文章编号:1000-5404(2006)19-1923-04

论著

AMP激活的蛋白激酶α2大肠杆菌双杂交诱饵重组质粒的构建及鉴定

符庆瑛,高钰琪 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建大肠杆菌双杂交系统的诱饵重组质粒。**方法** PCR扩增大鼠AMP激活的蛋白激酶α2(AMP-activated protein kinase α2,AMPKα2)蛋白编码区cDNA,与大肠杆菌双杂交表达载体pBT构建融合蛋白表达质粒pBT-AMPKα2。经酶切和测序鉴定后,将pBT-AMPKα2转化XL-1 Blue MRF'大肠杆菌报告菌株,检测诱饵融合蛋白的表达。并用pBT-AMPKα2和pTRG空载体共转化XL-1 Blue MRF'菌株,通过3-氨基-1,2,4-三唑(3-amino-1,2,4-triazole,3-AT)选择性筛选平板检测诱饵融合蛋白的自激活作用。**结果** 酶切和测序结果表明AMPKα2蛋白编码序列成功克隆入pBT载体,融合区阅读框正确。诱饵重组质粒pBT-AMPKα2能表达λcI/AMPKα2融合蛋白。转化有pBT-AMPKα2和pTRG空载体的XL-1 Blue MRF'大肠杆菌报告菌株在3-AT选择性筛选平板上不生长,而在no 3-AT非选择性筛选平板上生长良好,表明pBT-AMPKα2重组质粒能在大肠杆菌细胞中正确表达且无自激活作用。**结论** 构建的pBT-AMPKα2诱饵重组质粒可用于下一阶段的cDNA文库筛选。

关键词: AMP激活的蛋白激酶;大肠杆菌双杂交;诱饵质粒
中图法分类号: R378.21; Q555.7; Q78 **文献标识码:** A

Construction and identification of bait plasmid carrying AMP-activated protein kinase α2 in bacterial two-hybrid system

FU Qing-ying, GAO Yu-qi (Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a bait plasmid in bacterial two-hybrid system. Methods A cDNA fragment encoding for rat AMP-activated protein kinase α2 (AMPKα2) was amplified by PCR and inserted into bacterial expression vector pBT. After confirmation with restricted endonuclease digestion and sequence analysis, bacterial reporter strain XL-1 Blue MRF' was transformed with pBT-AMPKα2 plasmid and the expression of the recombinant bait fusion protein was detected. To test whether the bait fusion protein had the capability of self-activation, the XL-1 Blue MRF' cells were cotransformed with the pBT-AMPKα2 plasmid and empty pTRG vector, and screened on 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) Selective Screening Medium plates. Results Restriction digestion and sequence analysis revealed that the AMPKα2 code sequence was correctly inserted into pBT with a right reading frame. pBT-AMPKα2 expressed λcI/AMPKα2 fusion protein. Colonies were obtained on no 3-AT Nonselective Screening Medium plates when XL-1 Blue MRF' cells were cotransformed with recombinant pBT-AMPKα2 and empty pTRG vector, while none grew on 3-AT plates, indicating that the recombinant plasmid pBT-AMPKα2 expressed AMPKα2/λcI fusion protein correctly, and was incapable of activation of the reporter cassette in the absence of an interaction partner. Conclusion The recombinant plasmid pBT-AMPKα2 could be used as "bait plasmid" to screen cDNA library.

Key words: AMP-activated protein kinase; bacterial two-hybrid; bait plasmid

AMP激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是真核生物中一个重要的蛋白激酶,属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的成员。AMPK结构复杂,是一个由α、β和γ亚基形成的异源三聚体,α为催化亚基,β和γ为调节亚基,3种亚基又存在不同的亚型(α1和α2,β1和β2,γ1、γ2和γ3)。AMPK主要协调代谢和能量的需要,一旦被激活,即导致超敏反应,一方面关闭

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(30393131)
Supported by the Major Program of the National Natural Science Foundation of China(30393131)
作者简介:符庆瑛(1977-),女,河南省新野县人,博士研究生,主要从事缺氧习服适应方面的研究。电话:(023)68772603,E-mail: fqykey@sohu.com
通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail: gyq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-01-11;修回日期:2006-05-07

