, E-mail: fengruofei@xbmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-11-29 14:32:38

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181129.1432.008.html>

sion only occurring in MRC-5 cells. After transfecting recombinant pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43* into HEK293 cells, gene expression of *TMEM43* was significantly increased along with successful protein expression. *TMEM43* content of the lung cells (MRC-5) were significantly higher than the kidney cells (HEK293); the recombinant vector pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43* was successfully transfected into HEK293 cells and expression. This study provided experimental evidence for the further research into the structure, function, and related mechanisms of *TMEM43*.

Keywords transmembrane protein 43 (*TMEM43*); eukaryotic expression vector; indirect immunofluorescence assay (IFA)

跨膜蛋白43(transmembrane protein 43, *TMEM43*), 又称luma, 在人体中主要由*TMEM43*基因编码^[1]。该蛋白通过在内核膜上形成蛋白复合体来维持核包膜结构。该蛋白在组织中的定位分布尚不清晰。Franke等^[2]证实, *TMEM43*存在于心肌闰盘而不是在核膜上。Christensen等^[3]则研究发现, *TMEM43*主要定位于组织的肌纤维膜。何仗群等^[4]通过生物信息学预测发现, *TMEM43*蛋白质有98%类似于鼠蛋白, 且存在于多种真核和原核生物中。Memer等^[5]从患者或携带者的白细胞及心脏组织中提取全长*TMEM43* cDNA, 该研究表明, *TMEM43*在血液和心脏组织中均存在。

致心律失常性右室心肌病, 又称致心律失常性右室发育不良(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVD/C)和埃德型肌营养不良症(Emery-Dreifuss muscular dystrophy, EDMD), 与*TMEM43*的突变相关^[6-10], 研究表明, *TMEM43*的基因突变导致了全外显性的ARVC。 *TMEM43*基因上游具有PPAR γ 反应元件, 这也可能就是导致ARVC患者出现纤维脂肪性心肌的原因^[4]。目前, 对于该基因的认识十分有限, 蛋白功能上有待进一步的研究; 临床上对于ARVC的诊断和治疗亦十分困难。基于此, 本研究根据人源*TMEM43*基因序列, 以MRC-5和HEK293细胞为材料, 分析不同组织人源细胞中*TMEM43*基因及蛋白表达情况。构建真核表达载体pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*, 利用脂质体法将该重组质粒转染至真核HEK293细胞中, 利用RT-PCR技术检测目的基因转录情况; Western blot检测目的蛋白表达情况。该研究旨在分析*TMEM43*基因表达情况, 为探究其生物学功能奠定实验基础, 也为临床诊断ARVC提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

人胚肺成纤维细胞(MRC-5)、人胚肾细胞

(HEK293)由甘肃省动物细胞工程技术研究中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清购自兰州民海生物工程有限公司; 质粒小提试剂盒、培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒、高纯质粒小提试剂盒、TIANScrip M-MLV、Taq DNA聚合酶均购自北京天根生化科技有限公司; pMD18-T、*Nhe* I、*Eco*R V限制性内切酶、T4 DNA连接酶均购自大连宝生物工程有限公司; SYBR Select Master Mix试剂盒购自美国ABI公司; LipofectamineTM 2000 Reagent购自Invitrogen公司; TCL显色试剂盒购自PerkinElmer公司; 兔抗*TMEM43*抗体、鼠抗 β -actin抗体购自Abcam公司; 山羊抗兔IgG-HRP、山羊抗鼠IgG-HRP、山羊抗兔IgG-Alexa Fluor[®] 594购自Jackson公司; DAPI染色液购自碧云天生物技术研究所; Easy Pure Quick Gel Extraction Kit购自北京全式金生物技术有限公司; 感受态细胞BL21、表达载体pcDNA3.1-EGFP均由西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室提供; PCR仪为德国Biometra公司产品; 实时荧光定量PCR仪为美国ABI公司产品; 紫外分光光度计为德国Eppendorf公司产品; 凝胶成像系统为美国GE公司产品; 激光共聚焦显微镜为日本尼康公司产品。

