

## 人 *TIMMDC1* 基因在杆状病毒系统中的表达

乌慧玲<sup>1,2</sup>, 高广<sup>2</sup>, 许化溪<sup>3</sup>, 王文兵<sup>3\*</sup>

(1. 江苏大学食品科学与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013;

3. 江苏大学医学院, 镇江 212013)

**摘要:** 旨在杆状病毒系统中表达 *TIMMDC1/c3orf1* (Translocase of inner mitochondrial membrane domain containing 1) 基因, 为其应用和功能研究奠定基础。将 *TIMMDC1* 基因克隆至重组杆状病毒表达系统的载体中, 构建重组穿梭质粒, 转染 Bm-N 细胞, Western blotting 验证蛋白的表达。结果表明, 重组克隆质粒 pFastBac1-GFP-*TIMMDC1* 的两酶切结果证实重组克隆质粒构建正确。PCR 结果显示重组穿梭质粒 Bacmid pFastBac1+ *TIMMDC1*+GFP 可扩增出目的条带。Bm-N-rBac*TIMMDC1* 的表达产物经 Western blotting 分析, 分别可见相对分子质量 57 kD 的特异蛋白条带, 表明融合蛋白 *TIMMDC1*+GFP 在家蚕 Bm 细胞中成功的进行了表达。本研究成功在杆状病毒表达系统中表达了 *TIMMDC1* 基因, 为其临床应用和功能研究奠定了基础。

**关键词:** *TIMMDC1*; 杆状病毒; 基因表达; 复合物 I

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)01-0139-04

### Expression of the human *TIMMDC1* gene in the baculovirus system

WU Huiling<sup>1,2</sup>, GAO Guang<sup>2</sup>, XU Huaxi<sup>3</sup>, WANG Wenbing<sup>3</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;

2. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;

3. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

**Abstract:** To express the human *TIMMDC1/c3orf1* (Translocase of inner mitochondrial membrane domain containing 1) gene in the baculovirus system, the *TIMMDC1* gene was cloned into a vector in the baculovirus system. The constructed recombinant shuttle plasmids were transfected to Bm-N cells. The expressed protein was identified using Western blot analysis. Results showed that the recombinant cloning plasmid pFastBac1-GFP-*TIMMDC1* was constructed correctly. Target gene bands were amplified from the recombinant shuttle plasmids for *TIMMDC1* using PCR. The protein *TIMMDC1* was identified using SDS-PAGE and Western blot analyses. In conclusion, the *TIMMDC1* gene was successfully expressed in the baculovirus system, which would lay a foundation for the study of the gene function.

**Key words:** *TIMMDC1*; baculovirus; gene expression; complex I

早在 2000 年<sup>[1]</sup>人类 *TIMMDC1/c3orf1* 基因就已经鉴定出来。本实验室闻燕等<sup>[2]</sup>又在用荧光差异显示方法筛选特异表达基因的时候发现该基因在高转移肺癌细胞系 95d 中高表达。人类 *TIMMDC1/c3orf1* 基因后来被证实是一个比较保守的线粒体内膜上电子传递链复合物 I 的一个组分<sup>[3]</sup>。闻燕等对 *TIMMDC1/c3orf1* 基因进行了表达分析<sup>[4]</sup>, 但是从结

果中可以看出, 原核表达的蛋白量不高且不受诱导时间和诱导浓度的影响。

昆虫表达系统是一种利用杆状病毒感染昆虫细胞稳定表达外源蛋白的表达系统, 该系统能更加有效地对蛋白产物进行翻译后的修饰, 已非常广泛应用于真核生物蛋白的表达<sup>[5-6]</sup>。本实验将 *TIMMDC1/c3orf1* 基因克隆入 pFastBac1 转座载体,

收稿日期: 2014-06-24

基金项目: 江苏大学人才启动基金 (05JDG053) 和江苏大学博士生创新基金 (CX08B-17X) 共同资助。

作者简介: 乌慧玲, 助理研究员。E-mail: huiling@ujs.edu.cn

\* 通信作者: 王文兵, 研究员。E-mail: wenbingwang@ujs.edu.cn

转染家蚕 Bm 细胞, 以期利用昆虫表达系统高效表达 *TIMMDC1/c3orf1*, 为 *TIMMDC1/c3orf1* 的应用和功能研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、菌株及细胞

