# MOF 基因克隆表达载体构建及拟南芥 转化

完成人 杨昕 本科期间我有幸入选了复旦大学生命科学学院的拔尖人才才计划。在此期 间,我在 AIBS 课上从蔡亮老师, 缑金营老师, 鲁伯埙老师, 任国栋老师, 吴 晓辉老师等有想法, 敢创新的老师身上学到了很多, 让我领略到了什么是真正 的科研, 以及怎么真正做科研。而在杨金水教授课题组学习的过程中, 我也从 一个什么都不懂的菜鸟, 逐渐成长为一个具备基础科研素养的科研新手。

我在本科期间只是做了一些微小的工作,实在不值一提,但我可以很自豪 的说我是付出过的。

困难是客观存在的,但也不是不能克服的,惟愿不忘记自己的初心。

祝复旦生科院的拔尖人才计划越来越好。

### 研究结果

1.1 MOF 基因全长序列的克隆

MOF 基因在 NCBI 数据库中:

1. Oryza sativa Japonica Group cDNA, clone: J075152G12, full insert sequence Sequence ID: dbjlAK288055.1l

2. PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group putative MYST-like histone

acetyltransferase 1 (LOC4343971), transcript variant X1, mRNA

Sequence ID: reflXM\_015789227.11

3. PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group putative MYST-like histone

acetyltransferase 1 (LOC4343971), transcript variant X2, mRNA

Sequence ID: reflXM\_015789228.11

(以上三组结果匹配度均为100%)

1.1.1 MOF 基因前 300 碱基对的获取

所使用的引物信息:

MOF-1

F: ATGGGAAGCATGGAGGCG

R: CTCATCGAGCCTCCTATTGAACT

MOF 基因前 300 碱基对的 GC 含量综合在 70%以上,通过常规 PCR 方 法无法扩增,故通过化学合成的方法获取。同时为了便于后续实验中通 过 overlapping PCR 拼接的方式获取全长序列,在化学合成的过程中进行 了降低 GC 含量但不改变蛋白质序列的密码子优化。



图 1 前 300 碱基对 MOF 基因序列比对,未优化序列在上,优化后序列在下。

图 2 前 300 碱基对对应的 MOF 蛋白序列比对,未优化序列在上,优化后序列在下。

经 GC Calculator 计算(<u>http://www.endmemo.com/bio/gc.php</u>),未优化序 列 GC 含量为 72.57%,优化后序列 GC 含量为 61.65%

(以上比对结果来自 Vector NTI 11.0 软件)

1.1.2 MOF 基因后 1200 碱基对的扩增

提取水稻明恢 63 系列的植物总 RNA, 逆转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为 模板进行 PCR 扩增获得 MOF 基因后 1200 碱基对。

所使用的引物信息:

MOF-2

F: CGTCCACTACACCGAGTTCA

R: TGAGGGAGAAAGAGAGGGGG

MOF 基因后 1200 碱基对 GC 含量稍低于前 300 碱基对,经过尝试,成 功以明恢 63 系列水稻的 cDNA 中通过 PCR 的方法获得了后 1200 碱基对 的序列,且经过测序验证正确无误。

1.1.3 MOF 全长序列的拼接

以 MOF 基因前 300 碱基对序列和 MOF 基因后 1200 碱基对序列同时作 为模板(以上两段序列有 37 个碱基对的重复序列),并设计 MOF 序列 全长引物,以 over-lapping PCR 的方式成功扩增到 MOF 基因的全长序 列。

获取全长序列的引物信息:

MOF-3

F: ATGGGAAGCATGGAGGC

R: TTAGCCTTGTTCCTTGTAGGG

37 个碱基对的重复序列



MOF全基因序列

图 3 MOF 基因全长序列示意图



2000bp 1000bp 750bp 500bp 250bp

100bp

图 4 MOF 全长序列电泳图。左: MOF 全长序列。右: DL2000 DNA Ladder 1.2 MOF 基因重组质粒的构建

将 MOF 全长序列两段加 A 尾后连接至 pMD19-T 克隆载体上。

1.3 MOF 基因植物表达载体的构建

添加酶切位点的引物信息:

F端引物前添加 Band I 酶切位点 R端引物前添加 EcoR I 酶切位点。(GC 为保护碱基)

