论著

文章编号:1000-5404(2007)23-2230-03

大鼠 RGS4 基因的克隆及在原核中的表达

鞠辉明[1,2],王 霞[3],周元国[2],刘宗平[1],陈星云[2] ([1]扬州大学兽医学院江苏省基因工程重点实验室,扬州 225009;[2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心,重庆 400042;[3]四川大学华西医院实验医学科,成都 610041)

提 要:目的 构建 pGEX4T-1-RGS4 载体,并检测融合蛋白 GST-RSG4 在原核中的表达水平。**方法** 采用 RT-PCR 方法,将克隆 SD 大鼠 G 蛋白信号转导调节因子(regulator of G protein signaling 4,RGS4)基因全长编码区的 cDNA 连接到原核表达载体 pGEX4T-1 中,IPTG 诱导原核表达,通过 Western blot 检测融合蛋白 GST-RSG4 的表达水平。**结果** 成功构建了 pGEX4T-1-RGS4 载体;经 IPTG 的诱导,RGS4 可与 GST 以融合蛋白的形式高效表达。pGEX4T-1-RGS4 在原核内表达产物相对分子质量约为 50×10^3,与预期融合蛋白大小一致。**结论** 构建的重组质粒能够在大肠杆菌中高效表达。

关键词: RGS4; 基因克隆; 基因表达

中图法分类号: R394-33; R394.3 **文献标识码**: A

Cloning of rat RGS4 gene and its expression in *Escherichia coli*

JU Hui-ming[1,2], WANG Xia[3], ZHOU Yuan-guo[2], LIU Zong-ping[1], CHEN Xing-yun[2] ([1]Jiangsu Key Laboratory of Genetic Engineering, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009; [2]Molecular Biology Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [3]Department of Laboratory Medicine, Western China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To construct pGEX4T-1-RGS4 and detect the GST-RSG4 fusion protein expressed in *Escherichia coli*. Methods The cDNA of RGS4 was amplified from total RNA extracted from the liver issue of SD rat by RT-PCR and inserted into pGEX4T-1 vector. The GST-RSG4 fusion protein was induced by IPTG and its expression level was analyzed by Western blot. Results The pGEX4T-1-RGS4 vector was successfully constructed. Under the induction of IPTG, the RGS4 and GST expressed efficiently in the mode of fusion protein. The molecular weight of pGEX4T-1-RGS4 expressed in *E. coli* was 50 000, consistent with the expectation. Conclusion The recombinant plasmid expressed efficiently in *E. coli*. This is the first step for studying the relationship between RGS4 and the structure domains of GR though GST-pulldown method.

Key words: RGS4; gene cloning; gene expression

G 蛋白信号调节因子(regulators of G protein signaling, RGS)是最近发现存在与 G 蛋白相结合的一类细胞信号传导调节因子,是细胞内 GTP 酶激活蛋白,它可加速 Gα 水解 GTP ,从而限制 G 蛋白激活的强度和持续时间,从而负向调控 G 蛋白的信号传导。RGS 是具有多种功能的蛋白质大家族,其中 RGS4 是 RGS 家族中具有重要意义的一个蛋白,通过其 RGS 结构域和非 RGS 结构域参与了细胞几乎所有信号传导的调控。RGS4 可作为多功能的支架蛋白组装有关的信号蛋白,从而调节信号传导[1]。研究表明,RGS4 参与了雌激素受体某些非基因组效应的调节[2]。糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)是激素核受体家族中的一个主要成员,同时也是一种重要的核转录因子,调控多种基因的激活和抑制,在机体的生命活动中具有重要作用[3]。研究发现,RGS4 与糖皮质激素经典核受体的相互作用可能是糖皮质激素受体介导的非基因组效应信号传导调节的重要机制。本研究通过构建 pGEX4T-1-RGS4 载体并确定其是否能在原核中高效表达,为采用 GST-pull down 方法研究 RGS4 与 GR 各个结构域之间的相互作用奠定基础。

基金项目:国家自然科学基金(30300423)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30300423)

作者简介:鞠辉明(1975-),男,江苏省泰兴市人,博士,讲师,主要从事动物基因工程和分子生物学方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(0514)87979081,E-mail: hymanju@gmail.com