Bac-to-Bac 表达系统、大肠杆菌 *DH5 $\alpha$* 、感受态细胞 DH10Bac 及 Bm-N 细胞为本实验室保存, Lipofectamine2000 脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司 (USA), 各种常规酶、DNA marker、低分子量蛋白 marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 设计引物及重组杆状病毒转座载体的构建

*TIMMDC1* 的引物

P1: 5'-TATGGATCCGCCGAAGCTGTGACTGC-3'

P2: 5'-GCCGAATTCACCTTCAGTCCTTGTCTTG-3'  
pUC/M13 引物

P1: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3',

P2: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

通过 *EcoR* I / *Kpn* I / *Hind* III 的酶切位点构建融合转移载体 pFastBac1+GFP+ *TIMMDC1*, 对经 PCR 鉴定为阳性的质粒进一步送公司测序, 将测序结果正确的重组质粒命名为 pFastBac1-GFP-*TIMMDC1*。

### 1.3 Bacmid 穿梭载体 rBac-pFastBac1-GFP-*TIMMDC1* 的构建

按照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统 protocol 进行操作, 将阳性质粒 pFastBac1-GFP-*TIMMDC1* 转化感受态细胞 DH10Bac, 经蓝白斑筛选, 挑取其中的白色菌落培养, 提取 Bacmid 重组杆粒, 利用 pUC/M13 进行 PCR 鉴定, 获得含 *TIMMDC1* 基因的重组质粒 rBac- pFastBac1-GFP-*TIMMDC1*, 同时做阴性对照。

### 1.4 转染家蚕细胞以及病毒包装

Bm-N 细胞, 用含 10% FBS 的 TNM-FH 完全培养液 28 $^{\circ}$ C (无 CO<sub>2</sub>) 培养箱中培养, 培养至细胞成单层后传代。用 Lipofectamine2000 试剂 (Invitrogen 公司) 将重组穿梭质粒 rBac- pFastBac1-GFP-*TIMMDC1* 转染 Bm-N 细胞, 28 $^{\circ}$ C 孵育 6 h; 细胞换液为完全培养基 (含 10% FBS), 然后 28 $^{\circ}$ C 培养过夜, 继续培养大概 5 d, 收集细胞培养上清, 500 $\times$ g 离心 10 min, -70 $^{\circ}$ C 保存。同时取一部分病毒液继续感染家蚕细胞 Bm-N。

### 1.5 杆状病毒 rBac *TIMMDC1* 的 PCR 验证

提取杆状病毒的总 DNA 作为模板, 以

pUC/M13 的扩增引物, *TIMMDC1* 基因的特异引物 P1、P2 分别为进行 PCR, 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果。

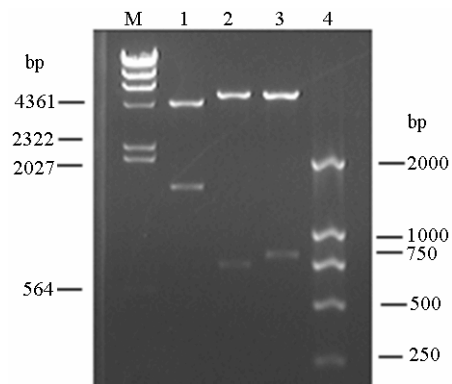
### 1.6 Western blotting

重组病毒的融合蛋白产物 10% SDS-PAGE 蛋白电泳后, 用全湿电转法将 PAGE 胶上的蛋白转移到尼龙膜 (NC) 上, 封闭 (PBS 配制的 5% 封闭液) 2 h, 一抗为小鼠抗兔子的 GFP 单抗 (1:3000 5% 封闭液稀释使用), 二抗为 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:5000 稀释使用), 洗膜之后加入化学发光剂处理。发光约 10 min 后, 在暗房中压片, 压片 10 min 后, 进行片子的显影和定影。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组载体的酶切鉴定