MOF-4

F: GC GGATCC ATGGGAAGCATGGAGGC

R: GC GAATTC TTAGCCTTGTTCCTTGTAGGG



图 5 pCAMBIA 1306 载体及其多克隆位点示意图。

(所使用的 pCAMBIA 1306 载体为该系列载体改造后获得的,按照该系列载体的命名 规则,1 代表转基因植物的潮霉素抗性,3 代表转基因细菌的卡那霉素抗性,0 代表 pUC18 polylinker,6 代表 Flag fusion 报告基因。)

#### 1.4 MOF 基因转化农杆菌 GV3101

将含有 MOF 基因全长序列的植物表达载体转化至农杆菌 GV3101.



图 6 转化表达载体的农杆菌 GV3101 经过平板筛选可获得单克隆

1.5 浸染法转化拟南芥花序

用转化了含有 MOF 序列的 pCAMBIA 1306 载体的农杆菌 GV3101 以浸染法转化拟南芥花序。

1.6 转化后的拟南芥进行平板筛选

对 T<sub>0</sub>代进行筛选后再连续进行 T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>两代筛选。



图 7 MOF 转基因拟南芥的 T<sub>2</sub>代平板筛选(平板添加潮霉素)。左图: 杂合子植株。右图: 纯合子植株。选取纯合子植株进行下一步实验。

1.7 提取平板筛选后的拟南芥基因组 DNA 进行 PCR 验证转基因阳性 所使用的引物信息:

HYG-2

F: CCGTCAACCAAGCTCTGATA

R: GCCGATGGTTTCTACAAAGA

使用以上引物所扩增的片段大小为683个碱基对

该序列片段为1306载体中潮霉素抗性序列的一部分。



图 8 PCR 产物检测提取的纯合子 MOF 转基因阳性拟南芥植株基因组 DNA 的电泳结果。从 左到右:标准 DNA Ladder 5000, MOF-21, MOF-23, MOF-24, MOF-31, WDR5-23, WDR5-24, MOF-11, MOF-12, MOF-13, MOF-14, MOF-22, MOF-25, 和空白对 照。空白对照为在 PCR 过程中以 ddH<sub>2</sub>O 作为模板所获得的结果。

1.8 提取平板筛选后的拟南芥的 MOF 蛋白进行 Western Blot 以验证蛋白表达



图 9 纯合子 MOF 转基因阳性拟南芥植株的 MOF 蛋白 Western Blot 结果。从左到右: MOF-21, MOF-23, MOF-24。(该实验于苏伟教授实验室完成。)确定 MOF-23, MOF-24 为阳 性植株,可用于后续试验。

#### 讨论

2.1 乙酰化及乙酰转移酶在表观遗传学中的重要地位

表观遗传学作为当下生命科学中最前沿的研究领域,备受瞩目与重视。乙酰化 及乙酰转移酶在其中的重要地位更是毋庸置疑。在可预见的未来,MOF等乙酰 转移酶在表观遗传学中的研究会映射到更多的诸如肿瘤发生的具有广阔前景的 领域。故这方面研究的重要性不言而喻。

2.2 MOF 基因的总体研究情况回顾

2.2.1 动物中的 MOF 基因

MOF 基因在动物如果蝇,小鼠,人细胞系,都有较深入的研究。而对 MOF 的功能的初步的认识,如肿瘤发生,DNA 损伤修复,细胞凋亡等方面的研究也进一步印证了对 MOF 的研究的重要性<sup>[11,12,13,14,20,21,22]</sup>。

2.2.2 植物中的 MOF 基因

在植物中,MOF以及MYST家族其他乙酰转移酶的研究无论是水稻还是拟南 芥,都仍处于起步研究阶段。但从已有研究来看,MOF基因不论在动物和植物 之间较为保守,有较强的同源性<sup>[15,16]</sup>。可见,MOF基因在植物中的研究仍有大 片空白,故可以认为在这方面的工作具有开创性和创新性。从已知研究来看, MYST家族乙酰转移酶在植物的配子发育过程中可能起到重要作用,故这方面 研究在也具有一定的农业方面的应用前景<sup>[15]</sup>。

