

小鼠 pMSV-Slfn5-GFP 表达质粒构建及基因结构分析*

况春燕¹, 杨 藩²

(1. 贵州省人民医院心内科, 贵阳 550002; 2. 西北农林科技大学动物医学院/陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

[摘要] **目的** 构建小鼠 pMSV-Slfn5-GFP 基因重组表达质粒及基因结构分析。**方法** 提取小鼠肝脏组织中总 RNA, 反转录为 cDNA。PCR 扩增小鼠 Slfn5 编码序列片段, 并与 pGEM-T Easy 载体连接, 连接产物转化到大肠埃希菌 DH5 α 中。挑取阳性克隆提取质粒, 经限制性内切酶 *Hpa* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。酶切鉴定正确的质粒送 Macrogen USA 测序。测序正确的质粒通过 *Hind* III 和 *Xho* I 与 pMSV-GFP 连接, 并命名为 pMSV-Slfn5-GFP。通过 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) 分析小鼠 Slfn5 及其家族基因组结构, 并通过 NCBI 确定 Slfn5 的蛋白结构域。**结果** Slfn5 全长基因序列克隆到表达载体 pMSV-GFP 中, 酶切鉴定片段大小为 2.65 kb。Slfn5 的 AAA₄ 蛋白结构域由 phylogeny.fr 确定了该结构在 Slfn 蛋白家族中的保守性。**结论** 成功构建了小鼠 pMSV-Slfn5-GFP 全长基因表达载体。

[关键词] pMSV-Slfn5-GFP; 构建; 基因结构; 分析**[中图分类号]** Q331**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)22-3033-03

Construction of pMSV-Slfn5-GFP plasmid and analysis of gene structure in mice*

Kuang Chunyan¹, Yang Fan²

(1. Department of Cardiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;

2. Shaanxi Provincial Center for Stem Cells Engineering and Technology Research, College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forest Science and Technology University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

[Abstract] **Objective** To perform mouse pMSV-Slfn5-GFP gene recombinant expression plasmid construction and gene structure analysis. **Methods** Total RNA was extracted from mouse liver and turned into cDNA by reverse transcription. Mouse Slfn5 coding sequence (CDS) fragment was amplified by PCR and connected with the pGEM-T Easy vector. The connected product was transferred the E. coli DH5 α . The positive clones were selected for extracting plasmid, which was identified by double enzyme of restriction endonuclease *Hpa* I and *Xho* I. Then correct plasmid identified by enzyme digestion was sequenced by Macrogen USA. Then correct plasmid by sequencing was connected with pMSV-GFP by *Hind* III and *Xho* I, which was named as pMSV-Slfn5-GFP. UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) was used to analyze mouse Slfn5 and its family genomic structure. Slfn5 protein structural domain was determined by NCBI. **Results** Slfn5 full-length gene sequence was cloned into the expression vector pMSV-GFP, the fragment size was about 2.65 kb by enzyme digestion identification. The conservatism of AAA₄ protein domain in Slfn5 protein family was determined by phylogeny.fr. **Conclusion** Mouse full-length gene pMSV-Slfn5-GFP expression vector is successfully constructed.

[Key words] pMSV-Slfn5-GFP; construction; gene structure; analysis

睡眠因子 (Schlafen, Slfn) 基因家族是近年来发现的一类新的细胞周期调节基因, 该家族基因在小鼠中由 10 个成员组成 (Slfn1、1L、2、3、4、5、8、9、10 和 14)^[1-2]。Slfn5 是 Slfn 家族第三组的成员之一, 它可影响多种细胞的生物学行为, 但在不同的细胞中, 其作用不同: (1) 在 NIH 3T3 成纤维细胞中, 通过异源性过表达 Slfn5 基因, 结果发现成纤维细胞的生长并未受到影响^[3]; (2) 在人类恶性黑色素瘤细胞中, 通过基因干扰的方法沉默 Slfn5 的表达, 结果显示其有双重的作用, 不仅促进恶性黑色素瘤细胞的不依赖支持物的生长和克隆形成能力, 而且还增强该细胞在三维胶原中的侵袭能力^[4]; 笔者的前期研究, 分离培养 5~7 d 的大鼠骨髓源性内皮祖细胞, 通过 RT-PCR 检测 Slfn5 基因的表达, 结果发现在 EPCs 细胞有 Slfn5 基因的表达, 是否 Slfn5 基因影响内皮祖细胞的功能, 目前仍不清楚。

