论著

文章编号:1000-5404(2008)03-0216-04

糖皮质激素受体结合域诱饵表达载体的构建及鉴定

郝 坡[1],刘北忠[1],欧阳峰[2],王东生[1],刘 畅[1],钟 梁[1],金丹婷[1],王 翀[1] ([1]重庆医科大学医学检验系临床生物化学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016;[2]广东省人民医院皮肤性病科实验室,广州 510000)

摘 要:目的 构建糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)结合域的诱饵表达载体。方法 RT-PCR扩增GR结合域,克隆入pMD18-T,测序正确后,再亚克隆入诱饵载体pGBKT7中,再把构建好的诱饵载体pGBKT7-GR转化到酵母AH109细胞中,并用Western blot分析诱饵蛋白的表达情况,同时检测诱饵蛋白的毒性和自激活作用。结果 成功扩增了GR结合域,并分别成功克隆到pMD18-T和pGBKT7中,测序结果正确。诱饵载体成功转化到酵母AH109细胞中,无毒性和自激活作用,Western blot分析结果也证实了酵母细胞高表达诱饵蛋白。结论 成功构建了GR结合域的酵母诱饵表达载体。

关键词:糖皮质激素受体结合域;诱饵载体;诱饵蛋白

中图法分类号:R394-33;R394.3;R977.11 文献标识码:A

Construction and identification of bait expression vector of glucocorticoid receptor binding domain

HAO Po[1], LIU Bei-zhong[1], OUYANG Feng[2], WANG Dong-sheng[1], LIU Chang[1], ZHONG Liang[1], JIN Dan-ting[1], WANG Chong[1] ([1]Department of Clinical Biochemistry, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2]Laboratory of Dermatology and Venerology, The People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510000, China)

Abstract: Objective To construct the bait expression plasmid pGBKT7-GR of glucocorticoid receptor (GR) binding domain. Methods The fragments of GR binding domain was amplified by RT-PCR, and then was cloned into pMD18-T. After being verified by sequencing, it was subcloned into the bait expression vector pGBKT7. Then the bait vector pGBKT7-GR was transformed into AH109 yeast cells and the expression of the bait protein was analyzed by Western blot. Toxicity and self-activation of the bait protein were detected. Results GR binding domain was amplified and cloned into pMD18-T and pGBKT7 successfully. The bait vector was transformed into AH109 yeast cells successfully, without toxicity or self-activation. The expression of the bait protein was confirmed by Western blot. Conclusion The successful construction of bait expression vector of glucocorticoid receptor binding domain lays the foundation for constructing small molecule ligand yeast three-hybrid system.

Key words: glucocorticoid receptor binding domain; bait expression plasmid; bait protein

糖皮质激素(glucocorticosteroid,GC)的生物学效应的发挥取决于靶细胞上的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)的介导。GR主要存在于细胞质中,是激素核受体的重要成员,也是一种重要的核转录因子,GR基因片段由转录调节域、DNA结合域及激素结合域组成。在富含丝-精氨酸蛋白p30(Serine -arginine rich protein p30,SRp30c)的参与下,GR前mRNA的不同剪接体形成糖皮质激素受体α亚单位(GRα)和β亚单位(GRβ)2种亚型[1]。GR可分为3个区:氨基末端激活功能域(AF-1)、DNA结合域与羧基端配体结合域(ligand binding domain,LBD)。LBD不但与GC结合,而且也参与了GR核移位及与其他转录因子的

基金项目:国家自然科学基金(30300449);国家中医药管理局基金(02-03ZP52)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30300449) and the State Administration of Traditional Chinese Medicine (02-03ZP52)

作者简介:郝 坡,男,河北省张家口市人,硕士研究生,主要从事中药抗肿瘤分子机制方面的研究。电话:(023)68574608,E-mail:hpo1979@126.com

通信作者:刘北忠,电话:(023)66645783,E-mail:liubeizhong@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-05-10 修回日期:2007-06-16

相互作用[2]。本研究通过构建 GR 受体的 LBD 诱饵表达载体,使其在酵母细胞中表达相应蛋白,从而通过 GR 与 GC 的结合,利用小分子配体酵母三杂交技术来筛选与杂合小分子配体相互作用的靶蛋白,旨在为建立小分子配体酵母三杂交系统奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

K562 细胞与 DH5α 细胞由本室保存;质粒小抽试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜;pMD18-T 载体、构建载体所需要的各种内切酶、T_4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、逆转录酶、各种 PCR 试剂和部分 DNA 标准购自 TaKaRa 公司;总 RNA 提取试剂盒、部分 DNA 标准购自上海生工;胎牛血清、1640 培养基购自 HyClone 公司;胰蛋白胨、酵母提取物、葡糖糖购自 Oxide 公司;pGBKT7-BD 克隆载体、AH109 酵母菌株、SD 基础培养基、各种缺陷培养基、X-α-gal 等购自 Clontech 公司;巯酸腺嘌呤、PEG、TE、LiAC、玻璃珠、蛋白酶抑制剂 Pepstatin A、Leupeptin、Benzamidine、Aprotinin 与 PMSF 均购自 Sigma 公司;DNA 结合域(BD)单克隆抗体购自 Clontech 公司;HRP-羊抗鼠多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;化学发光试剂盒购自 Viagene 公司;预染蛋白标准购自赛百胜公司;所需引物交上海生工生物技术公司合成。

