文章编号:1000-5404(2006)08-0781-04

论著

Foxp3酵母双杂交诱饵表达载体的构建、鉴定和其毒性及自激活效应检测

周丽娜,吴 军,罗高兴,贺伟峰,陈希炜,柏甘萍,石东文,王庆红,袁顺宗,张小容,胡晓红 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 利用酵母双杂交系统,构建人Foxp3酵母双杂交体系中的诱饵载体,并对其进行鉴定。**方法** 获得正常人外周血PBMC,抽提mRNA,通过巢式RT-PCR在人外周血PBMC中获得Foxp3基因片断,纯化后连接至pMD18-T载体,测序正确,*Eco*RⅠ、*Sal*Ⅰ双酶切pMD18-T-Foxp3和酵母表达载体pGBKT7,回收产物并连接,重组质粒命名为pGBKT7-Foxp3,测序正确,用醋酸锂法将重组质粒转化酶母菌AH109,在缺陷性培养基上观察pGBKT7-Foxp3在AH109中的表达情况,检测诱饵载体有无毒性作用和自激活功能。**结果** RT-PCR扩增出的DNA片段约1 203 bp,大小正确,与pMD18-T载体连接,测序正确。构建的诱饵载体pGBKT7-Foxp3,测序结果表明序列完全正确,融合区域的读码框正确。pGBKT7-Foxp3转化酵母感受态AH109,在SD/-Trp板上生长良好,在SD/-Trp/X-α-Gal平板上长出白色菌落,在SD/-His/-Trp/X-α-Gal、SD/-Ade/-Trp/X-α-Gal平板上不能生长,说明AH109[pGBKT7-Foxp3]转化成功,对酵母菌株AH109不具有毒性且不具自主激活报告基因的功能。**结论** 成功获得了在酵母细胞中正确表达,并对酵母细胞无毒性且未自主激活报告基因的诱饵表达载体pGBKT7-Foxp3,可作为酵母双杂合系统中的"诱饵",为下一步利用酵母双杂交系统筛选Foxp3相互作用蛋白创造了条件。

关键词:基因;克隆;Foxp3;酵母双杂交
中图法分类号:Q503;Q782 **文献标识码**:A

Expression and construction of "bait plasmid" containing human Foxp3 gene in yeast two-hybrid system

ZHOU Li-na, WU Jun, LUO Gao-xing, HE Wei-feng, CHEN Xi-wei, BAI Gan-ping, SHI Dong-wen, WANG Qing-hong, YUAN Shun-zong, ZHANG Xiao-rong, HU Xiao-hong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a bait vector containing human Foxp3 gene in yeast two-hybrid system in order to screen the cDNA library of T lymphocyte. Methods RT-PCR was used to amplify the Foxp3 gene fragment from the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with the primers designed in accordance with the sequence in GenBank. The product was inserted into pMD18-T vector. After verified with restriction endonuclease digestion of *Eco*RⅠ and *Sal*Ⅰ, the vector was inserted into the "bait plasmid" pGBKT7 (named as pGBKT7-Foxp3). After confirmation with restricted endonuclease digestion and sequence analysis, the plasmid was transformed into the yeast cell AH109, and its toxicity and transcriptional activation was tested by both the phenotype assay and the color assay. Results The amplified product of 1 203 bp was inserted into PMD18-T vector and proven correctly by double restriction enzyme digestion. Sequence analysis revealed that the fragment was correctly inserted into pGBKT7 with a right reading frame and its expression in yeast was verified. Conclusion The bait plasmid pGBKT7-Foxp3 constructed expresses correctly, and can not activate the transcription of reporter gene alone in yeast two-hybrid system

Key words: gene; clone; Foxp3; yeast two hybrid

调节性T细胞(Treg)是机体免疫中最重要的负调T细胞,与机体的免疫系统自稳状态、自身免疫性疾病、移植物免疫排斥反应及肿瘤发生有极其密切的联系[1]。但有关Treg特征性标志物、细胞接触性抑制和无能的分子基础等根本问题却有待于回答。Foxp3基