为了研究 Slfn5 基因对内皮祖细胞功能的影响, 需要构建 Slfn5 基因的表达载体, 本文获得小鼠 Slfn5 全长基因表达质粒并对其基因的结构进行分析, 为进一步探讨其在内皮祖细胞的生物学作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 大肠埃希菌 DH5 α , 质粒 pMSV-GFP、反转录病毒包装细胞 Plat-E、小鼠 293 细胞由西奈山医学院遗传系实验室提供。载体 pGEM-T Easy 均购自 Promega 公司。总 RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA marker 均购自天根公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、反转录试剂盒和 Taq 聚合酶均购自 Fermentas 公司; 高保真 DNA 聚合 (PhantaTM HS Super-Fidelity DNA Polymerase) 购自 Vazyme 公司; 定量 PCR Mix (Power 2 \times SYBR Real-time PCR Premix-

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560056)。 作者简介: 况春燕 (1976—), 副主任医师, 博士, 主要从事冠心病, 血管损伤和修复的研究。

ture)购自 Biotek 公司;脂质体 (Lipofectamine 2000)、Opti-MEM 和 DMEM 培养基均购自 Invitrogen 公司;非必需氨基酸 (NEAA)、L-谷氨酰胺 (L-Glu)、β-巯基乙醇 (β-ME) 购自 Gibco 公司;胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司;PCR 引物由美国 MacroGen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 Slfn5 编码序列的克隆与载体构建 参照天根的血液/细胞/组织基因组 RNA 提取试剂盒从小鼠肝脏组织中提取总 RNA。从 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 中下载小鼠 Slfn5 编码序列 (CDS) 并设计带有酶切位点 Hpa I 和 Xho I 的上下游引物,引物序列为 Slfn5-xho1-F CCG CTC GAG ATG AGT TTC CTG GAG GAT TTT G;Slfn5-hpa1-R AGT TAA CTG GCA TCT TCC TAT CAA AAC ACA,并扩增 2.7 kb CDS 片段。产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收,并与 pGEM-T Easy 载体连接,连接产物转化到大肠埃希菌 DH5α 中。挑取阳性克隆提取质粒,经限制性内切酶 Hpa I 和 Xho I 双酶切鉴定。酶切鉴定正确的质粒送美国 MacroGen 公司测序。测序正确的质粒通过 Hind III 和 Xho I 与 pMSV-GFP 连接,并命名为 pMSV-Slfn5-GFP。引物序列为 Slfn5-xho1-F CCG CTC GAG ATG AGT TTC CTG GAG GAT TTT G;Slfn5-hpa1-R AGT TAA CTG GCA TCT TCC TAT CAA AAC ACA。

1.2.2 细胞培养与感染 Plat-E 和 293 细胞用含有 10% FBS 的 DMEM 培养液,在 37 °C、含有 5% CO₂ 的细胞培养箱内培养。按照 Lipofectine 2000 使用说明书,首先将 pMSV-Slfn5-GFP 转入 Plat-E 细胞,转染后 18 h 在换成新鲜培养液。并在转染后 48、72、96 h 收取细胞培养液中上清液存放于 4 °C 冰箱中。将收集的培养液上清液用 45 nm 的滤器过滤并按照上清液与细胞培养液 1:1 的比例感染小鼠内皮祖细胞,并在感染 12 h 后换液。为了提高感染效率将在换液后 12 h 进行第 2 次感染并换液。

