



斑马鱼 *notch3* 基因真核表达载体的构建及表达分析

王子睿, 吴坤坤, 邱军强, 任建峰, 李伟明, 张庆华*
 上海海洋大学 水产与生命学院
 * 通讯作者, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

为了进一步研究 *notch3* 基因在斑马鱼中的功能, 构建了斑马鱼 *notch3* 真核表达载体并在真核细胞中成功表达。其中斑马鱼 *notch3* 基因编码序列 (Coding sequence, CDS) 从 NCBI 的在线数据库中获得, 根据序列克隆其胞内段 (Notch intracellular domain, NICD), 接着利用同源重组技术构建 pCMV-N3ICD 表达载体。再通过双酶切和测序筛选阳性重组载体, 借由脂质体法转染至 HEK293T 细胞中, 最后经细胞免疫荧光技术和蛋白质印迹法验证 N3ICD 的表达。结果显示, 重组质粒经酶切电泳片段及测序比对均与预期结果一致。在蛋白质印迹实验中 N3ICD 蛋白可正常表达, 且大小与预测结果一致。细胞免疫荧光显示重组质粒可以在 HEK293T 细胞的细胞核中表达。同时, 构建的 N3ICD 真核表达载体能够明显增强 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 家族中 *rela* 和 *nfkb1* 启动子的活性。成功构建了 pCMV-N3ICD 真核表达载体, 将为后续研究 Notch3 分子在个体发育、天然免疫机制等方面提供有力的研究工具。

