文章编号:1000-5641(2009)06-0134-07

* 简报 *

秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans pkc-2* 基因 cDNA 的克隆和表达

钱 雨[1,2], Laurent SÉGALAT[2]

(1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062; 2. 克洛德·贝纳尔-里昂第一大学 细胞与分子遗传学中心, 法国 里昂 69100)

摘要: 蛋白激酶 C 在秀丽小杆线虫中具有调节肌细胞渐进性萎缩的功能. 为了揭示它的调节机制, 本研究克隆了秀丽小杆线虫中蛋白激酶 C *pkc-2* 基因的 cDNA *pkc-2-c*, 构建了含该 *pkc-2* 基因 cDNA 亚型的重组质粒 pPD 118.20-pKG 63; 揭示了该 cDNA 在秀丽小杆线虫体壁肌细胞中的定位.

关键词: 秀丽小杆线虫; *pkc-2* 基因; cDNA 克隆; 免疫细胞化学

中图分类号: **文献标识码**: A

Cloning and expression pattern analysis of a cDNA of *pkc-2* gene in *Caenorhabditis elegans*

QIAN Yu[1,2], Laurent SÉGALAT[2]

(1. *School of Life Science, East China Normal University, Shanghai* 200062, *China*; 2. *Center for Cell and Molecular Genetics, Université Claude Bernard Lyon* 1, *Lyon* 69100, *France*)

Abstract: Protein kinase C regulates the progressive muscle degeneration in *Caenorhabditis elegans*. In order to investigate the function of PKC involved in muscle degeneration, this paper cloned a cDNA isoform of *pkc-2* gene of *C. elegans* and constructed the recombinant plasmids pPD118.20-pKG63 containing the isoform. The new isoform was then further studied for gene expression pattern. Immunocytochemistry experiment showed that this cDNA isoform expressed in body-wall muscle cells and located near the dense body.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; *pkc-2* gene; clone; immunocytochemistry

0 引 言

蛋白激酶 C(PKC)属丝氨酸/色氨酸特异性蛋白激酶,被胞质中的甘油二酯(diacylglycerol, DAG) 和 Ca^{2+} 激活后磷酸化不同底物,从而调节不同的信号传导通路. PKC 家族根据其结构特征及序列,包括至少

收稿日期:2008-10

基金项目:教育部-国家留学基金管理委员会 2007 年国家建设高水平大学公派研究生项目

第一作者:钱雨,博士研究生. E-mail:emma.qian@cgmc.univ-lyon1.fr.

12 个亚型，分为三大类[1]：传统 PKC（cPKCs），包括 PKCα，PKCβI，PKCβII 和 PKCγ，其活化依赖于磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）存在，由 Ca^{2+} 和二酰甘油（DAG）激活；新 PKC（nPKCs），包括 PKCδ，PKCε，PKCη，PKCθ 和 PKCμ，其活化需要 PS 和 DAG 的存在，但不需要 Ca^{2+} 参与；非典型 PKC（aPKCs），包括了 PKCζ，PKCι 和 PKCλ3 种异构体，活化需要 PS，但不需要 Ca^{2+} 和 DAG. 在不同的组织器官中，各 PKC 亚型的分布也不尽相同，各亚型因酶特性、组织表达和特异性细胞内定位不同而功能有所差异[2]. 秀丽小杆线虫中共有 4 个 PKC 基因，分别代表 4 种不同亚型，参与线虫不同的生理过程. 例如，*pkc-3* 在合子形成极性过程中具有关键作用[3]，*pkc*-1 调节神经递质在突触中的释放[4]，*tpa-1* 则在尼古丁通路中发挥作用[5].