消耗 ATP 的合成代谢途径，另一方面启动产生 ATP 的分解代谢途径，被称为“细胞能量调节器”[1]。

α 催化亚基作为 AMPK 的特征性结构，与该亚基相互作用的蛋白质在一定程度上代表了特异地与 AMPK 相互作用的分子。本研究以 AMPKα2 为诱饵蛋白，构建诱饵质粒 pBT-AMPKα2，为利用大肠杆菌双杂交系统寻找与 AMPKα2 相互作用的分子打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌表达载体 pBT、大肠杆菌株 XL1-Blue MRF' 和 XL1-Blue MRF' Kan 购自 Stratagene 公司。大肠杆菌株 DH5α 由本室保存。大肠杆菌用培养基 M9 salts、-His Dropout Supplement 购自 BD/Clontech 公司，adenine HCl、3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) 购自 Sigma 公司。*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ限制性内切酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。质粒抽提试剂盒、PCR 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司。引物由上海博亚公司合成。pcDNA3-rat AMPKα2 全长 cDNA 质粒由 Dr. David Carling 教授(英国)惠赠。其他生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计 根据大鼠 AMPKα2 全长 cDNA 序列、酶切图谱，结合大肠杆菌表达载体 pBT 的读框、多克隆位点，设计引物序列。上游引物：5′-CGGAATTCAGCTGAGAAGCAGAAGCACGACGG-3′；下游引物：5′-GCGCTCGAGATTCAACGGGCTAAAGCAGTGATA-3′。

1.2.2 AMPKα2 编码区的扩增 以 pcDNA3-rat AMPKα2 全长 cDNA 质粒为模板，用上述引物扩增 AMPKα2 编码区，PCR 扩增条件为 94 ℃ 30 s，65 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，共进行 30 个循环，最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 PCR 产物克隆入 T 载体 PCR 产物经 PCR 纯化试剂盒回收纯化，pMD18-T 载体 16 ℃ 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，37 ℃ 培养过夜。挑取菌落，摇菌提取质粒，经 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ单酶切和 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切鉴定为相应大小片段后，送北京三博公司测序，重组质粒命名为 pMD18T-AMPKα2。

1.2.4 诱饵质粒的构建 重组质粒 pMD18T-AMPKα2 用 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切，回收相应连接片段，用 T_4 DNA 连接酶与大肠杆菌表达载体 pBT 连接，16 ℃ 过夜，转化大肠杆菌株 XL1-Blue MRF' Kan 感受态，挑取菌落，摇菌提取质粒，经 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ单酶切和 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切鉴定为相应大小片段后，送北京三博公司测序，重组质粒命名为 pBT-AMPKα2，即诱饵质粒。

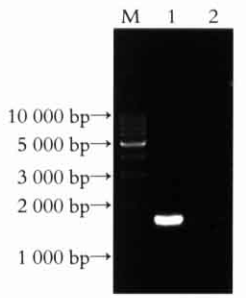
1.2.5 诱饵蛋白的表达 重组质粒 pBT-AMPKα2 和 pBT 空质粒分别转化大肠杆菌感受态细胞 XL-1 Blue MRF'，在 LB-氯霉素(25 mg/L)平板上生长，30 ℃ 培养 24 h。挑单菌落接种于 2 ml $M9^+$ His-dropout 肉汤培养基(含氯霉素 25 μg/ml)中，37 ℃ 振摇过夜。再将过夜菌液转接于新鲜的 $M9^+$ His-dropout 肉汤培养基(含氯霉素 25 μg/ml，10 μmol/L IPTG)中，37 ℃ 振摇至 $D(600)$ 为 0.5～0.6，收集、裂解细菌，样品上样进行 SDS-PAGE 电泳，检测诱饵融合蛋白的表达。

1.2.6 pBT-AMPKα2 重组质粒转化大肠杆菌细胞及自激活作用检测 重组质粒 pBT-AMPKα2 和 pTRG 空质粒各取 50 ng，pTRG-GAL11^P 对照质粒和 pBT 空质粒也各取 50 ng，分别共转化 100 μl 大肠杆菌感受态细胞 XL-1 Blue MRF'。取 200 μl 转化混合液涂布 3-AT 选择性筛选平板；再从转化混合液中另取 100 μl 按 1∶100 稀释后，分别用 20 μl 和 200 μl 涂布 no 3-AT 非选择性筛选平板。37 ℃ 倒置培养 24 h，若菌落生长不明显，则将平板移至室温暗处继续培养 16 h 后再观察结果。

