

本文引用: 李宏文, 张艳红, 邓云华, 等. 人源性 Rab32 荧光融合蛋白表达载体的构建及鉴定 [J]. 新乡医学院学报 2016, 33(9): 745-747, 751. DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.09.001.

【基础研究】

人源性 Rab32 荧光融合蛋白表达载体的构建及鉴定

李宏文¹, 张艳红¹, 邓云华¹, 张彩娥²

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院皮肤科, 湖北 武汉 430000; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉科, 湖北 武汉 430000)

摘要: 目的 构建人源性 Rab32 荧光融合蛋白表达载体 pEGFP-Rab32, 并观察 Rab32 在人黑素细胞瘤细胞系 A375 中细胞定位情况。方法 收集并提取 A375 细胞中的总 RNA, 反转录成 cDNA, 以特异性引物扩增 Rab32 片段, 经 *XhoI* 和 *KpnI* 双酶切聚合酶链反应 (PCR) 产物和 pEGFP-C3 表达载体, 酶切产物经胶回收、连接后转化至感受态大肠杆菌 DH5a 中, 挑取单克隆菌落进行菌液 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序分析, 以确定表达载体构建正确。将构建的重组质粒转染 A375 细胞, Western blot 检测细胞中 Rab32 表达水平, 激光共聚焦显微镜观察其细胞定位。结果 pEGFP-Rab32 重组质粒经菌落 PCR、双酶切和测序鉴定构建正确, 转染 A375 细胞后, Western blot 可检测出细胞中 pEGFP-Rab32 融合蛋白的表达, 激光共聚焦显微镜观察到 Rab32 定位于细胞质中, 且大量聚集于细胞核周围。结论 pEGFP-Rab32 融合蛋白表达载体成功构建, 并观察了 Rab32 在细胞中的定位, 为进一步研究 Rab32 在黑素代谢中的作用奠定了良好的基础。

关键词: Rab32; 融合蛋白; 表达载体; 细胞定位; 黑素代谢

中图分类号: Q257 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2016)09-0745-04

Construction and identification of human pEGFP-Rab32 fusion protein expression vector

LI Hong-wen¹, ZHANG Yan-hong¹, DENG Yun-hua¹, ZHANG Cai-e²

(1. Department of Dermatology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, Hubei Province, China; 2. Department of Anesthesiology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, Hubei Province, China)

Abstract: **Objective** To construct the expression vector of pEGFP-Rab32 of human Rab32 green fluorescent protein fusion protein and detect its cellular localization in human melanocytoma A375 cells. **Methods** Total RNA was extracted from A375 cells for reverse transcription of cDNA. Rab32 fragment was amplified by specific primers, polymerase chain reaction (PCR) product and pEGFP-C3 expression vector was digested by *XhoI* and *KpnI* enzyme and then digestion products were transformed into *E. coli* DH5a after recycling by gel extraction kit and connecting by T4 DNA ligase. Monoclonal bacteria colonies were picked and identified by PCR, enzyme digestion and DNA sequencing to determine the expression vector was constructed correctly. The recombinant plasmid was transfected into A375 cells and the expression levels of Rab32 in cells were detected by Western blot and the laser scanning confocal microscopy was used to observe the cellular localization of Rab32. **Results** pEGFP-Rab32 expression vectors were verified by colony PCR, enzyme digestion and DNA sequencing. The pEGFP-Rab32 fusion protein was detected in A375 cells after transfected with the recombinant plasmids by Western blot. Laser scanning confocal microscopy showed that Rab32 localized in cytoplasm and mostly in the peripheral area. **Conclusions** pEGFP-Rab32 fusion protein expression vector was constructed successfully and the cellular localization of Rab32 in A375 cells was performed. This research provides a good basis for further study of the role of Rab32 in melanin metabolism.