有证据表明，PKC 蛋白在哺乳类肌细胞中表达，并且与相关疾病有关. PKC 激活因子如转录因子 AP-1，基因 TGF-β1，以及跨膜蛋白 troponin Ⅰ（TnI）；它们与一些心血管疾病相关，如心肌内膜纤维变性（myocardial fibrosis），心肌肥大（hypertrophy）等[6-8]. 心肌细胞 L-type Ca^{2+} 通道也是 PKC 的作用底物[9,10]. 骨骼肌中表达最多的为 Novel PKC-ζ，位于神经肌肉接头处[11]. 越来越多的研究表明肌肉疾病的致病机制一般与细胞凋亡过程有关，并且很多 PKC 亚型也是肌细胞凋亡过程中的主要调节蛋白[12]. 杜兴氏肌营养不良症（Duchenne Muscular Dystrophy，DMD）是由于 dystrophin 基因的突变或缺失而使得 Dystrophin 蛋白在肌细胞内无法行使正常功能，导致肌细胞萎缩凋亡. 目前，人们仍未能揭示 DMD 的致病机制. 秀丽小杆线虫体壁肌组织为横纹肌，结构高度类似哺乳动物骨骼肌[13]. 每一肌节（sarcomere）的肌球蛋白 myosin 连接于 M-line，肌动蛋白 actin 则连接于秀丽小杆线虫的特定结构 dense body[14]，功能上等同于哺乳类骨骼肌的 Z-line . dystrophin 蛋白 N 末端和 actin 相连接. 敲除编码 dystrophin 蛋白的 *dys-1* 基因以及肌原细胞转录因子 *hlh-1* 基因的秀丽小杆线虫双突变体 *dys-1*；*hlh-1* 具有肌细胞渐进性萎缩的表型，从而成为研究杜兴氏肌营养不良症的良好模型[15,16].

在该模型中敲除 *pkc-2* 基因后，秀丽小杆线虫成虫体壁肌细胞数目显著性增加，其运动能力也明显提高（另文发表），然而其作用机理尚未清楚. 本研究克隆了秀丽小杆线虫的 *pkc-2* 基因的 cDNA 之一：*pkc-2-c*，并克隆入表达载体 pPD118.20，构建了重组质粒命名为 pPD118.20-pKG63，研究了 *pkc-2* cDNA 在秀丽小杆线虫中的亚细胞定位，初步确定 PKC-2 蛋白在肌细胞中 dense body 处表达.

1　材料与方法

1.1　实验材料及培养基

秀丽小杆线虫野生型 Bristol（N2）为本实验室保存，大肠杆菌感受态细胞株“SURE”来自 STRATEGYGENE，真核表达载体 pPD 118.20 为 Dr. A Fire 惠赠，含有氨苄青霉素（Ampicilin，Amp）编码序列，肌细胞强启动子 *myo-3* 和 GFP. Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen. 鬼笔环肽-罗丹明（phalloidin-rhodamine）购自 Interchim. 秀丽小杆线虫培养基为 NGM 培养基，细菌培养基为 LB/Amp^+ 培养基以及 LB /Amp^+ $Tetra^+$ 培养基.

1.2　秀丽小杆线虫培养

秀丽小杆线虫采用大肠杆菌 *E. coli* OP50 饲养，培养于 16 ℃恒温箱. 7 d后收集处于不同发育时期的个体，10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 清洗两次后于 - 80 ℃储存待用.

1.3　引物设计

查找 Worm Base 中 *pkc-2* 基因的 cDNA 序列，根据数据库中四种不同亚型 cDNA 的序列的共同特点，设计逆转录引物 PKC-2-KG5，PKC-2-KG6，以及 PCR 扩增引物 PKC-2-KG1，PKC-2-KG2，PKC-2-KG3，PKC-2-KG4，并分别引入酶切位点 *Nhe*I.

1.4　*pkc-2* cDNA 的克隆

按 Trizol 试剂盒说明书提取虫体总 RNA，Nano Drop 测定 RNA 浓度. 使用 Promega 公司逆转录试剂盒得到 cDNA 第一链. 随后 PCR 扩增，反应参数为 95 ℃，2 min；95 ℃，30 s；53 ℃，30 s；68 ℃，2 min，进行 30 个 PCR 循环，最后 72 ℃延伸 2 min.

PCR 产物经 *Nhe*I 酶切并纯化后，与 *Nhe*I 酶切处理的质粒载体 pPD 118.20 连接. 连接产物以电击法

转化入感受态大肠杆菌 SURE,转化参数为:电压 2 500 V,电容 25 μf,电击时间 10 ms.转化后经 *Nhe*I 酶切鉴定并测序.

1.5 转基因秀丽小杆线虫的建立

显微注射 10 ng/μL 重组质粒 pPD 118.20-pKG 63 于野生型秀丽小杆线虫 N2 生殖腺,同时注射 30 ng/μL *sur-5*::*rfp*(Clontech)作为筛选标记[17],表达红色荧光蛋白 DsRed.15 ℃培养,以 558 nm 波长范围在 Zeiss Axioplan 荧光显微镜下观察红色荧光蛋白表达情况,筛选稳定遗传 DsRed 标记的线虫系.获得的转基因线虫取成虫直接置于 Dakocytomation Fluorescent Mounting Medium (Interchim) 中,以 475 nm 波长范围在 Zeiss Axioplan 荧光显微镜下活体观察 GFP 荧光蛋白表达情况.