1.3 引物设计与合成

根据GenBank公布的人源*TMEM43*基因序列(登录号: NM_024334.2), 利用Primer Premier 5软件设计1对表达引物(*TMEM43*-bdF/R), 在上游引物和下游引物中分别加入*Nhe* I和*Eco*R V酶切位点(下划线), 并在上游引物中引入Kozak序列(粗体); 同时, 另设计1对qPCR检测引物(*TMEM43*-qF/R)。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

1.4 *TMEM43*基因水平表达的检测

1.4.1 RT-PCR方法检测目的基因转录 分别收取 2×10^5 个不同代次的MRC-5和HEK293细胞进行

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primer	大小(bp) Size (bp)
TMEM43-qF	5'-ATG TTC ATG GGC CTC AAC CTT A-3'	88
TMEM43-qR	5'-GGC CAA TGT TGA CCA GGT CTC-3'	
TMEM43-bdF	5'-CTA GCT AGC CAC CAT GGC MGC GAA YTA TTC CAG TAC-3'	1 200
TMEM43-bdR	5'-CGG ATA TCC TCC ARC TTT TTG GYT GGC A-3'	

总RNA提取。反转录获得的cDNA用于PCR扩增 *TMEM43* 基因, 反应体系为: DEPC H₂O 18.5 μ L、上、下游引物(TMEM43-bdF/R)各0.5 μ L(20 μ mol/L)、10 \times PCR buffer 2.5 μ L、dNTPs(10 mmol/L) 0.5 μ L、Taq DNA聚合酶0.5 μ L、cDNA 2 μ L。总体系25 μ L, 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 60 $^{\circ}$ C退火50 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。反应结束后, 用10 g/L的琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物, 每代次细胞重复检测3次, 不同代次分别进行检测。

1.4.2 SYBR Green I实时荧光定量PCR方法检测目的基因 采用SYBR Green I实时荧光定量PCR方法对1.4.1中所得RT产物进行检测。反应体系如下: SYBR Select Master Mix(2 \times) 12.5 μ L, DEPC H₂O 9.7 μ L, 上、下游引物TMEM43-qF/R(10 pmol/ μ L)各0.4 μ L, RT产物2.0 μ L。反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 61.5 $^{\circ}$ C 35 s, 共40个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 65 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C, 每0.5 $^{\circ}$ C/s, 10 s/cycle为间隔绘制熔解曲线, 根据实验结果计算MRC-5细胞及HEK293细胞中*TMEM43*基因的含量。

1.5 *TMEM43*蛋白水平表达的检测

分别收取2 \times 10⁵个不同培养代次MRC-5和HEK293细胞, RIPA裂解, 产物经SDS-PAGE电泳, 条带在60 V、低温条件下转印至PVDF膜。用50 g/L脱脂奶粉封闭, 封闭时温度为37 $^{\circ}$ C, 水平80 r/min震荡1 h。加入1:1 000稀释的兔抗*TMEM43*抗体, 37 $^{\circ}$ C摇床孵育2 h, PBST洗5次, 5 min/次; 再加入HRP标记的山羊抗兔二抗, 37 $^{\circ}$ C摇床孵育1 h, PBST洗5次, ECL显色并观察结果, 每代次细胞重复检测3次, 不同代次分别进行检测。

1.6 *TMEM43*蛋白在MRC-5细胞中的定位

取MRC-5细胞铺至6孔板, 待细胞密度至70%以上时, 弃去原培养基; PBS洗3次, 每次5 min; 加入80 g/L预冷丙酮(1 mL/孔), 固定15 min; 弃去, 晾干,

加入0.1 mL/L Triton X-100对细胞透化处理15 min; PBS洗3次, 每次5 min, 用50 g/L牛血清白蛋白于37 $^{\circ}$ C封闭90 min; 加入1:200稀释的兔抗*TMEM43*抗体, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h; PBS洗5次, 每次5 min; 再加入1:500稀释的山羊抗兔IgG-Alexa Fluor[®] 594, 37 $^{\circ}$ C避光孵育1 h; 避光条件下PBS洗5次, 每次5 min; DAPI染色液复染核10~15 min; 蒸馏水洗10 min; 加入抗荧光猝灭封片液封片; 于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.7 表达载体pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*的构建及鉴定

