

牛 *c-myc* 基因的克隆及其在皮肤成纤维细胞中的表达

肖佳佳, 张凤凤, 熊显荣, 张涌

西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100

摘要: 为了构建包含牛 *c-myc* 基因编码序列的重组载体, 以胎牛原始生殖嵴为材料, 用 RT-PCR 方法克隆出牛 *c-myc* 基因的编码序列, 将其亚克隆至 pMD19-T 载体, 再从酶切鉴定和测序正确的质粒上切下目的片段, 定向克隆到 pIRES2-AcGFP1-Nuc 表达载体上, 挑选序列正确的重组真核表达质粒转染牛皮肤成纤维细胞, 用 RT-PCR 和 Western blotting 分别检测 *c-myc* mRNA 和蛋白的表达。结果表明, 从胎牛原始生殖嵴中正确克隆了 *c-myc* 基因的全长编码序列, 所构建的重组质粒能够在皮肤成纤维细胞中有效表达, 为进一步研究 *c-myc* 基因功能以及下一步特定因子诱导牛体细胞转变为牛 iPS 细胞的研究奠定了基础。

关键词: 牛, *c-myc* 基因, iPS 细胞, 真核表达

Cloning of bovine *c-myc* gene and its expression in skin fibroblast cells

Jiajia Xiao, Fengfeng Zhang, Xianrong Xiong, and Yong Zhang

College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: In order to construct a eukaryotic expression vector of bovine *c-myc* gene, the coding sequence (CDS) of *c-myc* gene was amplified from bovine primordial genital ridges by RT-PCR. The CDS was subcloned into pMD19-T vector, and then inserted into vector pIRES2-AcGFP1-Nuc. After confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing, the recombinant plasmid was transfected into skin fibroblast cells. RT-PCR and Western Blotting were used to detect the expression of *c-myc* mRNA and protein, respectively. The results show that the complete CDS of *c-myc* gene was cloned from fetal bovine primordial genital ridges. The eukaryotic expression vector of bovine *c-myc* gene was constructed and efficiently expressed in the skin fibroblast cells. The present study will lay a good foundation for further study of *c-myc* gene function and bovine induced pluripotent stem cells from somatic cells by defined factors.

Keywords: bovine, *c-myc* gene, iPS cells (induced pluripotent stem cells), eukaryotic expression

Received: November 9, 2010; **Accepted:** January 20, 2011

Supported by: Key Scientific and Technological Special Program for the Development of Transgenic Species from Ministry of Science and Technology of China

Corresponding author: Yong Zhang. Tel: +86-29-87080085; E-mail: zhy1956@263.net

国家科技部转基因新品种培育重大专项。

c-myc 基因是细胞进化过程中高度保守的基因之一。*c-myc* 基因最初是从鸡病毒 *v-myc* 基因的同源物中分离出来的, 由 3 个外显子及 2 个内含子组成, 第 1 个外显子不编码, 只起调节作用, 只有外显子 2 和 3 与 *v-myc* 相对应。在不同动物中, *c-myc* 基因的第 1 外显子差异较大, 其他则高度保守。*c-myc* 基因编码的相关蛋白, 是一个由 439 个氨基酸组成的蛋白质, 分为 C 端 (C-terminal)、中间部分和 N 端 (N-terminal)。C 端 140 个氨基酸是 DNA 结合和形成杂合体的结构域, 包含碱性螺旋-环-螺旋以及亮氨酸拉链结构 (Basic helix-loop-leucine zipper, BHLH-LZ) 及与 Max 的结合区。N 端 143 个氨基酸是转录激活功能域, 包含 2 个 *myc* 家族特有的高保守序列。中间部分包含 1 个非特异性 DNA 结合区和 1 个核定位信号 (Nuclear localization signal, NLS), 前者的功能是协助碱性区寻找 DNA 特异结合位点; 后者是 *c-myc* 蛋白进入核内所必需的结构, 负责将 *c-myc* 蛋白转入并定位于核内^[1-3]。

