

[10] 周琼艳,赵敬军,许素玲,等. 13 181 例疑似生殖道支原体感染患者支原体分布及耐药性分析[J]. 中华临床感染病杂志,2016,9(2):186-189.

[11] 朱小飞,彭红新,李岷,喹诺酮抗性决定区域位点突变诱导解脲原体耐喹诺酮类药物的系统评价[J]. 临床检验杂志,2015,33(1):46-48.

[12] 于静波,薛文成,张明磊,等. 人型支原体耐药性监测及耐药机制的研究[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(10):788-791.

[13] PEREYRE S,RENAUDIN H,CHARRON A,et al. E-

mergence of a 23S rRNA mutation in mycoplasma hominis associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin [J]. J Antimicrob Chemother,2006,57(4):753-756.

[14] 周丽华,沈梦远,李曦,等. 12 548 例泌尿生殖道标本解脲原体和人型支原体检测及药物敏感性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2018,28(1):106-108.

[15] 龚娅,段德令,何宗忠,等. 19 530 例泌尿生殖道感染患者支原体感染及药敏结果分析[J]. 重庆医学,2015,44(25):3539-3541.

(收稿日期:2019-01-13 修回日期:2019-04-14)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.13.029

小鼠 Cdc14A 基因真核表达载体的构建

刘 儒¹,谢基明²,孟 峻¹,李瑞林¹

1. 内蒙古医科大学附属医院检验科,内蒙古呼和浩特 010050;2. 内蒙古自治区人民医院检验科,内蒙古呼和浩特 010017

摘要:目的 构建小鼠 pcDNA3.1-MYC-细胞分裂周期 14A(Cdc14A)真核表达载体,并观察和验证其在真核细胞中的表达。方法 将化学合成的目的基因 Cdc14A 定向克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(+)中,经酶切和测序鉴定正确后,采用脂质体法转染 HEK293 细胞,通过 Western blot 检测细胞内 Cdc14A 的表达,并检测 Cdc14A 基因序列。结果 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 真核表达载体构建成功,将其转染 HEK293 细胞 48 h,提取细胞蛋白,采用 Western blot 检测到细胞内 Cdc14A 的表达,并且测序结果与预期结果一致。结论 成功构建了真核表达载体 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A,为研究 Cdc14A 在小鼠一细胞期受精卵 G2/M 期转换中的作用奠定了基础。

关键词:真核表达载体; 细胞分裂周期 14A; HEK293 细胞

中图分类号:R394.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)13-1891-03

人类基因组编码 518 个激酶,其中仅有 147 个蛋白磷酸酶。磷酸酶与来源于同一祖系的蛋白激酶相反,能由若干进化的祖细胞独立进化为不同的磷酸酶家族。由于编码磷酸酶的基因数量相对较少,而且分离的磷酸酶在体外仅表现出低底物特异性,因此,磷酸酶已被广泛认为是混杂酶^[1-2]。细胞分裂周期 14A(Cdc14A)是真核细胞生物中广泛表达的一类特殊的高度保守的双重特异性磷酸酶,是 Cdc14 家族的一个亚型。从酵母到人类体细胞的多种研究表明,Cdc14 涉及的作用广泛,如减数分裂、细胞质分裂、有丝分裂、DNA 损伤修复、肿瘤发生、发展及生殖等^[2]。本文通过构建小鼠 Cdc14A 基因真核表达载体,为 Cdc14A 在小鼠一细胞期受精卵 G2/M 期转换作用的研究奠定了基础,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 目的基因、细胞株、菌种和质粒:目的基因 Cdc14A 由鸿讯生物科技有限公司化学合成;真核表达载体 pcDNA3.1(+),DH5a 感受态大肠杆菌为广州辉骏生物科技有限公司产品;HEK293 细胞购于北京全式金生物技术有限公司。