1.7.1 *TMEM43*基因的扩增 提取MRC-5细胞总RNA; 利用1.4.1所述RT-PCR扩增*TMEM43*目的基因。反应结束, 用10 g/L的琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物。

1.7.2 克隆载体pMD18-T-*TMEM43*的构建及鉴定 回收1.7.1 PCR样品, 将产物与克隆载体pMD18-T于16 $^{\circ}$ C连接并转化至大肠杆菌BL21感受态细胞, 在含Amp⁺抗性LB平板上培养12~16 h, 随机选取较大、圆润而单一的克隆增菌培养, 培养物提取质粒DNA并PCR验证, 阳性菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 阳性质粒命名为pMD18T-*TMEM43*。

1.7.3 表达载体pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*的构建 *Nhe*I+*Eco*R V分别双酶切pMD18T-*TMEM43*和pcDNA3.1-EGFP载体, 回收各酶切产物, T4酶重组连接, 参照1.7.2所述进行转化及培养, 培养物提取质粒DNA并进行双酶切验证, 阳性菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 该重组质粒命名为pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*。

1.8 脂质体介导重组质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*的转染

在6孔板上培养HEK293细胞, 待细胞生长至80%~85%后, 用Opti-MEM清洗细胞, 并分别稀释重组质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*及空载质粒pcDNA3.1-EGFP, 按比例与脂质体Lipofectamine[™] 2000 Reagent混合, 逐滴加入上述HEK293细胞中, 等

量Opti-MEM作空白对照, 在37 °C、5% CO₂条件下孵育6 h, 弃去转染液, 各加入4 mL DMEM(含50 mL/L FBS)培养液培养; 并分别于转染24 h、48 h、72 h及96 h观察、拍照。

1.9 目的基因转录表达

1.9.1 RT-PCR方法检测目的基因转录 分别收取转染48 h后细胞, 各组收取量一致, 经总RNA提取, 同1.4.1所述RT-PCR扩增TMEM43基因, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测TMEM43基因的转录情况。

1.9.2 SYBR Green I实时荧光定量PCR方法检测目的基因 采用1.4.2中所述SYBR Green I实时荧光定量PCR方法对1.9.1中所得RT产物进行检测。根据实验结果计算转染前后HEK293细胞TMEM43含量。

1.10 TMEM43蛋白在HEK293细胞中的表达及Western blot检测

分别收集等量转染pcDNA3.1-EGFP-TMEM43组、pcDNA3.1-EGFP组及空白组细胞, 参照1.5所述方法进行Western blot分析, ECL显色并观察结果。

2 结果

2.1 TMEM43基因水平的检测结果

对选取的MRC-5和HEK293细胞分别扩增TMEM43

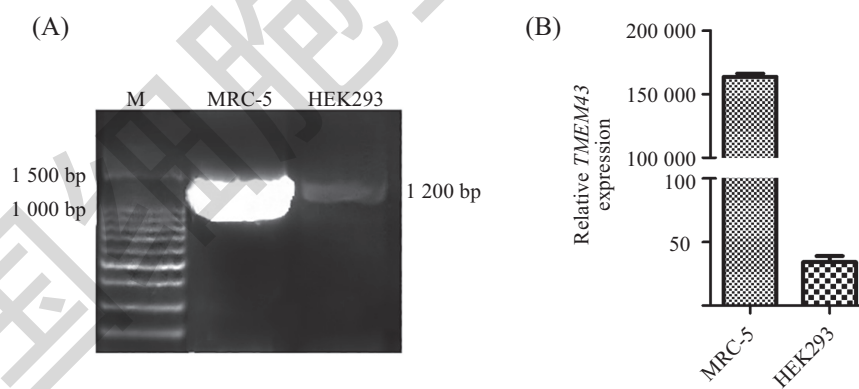
基因, 每个细胞样品重复3次, 分别进行检测, RT-PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 目的基因条带位于约1 200 bp处, 符合预期(图1A)。根据电泳条带发现, TMEM43基因在MRC-5细胞中含量明显高于HEK293细胞; 同期进行的qPCR检测结果与RT-PCR检测结果相符(图1B), TMEM43基因在MRC-5细胞内高表达, 不同代次细胞检测结果均一致。该结果与TMEM43存在于多种组织内相符^[5], 但不同组织内含量也有所不同, 本次检测结果显示, 肺组织内含量明显高于肾组织。