Key words: Rab32; fusion protein; expression vector; cellular localization; melanin metabolism

细胞内的物质转运是维持细胞正常功能必不可少的生物过程。细胞内物质转运的异常可导致多种

疾病^[1]。传统上把细胞中的转运途径分为分泌途径和内存途径,前者起于内质网,止于细胞膜,后者则起于细胞膜,止于溶酶体^[2]。在真核细胞中,囊泡转运过程可将新合成的蛋白转运至各种膜性细胞器或小室中,也可将受体和信号分子等循环蛋白转运至细胞表面^[3]。Rab 蛋白是 Ras 超家族中的一类单体三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 酶^[4]。Rab 蛋白几乎存在于所有真核细胞中^[5],在囊泡转

DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.09.001

收稿日期: 2016-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81371728, 81472864)。

作者简介: 李宏文(1990-),男,湖北汉川人,博士研究生在读,主要从事分子皮肤病研究。

通信作者: 张彩娥(1972-),女,湖北汉川人,博士,副主任技师,主要从事遗传免疫学研究; E-mail: zhangcaie1972@126.com。

运中发挥重要作用。目前,在人类中已发现超过60种Rab蛋白。高度保守的Rab蛋白几乎可表达于所有细胞和组织中,参与基本转运途径的调节;而保守度相对较低的Rab家族成员则仅在不同细胞的某些特异性的转运途径中发挥作用。Rab32是黑素细胞和视网膜色素上皮细胞中一种重要的Rab蛋白,在黑素代谢中发挥重要作用^[6]。为进一步研究Rab32在黑素细胞中的作用及其影响黑素代谢的机制,本研究构建了Rab32与强化绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)表达载体pEGFP-Rab32,并初步研究了Rab32在A375细胞中的定位情况。

1 材料与方法

1.1 材料 本实验所用载体pEGFP-C3和人黑素瘤细胞系A375细胞由华中科技大学同济医学院附属同济医院皮肤科实验室常规保存。聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)上游引物P1:5'-CCGCTCGAGATGGCGGCGGAGAG-3',在其5'端引入酶切位点XhoI及保护碱基;下游引物P2:5'-CGCGGTACCTCAGCAACTGGGATTT-3',在其5'端引入酶切位点KpnI及保护碱基,引物由武汉擎科创新生物科技有限公司合成。DNA胶回收试剂盒、去内毒素质粒提取试剂盒购自美国Omega公司。达尔伯克改良伊格培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)、胎牛血清、Lipofectamine™ 2000和无血清Opti-MEM培养基均购自美国Gibco公司。限制性内切酶XhoI、KpnI,T4 DNA连接酶,Taq DNA聚合酶购自上海Invitrogen生物技术有限公司。DNA Marker购自上海生工生物工程股份有限公司。兔抗-Rab2抗体购自美国Santa Cruz生物技术有限公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗兔二抗购自武汉谷歌生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增获取Rab32片段 收集培养的A375细胞,TRIzol提取总RNA,经反转录反应获得cDNA。以cDNA为模板扩增Rab32片段。PCR反应体系:5×PCR Buffer 4 μL,P1、P2引物(10 μmol·L⁻¹)各1 μL,模板2 μL,脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleotide triphosphate,dNTP)(2 mmol·L⁻¹)2 μL,Taq DNA聚合酶1 μL,无菌双蒸水补充体积至20 μL。

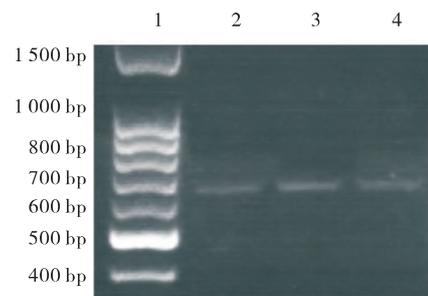
1.2.2 pEGFP-Rab32重组表达载体的构建与鉴定 pEGFP-C3载体和纯化后的Rab32 PCR产物经XhoI和KpnI双酶切,酶切产物经DNA胶回收试剂盒纯化回收,T4 DNA连接酶将酶切回收的Rab32