2006 年, Yamanaka 等^[4]首次开创性地利用反转录病毒分别将 4 个转录因子 (Oct-3/4、Sox2、KLF4 和 *c-Myc*) 一起导入小鼠胚胎成纤维细胞和成体成纤维细胞, 并都成功得到小鼠 iPS 细胞。2007 年, Takahashi 等^[5]又用同样的转录因子组合导入成人的成纤维细胞, 得到人的 iPS 细胞。这些细胞与 ES 细胞在形态、增殖、表面抗原、基因表达和体内外分化等方面基本一致。2008 年, Dubois 等^[6]的研究证明, 造血干细胞的功能特别依赖 *c-Myc* 因子。胚胎干细胞的自我更新能力有赖于白血病抑制因子 LIF 的存在。LIF 结合其相识受体后, 活化转录因子 STAT3, 后者激活 *c-myc* 的表达。STAT3 或 *c-myc* 突变体等位基因 (T58A) 的结构性表达, 即使移除 LIF, 也能维持 ES 细胞的自我更新和多能性状态; 反之, 抑制 *c-myc* 即使存在 LIF 也诱发 ES 细胞分化, 这证明 *c-myc* 对于抑制 ES 细胞分化并保持其自我更新的能力具有关键性作用^[7]。这些研究表明, *c-myc*

基因在诱导成体细胞转变为 iPS 细胞, 并抑制其分化, 使其维持自我更新和多能性状态方面起着重要作用。

本研究拟从胎牛原始生殖嵴获得 *c-myc* 基因, 构建 *c-myc* 基因真核表达质粒, 并在脂质体介导下转染胎儿成纤维细胞, 并观察记录其表达情况, 为进一步诱导牛的 iPS 提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

40 日龄的秦川牛胎儿由杨凌科元克隆股份有限公司提供。载体 pIRES2-AcGFP1-Nuc、牛皮肤成纤维细胞, 菌株 JM109 均为本实验室保存。LA *Taq* 酶、pMD19-T Vector、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXGEN 公司; 各种限制性内切酶购自 NEB 公司; 小量质粒提取试剂盒购自上海生工生物技术有限公司; 无内毒素质粒大量提取试剂盒购自康为公公司; 多种 DNA marker 购自 Transgen 公司。

细胞培养相关试剂: 基本培养基 (DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸、青霉素、链霉素均购自 Gibico 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; FuGENE HD 转染试剂 (Roche) 及其他试剂购自 Sigma 等公司。引物由上海生工生物技术有限公司合成; 基因测序工作由华大基因 (北京) 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 牛 *c-myc* 基因的克隆

根据已发表牛 *c-myc* 基因 mRNA 序列 (GenBank Accession No. BC113343), 设计合成 1 对引物, 上游引物 Mycs: 5'-TCGGCTAGCATGCCCTCAACGTCAG-3' (下划线处为 *Nhe* I 酶切位点), 下游引物 Myca: 5'-GCAGAATTTCGGCGCAAGAGTTCCGTATC-3' (下划线处为 *Eco*R I 酶切位点), 由上海生工生物技术有限公司合成。

采集 40 日龄牛胎儿原始生殖嵴, 用 Trizol 试剂从原始生殖细胞 (Primordial genital cells, PGC) 中提取总 mRNA, 经反转录得到 cDNA, 以 Mycs 和 Myca 为引物进行 PCR 反应。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。预期 PCR 产物长度应为 1 335 bp。

1.2.2 pMD19-T 载体克隆与测序

PCR 产物经快速回收, 回收产物 (目的片段) 和 pMD19-T 载体在 T4 DNA 连接酶作用下于 16 °C 连接。将连接产物转化感受态菌 JM109, 菌液与 IPTG 和 X-gal 按比例混匀后涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平皿上筛选, 挑取大小均匀的白斑摇菌, 按照质粒抽提试剂盒说明书小量提取质粒, 经 *EcoR* I 与 *Nhe* I 双酶切鉴定, 将获得的阳性克隆质粒 (命名为 pMD19-T-*c-myc*, 简称为 pTM) 送华大基因 (北京) 公司测序。用 NCBI 在线工具 Blast 对所克隆 *c-myc* 基因序列与 GenBank 中的序列进行同源性比较分析。

1.2.3 pRM 的构建与鉴定

将载体质粒 pIRES2-AcGFP1-Nuc (图 1) 和测序正确的质粒 pTM 用内切酶 *Nhe* I 和 *EcoR* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收载体质粒 pIRES2-AcGFP1-Nuc 和 *c-myc* 基因的 DNA 片段, T4 DNA 连接酶连

接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 JM109, 经含卡那霉素 (60 μg/mL) 的 LB 平皿培养筛选克隆、提取质粒后, 用 *Nhe* I 和 *EcoR* I 双酶切鉴定, 再送华大基因 (北京) 公司测序。测序正确的菌株于 37 °C 扩增摇菌 100 mL, 提取重组表达载体阳性质粒 (pIRES2-AcGFP1-Nuc-*c-myc*, 简称为 pRM), 测定其核酸浓度, 备用。