通讯作者:陈星云,电话:(023)68757465,E-mail: xingyunchen@gmail.com

收稿日期:2007-03-26;**修回日期**:2007-06-25

1　材料与方法

1.1　实验材料和试剂

成年 SD 大鼠 10 只,体质量 220 g,清洁级,由第三军医大学实验动物中心提供。

pGEX4T-1 质粒、BAL DE3 菌株购自 Pharmacia 公司。*Xho* Ⅰ及 *Bam*HⅠ等各种限制性内切酶、T_4 连接酶、*Taq* 酶、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;Tripure 购自罗氏公司;PCR 产物纯化和胶回收试剂盒购自 V-gene 公司;质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司;HP 标记的兔抗山羊 IgG 购自博士德公司;山羊抗大鼠 RGS4 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;X 线片购自 Kodark 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2　RT-PCR 扩增目的基因

1.2.1　PCR 引物设计合成　　根据 GenBank(NM_017214)提供的基因序列和阅读框设计 PCR 引物,在上游引物和下游引物分别添加 *Xho* Ⅰ和 *Bam*HⅠ位点(下划线部分)。引物序列:上游:5′-ATTGGATCCATGTGCAAAGGACTCGCTGGTCTG-3′;下游:5′-ATACTCGAGTTAGGCACACTGAGGGACTAGGGAAG-3′。

1.2.2　RT-PCR 扩增及产物纯化　　Tripure 一步法提取 SD 大鼠肝脏组织中总 RNA,采用 RT-PCR 试剂盒扩增大鼠 RGS4 基因,反应完毕后,取 3 μl 反应产物,在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析。纯化试剂盒纯化 PCR 产物。

1.2.3　pGEX4T-1-RGS4 载体构建[4]　　将 PCR 产物和 pGEX4T-1 载体用 *Xho* Ⅰ、*Bam*HⅠ双酶切,分别用 PCR 产物和胶回收试剂盒回收,线性载体和 PCR 产物连接,取连接产物转化到 *E. coli* BAL DE3 感受态细胞中,37 ℃培养过夜。挑取转化菌落接种于 3 ml 含 Amp 的 LB 培养液中,37 ℃培养过夜。碱裂解法小量快速抽提质粒 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳分析,筛选出可能的质粒 DNA。用 *Bam*HⅠ/*Xho* Ⅰ双酶切鉴定可疑重组子。将酶切结果正确的质粒进行序列测定。

1.3　pGEX4T-1-RGS4 的诱导表达和表达鉴定

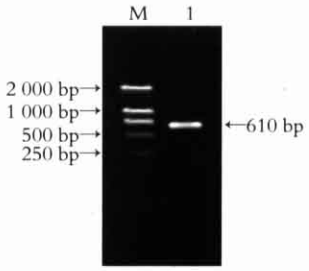
1.3.1　IPTG 原核诱导表达　　挑取 pGEX4T-1-RGS4 和 pGEX4T-1 的新鲜菌落分别接种到 Amp^+ 的 LB 中,37 ℃过夜培养。取 50 μl 过夜培养物接种到 5 ml 含 Amp 的 LB 中,37 ℃振荡培养 3 h 达到对数生长周期[$D(600)$为 0.6 ~ 0.8]。加入 5 μl IPTG(1 mmol/L)到 5 ml 培养物中,每隔 1 h 取出 1 ml 培养物,12 000 × g 离心 1 min,离心后弃上清,置于 -20 ℃冰箱冻存 1 h。取出冻存菌室温融解(即冻融破菌),加入 200 μl 溶菌液,加入 2 μl DNA 酶,室温孵育 30 min 后,16 000 × g 离心 40 min后待用,取 1 μl 上清与 2% 上样缓冲液混匀煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,40 V × 1 h,120 V × 3 h 后考马斯亮蓝染色 1 h,脱色液脱色 1 h 后观察蛋白电泳条带。采用 Labwork 软件分析整条泳道的积分光密度值作为总蛋白量,目标条带的积分光密度值占整条泳道总积分光密度值的比例即为其表达含量。