2.2 TMEM43蛋白水平的检测结果

选取不同代次MRC-5和HEK293细胞, 每组细胞3个平行, 分别处理, 产物经SDS-PAGE后, Western blot中表达产物与TMEM43抗体反应, 重复该实验3次。结果显示, MRC-5细胞在48 kDa左右出现明显阳性条带, 片段大小符合预期, 而HEK293细胞则无条带出现, 该结果与上述基因检测结果相符合, 说明在基因水平MRC-5细胞内TMEM43含量明显高于HEK293细胞, 故MRC-5细胞内蛋白水平可明显检测到目的条带, 但是TMEM43基因由于在HEK293细胞内低表达, 故蛋白水平未检出(图2)。

2.3 TMEM43蛋白在MRC-5细胞中的定位

间接免疫荧光实验检测结果见图3。显微镜下



M: DNA分子质量标准。
M: 1 Kb plus DNA ladder marker.

图1 TMEM43基因在不同细胞中RT-PCR(A)及qPCR(B)检测结果

Fig.1 The amplification of TMEM43 in different cells by RT-PCR (A) and qPCR (B)

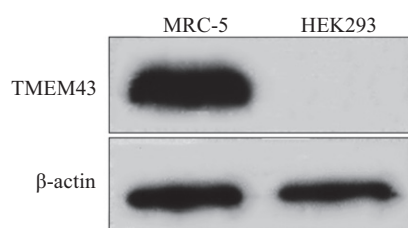


图2 Western blot分析TMEM43蛋白在不同细胞中的表达情况

Fig.2 Western blot analysis of expressed TMEM43 protein in different cell

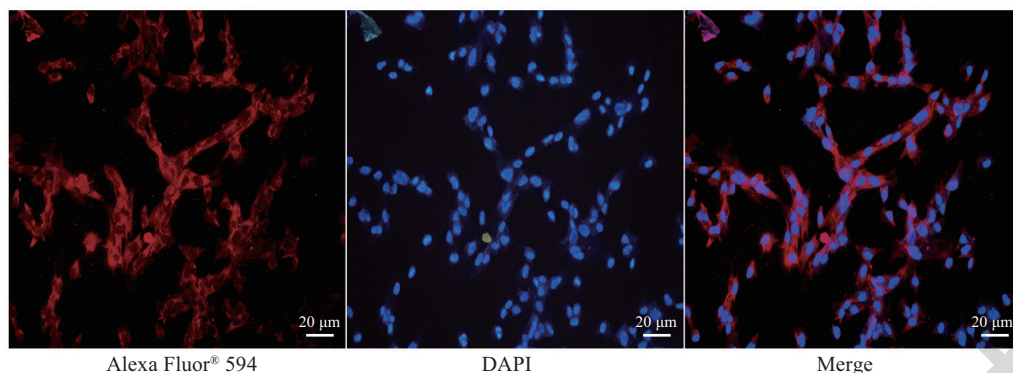


图3 TMEM43蛋白在MRC-5细胞中的定位
Fig.3 Location of TMEM43 in MRC-5 cells

观察发现, MRC-5细胞质及膜均观察到明显的红色荧光, 而细胞核未观察到。

2.4 *TMEM43*目的基因的扩增

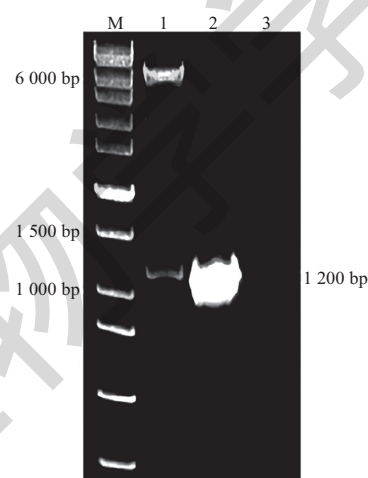
取MRC-5细胞抽提总RNA, 利用RT-PCR方法扩增*TMEM43*基因, 在10 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳, 由图中可以看出, 目的基因条带位于约1 200 bp处, 符合预期(图4)。克隆质粒pMD18T-*TMEM43*测序结果显示, 插入片段序列与GenBank中原序列NM_024334.2的基因序列无差异。