2.3 本实验结果评价

本实验从 MOF 基因的克隆扩增开始,经历植物载体的构建,拟南芥转化,植 株转基因阳性鉴定,最终获得了 MOF 转基因阳性的拟南芥植株,为后续研究 打下了基础。

本实验中使用的是水稻品种明恢 63 系列,属于籼稻,而 NCBI 数据库中的水稻 相关数据以粳稻为主,且大多为日本晴(O. Sativa L. spp. japonica),但由于 MOF 序列在籼稻和粳稻之间具有保守性,而实验结果也证明使用明恢 63 系列 作为实验材料得出的 MOF 序列信息也适用于日本晴,故水稻品种的差别不影 响实验结果的得出。

#### 2.3.1 MOF 基因全长的克隆

本实验中 MOF 基因全长的克隆扩增是两部分分步完成的,其中 GC 含量较高的前 300 碱基对由化学合成而得到,后 1200 碱基对以 cDNA 为模板通过 PCR 反应得到。而之后的 overlapping PCR 则将两端序列连接。

2.3.2 MOF 基因的植物表达载体构建

本实验成功使用改造后的 pCAMBIA1306 载体作为拟南芥表达载体。

2.3.3 植物表达载体转化农杆菌并以浸染法转化拟南芥花序

本实验成功植物表达载体转化农杆菌并用农杆菌转化拟南芥。

2.3.4 检测拟南芥转基因阳性

本实验成功通过 PCR 的方法检测基因组水平上的转基因阳性,以及在合作实验 室以 Western Blot 的方法检测蛋白水平的转基因阳性。

2.4 本实验研究结果的意义

本实验从对 MOF 基因的克隆开始,通过植物表达载体的构建,到转基因阳性 植株的获得,为之后研究 MOF (及其他候选蛋白如 MLE, WDR5)和该 lncRNA 的互作提供了实验基础与实验材料。同时 MOF 转基因阳性拟南芥植株 的获取也使得后续的植物生理学实验成为可能。而 MOF 及其他候选蛋白与我 们所发现的 lncRNA 的互作目前正由杨金水教授实验室王莹博士与我校苏伟教 授合作通过 CHIP, RIP 的手段进行互作验证相关实验,我本人也有参与。而从 MOF 与 lncRNA 互作的角度看,MOF 作为候选蛋白之一与我实验室发现的 lncRNA 的互作的有关研究有可能填补表观遗传学在这部分的空白,甚至真正解 答基因组转录水平远高于编码蛋白基因转录水平的疑问。

2.5 存在的问题及展望

本实验仅获取了 MOF 基因的转基因阳性植株,而并未对其进行激素筛选等植物生理学方面的研究,故后续的表型研究应继续进行。也可以从转录组的层面对 MOF 转基因阳性植株进行研究。植物中 MOF 蛋白是否具有和果蝇,小鼠,人细胞系中类似的调节转录水平的功能也有待进行而植物 MOF 和动物中 MOF 蛋白的异同的研究也可以使下一步的研究方向。

11

MOF 及其他候选蛋白与我们所发现的 lncRNA 的互作研究在现在正在进行。 同时 MOF 在水稻中的相关研究仍需继续进行。目前,在水稻(明恢 63 系列) 中的的 MOF 转基因植株的转化已完成,其种植于海南完成,现已收获第一批 种子。第一批种子将继续种植于海南及江苏太仓等地以进行后续研究。