2 结果

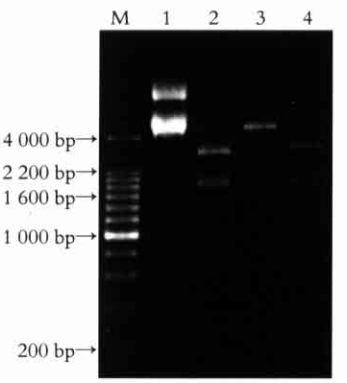
2.1 AMPKα2 亚基编码区的 PCR 扩增及鉴定

以 pcDNA3-rat AMPKα2 全长 cDNA 质粒为模板，用所设计的引物扩增出的 DNA 片段约 1 676 bp，片段大小与预期值相符(图 1)。将片段纯化插入 pMD18-T 载体后，分别经 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ单酶切，以及 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切。*Eco*R Ⅰ单酶切得 2 条带分别是 1 706 bp 和 2 657 bp，*Xho* Ⅰ单酶切得 1 条 4 368 bp 带，*Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切得 2 条带分别是 1 665 bp 和 2 662 bp，电泳分析显示酶切后条带大小均与预期值相符(图 2)，证实已成功连接到 T 载体。测序结果表明序列完全正确。



M：1 kb DNA 梯度标准；1：AMPKα2 编码区 PCR 产物；2：阴性对照

图 1 AMPKα2 编码区的 PCR 扩增电泳图



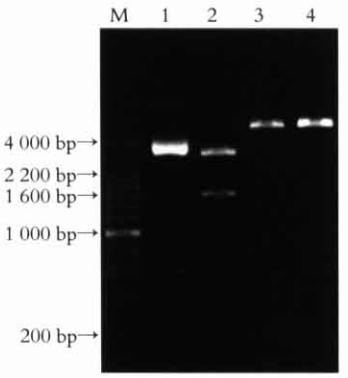
M：200 bp DNA 梯度标准；1：pMD18T-AMPKα2；2：*Eco*R Ⅰ酶切 pMD18T-AMPK；3：*Xho* Ⅰ酶切 pMD18T-AMPKα2；4：*Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切 pMD18T-AMPKα2

图 2 重组质粒 pMD18T-AMPKα2 的单、双酶切鉴定

2.2 诱饵质粒的构建及鉴定

重组 T 载体 pMD18T-AMPKα2 经 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切释放出 1 665 bp 插入片段，片段经电泳回收纯化，与相同酶切线性化的大肠杆菌诱饵载体 pBT 连接，构建与 λcI 融合的表达质

粒 pBT-AMPKα2(即诱饵质粒),并经 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ单酶切、*Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切以及测序分析予以鉴定。*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ单酶切得 1 条 4 860 bp 带,*Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切得 2 条带分别是 1 665 bp和3 195 bp,电泳分析显示插入片段大小与预期相符(图 3)。测序结果表明插入序列以及融合区域的读码框完全正确。

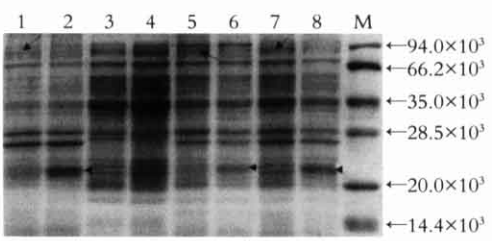


M: 200 bp DNA 梯度标准; 1: pBT-AMPKα2; 2: *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切 pBT-AMPKα2; 3: *Xho* Ⅰ酶切 pBT-AMPKα2; 4: *Eco*R Ⅰ酶切 pBT-AMPKα2

图 3　重组质粒 pBT-AMPKα2 的单、双酶切鉴定

2.3　诱饵蛋白的表达及鉴定

37 ℃培养的阳性菌(转化了重组质粒 pBT-AMPKα2)和空载体菌(转化了 pBT 空质粒),在 IPTG 诱导表达条件下,待振摇培养至 *D*(600)为 0.5 ~ 0.6 时,收集和裂解细菌,样品上样进行 SDS-PAGE 电泳(图 4)。pBT 空质粒编码的 λcI 蛋白分子量约为 27.0×10^3, AMPKα2 蛋白分子量约为 62.2×10^3, AMPKα2 / λcI 融合蛋白的分子量约为 89.2×10^3。阳性菌的总裂解产物以及裂解上清和沉淀中,在接近 94.0×10^3 处有 1 条蛋白带,该蛋白带与预期融合蛋白分子量相符,并且在裂解沉淀中的含量明显高于上清,提示诱饵融合蛋白可能主要是以包涵体形式存在。空载体菌的裂解混合物以及裂解上清和沉淀中均未见此带,而是在(20.0 ~ 28.5) $\times 10^3$ 间有 1 条明显的蛋白带,与 pBT 空质粒编码的 λcI 蛋白分子量相符。在无 IPTG 诱导时,阳性菌和空载体菌的裂解物进行 SDS-PAGE 电泳,在相应位置处未见诱饵融合蛋白带和 λcI 蛋白带。