2.5 重组质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*的酶切和测序鉴定

重组质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*经*Nhe*I+*Eco*R V酶切, 结果显示, 可观察到明显的目的条带及载体带, 与预期相符(图4); Blast比对测序序列, 显示插入片段的序列与NM_024334.2基因序列一致, 表明pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*构建成功。

2.6 转染后不同时间绿色荧光蛋白的表达

在倒置荧光显微镜下观察荧光生成情况, pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组及pcDNA3.1-EGFP组转染后第24 h、48 h、72 h和96 h的HEK293细胞均能观察到特异性绿色荧光表达, 转染后pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组随着时间的延长荧光信号逐渐增强, 后逐渐趋于稳定, 观察发现, 48 h荧光信号最强(图5)。另外, 根据荧光信号结果观察发现, 阳性对照pcDNA3.1-EGFP组荧光信号均匀分布于整个细胞, 而实验组pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*细胞荧光信号则呈现点状分布, 24 h时可看出荧光信号多分布于细胞核及膜上, 而随着时间的延长, 融合蛋白荧光信号部分猝灭, 至96 h时已完全呈现星点状。此外, 该实验中发现, 阳性对照组荧光均匀分布于整个细胞, 该结果与大部分真核表达结果一致, 但实验组荧光



M: DNA分子质量标准; 1: *Nhe*I+*Eco*R V双酶切质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*产物; 2: *TMEM43*的PCR产物; 3: 阴性对照。

M: 1Kb plus DNA ladder marker; 1: *Nhe*I+*Eco*R V digestion product of recombinant plasmid pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*; 2: PCR product of *TMEM43*; 3: negative control.

图4 *TMEM43*基因的扩增及重组质粒的酶切鉴定
Fig.4 The amplification of *TMEM43* and digestion of recombinant plasmid

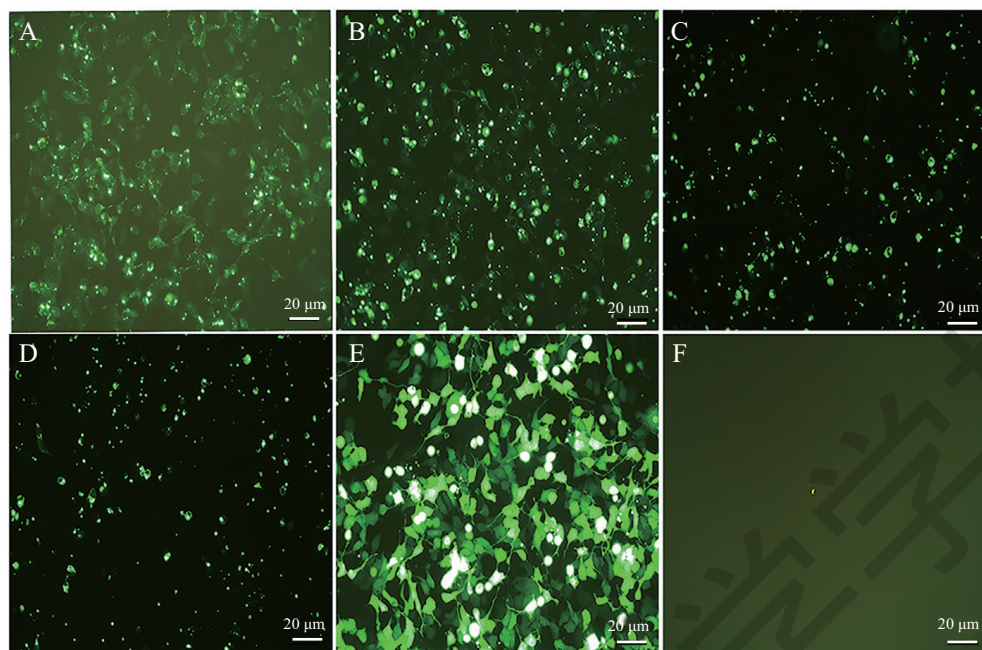
则呈现点状分布, 该结果不同于一般真核表达结果, 这可能与*TMEM43*基因的分布相关, 该基因并非均匀分布于整个细胞, 由此导致出现点状分布的情况。