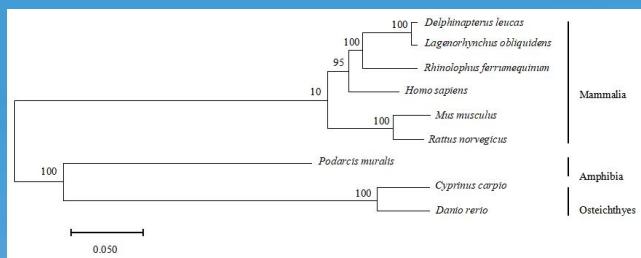


图1 NJ法构建Notch3进化树, 哺乳动物Notch3聚为一大支, 斑马鱼的Notch3又与硬骨鱼类聚为一支, 而哺乳动物各自聚为一个分支

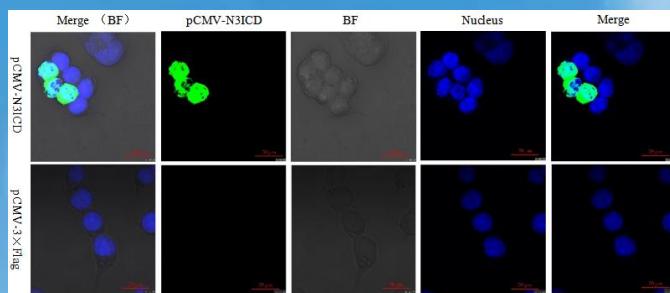


图4 用DAPI试剂标记细胞核 (蓝色荧光), FLAG抗体标记pCMV-N3ICD (绿色荧光), 观察到pCMV-N3ICD聚集在HEK293T细胞核

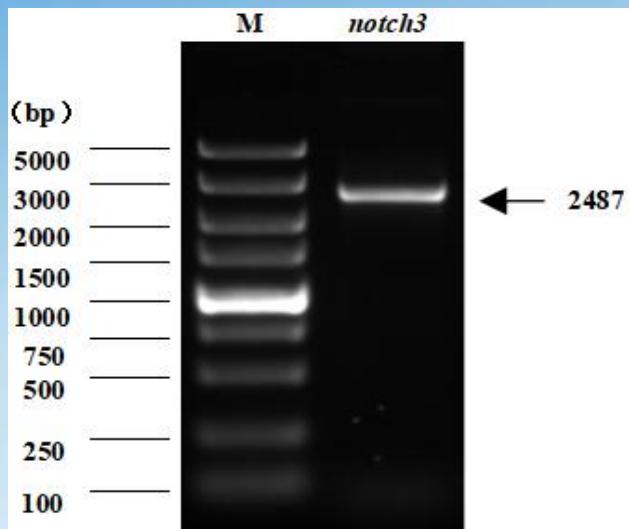


图2 利用高保真酶对斑马鱼 *notch3* 基因胞内段进行 PCR 扩增, 其 CDS 序列大小为 2487bp

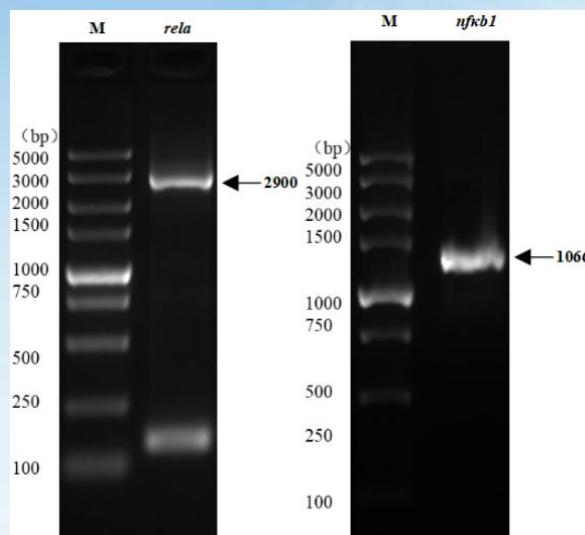


图5 NF- κ B家族基因 *rela* 和 *nfkb1* 启动子序列的扩增



图3 Western Blot验证实验组pCMV-N3ICD质粒转染HEK293T细胞后成功表达N3ICD蛋白, 对照组无表达

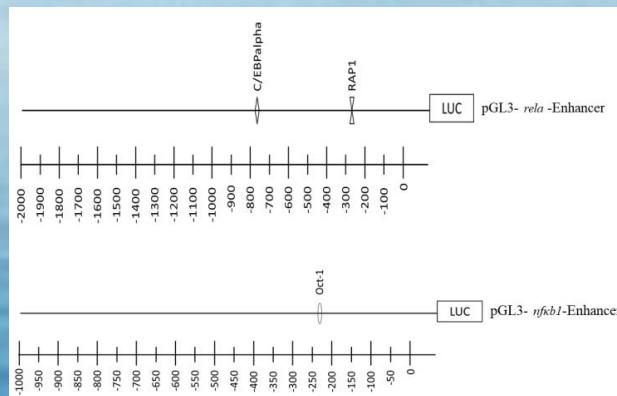


图6 *rela* 启动子区有 RAP1 和 C/EBP α 共 2 个转录因子结合位点, *nfkb1* 启动子区有 Oct-1 共 1 个转录因子结合位点

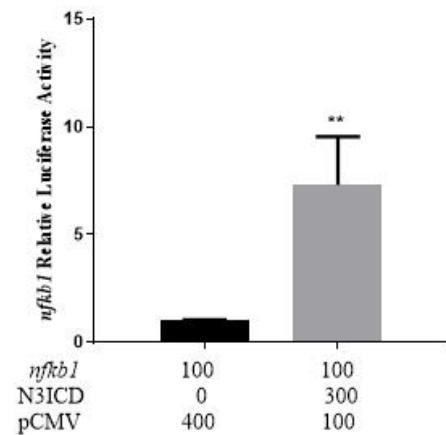
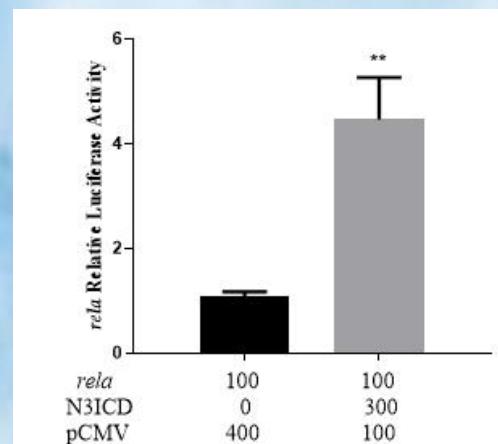


图7 过表达斑马鱼 *notch3* 基因, pGL3-*rela* 启动子活性约为对照组的 4.5 倍, pGL3-*nfkb1* 转录活性约为对照组活性的 7 倍

总结

本研究成功构建了斑马鱼 N3ICD 真核表达载体, 并进行了表达分析, 所构建的 N3ICD 真核表达载体能够对 NF- κ B 家族中 *rela* 和 *nfkb1* 启动子的活性产生影响, 使其活性明显升高。

致谢:

本研究由国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2019YFD0900102)和上海市教委重点项目《基于斑马鱼研究模型的Notch分子参与天然免疫的应答机制》(13ZZ127)资助。