↑: AMPKα2 / λcI 融合蛋白; ▲: λcI

M: 蛋白标准; 1: 阳性菌总裂解产物(IPTG 诱导); 2: 空载体菌总裂解产物(IPTG 诱导); 3: 阳性菌总裂解产物(无 IPTG 诱导); 4: 空载体菌总裂解产物(无 IPTG 诱导); 5: 阳性菌裂解上清(IPTG 诱导); 6: 空载体菌裂解上清(IPTG 诱导); 7: 阳性菌裂解沉淀(IPTG 诱导); 8: 空载体菌裂解沉淀(IPTG 诱导)

图 4　SDS-PAGE 鉴定 AMPKα2/λcI 融合蛋白表达

2.4　重组质粒 pBT-AMPKα2 自激活作用检测

pTRG-GAL11^{P}对照质粒和 pBT 空质粒共转化大肠杆菌感受态细胞 XL-1 Blue MRF',在 no 3-AT 平板上生长良好,而在 3-AT 平板上无菌落生长。pBT 空质粒和 pTRG-GAL11^{P}并非相互作用对,转化后涂布 3-AT 平板是作为阴性对照,以对 3-AT 培养板的质量进行验证。转化结果示在 3-AT 平板上无菌落生长,说明 3-AT 培养板的质量可靠。重组质粒 pBT-AMPKα2 和空质粒 pTRG 共转化结果显示,转化子在 no 3-AT 平板上生长良好,而在 3-AT 平板上不生长,表明重组质粒 pBT-AMPKα2 并无自主活化作用,可用于下一步的双杂交筛选实验。

3　讨论

大肠杆菌双杂交系统是继酵母双杂交系统之后,产生的另一种用于蛋白质相互作用研究的新方法。该系统克服了酵母双杂交系统本身存在的一些局限,在以下几方面具有独特的优势:第一,研究周期短,操作简单、快速;第二,大肠杆菌的转化效率显著高于酵母细胞,这为构建和筛查大文库提供了条件,从而可能发现稀有蛋白作用对;第三,大肠杆菌与高等真核生物之间具有更大的进化距离,从而避免了在研究真核生物蛋白相互作用时,由酵母内源蛋白所引起的假阳性和假阴性现象。利用大肠杆菌双杂交系统研究蛋白相互作用的原理是目的蛋白(诱饵)与全长 λ 噬菌体 cI 蛋白(λcI)融合,其中 λcI 氨基末端具有 DNA 结合域;靶蛋白则是与 RNA 聚合酶 α 亚基的 N 末端结合域融合。诱饵通过 λcI 的 DNA 结合域与报告基因的启动子上游的 λ 操纵区连接。当诱饵与靶蛋白相互作用时,彼此相互接近,使 RNA 聚合酶结合到报告基因的启动子上,启动报告基因的转录,从而调控报告基因的表达。

AMPK 作为真核生物中广泛存在的一个蛋白激酶,除了通过调节代谢过程的酶类参与调节糖、脂肪、蛋白质三大物质代谢外;还通过与基因转录[2-6]和翻译调控的因子[7]以及多种信号转导通路中的分子相互作用[8-15],从而实现对基因表达的调控及相关生物学过程的调节。其功能上的特点及进化上的保守性,表明该酶系在维持能量稳态过程中起重要作用。

鉴于 α 亚基在 AMPK 催化活性方面发挥的重要作用,因此我们选用 AMPKα2 亚基为诱饵,筛选与其相互作用的蛋白,以期了解参与 AMPK 脑内调节功能的重要分子。

本实验根据大鼠 AMPKα2 编码区序列,并结合大肠杆菌表达载体 pBT 的读框、多克隆位点以及酶切图谱设计引物,PCR 扩增出的 DNA 片段约 1 676 bp,大小正确,并成功地连接到 T 载体。重组 T 载体经 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切释放目的片段,与 pBT 空载体上的 λcI 形成融合表达的重组质粒 pBT-AMPKα2。重组质粒 pBT-AMPKα2 测序结果表明序列完全正确,融合区读码框亦正确。重组质粒 pBT- AMPKα2 转化 XL-1

Blue MRF' 感受态细胞，在 IPTG 诱导条件下，SDS-PAGE 检测到 AMPKα2/λcI 融合蛋白的表达。并且重组质粒 pBT-AMPKα2 和空质粒 pTRG 共转化结果显示，转化子在 no 3-AT 平板上生长良好，而在 3-AT 平板上不生长。以上表明构建的重组质粒 pBT-AMPKα2 无自主激活报告基因的作用，并能正确表达，可作为大肠杆菌双杂交系统的诱饵质粒，为进一步探究与 AMPK 相互作用的蛋白分子提供实验基础。

参考文献：

[1] KEMP B E, MITCHELHILL K I, STAPLETON D, *et al*. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase[J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24(1): 22 - 25.