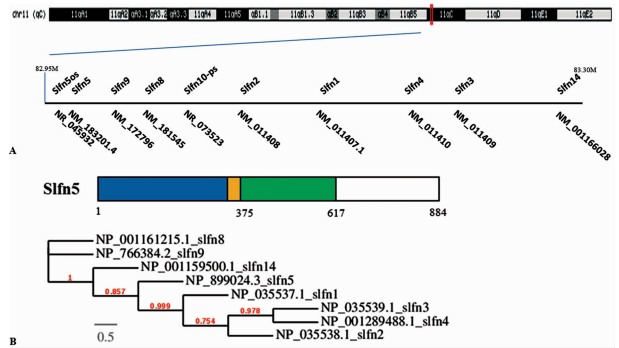
1.2.3 荧光定量 PCR 按照天根总 RNA 提取试剂盒说明书提取组织总 RNA,按照 RevertAid™ Frist Strand cDNA Synthesis Kit 相关说明进行反转录获得 cDNA,并设计 qSlfn 和 qGAPDH 引物。荧光定量 PCR 反应体系如下:2 × SYBR Green Mix 10 μL,25 mmol/L dNTPs 1 μL,上、下游引物各 0.5 μL (10 pmol/L),模板 cDNA 1 μL,去离子水 7 μL,共 20 μL。每个样本设 3 个重复。反应条件为:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环;95 °C 5 s,60 °C 退火阶段收集荧光信号。实时荧光定量 PCR 引物序列 Slfn5-xho1-F CCG CTC GAG ATG AGT TTC CTG GAG GAT TTT G;Slfn5-hpa1-R AGT TAA CTG GCA TCT TCC TAT CAA AAC ACA。

1.2.4 小鼠 Slfn5 编码序列克隆及生物学分析 本研究通过 UCSC(http://genome.ucsc.edu/)分析小鼠 Slfn5 及其家族基因组结构,并通过 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)确定 Slfn5 的 AAA_4 蛋白结构域。

2 结果

2.1 Slfn 基因簇结构分析 通过对小鼠 Slfn 家族基因在基因组中的定位分析发现,10 个 Slfn 基因成簇分布于 11Qc,且长度约为 1 mbp(82.95~83.30 mbp)。这其中包含了 2 个非编码基因 Slfn5os 和假基因 Slfn10-ps。Slfn5os(Schlafen 5,opposite strand)是位于对应链上的 Slfn5 序列,Slfn5 位于

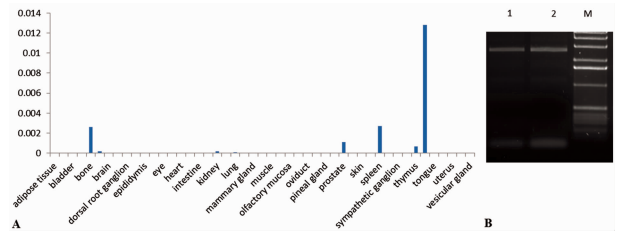
Slfn5os 下游(图 1A)。蛋白序列分析发现,Slfn5 编码 884 个氨基酸且含有 4 个保守的结构域。其中的 AAA-4 结构域位于第 188 和 320 氨基酸之间。该结构域在 Slfn 家族中很保守(图 1B)。进一步对 Slfn 家族全长蛋白序列分析发现 Slfn5 蛋白与 Slfn1、Slfn3、Slfn4 和 Slfn2 同源性较高,但是与 Slfn8 和 Slfn9 差异较大。



A:Slfn 相关基因在第 11 号染色体上的定位。B:Slfn 蛋白及 AAA_4 结构域在 Slfn 家族蛋白中的同源比对

图 1 Slfn 基因结构分析

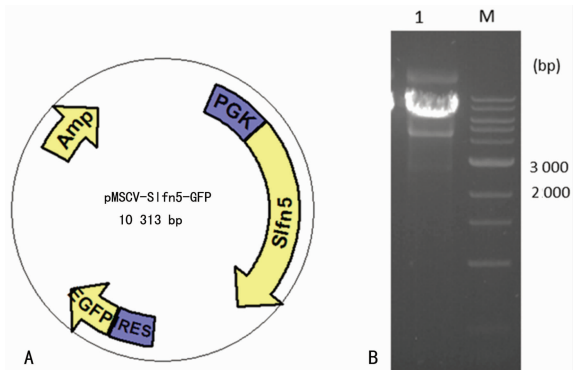
2.2 Slfn5 组织表达分析 通过对小鼠序列表达标签 (EST) 分析发现,小鼠 Slfn5 表达具有组织特异性。具体来说神经组织和腺体高表达 Slfn5(图 2A)。通过设计针对 Slfn5 全序列的特异引物,成功从腺体组织中扩增得到 Slfn5(图 2B)。