1.6 免疫细胞化学 (Immunocytochemistry)

野生型秀丽小杆线虫以及转基因线虫按 Benian 等人描述的方法进行免疫荧光分析[18].一抗兔抗 GFP (Interchim)工作液浓度 1∶1 000,单克隆抗体 MH24(抗 DEB-1/vinculin, Francis and Waterston, 1985)工作液浓度为 1∶100;二抗为羊抗鼠(FluoroProbes 586, red, Interchim),羊抗兔(FluoroProbes 488, green, Interchim, Montluçon, France),工作液浓度均为 1∶200.所得结果在 Zeiss ZI Imager 下油镜(100×)观察.

2 结 果

2.1 引物设计

根据 Worm Base 数据库中秀丽小杆线虫 *pkc-2* 基因 cDNA 序列,直接设计引物如下(*Nhe*I 位点以下划线表示):

PKC-2-KG1 5′-AATT GCTAGCTCGTTGAGCACGAACAGCTCC-3′

PKC-2-KG2 5′-AATT GCTAGCAGCCTACGACCAAAGCAAAAG-3′

PKC-2-KG3 5′-TTAA GCTAGCACTCGTCGCCCTTCAGATTTTCC-3′

PKC-2-KG4 5′-TTAAGCTAGCGGACCTCGTGAGTAAACTCT-3′

PKC-2-KG5 5′-GCACTCTTGAACATATTCTGGG-3′

PKC-2-KG6 5′-TACATCTTTGACATAAAACGGG-3′

2.2 *pkc-2* 基因 cDNA 克隆及表达产物 PKC-2 蛋白结构分析

从逆转录 cDNA 扩增的片断经纯化,连接,转化后,所得重组质粒命名为 pPD 118.20-pKG 63.经酶切鉴定及测序,确认所得克隆为全长约 2 300 bp 大小的 *pkc-2-c* cDNA 序列(见图 1).利用在线生物信息软件 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de) 分析比对了 Worm Base 数据库 *pkc-2-c* 和所克隆的产物,结果显示数据库 *pkc-2-c* 翻译产物为 936 个氨基酸,RT-PCR 片断翻译产物为 683 个氨基酸;然而两者蛋白质结构区域一致(见图 2).