1.2 试剂与仪器 限制性内切酶 KpnI、XhoI 和

ApaI(Thermo Scientific);DMEM 培养基(GIBCO 公司);微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(上海生工 B518131-0100);质粒小量抽提试剂盒(上海生工 B518191-0050);ClonExpress II One Step Cloning Kit 连接酶(诺唯赞 C112-2);DNA 测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。低温超速离心机(美国,Sigma 公司);基因扩增仪(HEMA,9600);台式高速离心机(TG17-WS,上海卢湘仪器有限公司);凝胶自动成像仪 GDS9000(美国,Bio-Rad 公司);紫外分光光度计(北京思博全公司);洁净工作台(AIRTECH,SW-OJ-2F);CO₂ 培养箱 CB115(德国 WTB-binder);恒温空气振荡器(上海艾测电子科技有限公司);电泳仪(君意,JY600E)。

1.3 方法

1.3.1 获取目的基因 带有 WYC 标签的 Cdc14A 目的基因由鸿讯生物科技有限公司化学合成。

1.3.2 载体双酶切 (1)载体双酶切。在无菌的 0.2 mL EP 反应管,取 5 μg 的 pcDNA3.1(+)载体,用 KpnI 和 XhoI 双酶切,酶切体系如下:10×Buffer 5 μL;pcDNA3.1(+) 5 μg;KpnI 1.5 μL;XhoI 1.5 μL;加无酶水补充到总体积为 50 μL,37 °C 酶切反应 20 min;

取酶切产物 6 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。
 (2) 酶切产物的回收。酶切产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中迁移 30 min 后, 将凝胶置于紫外灯下, 用手术刀小心将琼脂糖凝胶上线性化的载体条带切割出来, 放至无菌无酶的 1.5 mL EP 管中, 用微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(上海生工)回收 DNA 目的片段(详细步骤见试剂盒说明书)。

1.3.3 目的片段与载体连接 目的片段 MYC-Cdc14A 与线性化载体连接, 反应体系: pcDNA3.1 (+) 100 ng; MYC-Cdc14A 100 ng; 5 \times CE II Buffer 4 μ L; ClonExpress II One Step Cloning Kit 连接酶 2 μ L; 加无酶水补充到总体积为 20 μ L; 37 $^{\circ}$ C 连接 30 min, 冰浴 5 min。

1.3.4 连接产物转化感受态细胞 在冰水中解冻 100 μ L DH5a 感受态细胞, 解冻后加入 2 μ L 连接产物, 轻轻摇匀, 冰浴 30 min 后于 42 $^{\circ}$ C 水浴中热休克 45 s, 然后迅速放在冰中冰浴 2 min。然后加入 500 μ L LB 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、225 r/min 振荡培养箱中培养 1 h 后, 取 150、100、50 μ L 3 种递减梯度的菌液均匀涂布于 3 个含 Amp 抗菌药物(100 μ g/mL)的琼脂平板上。倒置放于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中过夜培养。挑取单个菌落于 Amp + LB(100 μ g/mL)培养基 3 管(每管约 5 mL)中培养 12~16 h, 测定其 OD 值为 2~3 时提取质粒。

1.3.5 用质粒小量抽提试剂盒提取质粒 取 5 mL 过夜培养的细菌菌液于干净离心管中, 8 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 加入 250 μ L Buffer P1, 重悬菌体沉淀; 加入 250 μ L Buffer P2, 立即轻柔颠倒 5~10 次, 室温静置 2 min, 彻底裂解菌体; 加入 350 μ L Buffer P3, 立即轻柔颠倒 5~10 次, 此时溶液中出现絮状物, 12 000 r/min 离心 15 min, 将上清液全部小心转移到 Spin column 内, 8 000 r/min 离心 1 min, 弃收集管内的液体; 向 Spin column 内加入 500 μ L Wash Solution, 8 000 r/min 离心 30 s 至 1 min, 弃收集管内的液体, 再向 Spin column 内加入 500 μ L Wash Solution 重复清洗 1 次, 8 000 r/min 离心 1 min, 弃收集管内的液体; 将空的 Spin column 8 000 r/min 离心 1 min, 彻底清除残留液体后将 Spin column 连接到无菌的 1.5 mL 离心管中; 向 Spin column 内加入 30 μ L Elution Buffer, 室温静置 2 min, 于 8 000 r/min 离心 1 min, 1.5 mL 离心管收集到的溶液中即含有质粒 DNA。