A:Slfn5 序列表达标签分布分析;B:Slfn5 在腺体组织中的表达检测(1、2 表示腺体组织)

图 2 Slfn5 组织表达分析

2.3 Slfn5 表达载体构建 将扩增得到 Slfn5 通过酶切插入到 pMSV-GFP 逆转录病毒载体中(图 3A)。双酶切鉴定发现成功地将 2.65 kb 的序列成功插入到了目标载体(图 3B)。



A:Slfn5 通过酶切插入到 pMSV-GFP 逆转录病毒载体中;B:双酶切鉴定发现将 2.65 kb 的序列成功插入到目标载体

图 3 pMSV-Slfn5-GFP 表达载体构建

2.4 Slfn5 基因结构分析 本研究通过 UCSC (http://genome.ucsc.edu/)分析小鼠 Slfn5 及其家族基因组结构,并通

过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 确定了 Slfn5 的 AAA_4 蛋白结构域由 phylogeny. fr(<http://www.phylogeny.fr/>) 确定了该结构在 Slfn 蛋白家族中的保守性。

3 讨 论

本研究有 3 个发现:(1)成功构建小鼠 Slfn5 表达载体;(2)发现 Slfn5 在神经组织及腺体组织中有高表达;(3)Slfn 基因簇结构分析发现 Slfn5 编码 884 个氨基酸且含有 4 个保守的结构域,其中 Slfn5 的 AAA_4 蛋白结构域由 phylogeny. fr 确定了该结构在 Slfn 蛋白家族中的保守性。

Slfn 基因家族尽管包含了许多成员,但在不同的物种之间,各个成员的表达不同,其作用也不尽相同。是否 Slfn 家族在小鼠及人类有相同的功能或其功能有物种的专一性,目前仍不清楚。几个小鼠的 Slfn 基因,包括 Slfn1、Slfn2、Slfn3 在细胞增殖和分化上发挥关键的调节作用^[5-7],Slfn2 在免疫细胞静止状态下发挥重要作用^[8],而 Slfn4 参与髓细胞生成的调控^[9]。Slfn5 在小鼠及人类有表达^[1-2]。人类 Slfn5 包含有一个 RNA/DNA 解链酶基序,而在 Slfn 组 1 成员中未见此结构^[10]。有研究报道,Slfn5 在干扰素诱导下,在人类的黑色素瘤细胞及肾癌细胞内表达,并且负性调节人类恶性黑色素瘤细胞的生长和侵袭能力^[4],而在鼠类的恶性黑色素瘤细胞并无类似的作用^[11]。此外,Slfn5 参与肾癌细胞的运动及侵袭能力的调控,并且 Slfn5 的表达与肾癌患者的存活呈正相关^[12]。目前,Slfn5 的组织表达特异性及其是否参与血管细胞的生物学行为的调控,目前均少见报道。