2.7 外源基因对HEK293细胞生长的影响

普通光学显微镜下观察, 转染后第24 h、48 h、72 h及96 h, pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组、pcDNA3.1-EGFP组及空白对照组细胞均生长良好, 无明显差异(图6)。

2.8 *TMEM43*基因在HEK293细胞中的转录表达

取转染pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组、pcDNA3.1-EGFP组及空白对照组细胞分别进行细胞总RNA提取, RT-PCR检测结果显示, 转染pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组目的基因转录表达明显强于其他两组



A~D: 分别为重组质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*转染后第24 h、48 h、72 h和96 h HEK293细胞荧光观察结果; E: 转染pcDNA3.1-EGFP组; F: 空白对照。

A-D: the 24 h, 48 h, 72 h and 96 h fluorescence of HEK293 cells after transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*, respectively; E: transfected with plasmid pcDNA3.1-EGFP; F: mock.

图5 绿色荧光蛋白的表达

Fig.5 Expression of green fluorescence protein

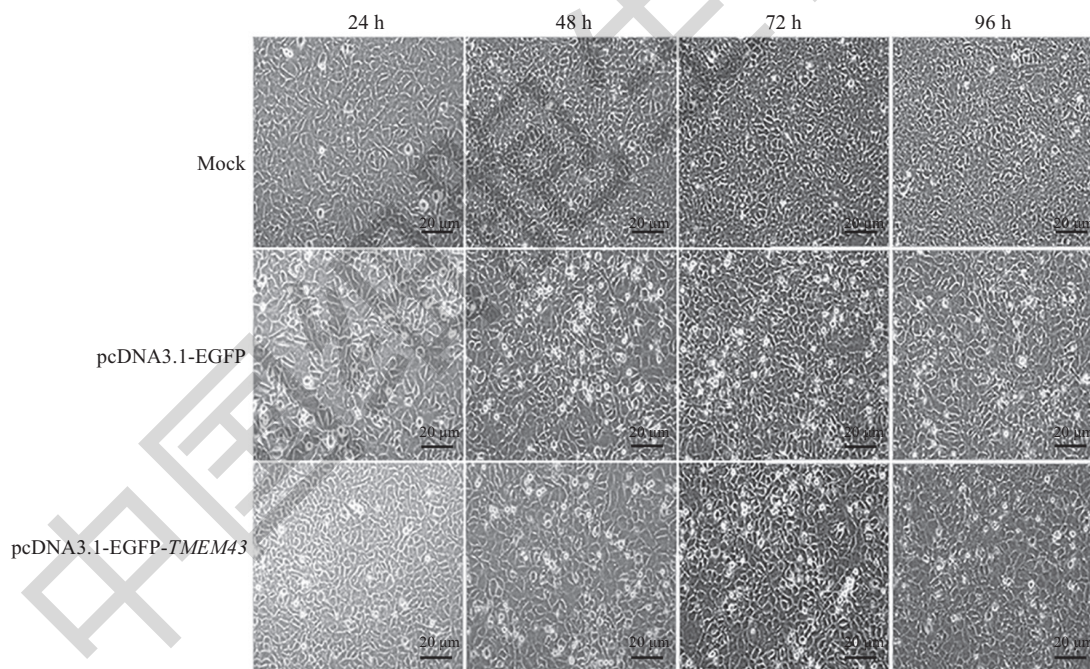


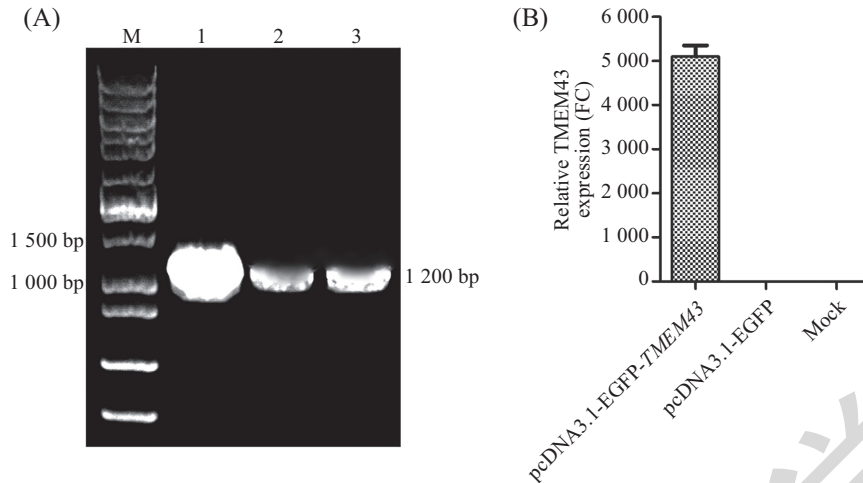
图6 重组质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*转染对HEK293细胞的影响