将 pFastBac1+*TIMMDC1*+GFP 连接产物转化到感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 经筛选, 抽取质粒限制性内切酶切验证。结果经琼脂糖电泳分析如图 1 所示, 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切得到约 1600 bp 的外源片段 (*TIMMDC1*+GFP), 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切得到约 700 bp 的外源片段 (*GFP*), 用 *Hind* III 和 *Kpn* I 酶切得到一个约 800 bp 的外源片段 (*TIMMDC1*), 由以上酶切结果可以说明获得了 pFastBac1+*TIMMDC1*+GFP 重组阳性质粒。



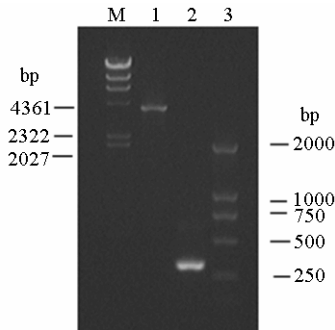
M: DNA Marker/ $\lambda$ -*Hind* III digest 1: pFastBac1+*TIMMDC1*+GFP 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切验证 2: pFastBac1+*TIMMDC1*+GFP 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切验证 3: pFastBac1+*TIMMDC1*+GFP 用 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切验证 4: DL-2000 Marker

图 1 pFastBac1+*TIMMDC1*+GFP 重组质粒的酶切验证  
Figure 1 Digestion identification of pFastBac1+*TIMMDC1*+GFP by restriction endonuclease

### 2.2 重组穿梭载体的 PCR 鉴定

以重组 Bacmid pFastBac1+*TIMMDC1*+GFP DNA 为模板, 用 pUC/M13 引物进行 PCR 扩增。

PCR 产物电泳分析结果显示, 以 pUC/M 13 为引物的阳性 Bacmid pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* 的扩增产物有 4000 多 bp 左右的片段, 转化后挑取的蓝色菌落 Bacmid 的扩增产物为 300 bp 的片段, 各 PCR 片段与预期值相符, 提示 *TIMMDC1* 基因在 DH10Bac 受体菌中正确转座 (如图 2)。



M: DNA Marker/ $\lambda$ -*Hind* III digest 1, 重组的 Bm/Bacmid pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* PCR 产物; 2, 阴性 Bacmid 的 PCR 产物; 3, DL-2000 Marker

图 2 Bacmid pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* 的 PCR 扩增产物的凝胶电泳

Figure 2 Gel electrophoresis identification of PCR product of recombinant Bacmid-pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP*

### 2.3 重组穿梭杆粒 Bacmid 转染家蚕细胞

重组 Bacmid pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* 的 DNA 转染家蚕细胞 Bm-N 后, 在家蚕细胞中经 DNA 的复制、蛋白产物表达、病毒的装配等过程, 产生重组杆状病毒, 由于融合了 *GFP* 基因, 所以在荧光显微镜下可清晰的看见转染的细胞发出绿色荧光 (如图 3)。同时将重组病毒命名为 rBac*TIMMDC1*。

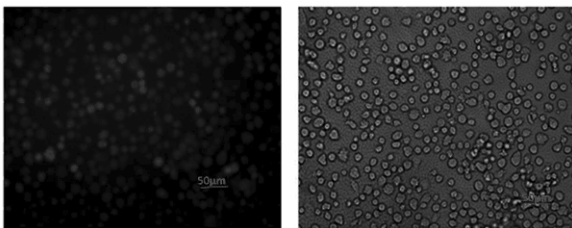
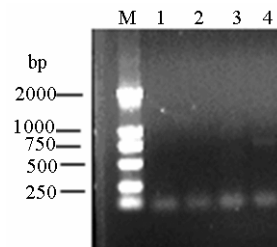


图 3 重组病毒 Bm/ pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* 镜检荧光  
Figure 3 The recombinant Bacmid- pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* under fluorescence microscope

### 2.4 杆状病毒 rBac *TIMMDC1* 的 PCR 验证

用 rBac-*TIMMDC1* 转染第 1 代 Bm 病毒细胞病变出现不明显, 第 2 代接种后 3 d 就可看到明显的细胞病变: 细胞变大、变圆。提取重组病毒 rBac-