1.3.6 质粒酶切鉴定 用限制性内切酶 KpnI 和 ApaI 进行双酶切, 酶切反应体系为: 10 \times Buffer 5 μ L; pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 2 μ g; 限制性内切酶 KpnI 和 ApaI 各 1 μ L; 加无酶水补充到总体积为 20 μ L; 37 $^{\circ}$ C 酶切 20 min。酶切完成后, 取 6 μ L 15 000 Marker 和 6 μ L 酶切产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。琼脂糖凝胶电泳鉴定完毕后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行质粒 DNA 序列测

定, 进一步证明构建成 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 真核表达载体。

1.3.7 细胞培养和转染 HEK293 细胞在 DMEM 培养液(含 10 μ g/mL 链霉素、10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素)中 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养至细胞密度达到 80% 后用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒转染 HEK293 细胞, 具体步骤参考试剂盒说明书。24 h 后, 细胞可转染 5 μ g pcDNA3.1-MYC-Cdc14A DNA。

1.3.8 Western blot 检测 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 的表达 收集转染 48 h 后的目的细胞, 提取蛋白, 用 BCA 试剂盒(来自碧云天)检测其浓度。取 50~80 μ g 蛋白样品按比例加入上样缓冲液, 沸水浴 10 min, 冷却离心后在 12% 的分离胶进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿转法在 110 V 90 min 电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。用磷酸盐缓冲液和 tween20 (TBST)溶解的 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 孵育一抗(rabbit mAb anti-Cdc14A(1:200), rabbit mAb anti-Actin(1:1 000)) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日用 TBST 洗涤 4 次(每次 8 min), 然后室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(rabbit IgG(1:5 000) 2 h, 最后用 ECL-Plus 系统检测在 PVDF 膜上的蛋白表达情况。