1.2.4 重组质粒 pRM 导入牛皮肤成纤维细胞

转染前 2 d, 将牛皮肤成纤维细胞接种至 6 cm 培养皿, 培养液为含 10% 新生牛血清, 不含青霉素、链霉素的高糖 DMEM。当细胞汇片达 80%~90% 时, 严格按照 FuGENE HD 转染试剂说明书的方法将重组质粒 pRM 导入牛皮肤成纤维细胞。转染 12 h 后换为含 10% 新生牛血清, 青霉素、链霉素各 100 U/mL 的高糖 DMEM。

1.2.5 RT-PCR 检测牛 *c-myc* 基因表达

转染 12 h 后荧光显微镜观察上述转染的牛皮肤成纤维细胞, 24 h 后用 Trizol 试剂提取总 RNA, 再反转录成 cDNA 第一链, 以此为模板, 用下列引物进行 PCR 扩增: Forward (*myc*): 5'-ATGCCCTCAA CGTCAG-3', Reverse (*myc*): 5'-GGCGCAAGAGTTC CGTATC-3'。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统观察结果。

1.2.6 Western blotting 检测牛皮肤成纤维细胞 *c-myc* 蛋白表达

转染 24 h 后, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液 (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 5 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF), 冰浴上裂解细胞 30 min, 15 000 r/min 离心 10 min, 收获上清液。将上述细胞裂解后得到的上清加入 5× SDS-PAGE 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min。13 000×g 离心 10 min, 取 12 μL 上清点样, 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。以湿转印法将蛋白转到硝酸纤维素膜上, 再加入用 TBST

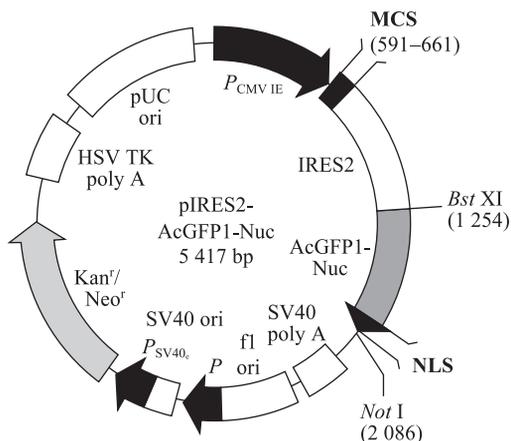


图 1 pIRES2-AcGFP1-Nuc 质粒结构示意图

Fig. 1 Structure of the recombinant plasmid pIRES2-AcGFP1-Nuc.

配制的 5% 脱脂奶粉, 室温平稳摇动 2 h。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入一抗 (按 1:1 000 比例用 TBST 稀释, 液体覆盖膜的全部), 4 °C 放置 12 h 以上。弃一抗, 用 TBST 洗膜 10 min 重复 4 次。加入辣根过氧化物酶偶联的二抗 (按 1:2 000 比例用 TBST 稀释), 室温平稳摇动 2 h。弃二抗, 用 TBST 洗膜 10 min 重复 4 次。洗膜后用化学发光法显色 5 min, 保鲜膜包裹硝酸纤维素膜, 固定在暗盒内, 压 X 光胶片, 曝光, 显影, 定影。用预染蛋白 marker 判定目的蛋白的相对分子质量。

2 结果

2.1 牛 *c-myc* 基因的克隆与测序

用 40 日龄牛胎儿 PGC 克隆牛 *c-myc* 基因编码序列, 预期 PCR 产物长度应为 1 335 bp。采用扩增复杂二级结构模板专用的 LA *Taq* 聚合酶进行 PCR 扩增, 得到预期长度的扩增片段。所得扩增片段测序后, 与已发表的牛 *c-myc* 基因序列 (GenBank Accession No. BC113343) 进行同源性比较分析, 核苷酸序列没有发生突变, 证明所克隆片段为牛 *c-myc* 基因编码序列。

2.2 真核表达载体的构建

pTM 和 pIRES2-AcGFP1-Nuc 载体分别经过双酶切, 胶回收, 连接, 转化 JM109 感受态细菌构建的重组质粒再经 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切和 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得大小为 1 329 bp 的片段, 与预期结果相符 (图 2)。鉴定正确的质粒命名为 pRM。