1.3.2　Western blot 检测融合蛋白 GST-RSG4 的表达　　将诱导表达的 pGEX4T-1 和 pGEX4T-1-RGS4 细胞裂解物 20 μl 样品,进行 12% SDS-PAGE 蛋白电泳,25 V 恒压转移 18 ~ 20 h。NC 膜置于 5% 脱脂奶粉的 PBS 中,室温下不停摇动约 4 h。完全封闭后,用 PBST 洗膜 3 次;然后加入山羊抗大鼠 RGS4 单克隆抗体,37 ℃反应 1 h,用 PBST 洗膜 3 次,再加入羊抗兔 IgG/HP 二抗,37 ℃反应 1 h。充分洗涤,ECL 试剂盒显色,覆盖 X 线片,暗室曝光。

2　结果

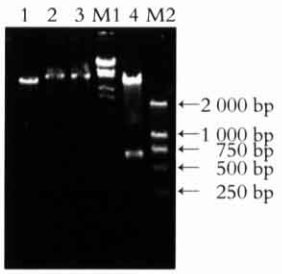
2.1　RGS4 基因编码区的扩增及重组质粒的鉴定

RGS4 基因编码区 RT-PCR 扩增获得目标产物(图 1)。重组质粒鉴定结果见图 2。重组 pGEX4T-1-RGS4 质粒的序列测定结果表明,重组质粒插入序列与 GenBank(NM_017214)中 RGS4 序列对比,序列正确,阅读框无移位。



M: DNA 标准(DL 2000);1: PCR 产物

图 1　rRGS4 基因 RT-PCR 扩增结果

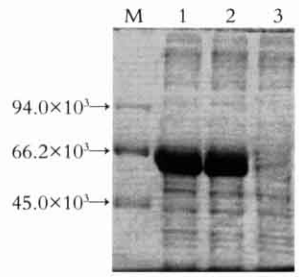


M1: λ*Eco*T14 Ⅰ标准; M2: 标准(DL 2000); 1: 环状 pGEX4T-1-RGS4; 2: *Xho* Ⅰ酶切; 3: *Bam*HⅠ酶切; 4: *Xho* Ⅰ和 *Bam*HⅠ双酶切

图 2　pGEX4T-1-RGS4 重组质粒鉴定

2.2　IPTG 诱导 pGEX4T-1-RGS4 原核表达

重组子转化 BL21 感受态细胞,经 IPTG 的诱导,可与 GST 以融合蛋白的形式高效表达。表达的融合蛋白的相对分子质量约为 50×10^3,同预期的大小一致,Labwork 软件灰度分析诱导表达蛋白约占总蛋白量的 84%(图 3)。

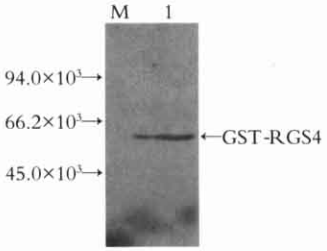


M: 蛋白质标准分子质量;1、2: 含重组质粒菌株诱导的表达产物;3: 空白对照

图 3　SDS-PAGE 分析重组质粒在 BL21 中 GST-RGS4 融合蛋白的表达

2.3 pGEX4T-1-RGS4 融合蛋白的鉴定

pGEX4T-1 的 GST 标签蛋白相对分子质量约为 26×10^3，RGS4 蛋白相对分子质量约为 24×10^3，因此表达的融合蛋合的相对分子质量约为 50×10^3，重组阳性菌中出现的融合蛋白带与预期融合蛋白相对分子质量相符。结果证实 pGEX4T-1-RGS4 在原核内表达产物为 50×10^3，与预期融合蛋白大小一致（图4）。