2 结 果

2.1 真核表达载体 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 的构建及鉴定 MYC-Cdc14A 目的片段与 pcDNA3.1 (+) 载体连接, 经测序公司进行质粒 DNA 序列测定分析, 目的基因插入正确, 测序结果见图 1。取构建成功的真核表达载体 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A, 用限制性内切酶 KpnI 和 ApaI 进行双酶切鉴定, 结果见图 2。电泳结果显示, 目的基因条带对应 1 800 bp、载体条带对应 5 200 bp, 与预期片段大小相符, 进一步证明了插入基因正确, 获得 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 真核表达载体, 可用于体外转录。

```

TAGCACTCACTATGAGGGAACCGCAAGCTGGCTAGCGTTAAACCTTAAGCTTGGTACCGCCACCATTGAGCAGAAACTCATCT
GAGAAGAAGGATCTCTGGTTGGCTATGTCAGCGGAGCTCTGGGAACTAATCGGGGCTTGGGAGTTCAAGAAAGATCGATAT
ATTTTGTACTTTAAGGAATA GACCAAAA AAGCACAATAAATTCGACTATTTCTCCATCGAAGAGAGGAGCTGGTCTATGAAAAT
TTCTATGCA GATTTTGGACCTCTGAACCTGGCGTTGTGTACAGATACTGCTGAAGCTAAAGAGAAACTAAAATCATACAG
TTTATCAAGA A AAGAA GATAGTGCATCA CACTCTTTTCGACCA GCGGAA AAGGCAA AOGCAGCATTTCTGTAGGTGCTTAT
GCGGTCACTACTTA AAGAA GACA CCGAAGA AGCGTACAGAGCTCTCTGCTCTGCTCAA ACCCTCTCTTA TCTTCCATTCA G
GGATGACTACTTTTG AAAAA CTGACTTACAACCTCA CCGTCTTGA CTGTTA CAA GGAATCA GAAAGGGATACAGCATGGGG
TTTTTTGA CTTGA GACCGTTTGTGTCGGAAGAATA TGAACATTATGAGCGAGTGTGA AAGCGGAGACTTCACTGCTGAAGTTC
CAGGAAA GTTTTTAGGGTTCAAGTGACCGCATCTCAAAA GCAA GATTGAG AATGGTTACCTCTCCAGCTCCG GAAGCCTTA
CTTCCACTACTTCAAA AAGAA CAA CGTGAACCATGATGTA GATTGAA CAA AAGAGATCTA CAGAGGGAA GCGCTTCCAGAC
GCTGCGTGGTGGACACTATGACTGTTCTTCATA GACGCGCAGCACCCCA CGGATAACTGGTGGGAGATCTCTGAACA TCT
GTGAGAA CACCGAGGGGCCATCGCTCCACTGCAAA GCTGCTGTGGA AAGAA CCGGGACA TTGATAGCTGTATGTCTCA
TGAACACTACAGGTTTACA CACTGCTGAAA TCACTTGGTGTGACGAAATTGCCAGCCAGCTCCATCGTGA CCGCA CGAG
CACTTCTTCAAGAAAA CAA GCATCACTGTGGGCCAA GGAGACATTTTTAGATCCAAA CTA AAAA ATA GACCATCTCGAGT
AGGGAA GTATTACAAA AATTATTCTACCTGGATGATGATGCTATTGTGTGCAAAATTTACAAA TTAACA AAGCACA GA AAGG
ATTGGAGAGAA TAA TTTTGAAGAGCA AGATATG GAAA TTAAGAACA CCGTAACGCA GGGAGACAAA CTACGTGCTTAAA
AGCCA GAGGCA TCCCGCTCTCGCCATCTGCTGATTTA TGGTACATGATATGAAA GGAGCCAAA GGGCA TCGG CCGAC
ACTTTCAAGATTAA GTTCCCTACC GCA ACCA ACTATGTGACCATGAAGACCTCCAAAAGTGTGTTTGTCCCTCAGTGACAGC
CAAAA AAAA AAGCGAGGTTCTTGTCTTCA GGGACAAA AT AAGA GCTTCTCA TAA ATTCCCGCTAGCA GTTCTCTAG
GGAA CTGAA GCGCGGACAG AAGAACCTGAGA CCAAGAA GACCCATCACTCA CCAAGGCGCTTTCATAGCA GCGCAT
TCAACA GCTTCTGA ATGCGAGCACCA GACA CCGGCA GAAA CTACCTGAGCTCA CACA ACA ACCAGTA CACCA GAAGCAG
CAACAGCA ACAGCAG CAGCA GCGAGCGGCTTGTGGGGCAACTCTGAACAGCTCTCCAGTCCCG AGAGCGCAAGCCGGA
GGAGCACCAACCATCTCTGACCTTCTCCGCGGCTCA CTCTCTCTCTCA GAGTGTGCTGAGCTCTGCTGCTCTGCTCTGCT
CCTTCACTGTAATACGTTCACTACTAAGTCTAGAGGCGCCGTTAAACCGCTGATCAGCTCGACTGTGCTCTTCA
GTTGCG

```

注: GAGCAGAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGG 为 MYC 标签序列; ATG 之后为 Cdc14A 目的基因序列

图 1 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 测序结果



注: lane1 为 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 质粒 DNA 双酶切(KpnI 和 ApaI)产物; Marker 为 DNAmarkerDL15 kb

图 2 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 质粒 DNA 双酶切结果

2.2 真核表达载体 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 在 HEK293 细胞中的表达 通过脂质体介导的基因转染方法将构建的载体 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 转染 HEK293 细胞,用 anti-β-actin 抗体和 anti-MYC 标签抗体进行 Western blot 检测,结果显示,在转染了真核表达载体 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 的 HEK293 细胞内,MYC-Cdc14A 有表达,见图 3。真核表达载体 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 构建成功并能正确表达 Cdc14A。