作者简介:周丽娜(1979-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事蛋白质组学方面的研究。电话:(023)66727819,E-mail:zln619@yahoo.com.cn
通讯作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:junwupro@126.com
收稿日期:2005-11-30;修回日期:2006-01-05

因和 Treg 细胞的关系首先是在自身免疫缺陷病 Scurfy 小鼠身上发现的，其体内 $CD4^+CD25^+$ T 细胞明显减少，导致 $CD4^+$ T 细胞介导的淋巴细胞增殖疾病，提示 Foxp3 可能是 Treg 细胞的一个特征性标志[2]。近来研究明确表明 Foxp3 属于转录调节子，主要作用是抑制转录，特异表达于机体的 $CD4^+CD25^+$ Treg，介导 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞在胸腺的发育，外周表达及功能维持[3]。然而对于 Foxp3 基因如何控制 Treg 细胞发育及其通过何种下游靶基因发生作用，其作用靶点是什么？这些问题目前仍不清楚。酵母双杂交体系（yeast two-hybrid system）是研究蛋白相互作用的一种方法，首先由 Fields 等[4]创立于 1989 年。本研究以 Foxp3 为饵蛋白，构建诱饵载体 pGBKT7-Foxp3，并成功地转化酵母获得表达，为利用酵母双杂交技术寻找与 Foxp3 相作用的蛋白打下基础，以诠释 Foxp3 相关 Treg 细胞接触性抑制和无能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

实验所需内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ、T_4 DNA 连接酶、DNA 标准分子量 Marker、*Taq* 等工具酶、T 载体试剂盒以及 RT-PCR 试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit（AMV）Ver. 3.0 购自大连 Takara 公司，淋巴细胞分离液购自天津血液研究所，琼脂糖凝胶片段回收试剂盒以及质粒抽提试剂盒购自美国 Omega 公司，大肠杆菌 DH5α 为本研究室保存，酵母 AH109 及酵母表达载体购自美国 Clontech 公司，引物合成及序列测定由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.2 正常人外周血标本

由西南医院输血科提供。

1.3 重组结合域载体的构建

1.3.1 Foxp3 基因的克隆　自西南医院输血科获得正常人外周血，用 Ficoll 密度梯度法分离外周血单个核细胞（PBMC），按常规方法提取 mRNA，用 TaKaRa RNA PCR Kit（AMV）中的反转录酶将 RNA 合成 cDNA，将总 RNA 1 μl，10 × 逆转录 buffer 1 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μl，10 mmol/L dNTP 1 μl，oligo(dT)12 0.5 μl，RNase Free ddH_2O 3.75 μl，RNase Inhibitor 0.25 μl，AMV 0.5 μl（总体积 10 μl），反转录反应条件：30 ℃ 10 min，42 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min。然后进行巢式 PCR 反应，使用 *Taq* 酶扩增此 cDNA，根据 GenBank 公布人 Foxp3 序列设计巢式 PCR 引物，其中 1 对内引物为 Foxp3 全基因序列，结合酵母表达载体的阅读框、多克隆位点，同时在上下游引物 5′端分别插入 *Eco*R Ⅰ及 *Sal* Ⅰ酶切位点，设计引物序列如下：5′-ACACCACCCACCACCGCCACT-3′（外正），5′-TCGGATGATGCCACAGATGAAGC-3′（外反）5′-GAATTCATGCCCAACCCCAGGCCTGGCAA-3′（内正），5′-GTCGACTCAGGGGCCAGGTGTAGGGTTG-3′（内反）。以 cDNA 为模板，以一对外引物进行第一轮扩增，条件为：cDNA 1 μl，10 × PCR buffer 5 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μl，10 mmol/L dNTP 4 μl，正反外引物各 1 μl（终浓度 100 nmol/L），*Taq* 酶 0.5 μl，ddH_2O 34.5 μl（总体积 50 μl）95 ℃变性 5 min，循环条件：94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，30 个循环后 72 ℃ 10 min；随后以第 1 轮 PCR 反应产物为模板，取 1 μl，以一对内引物进行第 2 轮扩增，反应条件同前，电泳观察结果。