M：蛋白质标准分子质量；1：含重组质粒菌株表达的蛋白

图4 Western blot 鉴定 GST-RGS4 融合蛋白

3 讨论

pGEX4T-1 是一种较为高效的蛋白表达载体，具有以下优点：既可消除外源基因起始信号 ATG 周围核苷酸序列对其表达水平的影响，又能以融合形式表达蛋白，降低了对宿主细胞的毒性作用，有利于目的蛋白的高效表达，同时表达产品可以通过亲和层析法纯化，操作简单，用凝血酶即可进行酶切除去 GST，进而获得所需要的蛋白产品，这也说明了融合蛋白表达系统具有的优越性。pGEX 表达质粒其内部含有 trp 启动子和 LacUV5 启动子，用 IPTG 进行诱导，可表达目的蛋白[5]。另外，pGEX4T-1 上带有 GST 基因，紧随其后有一段多克隆位点（MCS）和终止序列，这为外源基因插入 MCS 后与 GST 构成融合基因带来便利。

外源基因在宿主菌中能否高效表达与外源基因本身的结构特点有关。影响表达量的因素是多方面的，就宿主和载体而言，存在着调控元件的影响，如启动子、SD 和 RBS 序列；载体在宿主中的复制能力以及外源蛋白在宿主中的稳定性等。用融合蛋白表达外源蛋白的优点就在于它能减少上述因素的不利影响的同时还能提高蛋白的稳定性，而事先装配于载体上的表达产物往往成为蛋白纯化的标记，由此方便了特异蛋白质的表达和提纯，如费希尔弧菌 luxR-GST 融合蛋白，人 HMGB1 基因等融合蛋白都是采用这种方式实现了成功表达[6-8]。

pGEX4T-1-RGS4 具有 GST-Tag 融合标签，表达相对分子质量约为 50×10^3 的融合蛋白（谷胱甘肽巯基转移酶GST-Tag相对分子质量约为 25×10^3），如果 GST-Tag 与外源基因融合后，就会增加所表达融合蛋白的可溶性，可以在不变性的条件下直接从细菌裂解物中提纯目的蛋白。在本实验中，将多肽 cDNA 与 GST 基因融合，重组质粒转化蛋白酶缺陷型大肠杆菌 BL-21（DE3）后，在生理温度（37 ℃）和 IPTG（1 mmol/L）诱导下，在裂解上清中得到了可溶的 GST-多肽融合蛋白，下一步可通过谷胱甘肽磁珠免疫亲和层析，简易方便地对融合蛋白进行纯化。

RGS 主要通过促进 GTP 酶的活性来调节 Gα 的功能。RGS4 是 RGS 家族的代表成员之一，参与了细胞几乎所有信号传导的调控。而糖皮质激素是肾上腺皮质分泌的甾体激素，具有调节免疫、代谢、渗透压、生长发育等多种生理和药理作用。本研究为采用酵母双杂交技术和 GST-pull down 技术研究 RGS4 与 GR 的相互作用奠定了基础，如能明确 RGS4 与 GR 之间可能的作用部位和 RGS4 在 GR 介导的非基因组效应中的可能作用机制，将可能为寻找糖皮质激素替代药物提供新的作用靶点和临床上更安全有效的使用糖皮质激素提供理论和实验依据。

参考文献：

[1] Ross E M, Wilkie T M. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins[J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69: 795-827.

[2] Chambliss K L, Shaul P W. Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae[J]. Steroids, 2002, 67(6): 413-419.

[3] Ishii M, Fujita S, Yamada M, *et al*. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Ca^{2+}/calmodulin competitively bind to the regulators of G-protein-signalling (RGS) domain of RGS4 and reciprocally regulate its action[J]. Biochem J, 2005, 385(Pt 1): 65-73.

[4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 金冬雁, 黎孟枫, 张德政, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 68-73.

[5] Amann E, Brosius J, Ptashne M. Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli* [J]. Gene, 1983, 25(2-3): 167-178.

[6] Manukhov I V, Kotova VIu, Zavil'genskii G B. Role of GroEL/GroES chaperonin system and Lon protease in regulation of expression Vibrio fischeri lux genes in *Escherichia coli* cells[J]. Mol Biol (Mosk), 2006, 40(2): 277-283.

[7] 刘洪波, 范学工, Wang H C, 等. 人 HMGB1 基因的克隆、融合表达与生物学活性[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(11): 20-23.

[8] 陈 婧, 袁志强, 彭毅志. 人高迁移率族蛋白的分子改建及原核表达[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 572-575.

（编辑 汪勤俭）