注: 1 为未转染组; 2 为空载体组; 3 为转染 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 组

图 3 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 在 HEK293 细胞中的表达结果

3 讨 论

Cdc14 蛋白磷酸酶最早由 MOCCIARO 等^[1]利用出芽酵母温度敏感突变株鉴定得到,该基因调控出芽酵母细胞周期。有研究表明,Cdc14 属于高度保守的丝氨酸/苏氨酸双特异性磷酸酶家族,可以逆转细胞周期素依赖性激酶(Cdk)活性,从酵母菌到人类,在真核生物细胞 G2 期阻滞中发挥稳定的保守作用^[2-5]。

小鼠卵母细胞研究表明,Cdk1 促进卵母细胞成熟,其活性和在底物上的作用受到严格调控^[4,6-8]。Cdc14A 在未开始进行减数分裂的小鼠卵母细胞中定位于细胞核,在开始进行减数分裂后 Cdc14A 扩散到整个小鼠卵母细胞中。在减数分裂过程中,Cdc14A 在减数分裂中期 I (Met I)和减数分裂中期 II 共定位纺锤体,其他时期没有特定的亚细胞定位。此外,Cdc14A 的定位与染色体的构型密切相关,Cdc14A 在生发泡(GV)期定位于细胞核,在生发泡破裂后聚集在染色体周围,减数分裂能力的获取与定位于 GV 的

Cdk1 蛋白增加有关,因此获取减数分裂能力时,Cdk1 和 Cdc14A 的核定位呈负相关^[4]。过表达的 Cdc14A 可以延缓减数分裂的进展,而沉默 Cdc14A 的卵母细胞则延迟了 Met I 的退出。过表达和/或基因沉默 Cdc14A 后都会产生染色体排列不正常的卵子,而且非整倍体卵子的发生率明显升高,由此表明 Cdc14A 具有调节卵母细胞成熟的功能,能够促进第 1 次减数分裂到第 2 次减数分裂的转变^[4]。

目前,国内少见小鼠 Cdc14A 真核表达载体的构建和 Cdc14A 在小鼠卵母细胞和受精卵发育中作用和机制的相关研究^[2]。本研究化学合成带有 MYC 标签的目的基因 Cdc14A,成功构建了 Cdc14A 真核表达载体 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A。通过脂质体介导的方法将 pcDNA3.1-MYC-Cdc14A 载体转染 HEK293 细胞后,采用 Western blot 证实转染细胞内的 Cdc14A 成功表达,为下一步研究 Cdc14A 基因的结构、功能及其在小鼠一细胞期受精卵 G2/M 期转换中的作用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] MOCCIARO A, SCHIEBEL E. Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions[J]. J Cell Sci, 2010, 123(17): 2867-2876.
- [2] 苏日古嘎, 孟峻. 细胞分裂周期蛋白 Cdc14A 功能的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(5): 1105-1108.
- [3] 屈延, 章翔, 吴景文, 等. 小鼠内皮抑素基因真核表达载体的构建和表达[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(9): 1054-1056.
- [4] SCHINDLER K, SCHULTZ R M. The CDC14A phosphatase regulates oocyte maturation in mouse[J]. Cell Cycle, 2009, 8(7): 1090-1098.
- [5] 李瑞林, 孟峻. 细胞分裂周期蛋白 14B 在肿瘤中的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(8): 632-633.
- [6] GRAY C H, GOOD V M, TONKS N K, et al. The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase[J]. EMBO J, 2014, 22(14): 3524-3535.
- [7] MOCCIARO A, BERDOUGO E, ZENG K, et al. Vertebrate cells genetically deficient for Cdc14A or Cdc14B retain DNA damage checkpoint proficiency but are impaired in DNA repair[J]. J Cell Biol, 2010, 189(4): 631-639.
- [8] WU S, WANG W, KONG X, et al. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. [J]. Genes Dev, 2010, 24(22): 2531-2542.