1.3.2 重组质粒 pMD18-T-Foxp3 的构建及鉴定　PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，将与上述预期片段大小一致的片段切下，利用胶回收试剂盒回收，按 T 载体试剂盒操作说明与 pMD18-T 载体连接，用 $CaCl_2$ 法转化入大肠杆菌 DH5α，进行蓝白斑筛选阳性菌落并扩增、抽提质粒，经双酶切分析鉴定连接片段大小，并用 T7 通用引物进行序列测定，与公布序列比较同源性。

1.3.3 诱饵重组质粒 pGBKT7-Foxp3 的构建及鉴定　上述重组质粒 pMD18-T-Foxp3 及酵母表达载体 pGBKT7 分别经 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后，琼脂糖电泳回收纯化。应用 T_4 连接酶连接纯化的 DNA 片段，用 $CaCl_2$ 法转化人大肠杆菌 DH5α，利用 pGBKT7 卡那霉素筛选阳性克隆，提取质粒，双酶切鉴定为相应大小片断，重组质粒命名为 pGBKT7-Foxp3，用酵母表达载体 pGBKT7 的引物，其上游引物为 T7 sequencing primer：5′-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3′，下游引物为 3′ DNA-BD sequencing primer：5′-TTTTCGTTTTAAAACCTAAGAGTC-3′送北京三博远志生物技术有限责任公司进行序列测定，与公布序列比较同源性。

1.3.4 制备酵母感受态细胞　诱饵载体转化的酵母株是 AH109，酵母感受态的制备用醋酸锂转化法[5]，按试剂盒（Clontech）说明书操作，将冻存的 AH109 划线接种至 YPDA 平板，倒置 30 ℃ 培养 3 d，挑取一单克隆于 0.5 ml YPDA 液中，30 ℃，250 r/min振摇 8 h，取 1 μl 接种于 5 ml YPDA 液中，30 ℃，250 r/min振摇 16 ~ 24 h，当 $D(600)=0.15\sim0.3$，弃上清，沉淀重悬于 10 ml YPDA 中，30 ℃，250 r/min 继续振摇 3 ~ 5 h，当 $D(600)=0.4\sim0.6$ 时，室温下，700 × *g* 离心 5 min，沉淀重悬于 6 ml无菌去离子水中，室温下，700 × *g* 离心 5 min，沉淀重悬于 300 μl 1.1 × TE/LiAC 中，平均分为两份，高速离心 15 s，弃上清，重悬沉淀于 60 μl 1.1 × TE/LiAC 中，制备的感受态细胞马上使用。

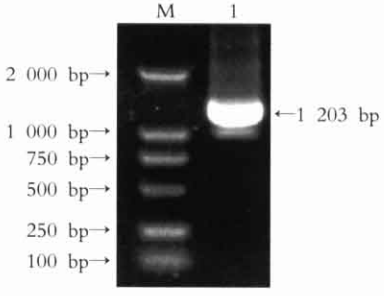
1.3.5 酵母细胞转化[5-7]及鉴定　按试剂盒（Clontech）说明书操作，50 μl 感受态加 0.5 μg pGBKT7-Foxp3，加入 5 μl 预先变性的 herring DNA，加入 0.5 ml PEG/LiAc，充分混匀后，30 ℃孵育 30 min，10 min 混匀 1 次，加入 20 μl DMSO，混匀后，42 ℃孵育 15 min，5 min 混匀 1 次，高速离心 15 s 后移去上清，重悬于 1 ml YPD plus Liquid Medium 中，30 ℃，250 r/min 振摇 90 min，高速离心 15 s 后移去上清，用 1 ml 0.9% NaCl 重悬，取 100 μl菌液涂板，将菌液按 1∶100，1∶1 000稀释后铺于 SD/-Trp 营养选择性培养基，30 ℃ 2 ~ 4 d。挑取较大（直径 > 2 mm）菌落，应用酵母表达载体 pGBKT7 引物进行酵母菌落 PCR，快速筛选酵母转化子，鉴定转化是否成功。