目的片段和载体在16℃下连接过夜。随后将连接产物转化至感受态大肠杆菌DH5a中,涂布与含卡那霉素的琼脂平板上,37℃倒置过夜。随机挑取3个单克隆菌落,接种于含有100 mg·L⁻¹卡那霉素的液体溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)培养基中,250 r·min⁻¹、37℃摇床振荡培养6 h。菌液PCR鉴定:取100 μL菌液,3 000 r·min⁻¹离心10 min,收集细菌,加入100 μL双蒸水,沸水煮沸10 min,离心收取上清液作为模板进行PCR鉴定^[7]。酶切鉴定:选取PCR鉴定阳性克隆菌落,培养扩增并提取质粒,进行XhoI和KpnI双酶切鉴定。测序鉴定:选择PCR鉴定和酶切鉴定双阳性的质粒进行DNA测序,由武汉擎科创新生物科技有限公司完成。

1.2.3 pEGFP-Rab32重组质粒的转染与Rab32的功能鉴定 A375细胞以DMEM培养基(含体积分数10%胎牛血清)培养,转染前1 d接种至24孔板中。转染前,将孔板中的培养基更换为无血清Opti-MEM培养基。分别用50 μL无血清Opti-MEM培养基稀释Lipofectamine™ 2000和重组质粒,室温静置5 min,将二者混合并静置20 min后加入孔板中,6 h后更换为正常的细胞培养基^[8]。转染48 h后收集细胞,提取细胞总蛋白并进行Western blot^[9]检测细胞中Rab32的表达情况。重组质粒转染A375细胞48 h后,40 g·L⁻¹多聚甲醛室温固定细胞15 min,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染核5 min,激光共聚焦显微镜下观察Rab32在细胞中的定位情况。

2 结果

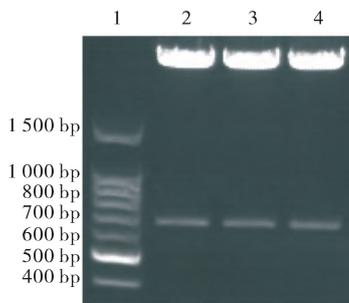
2.1 重组质粒菌液PCR鉴定和酶切鉴定结果 pEGFP-Rab32重组质粒的菌液PCR鉴定和酶切鉴定结果见图1、2。Rab32目的片段大小为678 bp,PCR产物与酶切产物目的片段大约在700 bp,与Rab32目的条带大小相符,提示重组质粒可能构建成功。



1: DNA Marker; 2~4: PCR鉴定阳性菌落。

图1 重组质粒菌落PCR鉴定结果

Fig. 1 Identification results of recombinant plasmid colonies by PCR



1: DNA Marker; 2~4: 酶切鉴定阳性菌落。

图2 重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification results of recombinant plasmid by enzyme digestion

2.2 重组质粒测序鉴定结果 重组质粒的测序结果经 Chromas 软件分析,采用 PubMed 网站上的 blast 软件与已知序列(Genbank, NM_006834.3)进行同源性比对分析,未发现任何突变,说明 pEGFP-

Rab32 重组表达载体构建成功。

2.3 转染重组质粒后 A375 细胞中的 Rab32 表达水平检测 在相对分子质量约 50 000 的位置检测到 pEGFP-Rab32(理论大小为相对分子质量 52 000)的表达(图 3)。