## 参考文献

- 1. Tyagi A K, Khurana J P, Khurana P, et al. Structural and functional analysis of rice genome. *Journal of Genetics J*, (2004), 83(1):79-99.
- 2. 杨金水.基因组学.(2007).高等教育出版社.
- 3. Goldberg A D, Allis C D, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell J*, (2007), 128(4):635-8.
- 4. Dekker, Frank J., and Hidde J. Haisma. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug discovery today* (2009)14.19: 942-948.
- 5. Kind J, Vaquerizas J M, Gebhardt P, et al. Genome-wide Analysis Reveals MOF as a Key Regulator of Dosage Compensation and Gene Expression in Drosophila. *Cell J*, (2008), 133(5):813-28.
- 6. Conrad T, Cavalli F G, Holz H, et al. The MOF Chromobarrel Domain Controls Genome-wide H4K16 Acetylation and Spreading of the MSL Complex. *Developmental Cell J*, (2012), 22(3):610-24.
- Ercan S, Lieb J D. Chromatin Proteins Do Double Duty. *Cell J*, (2008), 133(5):763-5.
- 8. Chelmicki T, Dündar F, Turley M J, et al. MOF-associated complexes ensure stem cell identity and Xist repression. *Elife Sciences J*, (2014), 3(3):e02024-e02024.
- 9. Gupta A, Guerin-Peyrou T G, Sharma G G, et al. The mammalian ortholog of Drosophila MOF that acetylates histone H4 lysine 16 is essential for embryogenesis and oncogenesis. *Molecular & Cellular Biology J*, (2008), 28(1):397-409.
- 10. Gupta A, Sharma G G, Young C S, et al. Involvement of human MOF in ATM function. *Molecular & Cellular Biology J*, (2005), 25(12):5292-5305.
- 11. Lingling Cao, Jiaming Su, Da Liu, et al. Functional analysis of human histone aeetyltransferase (hMOF) in tumorigenesis. *International Journal of Molecular Medicine J*, (2014), 34.
- Kapoor-Vazirani P, Kagey J D, Vertino P. Role of hMOF-dependent histone H4 lysine 16 acetylation in the maintenance of TMS1/ASC gene activity. *Cancer Research J*, (2008), 68(16):6810-6821.
- 13. Kapoor-Vazirani P, Kagey J D, Powell D R, et al. Role of hMOF. *Cancer Research J*, (2008), 68(16):6810–6821.
- 14. 朱琳. hMOF 的表达以及其对组蛋白 H4K16 乙酰基化酶活性在胃癌发病中的 作用研究. 吉林大学 D, (2015).
- Latrasse D, Benhamed M, Henry Y, et al. The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in Arabidopsis. *Bmc Plant Biology J*, (2008), 8(6):: 121.
- 16. Tim T, Voss A K. The diverse biological roles of MYST histone acetyltransferase family proteins. *Cell Cycle J*, (2007), 6(6):696-704.
- 17. Igor U, Bartel D P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell J*, (2013), 154(1):26-46
- 18. Lim C K, Kelley R L. Autoregulation of the Drosophila Noncoding roX1 RNA Gene. *Plos Genetics J*, (2012), 8(3):e1002564.
- 19. Quinn J J, Ilik I A, Qu K, et al. Revealing long noncoding RNA architecture and

functions using domain-specific chromatin isolation by RNA purification. *Nature Biotechnology J*, (2014), 32(9):933-940.

- 20. Bhadra M P, Horikoshi N, Pushpavallipvalli S N, et al. The role of MOF in the ionizing radiation response is conserved in Drosophila melanogaster. *Chromosoma J*, (2012), 121(121):79-90.
- 21. Pushpavalli S N, Sarkar A, Ramaiah M J, et al. Drosophila, MOF controls Checkpoint protein2 and regulates genomic stability during early embryogenesis. *Bmc Molecular Biology J*, (2013), 14(1):1-15.
- 22. Li, Xiangzhi, et al. The histone acetyltransferase MOF is a key regulator of the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell Stem Cell J*, (2012) 11.2: 163-178.

#### 致谢

本科期间,我有幸加入了复旦大学生命科学学院遗传所杨金水教授课题 组。在我于杨老师实验室学习的三年里,我不仅惊叹于杨老师深厚的学术功 底,老师耐心的指导和敏锐的学术洞察力也都让我敬佩。在学习过程中,我深 深地感受到老师的个人修养与品格。感谢杨老师对我的指导与帮助。同时也感 谢罗小金副教授对我的帮助。以及,感谢王莹博士对我的指导。更需要指出得 出王莹博士对本课题的帮助是无比巨大的,没有她的帮助我是无法完成此课题 的。感谢实验室徐旭鼎硕士,已毕业的孙凡博士、曹昌翔硕士的支持以及对我 实验技能的传授。最后,感谢董贤欣博士,孙大运博士,胡泽军师兄,姜玲师 姐,孙学军师兄等实验室其他成员对我在完成此课题过程中的帮助。

感谢拔尖人才计划里蔡亮老师,缑金营老师对我的帮助。

感谢我的所有家人对我个人选择的支持。

生命的奥秘是无比浩瀚的,而在探索的过程中,我并不知道我真正能取得 怎样的成果,只愿对得起自己的初心。

感谢给过我帮助的所有人。