1.3.6 重组质粒 pGBKT7-Foxp3 的毒性与自身激活作用验证[7]　同时将重组子 pGBKT7-Foxp3 和空载体 pGBKT7 分别转化感受态酵母菌 AH109，观察其生长情况；同时随机挑选 pGBKT7-Foxp3 和 pGBKT7 的单克隆划线接种至在 SD/-Trp/X-α-Gal、SD/-His/-Trp/X-α-Gal 和 SD/-Ade /-Trp/X-α-Gal 平板上，观察生长情况。

2　结果

2.1　重组质粒 pMD18-T-Foxp3 的构建及其鉴定

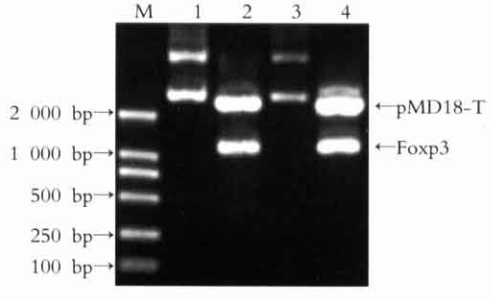
2.1.1　人 Foxp3 基因的克隆分离结果　　用巢式 RT-PCR 方法由正常人外周血 PBMC 中获得 Foxp3 基因，通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳，第 1 轮 PCR 产物大小片断大小约为 1 300 bp，第 2 轮 PCR 产物大小片断大小约 1 200 bp，与预期一致（图 1）。



M：DNA 标准（DL2 000）；1：Foxp3

图 1　Foxp3 基因 RT-PCR 电泳结果

2.1.2　重组质粒 pMD18-T-Foxp3 的构建及其鉴定结果　　重组 T 载体经 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后电泳鉴定，可见释放出所需片段大小约为 1 203 bp，与理论值大小相符。以 T7 引物作为测序引物对其进行鉴定，测序结果经 BLAST 分析证实为人 Foxp3 序列（GenBank ID DQ010327），表明 pMD18-T-Foxp3 构建成功（图 2）。



M：DNA 标准（DL2000）；1，3：重组质粒 pMD18-T-Foxp3；2，4：pMD18-T-Foxp3 双酶切后的产物

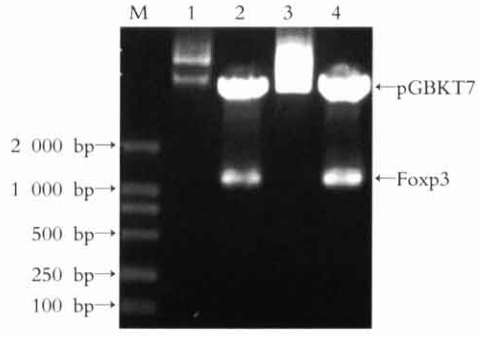
图 2　重组质粒 pMD18-T-Foxp3 酶切产物电泳图

2.2　重组质粒 pGBKT7-Foxp3 的鉴定结果

上述重组结合域载体经 *Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切后电泳鉴定插入片段大小正确，表明诱饵质粒构建成功（图 3）。利用酵母表达载体 pGBKT7 引物的测序结果也证实为人 Foxp3 序列（GenBank ID DQ010327），表明重组质粒 pGBKT7-Foxp3 构建成功。

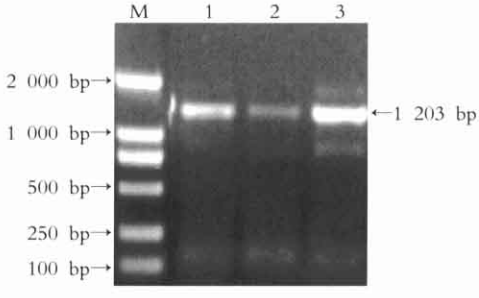
2.3　重组诱饵质粒 pGBKT7-Foxp3 的表达与鉴定

重组成功的诱饵蛋白编码质粒 pGBKT7-Foxp3 经 LiAc 法转化感受态酵母菌 AH109。利用 SD/-Trp 平板筛选出阳性克隆。采用酵母表达载体 pGBKT7 引物对转化后的新鲜阳性克隆（酵母菌株生长 <3 d）进行酵母菌落 PCR，快速筛选酵母转化子，实验重复 3 次（图 4），在 1 200 bp 处均可见到目的条带，证明转化成功。