2.3 牛 *c-myc* 在皮肤成纤维细胞中的表达

重组质粒 pRM 转染 12 h 后, 在荧光显微镜下观测 GFP 的表达情况 (图 3)。结果表明质粒 pRM 已转染到牛成纤维细胞内并表达。转染 24 h 后的细胞用 Trizol 试剂提取总 RNA, 再反转录成 cDNA 第一链, 以此为模板用引物 Forward (*myc*) 和 Reverse (*myc*) 扩增后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得了大小为 1 317 bp 的目的条带 (图 4), 与预期结果相符。

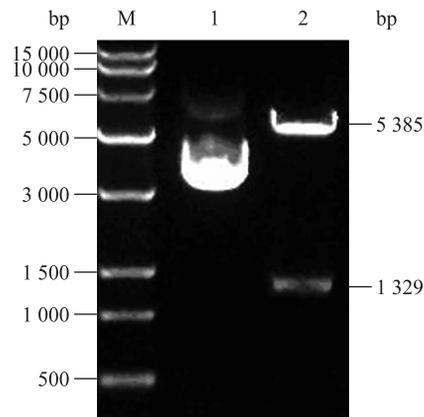


图 2 pRM 质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pRM by enzyme digestion. M: trans15K DNA marker; 1: intact pRM; 2: pRM digested with *Nhe* I and *Eco*R I.

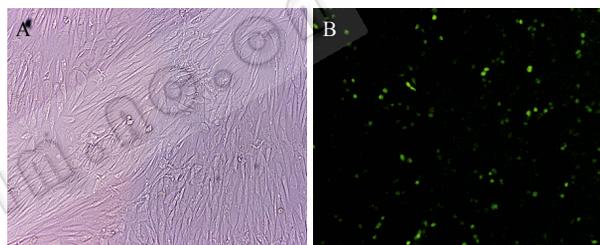


图 3 重组质粒转染成纤维细胞

Fig. 3 The fibroblasts transfected with pRM. (A) The cells transfected with pRM under microscope (100 \times). (B) The cells transfected with pRM under fluorescent microscope (100 \times).

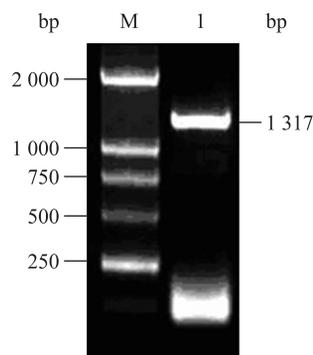


图 4 转染细胞中 *c-myc* 基因的表达检测

Fig. 4 Expression detection of *c-myc* gene in pRM-transfected fibroblast cells. M: DL2000 DNA marker; 1: pRM-transfected fibroblast cells.

2.4 *c-myc* 蛋白在成纤维细胞中的表达

将转染细胞和未转染的细胞用胰酶消化, 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液, 冰浴上裂解细

胞 30 min, 经离心收获上清, 进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜, 抗体孵育, 曝光, 显影, 定影。结果如图 5 所示: 转染的成纤维细胞样品出现了约 49 kDa 的特异性条带, 阴性对照组则未出现此反应条带, 与预期结果相符。

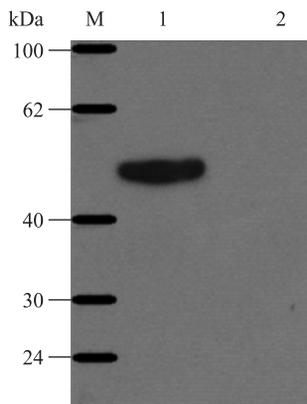


图 5 *c-myc* 蛋白的 Western blotting 检测

Fig. 5 Western blotting detection of *c-Myc* protein. M: prestained protein marker; 1: pRM-transfected fibroblast cells; 2: non-transfected fibroblast cells.