笔者的前期研究发现,Slfn5 在小鼠的内皮祖细胞有表达,为了研究 Slfn5 是否调节内皮祖细胞的生物学行为,本研究设计构建了小鼠 Slfn5 的表达载体。本实验通过获得小鼠 Slfn5 的全长基因,为研究 Slfn5 在小鼠的功能提供新的可靠依据。本研究从小鼠肝脏组织中提取了总 RNA,并将其进行反转录获得 cDNA,并设计带有酶切位点 *Hpa* I 和 *Xho* I 的上下游引物,利用引物从 cDNA 中扩增出 Slfn5 的全长 2.65 kb 的基因序列,并与 pGEM-T Easy 载体连接,经转化到大肠埃希菌 DH5 α 中形成克隆后,挑取阳性克隆进行双酶切鉴定。鉴定正确的质粒进行测序,经过测序发现得到的 Slfn5 与网上公布的序列 NM_183201 一致。测序正确的质粒通过 *Hind* III 和 *Xho* I 与 pMSV-GFP 连接,质粒构建成功。同时,也通过 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) 分析小鼠 Slfn5 及其家族基因组结构,并通过 NCBI 分析 Slfn5 的 AAA_4 蛋白结构域由 phylogeny. fr(<http://www.phylogeny.fr/>) 确定了该结构在 Slfn 蛋白家族中的保守性。Slfn5 组织表达分析。此外,还通过对小鼠 EST 分析发现,小鼠 Slfn5 表达具有组织特异性,其在神经组织及腺体组织高表达,通过设计 Slfn5 全序列的特异引物,成功从腺体组织中扩增得到 Slfn5。目前,国际上对 Slfn5 的作用研究极其有限,通过本实验获得 Slfn5 的全长基因序列,并对其结构及其组织表达进行分析,可为进一步研究其在血管系统及神经组织及腺体组织中的生物学效应打下坚实的基础。

参考文献

[1] Neumann B,Zhao L,Murphy K,et al. Subcellular localiza-

tion of the Schlafen protein family[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2008,370(1):62-66.

- [2] Bustos O, Naik S, Ayers G, et al. Evolution of the Schlafen genes, a gene family associated with embryonic lethality, meiotic drive, immune processes and orthopoxvirus virulence[J]. *Gene*,2009,447(1):1-11.
- [3] Geserick P, Kaiser F, Klemm U, et al. Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif[J]. *Int Immunol*,2004,16(10):1535-1548.
- [4] Katsoulidis E, Mavrommatis E, Woodard J, et al. Role of interferon {alpha} (IFN{alpha})-inducible Schlafen-5 in regulation of anchorage-independent growth and invasion of malignant melanoma cells[J]. *J Biol Chem*,2010,285(51):40333-40341.
- [5] Brady G, Boggan L, Bowie A, et al. Schlafen-1 causes a cell cycle arrest by inhibiting induction of cyclin D1[J]. *J Biol Chem*,2005,280(35):30723-30734.
- [6] Katsoulidis E, Carayol N, Woodard J, et al. Role of Schlafen 2 (SLFN2) in the generation of interferon alpha-induced growth inhibitory responses[J]. *J Biol Chem*,2009,284(37):25051-25064.
- [7] Yuan L, Yu Y, Sanders MA, et al. Schlafen 3 induction by cyclic strain regulates intestinal epithelial differentiation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2010,298(6):G994-1003.
- [8] Berger M, Krebs P, Crozat K, et al. An Slfn2 mutation causes lymphoid and myeloid immunodeficiency due to loss of immune cell quiescence[J]. *Nat Immunol*,2010,11(4):335-343.
- [9] van Zuylen WJ, Garceau V, Idris A, et al. Macrophage activation and differentiation signals regulate schlafen-4 gene expression; evidence for Schlafen-4 as a modulator of myelopoiesis[J]. *PLoS One*,2011,6(1):e15723.
- [10] Mavrommatis E, Fish EN, Plataniias LC. The schlafen family of proteins and their regulation by interferons[J]. *J Interferon Cytokine Res*,2013,33(4):206-210.
- [11] Mavrommatis E, Arslan AD, Sassano A, et al. Expression and regulatory effects of murine Schlafen (Slfn) genes in malignant melanoma and renal cell carcinoma[J]. *J Biol Chem*,2013,288(46):33006-33015.
- [12] Sassano A, Mavrommatis E, Arslan AD, et al. Human schlafen 5 (SLFN5) is a regulator of motility and invasiveness of renal cell carcinoma cells[J]. *Mol Cell Biol*,2015,35(15):2684-2698.

(收稿日期:2017-02-22 修回日期:2017-04-10)