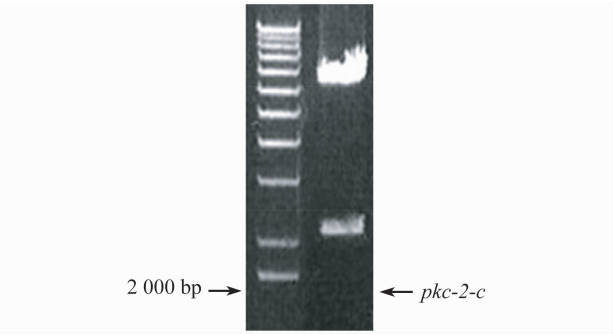

图 1 重组表达质粒 pPD 118.20-pKG 63 *Nhe*I 酶切电泳图

Fig.1 Gel eletrophoresis digest the plasmid pPD 118.20-pKG 63 with *Nhe*I

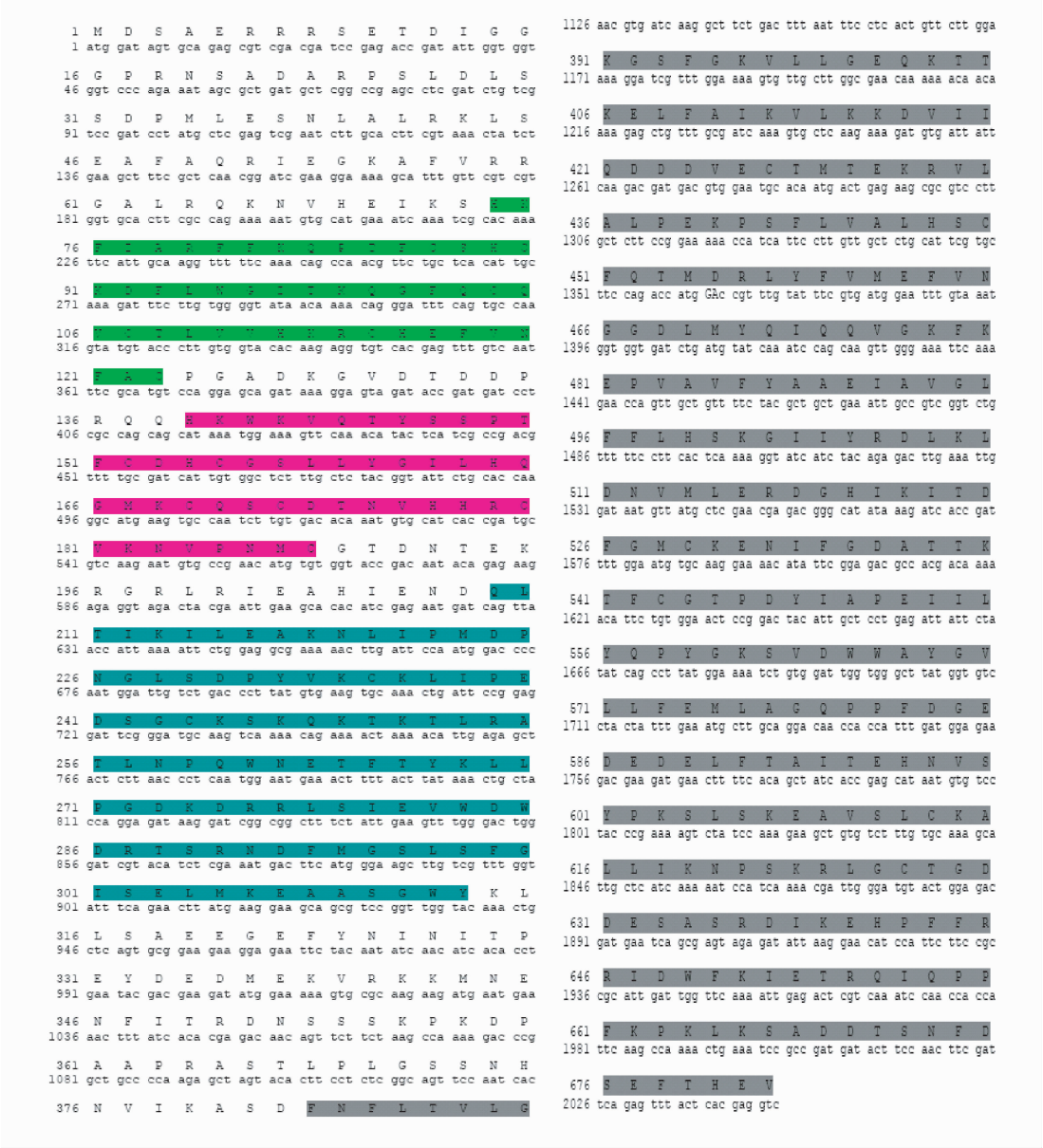

图 2　*pkc-2-c* 基因 cDNA 克隆及其表达产物示意图

Fig. 2　*pkc-2-c* cDNA clone and protein sequence analysis with predicted domain architecture

注：如图，克隆产物经测序，得到长约 2 300 bp 的编码序列，其表达产物为 683 个氨基酸，构成了蛋白激酶 C 的不同结构域；绿色和红色标记序列分别为 2 个 C1 区域，蓝色标记序列为 C2 区域，灰色标记序列为催化反应区域

2.3　转基因秀丽小杆线虫的建立和 *pkc-2*::*gfp* 的亚细胞定位

定期观察每个经显微注射后的 F0 线虫的后代，经筛选，得到 3 条稳定表达红色荧光蛋白 DsRed 的转基因线虫系. DsRed 标记秀丽小杆线虫咽腔部位（见图 4A，B）. 经显微观察，所得转基因线虫系表达情况一致. 图 4 列出了具代表性的 *pkc-2*::*gfp* 表达情况.