M：DNA 标准（DL2000）；1，3：重组质粒 pGBKT7-Foxp3；2，4：pGBKT7-Foxp3 经双酶切后的产物

图 3　重组质粒 pGBKT7-Foxp3 酶切产物电泳图



M：DNA 标准（DL2 000）；1，2，3 分别为 3 次 PCR 产物

图 4　酵母菌 AH109 重组诱饵质粒 pGBKT7-Foxp3 转化后的阳性克隆 PCR 产物电泳图

2.4　重组诱饵质粒 pGBKT7-Foxp3 的毒性与自激活检测

分别将重组成功的 pGBKT7-Foxp3 和空载体 pGBKT7 转化入酵母菌 AH109，观察在 SD/-Trp 平板中生长出的单克隆克隆数量大致相近，表明 pGBKT7-Foxp3 对 AH109 无毒性作用；同时含 pGBKT7-Foxp3 的 AH109 在 SD/-Trp/X-α-Gal 平板上长出白色菌落，在 SD/-His/Trp/X-α-Gal、SD/-Ade /Trp/X-α-Gal 平板上不能生长，排除了 pGBKT7-Foxp3 具有自激活宿主菌 AH109 的作用。说明构建成功的 pGBKT7-Foxp3 能够适用于酵母双杂交系统进行的相互作用蛋白筛选。

3　讨论

酵母双杂交系统技术作为发现和研究在活细胞体内的蛋白质与蛋白质之间的相互作用的技术平台，在近几年来得到了广泛的运用。该系统是在真核模式生物酵母中进行的，不但可用来研究活细胞内蛋白质相互作用，而且还能用来发现新的作用蛋白质，是一种具有很高灵敏度的研究蛋白质之间关系的技术。基于此，我们拟用酵母双杂交的方法来筛选 Foxp3 的相互

作用蛋白,从而推测出 Foxp3 基因的功能角色。

2003 年 Rudensky、Ramsdell 和 Hori 等研究小组均证明 Foxp3 在 Treg 细胞上特异性表达,且 Foxp3 在 Treg 细胞的发育和功能上是必需的[8-10]。Foxp3 (forkhead/winged helix transcription factor)称叉状头/翅膀状螺旋转录因子[11],在调控 T 细胞的发育上起很重要的作用。由于 Scurfy 小鼠发生了 Foxp3 基因的突变,导致 $CD4^+$ T 细胞介导的淋巴细胞增殖疾病,表现为恶病质和多器官淋巴细胞浸润。人类同源的 Foxp3 突变可引起人类基因性疾病的免疫失调、内分泌疾病、肠病、X 染色体性联综合症(IPEX,也称为 X 染色体性联自身免疫一变态失调综合症,XLAAD),表现为全面的免疫失调,带有自身免疫性内分泌疾病、早期发作的 I 型糖尿病和甲状腺炎,且在一些病例证明伴有严重的异位特异反应,包括湿疹、食物变态反应和嗜酸性炎症[12]。这些研究均表明 Foxp3 是 Treg 细胞发育的一个关键转录因子,这极大地促进了分子水平上对 Treg 细胞的认识。但 Foxp3 如何调控 Treg 细胞的发育及其调节的下游靶基因未明。阐明这些问题,将有助于 Treg 细胞的发育和其功能的研究,并对于自身免疫性疾病,肿瘤的治疗及移植免疫耐受的诱导等临床应用具有非常重要的意义。