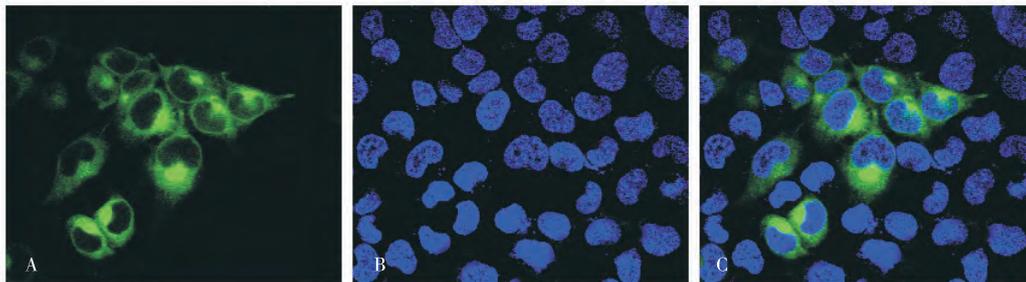


1: pEGFP-Rab32 转染组; 2: pEGFP-C3 空载质粒转染组。

图3 转染重组质粒后 A375 细胞中的 Rab32 表达水平检测

Fig. 3 Expression of Rab32 in A375 cells transfected with pEGFP-Rab32

2.4 Rab32 在 A375 细胞中的定位 Rab32 定位于细胞质中,且大量 Rab32 聚集于细胞核周围(图 4)。



A: pEGFP-Rab32; B: DAPI; C: A、B 合并。

图4 Rab32 在细胞中的定位情况

Fig. 4 Subcellular localization of Rab32 in A375 cells

3 讨论

Rab 蛋白是 Ras 超家族中的一类小分子 GTP 酶,在细胞分泌、内吞、信号转导和细胞发育过程中发挥重要作用^[10]。Rab 蛋白在翻译后修饰过程中,C 端可被脂类基团修饰,这种修饰在 Rab 蛋白与膜性细胞器和囊泡的细胞质面结合中发挥重要作用^[11]。经脂类修饰的 Rab 蛋白可定位于特异性的膜结构,从而具有特定的亚细胞定位。Rab 蛋白具有活性态和非活性态。活性状态的 Rab 蛋白可募集多种“效应蛋白”,并在囊泡转运过程中的重要步骤中发挥调节作用,包括物质分选、膜出芽、囊泡运动、停靠和融合等^[4]。Rab 蛋白的广泛存在性和重要功能使其在多种生命过程和人类疾病中发挥重要作用,如 Rab23 可影响整个神经系统的发育^[12],Rab23 基因突变可导致 Carpenter 综合征^[13],Rab7 基因突变可导致 2B 型腓骨肌萎缩症^[14]等。

Rab32 是 Rab 家族的成员之一,主要表达在黑素细胞和视网膜色素上皮细胞中^[6]。Rab32 蛋白相

对分子质量为 26 000,本研究构建的 pEGFP-Rab32 融合蛋白相对分子质量约在 50 000,与理论预期大小一致。Rab32 在黑素代谢中发挥重要作用,Rab32 缺乏可导致黑素细胞中酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)和 TYR 相关蛋白 1(TYR-related protein 1, TYRPI)异常滞留于核周区域,从而导致黑素合成障碍^[6]。本研究通过激光共聚焦显微镜成像技术发现 pEGFP-Rab32 定位于细胞质中,且大量定位于核周区域,结合 Rab 蛋白在物质转运中发挥的作用,作者推测 Rab32 可促进 TYR 和 TYRPI 向黑素小体的转运过程。此外,Rab32 缺乏还可导致黑素细胞中多巴色素异构酶的表达量降低^[15],提示 Rab32 可从多方面影响黑素代谢。本研究成功构建了 Rab32 与 EGFP 融合蛋白表达载体 pEGFP-Rab32,并初步研究了 Rab32 在人黑素细胞瘤细胞系 A375 中定位情况,为进一步研究 Rab32 的生物学功能及其在黑素代谢过程中的作用奠定了良好的基础。

(下转第 751 页)

- [3] LEE M ,OH S ,LEE H J *et al.* Telbivudine protects renal function in patients with chronic hepatitis B infection in conjunction with adefovir-based combination therapy [J]. *J Viral Hepat* ,2014 ,21 (12) : 873-881.
- [4] LIANG K H ,CHEN Y C ,HSU C W *et al.* Decrease of serum angiotensin converting enzyme levels upon telbivudine treatment for chronic hepatitis B virus infection and negative correlations between the enzyme levels and estimated glomerular filtration rates [J]. *Hepat Mon* 2014 ,14(1) : e15074.
- [5] COMBES B ,SHOREY J ,BARRERA A *et al.* Glomerulonephritis with deposition of Australia antigen-antibody complexes in glomerular basement membrane [J]. *Lancet* ,1971 2(7718) : 234-237.
- [6] SACKS S ,ZHOU W ,CAMPBELL R D *et al.* C3 and C4 gene expression and interferon-gamma-mediated regulation in human glomerular mesangial cells [J]. *Clin Exp Immunol* ,1993 93(3) : 411-417.
- [7] DENG C L ,SONG X W ,LIANG H J *et al.* Chronic hepatitis B serum promotes apoptotic damage in human renal tubular cells [J]. *World J Gastroenterol* 2006 ,12(11) : 1752-1756.
- [8] APPEL G. Viral infections and the kidney: HIV ,hepatitis B ,and hepatitis C [J]. *Cleve Clin J Med* 2007 ,74(5) : 353-360.
- [9] LAI K N ,HO R T ,TAM J S *et al.* Detection of hepatitis B virus DNA and RNA in kidneys of HBV related glomerulonephritis [J]. *Kidney Int* ,1996 50(6) : 1965-1977.
- [10] KOKOTIS P ,SCHMELZ M ,SKOPELITIS E E *et al.* Differential sensitivity of thick and thin fibers to HIV and therapy-induced neuropathy [J]. *Auton Neurosci* 2007 ,136(1/2) : 90-95.
- [11] 韩丽娜,于岩岩. 替比夫定单药或联合干扰素体外对 SH-SY5Y 细胞系线粒体的影响 [J]. 传染病信息 ,2013 ,26(3) : 171-174.
- [12] 姜晓刚,崔文. 系膜细胞与肾脏纤维化研究进展 [J]. 济宁医学院学报 2014 ,37(1) : 56-58.