Fig.6 Influence of recombinant plasmid pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43* transfection on HEK293 cells

(图7A); qPCR检测结果显示, 转染pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组细胞内*TMEM43*含量亦明显高于其他两组(图7B), 说明*TMEM43*基因在HEK293细胞中成功转录表达。

2.9 TMEM43蛋白在HEK293细胞中的表达

取转染pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组、pcDNA3.1-EGFP组及空白对照组细胞分别处理后经SDS-PAGE电泳, Western blot过程中表达产物与TMEM43抗体反

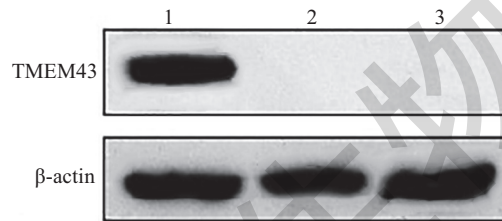


M: DNA分子质量标准; 1: 转染重组质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组; 2: 转染空载pcDNA3.1-EGFP组; 3: 空白对照组。

M: 100 bp DNA ladder marker; 1: HEK293 cells transfected with pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*; 2: HEK293 cells transfected with pcDNA3.1-EGFP; 3: mock.

图7 RT-PCR(A)及qPCR(B)检测*TMEM43*基因在HEK293细胞中的转录结果

Fig.7 Transcription of *TMEM43* gene in HEK293 cells by RT-PCR (A) and qPCR (B)



1: 转染重组质粒pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组; 2: 转染空载pcDNA3.1-EGFP组; 3: 空白对照组。

1: HEK293 cells transfected with pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*; 2: HEK293 cells transfected with pcDNA3.1-EGFP; 3: mock.

图8 Western blot检测*TMEM43*蛋白在HEK293细胞中的表达

Fig.8 Detected the expression of *TMEM43* protein in HEK293 cell by Western blot

应, 结果显示, pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*组在78 kDa左右出现目的条带(*TMEM43*大小约48 kDa, EGFP大小约30 kDa), 片段大小符合预期, 而转染pcDNA3.1-EGFP组及空白组细胞无条带, 说明*TMEM43*蛋白在HEK293细胞中成功表达(图8)。

3 讨论

针对*TMEM43*的研究, 目前涉及较多的是其与致心律失常性右室心肌病(ARVD)相关的研究, 由于ARVD临床诊断较为困难^[5,11], 故研究学者对此病进行了较为详细的研究。其中, Merner等^[5]和Siragam等^[12]发现, *TMEM43*基因的错义突变可导致ARVD5的临床表现为外显性状, 由此确定*TMEM43*基因为ARVD5的致病基因。但是, 目前对于*TMEM43*的结构及功能知之甚少, 使得对该基因的进一步研究受到限制。

常用的真核表达载体为pcDNA3.1, 但是该载体

转染进细胞后肉眼观察细胞无明显差异, 不能直观地判断转染是否成功, 只能通过后续实验验证。本实验室改造的pcDNA3.1载体携带有绿色荧光蛋白EGFP, 转染后可通过绿色荧光的生成情况直观地判断转染效果, 有效地提高了实验效率, 通过后续实验验证证明与肉眼观察的结果基本一致。