[2] OUCHI N, KOBAYASHI H, KIHARA S, *et al*. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(2): 1304 - 1309.

[3] YANG W, HONG Y H, SHEN X Q, *et al*. Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 38341 - 38344.

[4] LEE M, HWANG J T, LEE H J, *et al*. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells [J]. J Biol Chem, 2003, 278(41): 39653 - 39661.

[5] HONG Y H, VARANASI U S, YANG W, *et al*. AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability[J]. J Biol Chem, 2003, 278(30): 27495 - 27501.

[6] AL-KHALILI L, CHIBALIN A V, YU M, *et al*. MEF2 activation in differentiated primary human skeletal muscle cultures requires coordinated involvement of parallel pathways[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286(6): C1410 - C1416.

[7] KIMURA N, TOKUNAGA C, DALAL S, *et al*. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway[J]. Genes Cells, 2003, 8(1): 65 - 79.

[8] KEFAS B A, CAI Y, LING Z, *et al*. AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase[J]. J Mol Endocrinol, 2003, 30(2): 151 - 161.

[9] VAN-DE-CASTEELE M, KEFAS B A, CAI Y, *et al*. Prolonged culture in low glucose induces apoptosis of rat pancreatic beta-cells through induction of c-myc[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(4): 937 - 944.

[10] GARCIA-GIL M, PESI R, PERNA S, *et al*. 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells [J]. Neuroscience, 2003, 117(4): 811 - 820.

[11] JUNG J E, LEE J, HA J, *et al*. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside enhances oxidative stress-induced apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in mouse Neuro 2a neuroblastoma cells [J]. Neurosci Lett, 2004, 354(3): 197 - 200.

[12] NAGATA D, MOGI M, WALSH K. AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress[J]. J Biol Chem, 2003, 278(33): 31000 - 31006.

[13] CHEN Z P, MITCHELHILL K I, MICHELL B J, *et al*. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase[J]. FEBS Lett, 1999, 443(3): 285 - 289.

[14] GIRI S, NATH N, SMITH B, *et al*. 5-aminoimidazole-4- carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase[J]. J Neurosci, 2004, 24 (2): 479 - 487.

[15] PILON G, DALLAIRE P, MARETTE A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs[J]. J Biol Chem, 2004, 279(20): 20767 - 20774.

（编辑 张大春）

《中华烧伤杂志》2007 年征订启事

《中华烧伤杂志》由中国科学技术协会主管、中华医学会主办，是国内烧伤学术界唯一的全国性权威刊物。读者对象为从事烧伤救治和整形的临床医师，以及与烧伤防治研究有关的科研人员。烧伤病情复杂、并发症多，涉及许多相关医学科学，特别与病理生理学、病理学、免疫学、微生物学、细胞生物学、分子生物学、生物工程学等有密切关系。烧伤病程中出现的休克、感染、营养代谢、内脏并发症、水与电解质紊乱及创面修复等既是烧伤的重要问题，也是整个外科的基本问题。本刊将择优刊登上述几方面的临床和实验研究论文，为读者提供烧伤及相关学科的新理论、新技术、新方法、新经验。《中华烧伤杂志》由国内著名烧伤外科及相关学科专家组成编委会，杂志具有科学性、实用性、内容新颖、可读性强。目前《中华烧伤杂志》的影响因子为 1.250，已被《CNKI 期刊全文数据库》、《中国科技论文统计源期刊》、《中国科学引文数据库统计源期刊》、《中文核心期刊要目总览》、《中文核心期刊(遴选)数据库》、《万方数据－数字化期刊群》、《中文科技资料目录－医药卫生》、《中国期刊全文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、美国国立医学图书馆《医学索引(IM)》又称《Medline 数据库》、美国化学文摘社《化学文摘(CA)》等主要检索机构收录，在国内医学期刊中具有较大的影响。

本刊为双月刊，大 16 开，80 页亚光铜版纸印刷并配彩图，每期定价 14 元。邮发代号：78－131。欢迎广大作者和读者通过邮局订阅或直接向编辑部邮购。

地 址：重庆市沙坪坝区西南医院《中华烧伤杂志》编辑部 邮 编：400038

电 话：(023)68754670，65460278 传 真：(023)65460398 E-mail：cmashz@mail.tmmu.com.cn