(本文编辑: 杨 博 英文编辑: 杨 博)

(上接第 747 页)

参考文献:

- [1] OLKKONEN V M ,IKONEN E. Genetic defects of intracellular-membrane transport [J]. *N Engl J Med* 2000 ,343(15) : 1095-1104.
- [2] SEABRA M C ,MULES E H ,HUME A N. Rab GTPases ,intracellular traffic and disease [J]. *Trends Mol Med* 2002 8(1) : 23-30.
- [3] CHUA C E ,TANG B L. Role of Rab GTPases and their interacting proteins in mediating metabolic signalling and regulation [J]. *Cell Mol Life Sci* 2015 ,72(12) : 2289-2304.
- [4] ZERIAL M ,MCBRIDE H. Rab proteins as membrane organizers [J]. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001 2(2) : 107-117.
- [5] PEREIRA-LEAL J B ,SEABRA M C. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily [J]. *J Mol Biol* 2000 ,301(4) : 1077-1087.
- [6] WASMEIER C ,ROMAO M ,PLOWRIGHT L *et al.* Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes [J]. *J Cell Biol* 2006 ,175(2) : 271-281.
- [7] 曹文萍,苑海刚,刘平,等. A546D 突变型 TGFBI 基因真核表达载体的构建及体外表达 [J]. 眼科新进展 ,2015 ,35(6) : 525-528.
- [8] 彭力,何庆南,李晓燕,等. 同源盒基因 A13 在清蛋白超载所致肾小管上皮细胞间充质转分化中的作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志 2015 ,30(21) : 1663-1667.
- [9] 高洁,史瑞明,吕颖,等. 钠通道重叠综合征相关基因 SCN5A 在 H9C2 细胞中的表达 [J]. 新乡医学院学报 2015 ,32(11) : 975-980.
- [10] SEABRA M C ,WASMEIER C. Controlling the location and activation of Rab GTPases [J]. *Curr Opin Cell Biol* 2004 ,16(4) : 451-457.
- [11] PEREIRA-LEAL J B ,HUME A N ,SEABRA M C. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease [J]. *Febs Lett* 2001 ,498(2/3) : 197-200.
- [12] JENKINS D ,SEELOW D ,JEHEE F S *et al.* RAB23 mutations in carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signalling in cranial-suture development and obesity [J]. *Am J Hum Genetics* 2007 80(6) : 1162-1170.
- [13] HUTAGALUNG A H ,NOVICK P J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology [J]. *Physiol Rev* ,2011 91(1) : 119-149.
- [14] BARISIC N ,CLAEYS K G ,SIROTKOVIC SKERLEV M *et al.* Charcot-marie-tooth disease: a clinico-genetic confrontation [J]. *Ann Hum Genetics* 2008 72(3) : 416-441.
- [15] BULTEMA J J ,AMBROSIO A L ,BUREK C L *et al.* BLOC-2 , AP-3 and AP-4 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles [J]. *J Biol Chem* 2012 287(23) : 19550-19563.

(本文编辑: 徐刚珍 英文编辑: 孟 月)