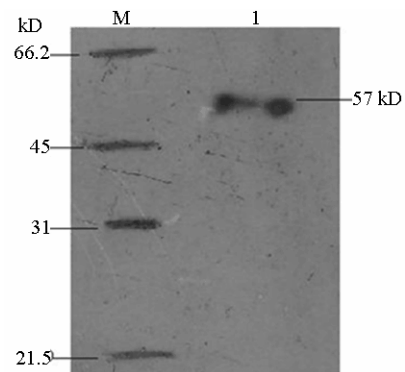
*TIMMDC1* 基因组 DNA, 采用 PCR 方法用引物 *TIMMDC1*P1 和 *TIMMDC1*P2 扩增 *TIMMDC1* 基因, 在 800 bp 左右可见明显条带 (见图 4)。这表明 *TIMMDC1* 基因被成功转染至家蚕细胞 Bm-N 中, 也说明 *TIMMDC1* 基因在 DH10Bac 受体菌中正确转座。



M: DL-2000 Marker, 1, 2, 3: 阴性对照; 4. 重组病毒 Bm/ pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* 的 PCR 产物

图 4 重组病毒 *TIMMDC1* 的 PCR 鉴定

Figure 4 PCR identification of recombinant Bacmid pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP*



M: 蛋白分子量标准; 1. 重组病毒 Bm/ pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* 的蛋白提取物

图 5 Western blotting 验证 *TIMMDC1*+*GFP* 蛋白的表达  
Figure 5 Identification of the expression of *TIMMDC1*+*GFP* protein by Western blotting

### 2.5 Western blotting 分析

用 Western blotting 检测融合蛋白表达产物, 结果在约 57 kD 处有明显的条带 (图 5), 符合 *TIMMDC1*+*GFP* 蛋白的预测分子量, 表明融合蛋白 *TIMMDC1*+*GFP* 在家蚕 Bm 细胞中成功的进行了表达。

## 3 小结与讨论

人类 *TIMMDC1* 基因是一个 4 次跨膜的 Tim17/TIM22/TIM23 家族的一个成员, 是进化上比较保守的线粒体内膜上电子传递呼吸链复合物 I(CI)

的一个组分<sup>[3]</sup>。作为 ATP 产生的其中一个中间体, 现已证实 CI 的活性和一些神经退行性疾病包括帕金森病有关<sup>[7]</sup>。因此, 对 *TIMMDC1* 基因的研究非常必要。

本试验构建了重组 Bacmid pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP*, 经 Western blotting 验证, 重组 Bacmid pFastBac1+*TIMMDC1*+*GFP* 在家蚕 Bm 细胞中成功的进行了表达。这为抗体的制备、验证该基因参与细胞的行为等功能研究奠定了基础, 提供了蛋白来源, 并为该基因的应用奠定了物质基础。

### 参考文献:

- [1] Escarceller M, Pluvinet R, Sumoy L, et al. Identification and expression analysis of *C3orf1*, a novel human gene homologous to the *Drosophila* RP140-upstream gene[J]. *DNA Seq*, 2000( 11): 335-338.
- [2] 闻燕, 王文兵, 许文荣, 等. 高转移肺癌细胞株 95D 中特异表达的 *C3orf1* 基因分析[J]. *临床检验杂志*, 2007, 25(2): 117-119.
- [3] Guarani V, Paulo J, Zhai B, et al. TIMMDC1/C3orf1 functions as a membrane-embedded mitochondrial complex I assembly factor through association with the MCIA complex[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(3): 847-861.
- [4] 闻燕, 王文兵, 江明珠. 高转移肺癌细胞株 95D 中高表达基因 *C3orf1* 的克隆与表达[J]. *江苏科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 23(4): 361-363.
- [5] Park D Y, Lee J H, So Y K, et al. Optimization of expression conditions for production of anti-colorectal cancer monoclonal antibody CO17-1A in baculovirus-insect cell system[J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2011, 30(5): 419-426.
- [6] 付金奇, 郭建强, 姚立红, 等. 甲型流感病毒血凝素基因在昆虫杆状病毒系统中的表达[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(9): 1007-1012.
- [7] Moreno-Lastres D, Fontanesi F, García-Consuegra I, et al. Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly[J]. *Cell Metabolism*, 2012, 15: 324-335.