本研究选用不同来源的人源细胞进行研究, 对细胞内*TMEM43*基因及蛋白水平进行检测。RT-PCR检测结果显示, *TMEM43*基因在肺组织内(MRC-5)表达量高于肾组织(HEK293); 蛋白水平在肾组织内未检出, 也验证了基因水平肾组织内基因表达量较低, 因此, 蛋白表达丰度较低, Western blot检测不到。基于此, 本研究从MRC-5细胞内扩增*TMEM43*基因, 克隆至真核表达载体pcDNA3.1-EGFP, 成功构建了重组真核表达载体pcDNA3.1-EGFP-*TMEM43*。将此重组载体转染至HEK293细胞中进行表达, 结果表明, 转染后基因水平表达量明显提高, 蛋白水平亦可

检出TMEM43的表达。研究还发现, 转染后细胞荧光信号呈现点状分布, 而非整个细胞均匀分布。这也从侧面印证了TMEM43基因并非均匀分布于整个细胞, 而是不同部位含量不同, 因此荧光信号呈现与其他真核表达不同的结果。对于该发现可进行进一步深入研究, TMEM43在细胞质及膜上每个点含量是否亦不相同? 该种分布方式对于基因的影响及与病毒相互作用是否相关? 总之, 本研究对TMEM43的分布进行了初步探索, 为进一步研究其结构和功能奠定了实验基础, 为病毒与基因之间相互关系的研究提供了一定的实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Wiemann S, Weil B, Wellenreuther R, Gassenhuber J, Glassl S, Ansorge W, *et al.* Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. *Genome Res* 2001; 11(3): 422-35.
- 2 Franke WW, Dörflinger Y, Kuhn C, Zimbelmann R, Winter-Simanowski S, Frey N, *et al.* Protein LUMA is a cytoplasmic plaque constituent of various epithelial adherens junctions and composite junctions of myocardial intercalated disks: a unifying finding for cell biology and cardiology. *Cell Tissue Res* 2014; 357(1): 159-72.
- 3 Christensen AH, Andersen CB, Tybjaerg-Hansen A, Haunso S, Svendsen JH. Mutation analysis and evaluation of the cardiac localization of TMEM43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Clin Genet* 2011; 80(3): 256-64.
- 4 何仗群. TMEM43基因定点突变克隆构建及其功能初步分析(硕士论文). 南华大学(He Zhangqun. Site-directed mutagenesis of TMEM43 gene and function analysis. University of South China), 2011.
- 5 Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, Connors S, French VM, Drenckhahn JD, *et al.* Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet* 2008; 82(4): 809-21.
- 6 Hodgkinson KA, Howes AJ, Boland P, Shen XS, Stuckless S, Young TL, *et al.* Long-term clinical outcome of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in individuals with a p.S358L mutation in TMEM43 following implantable cardioverter defibrillator therapy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2016; 9(3): e003589.
- 7 Milting H, Klauke B, Christensen AH, Müsebeck J, Walhorn V, Grannemann S, *et al.* The TMEM43 Newfoundland mutation p.S358L causing ARVC-5 was imported from Europe and increases the stiffness of the cell nucleus. *Eur Heart J* 2015; 36(14): 872-81.
- 8 Haywood AF, Merner ND, Hodgkinson KA, Houston J, Syrris P, Booth V, *et al.* Recurrent missense mutations in TMEM43 (ARVD5) due to founder effects cause arrhythmogenic cardiomyopathies in the UK and Canada. *Eur Heart J* 2013; 34(13): 1002-11.
- 9 Baskin B, Skinner JR, Sanatani S, Terespolsky D, Krahn AD, Ray PN, *et al.* TMEM43, mutations associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in non-Newfoundland populations. *Hum Genet* 2013; 132(11): 1245-52.
- 10 Jiang C, Zhu Y, Zhou Z, Gumin J, Bengtsson L, Wu W, *et al.* TMEM43/LUMA is a key signaling component mediating EGFR-induced NF-kappa B activation and tumor progression. *Oncogene* 2016; 36(20): 2813-23.
- 11 Te Rijdt WP, Jongbloed JD, de Boer RA, Thiene G, Basso C, van den Berg MP, *et al.* Clinical utility gene card for: arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC). *Eur J Hum Genet* 2014; 22(2): doi:10.1038/ejhg.2013.124.
- 12 Siragam V, Cui XZ, Masse S, Ackerley C, Aafaqi S, Strandberg L, *et al.* TMEM43 mutation p.S358L alters intercalated disc protein expression and reduces conduction velocity in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9(10): e109128.