为此,我们构建 Foxp3 诱饵融合蛋白表达载体,为获取与 Foxp3 相互作用的蛋白质分子奠定实验基础。首先需要将 Foxp3 构建入 pGBKT7 的多克隆位点从而得到诱饵重组子 pGBKT7-Foxp3。应用定向克隆技术,事先设计的 Foxp3cDNA 特异性引物中含有与 pGBKT7 相对应的限制性内切酶酶切位点 *Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ,通过 PCR 法获得两端含相应酶切位点的 Foxp3 cDNA PCR 产物后,同时以 *Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切该产物与 pGBKT7,回收片段并连接、转化 DH5α 利用 pGBKT7 的 Kana 抗性筛选阳性克隆,提取阳性克隆中的重组质粒,双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳验证目的片段大小与理论值相符,并经测序进一步验证诱饵重组子序列正确。至此,诱饵重组子 pGBKT7-Foxp3 构建成功,为下一步利用酵母双杂交系统筛选 Foxp3 相互作用蛋白创造了条件。

另外,由于某些蛋白质在酵母菌株内表达时可能对酵母产生一定的毒性作用,使酵母细胞不能在选择性培养基上生长,或者,本生就有结合转录激活活性的蛋白质会直接激活报告基因的表达,因此在筛选前还需要验证诱饵蛋白 Foxp3 的自激活与毒性作用,用以排除假阳性和假阴性相互作用。本实验在诱饵重组子 pGBKT7-Foxp3 转化感受态酵母菌株 AH109 的同时转化 pGBKT7 空载体作为对照利用显色反应来检测诱饵表达载体是否有自激活作用。实验结果表明,分别转化重组诱饵载体 pGBKT7-Foxp3 和空载体 pGBKT7 后的酵母菌 AH109 在 SD/-Trp 平板中生长出的单克隆克隆数量大致相近,表明 pGBKT7-Foxp3 对 AH109 无毒性作用;同时含 pGBKT7-Foxp3 的 AH109 在 SD/-Trp/X-α-Gal 平板上长出白色菌落,在 SD/-His/-Trp/X-α-Gal、SD/-Ade /-Trp/X-α-Gal 中不能生长,排除了 pGBKT7-Foxp3 具有自激活宿主菌的作用。因此,我们构建的 Foxp3 诱饵融合蛋白表达载体 pGBKT7-Foxp3 符合筛选 cDNA 文库的需要,解决了本实验的关键性问题,可以进行 Foxp3 的相互作用蛋白筛选。

参考文献:

[1] WOOD K J, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in transplantation tolerance[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(3): 199-210.

[2] BRUNKOW M E, JEFFERY E W, HJERRILD K A, *et al*. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse[J]. Nat Genet, 2001, 27(1): 68-73.

[3] CHOI B M, PAE H O, JEONG Y R, *et al*. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(4): 1066-1071.

[4] FIELDS S, SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340(6230): 245-246.

[5] BARTEL P L, FIELDS S. The Yeast Two-Hybrid System[M]. New York: Oxford University Press, Oxford, 1997. 425-428.

[6] Pretransformed MATCHMAKER Libraries[J]. Clontechniques, 1997, Ⅻ(4): 12-13.

[7] SCHIESTL R H, GIETZ R D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier[J]. Curr Genet, 1989, 16(5-6): 339-346.

[8] FONTENOT J D, GAVIN M A, RUDENSKY A Y. Foxp3 programs the development and function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330-336.

[9] KHATTRI R, COX T, YASAYKO S A, *et al*. An essential role for Scurfin in $CD4^+CD25^+$ T regulatory cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 337-342.

[10] HORI S, NOMURA T, SAKAGUEHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science, 2003, 299(5609): 1057-1061.

[11] SUHUBERT L A, JEFFERY E, ZHANG Y, *et al*. Scurfin (Foxp3) acts as a repressor of transcription and regulatory T cell activation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(40): 37672-37679.

[12] CHATILA T A, BLAESER F, HO N, *et al*. JM2 encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome[J]. J Clin invest, 2000, 106(12): R75-R81.

(编辑 陈聪连)