3 讨论

由于牛 *c-myc* 基因编码序列 G、C 含量达到 59%, 所以本研究采用了能够很好地扩增复杂二级结构模板的 LA *Taq* 聚合酶, 并以胎牛原始生殖嵴为材料提取总 RNA, 再以反转录的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 将得到的产物与已发表的牛 *c-myc* 基因序列 (GenBank Accession No. BC113343) 进行同源性分析, 结果显示得到的产物并未发生位点突变。本研究利用牛 *c-myc* 基因的编码序列成功构建了重组真核表达载体 pRM。该载体在转染牛皮肤成纤维细胞之后能正确表达 *c-Myc* 蛋白。

c-myc 对细胞具有双重作用, 既可刺激细胞增殖, 也可促进细胞凋亡^[8]。在细胞增殖的过程中, *c-myc* 可使细胞由 G0 期进入 G1 期, 从而由静止期向 DNA 的合成转变。*c-myc* 也能促进细胞凋亡, 其细胞凋亡作用依赖于 *c-myc* 蛋白的表达水平^[9]。本研究在操作过程中发现重组质粒 pRM 转染牛皮肤

成纤维细胞 48 h 之后部分阳性细胞呈现凋亡趋势, 可能是因为在其他因子不足的情况下 *c-myc* 的异常表达导致了皮肤成纤维细胞的衰老和凋亡。外源性 *c-myc* 转录因子与其他因子组合, 可以将哺乳动物体细胞诱导为 iPS 细胞, 但到目前为止, 将体细胞核重编程为 iPS 细胞的分子机理以及 *c-myc* 转录因子在此过程中起何具体作用仍不是很清楚。2007 年, Yamanaka^[10]提出了一个关于 iPS 细胞诱导过程中外源转录因子如何起作用的模型, 他认为 Oct4 促使细胞向 ES 细胞方向发展, 在 Sox2 的共同作用下, 调控细胞一系列基因的表达, 使细胞获得多能性状态, *c-myc* 起到打开染色体结构, 促进细胞增殖的作用, 但同时 *c-myc* 还导致细胞的衰老和凋亡, 而 Klf4 则阻断了细胞衰老和凋亡的过程。近年来, 在 iPS 细胞的研究过程中, 人们曾尝试除了经典的四因子组合之外, 用减少某些因子的方法, 看能否诱导得到 iPS 细胞。Huangfu 等^[11]仅用 Oct4、Sox2 两个因子和一种组蛋白乙酰基转移酶抑制物——丙戊酸 (Valproic acid, VPA) 成功得到 iPS 细胞。Kim 等^[12]用 Oct4 分别与 Klf4 或 *c-Myc* 组合, 以二因子成功诱导小鼠神经干细胞转变为 iPS 细胞。Kim 等^[13]又尝试仅以 Oct4 的外源性表达来诱导小鼠神经干细胞, 成功得到 iPS 细胞, 值得注意的是: 小鼠神经干细胞本身就高水平表达 Klf4 和 *c-Myc* 因子。虽然这些研究都成功得到 iPS 细胞, 但重编程的效率却随着转录因子数目的减少而降低。

总之, 本研究成功地从胎牛原始生殖嵴中克隆出牛 *c-myc* 基因编码序列, 其核苷酸序列和对应的氨基酸序列与发表的牛 *c-myc* 基因序列完全一致, 为进一步研究 *c-myc* 基因功能以及下一步特定因子诱导牛体细胞转变为牛 iPS 细胞的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Garte SJ. The *c-myc* oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncogenesis*, 1993, 4(4): 435-449.

- [2] Lüscher B, Eisenman RN. New light on Myc and Myb Part I Myc. *Genes Dev*, 1990, 4: 2025–2035.
- [3] Schwinkendorf D, Gallant P. The conserved Myc box 2 and Myc box 3 regions are important, but not essential for Myc function *in vivo*. *Gene*, 2009, 436(1/2): 90–100.
- [4] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676.
- [5] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861–872.
- [6] Dubois NC, Adolphe C, Ehninger A, et al. Placental rescue reveals a sole requirement for c-Myc in embryonic erythroblast survival and hematopoietic stem cell function. *Development*, 2008, 135: 2455–2465.
- [7] Zhang QH, Xie FP, Zhang Z. Advance in studies of MYC. *J Med Res*, 2010, 39(2): 109–112.
张庆华, 谢丰培, 张众. MYC 的研究进展. *医学研究杂志*, 2010, 39(2): 109–112.
- [8] Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 416(2): 129–136.
- [9] de Nigris F, Sica V, Hermann J, et al. *c-myc* oncoprotein: cell cycle-related events and new therapeutic challenges in cancer and cardiovascular diseases. *Cell Cycle*, 2003, 2(4): 325–328.
- [10] Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 39–49.
- [11] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1269–1275.
- [12] Kim JB, Zaehres H, Wu GM, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454(7204): 646–650.
- [13] Kim JB, Sebastiano V, Wu GM, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, 136(3): 411–419.

JOURNALS.IM.AC.CN