线虫体壁共四列肌细胞带，每列 20 个肌细胞. 图 C，D，E 均为同一观察部位图片，由图清晰可见荧光蛋白标记的肌细胞轮廓. 免疫细胞化学实验观察发现，*pkc-2-c* 在秀丽小杆线虫体壁肌细胞中表达，呈点状

线性有序排列(见图 4 D). 为研究该基因表达产物在肌细胞中的精确定位,本研究利用抗 DEB-1/vinculin 抗体显示了 dense body 所在位置(见图 4 C),DEB-1/vinculin 抗体识别秀丽小杆线虫 dense body 结构的主要蛋白 DEB-1/vinculin 蛋白. 比较研究发现,PKC-2 蛋白表达在 dense body 结构处,邻近 DEB-1/vinculin(见图 4E).

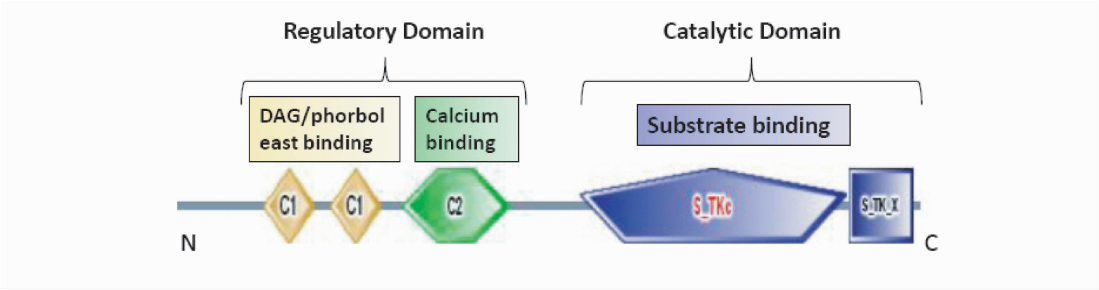

图 3 SMART 推导 RT-PCR 产物 *pkc-2-c* 翻译产物的蛋白结构示意图

Fig. 3 SMART analysis of predict *pkc-2-c* translation product structure

注:从 N 末端开始到 C 末端,黄色区域为 2 个重复 C1 区,与 DAG/phorboleast 发生相互作用;绿色区域为 C2,是 Ca^{2+} 作用区域;它们构成 PKC-2 调节区域;蓝色区域构成蛋白的催化区域,是不同底物的结合区;该蛋白结构与数据库中 *pkc-2-c* 蛋白结构相同

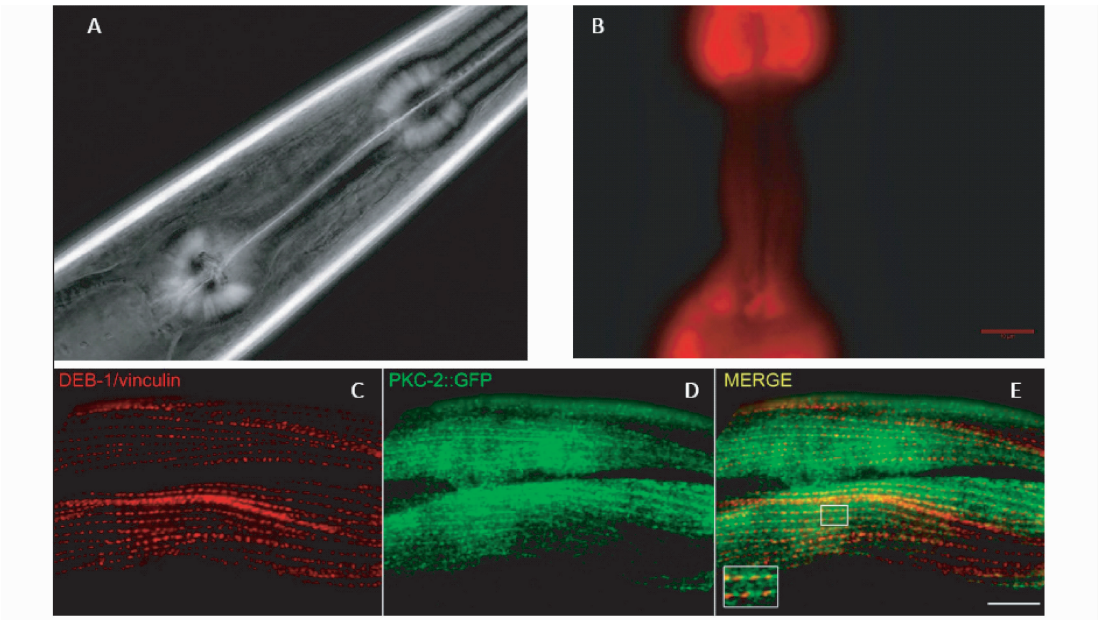

图 4 *pkc-2*::*gfp* 在体壁肌细胞的亚细胞定位(标尺 = 10 μm)

Fig. 4 Sub-cellular localization of *pkc-2*::*gfp*

注:A C. *elegan* 咽腔结构;B 红色荧光蛋白 DsRed 在咽腔表达;C DEB-1/vinculin;D *pkc-2*::*GFP*;E DEB-1/vinculin 和 *pkc-2*::*gfp* 的相对位置关系

3 讨 论

Worm Base 数据库中的四种 *pkc-2* 基因 cDNA 亚型具有共同的保守区域,行使相同的功能(见图 5). PKC 家族因其各种亚型的结构特异性,组织特异性及底物激活机制的不同而和细胞的不同生理机制密切相关.

Alma Islas-Trejo 等研究人员发现了 *pkc-2* 基因及其 cDNA 亚型，在设计了一系列基因组克隆并以 lacZ 标记后，研究发现 lacZ 在线虫体壁肌细胞以及神经系统中均有表达[19]. PKC-2 蛋白在调节秀丽小杆线虫体壁肌细胞渐进性凋亡过程中具有重要作用，为了研究模式动物中肌细胞渐进性凋亡的机制，本研究关注 PKC-2 蛋白在肌细胞中的功能，而研究的首要问题即该蛋白在肌细胞中的精确定位. 本实验克隆了 *pkc-2* 基因 cDNA 亚型 *pkc-2*-c，并建立了转基因线虫系，发现该基因亚型在肌细胞 dense body 中表达. 图 4E 中，考虑到所观察区域不在同一平面，因此 PKC-2::GFP 与 DEB-1/vinculin 并非全部整合；此外，和抗 DEB/vinculin 抗体相比，兔抗 GFP 的背景噪音比较明显（见图 4D，E），因此在两列 dense body 中间的绿色荧光蛋白，作者认为是由背景噪音所导致. 确认了 PKC-2 蛋白在肌细胞中的大致定位以后，这为后续的深入研究建立了一个平台，例如，可以用 Anti PAT-3/β-integrin 作免疫染色，以确定 *pkc-2* 在 M-line 是否有表达；用酵母双杂交来寻找 PKC-2 蛋白在肌细胞中的相互作用蛋白，以及蛋白质组学分析蛋白质功能，等等.

虽然目前人们对于基于 PKC 机制的下游信号传导过程尚不清楚，但是已有研究初步揭示其中某些信号传导过程，如 MEK-ERK 信号传导[20,21]，PI3K-Akt 信号传导[22]，两者都在细胞凋亡过程中具有关键调控功能. 蛋白激酶通过对其底物的磷酸化及去磷酸化进行一系列信号传导反应，这可能会导致肌细胞的非正常性死亡. 而目前对于 PKC 在心肌细胞，平滑肌细胞中的功能研究较多，多集中于细胞凋亡领域. 对 PKC 在骨骼肌细胞中的研究则几乎是空白. 本实验基本确定了 PKC-2 蛋白在秀丽小杆线虫中的表达位置，在一定程度上有助于蛋白质功能的了解，以提出蛋白质功能的假设.

总之，本研究为利用基因工程技术表达 *pkc-2* 基因以及其在细胞信号传导过程中的功能研究打下了基础. 而探索 PKC 蛋白在秀丽小杆线虫肌细胞渐进性萎缩过程中的功能，也为 PKC 在有关细胞信号传导研究领域提供了新的方向.

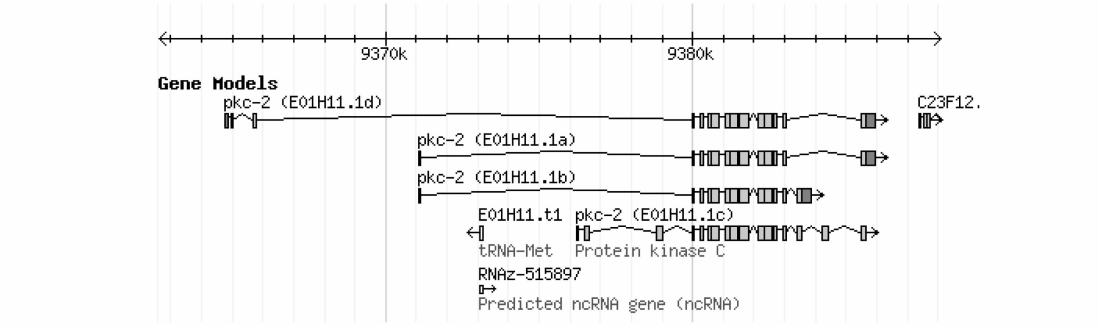

图 5　*pkc-2* 基因模型（http://www.wormbase.org）

Fig. 5　*pkc-2* gene model in Worm Base (http://www.wormbase.org)

[参　考　文　献]

[1] NEWTON A C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm[J]. Biochem J, 2003, 370(Pt 2): 361-371.

[2] DEMPSEY E C, NEWTON A C, MOCHLY-ROSEN D, et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(3): L429-438.

[3] TABUSE Y, IZUMI Y, PIANO F, et al. Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*[J]. Development, 1998, 125(18): 3607-3614.

[4] SIEBURTH D, MADISON J M, KAPLAN J M. PKC-1 regulates secretion of neuropeptides[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(1): 49-57.

[5] WAGGONER L E, DICKINSON K A, POOLE D S, et al. Long-term nicotine adaptation in *Caenorhabditis ele-*

gans involves PKC-dependent changes in nicotinic receptor abundance[J]. J Neurosci 2000, 20(23): 8802-8811.

[6] JIDEAMA N M, NOLAND T A, JR RAYNOR R L, et al. Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties[J]. J Biol Chem, 1996, 271(38): 23277-23283.

[7] MALHOTRA A, REICH D, REICH D, et al. Experimental diabetes is associated with functional activation of protein kinase C epsilon and phosphorylation of troponin I in the heart, which are prevented by angiotensin II receptor blockade[J]. Circ Res, 1997,81(6): 1027-1033.

[8] TAKEISHI Y, CHU G., KIRKPATRICK D M, et al. In vivo phosphorylation of cardiac troponin I by protein kinase Cbeta2 decreases cardiomyocyte calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts[J]. J Clin Invest, 1998, 102(1): 72-78.

[9] PURI T S, GERHARDSTEIN B L, ZHAO X L, et al. Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels[J]. Biochemistry, 1998, 36(31): 9605-9615.

[10] KAMP T J, J W HELL. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C [J]. Circ Res, 2000, 87(12): 1095-1102.

[11] HILGENBERG L, K MILES. Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction[J]. J Cell Sci, 1995,108 (Pt 1): 51-61.

[12] RYER E J, SAKAKIBARA K, WANG C, et al. Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent mechanisms [J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35310-35317.

[13] WATERSON R H. Muscle[M]// The Nematode *Caenorhabditis elegans*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988: 281-335.

[14] MOERMAN D G, WILLIAMS B D. Sarcomere assembly in C. *elegans* muscle[G/OL]// The *C elegans* Research Community. Wormbook. [2006-01-16]. http://www. wormbook. org/chapters/www-SarcomereAssembCelegansmusc/SarcomereAssembCelegansmusc. html.

[15] GRISONI K, MARTIN E, GIESELER K, et al. Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*[J]. Gene, 2002, 294(1-2): 77-86.

[16] SEGALAT L. Dystrophin and functionally related proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. Neuromuscular Disorder, 2002(12): 105-108.

[17] MELLO C, FIRE A. DNA transformation[J]. Methods Cell Biol, 1995, 48: 451-82.

[18] BENIAN G M, TINLEY T L, TANG X, et al. The Caenorhabditis elegans gene unc-89, requited for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains[J]. J Cell Biol, 1996, 132:835-848.

[19] ISLAS-TREJO A, LAND M, TCHEREPANOVA I, et al. Structure and expression of the *Caenorhabditis elegans* protein kinase C2 gene. Origins and regulated expression of a family of Ca^{2+}-activated protein kinase C isoforms [J]. J Biol Chem, 1997, 272(10): 6629-6640.

[20] CAI H, SMOLA U, WIXLER V, et al. Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(2): 732-741.

[21] MARSHALL C J. Cell signalling. Raf gets it together[J]. Nature, 1996, 383(6596): 127-128.

[22] BALENDRAN A, BIONDI R M, CHEUNG P C, et al. A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase Czeta (PKCzeta) and PKC-related kinase 2 by PDK1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20806-20813.