1.2　方法

1.2.1　诱饵载体 pGBKT7-GR 的构建[3]

1.2.1.1　RT-PCR 扩增 GR 结合功能片段　　首先在 GenBank 中找到 GR(登录号为 X03225)的 mRNA 序列,全长 4 788 bp,其开放阅读框架为 2 334 bp,进一步分析它的结构发现其中 LBD 区域在与配体结合中发挥重要作用,应该是其功能域。通过培养 K562 细胞、提取总 RNA 后,进行 RT-PCR,RT-PCR 的引物设计为:上游 5′-ATGGATCCCAACTTGGAGGATCATG-3′;下游 5′-GGGTCGACGATTTTCAACCACTTCA-3′,其中在上游引物 5′端加入 *Bam*HⅠ酶切位点,下游引物 5′端加入 *Sal*Ⅰ酶切位点。采用宝生物公司二步法进行 RT-PCR。逆转录:首先 30 ℃保温 10 min,然后 42 ℃ 30 min,最后 99 ℃ 5 min 灭活逆转录酶活性。PCR 反应体系:10 × buffer 5 μl,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 4 μl,上下游引物(10 pmol/μl)各 2 μl,r*Taq* 酶 0.5 μl,ddH_2O 补充到 50 μl。PCR 扩增参数:预变性 94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s、56 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s,35 个循环,最后 72 ℃延伸10 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。

1.2.1.2　重组载体 pMD18-T-GR 的构建和转化　　PCR 产物纯化后,然后与 pMD18-T 在 16 ℃过夜连接,连接产物转化 DH5α 感受态细胞,将转化后的 DH5α 铺到涂有 60 μl 2% X-gal 和 50 μl 20% IPTG 的氨苄青霉素平板,进行蓝白斑筛选。37 ℃ 24 h 后挑取阳性克隆进行摇菌,提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定,阳性克隆进行测序。

1.2.1.3　重组载体 pGBKT7-GR 的构建和转化 DH5α　　转化 pGBKT7 到 DH5α 中,然后铺平板 LB(卡那霉素,50 μg/ml),37 ℃ 24 h 后挑取单个菌落进行摇菌,37 ℃ 250 r/min 摇 12 ~ 16 h 后提取质粒。紫外分光光度计测质粒浓度后用 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ对 pGBKT7 进行双酶切,同时对重组质粒 pMD18-T-GR 进行双酶切,37 ℃酶切 4 h 后,取 5 μl 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果,并将剩余酶切产物全部电泳进行胶回收,回收产物测浓度后按比例进行连接。16 ℃过夜后,将连接好的重组质粒转化 DH5α 感受态细胞。提取质粒 pGBKT7-GR,对重组质粒进行酶切分析和 PCR 鉴定。

1.2.1.4　重组载体 pGBKT7-GR 转化酵母 AH109 菌株及鉴定　　酵母感受态细胞制备和转化均参考 MACHMAKER Two-hybrid system3 User Manual 和 Yeast Protocols Handbook(Clontech)。先用 TE/LiAC 方法制备酵母 AH109 感受态细胞,然后用 PEG/LiAC 法将 pGBKT7-GR 转化到酵母 AH109 感受态细胞中。将转化有 pGBKT7-GR 的感受态细胞铺 SD/-Trp 平板,30 ℃培养 3 ~ 5 d,挑取 15 个直径在 2 ~ 3 mm 大小的菌落做菌落 PCR,同时作阴性对照,验证载体 pGBKT7-GR 是否已转化到 AH109 细胞中。

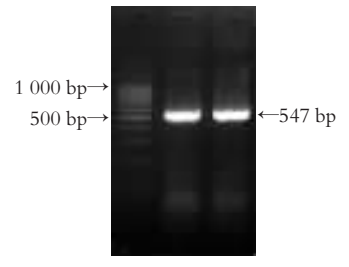
1.2.2　Western blot 分析诱饵质粒 pGBKT7-GR 的蛋白表达情况　　参照 Yeast Protocols Handbook(Clontech)中酵母蛋白提取部分来提取诱饵蛋白,然后将提取到的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,同时加预染的蛋白标准来标示目的蛋白的位置,电泳结束后,通过和预染蛋白标准进行比较,在相应的位置切胶,100 V转膜 1 h,5% 脱脂奶粉封闭过夜,封闭后用 DNA 结合域单克隆抗体在 37 ℃孵育 2 h,接着用 HRP 标记的羊抗鼠抗体在 37 ℃孵育 1 h,最后加入底物和显色剂,利用化学发光的方法来检测目的蛋白。

1.2.3　诱饵蛋白的毒性、渗漏和自激活的检测　　将转化有质粒 pGBKT7-GR 的 AH109 菌落与转化有空质粒 pGBKT7 的 AH109 菌落分别接种于 50 ml 的 SD/-Trp/kan 液体培养基中,30 ℃ 培养 24 h,用 722 分光光度计检测 *D*(600)值。通过比较两者的 *D*(600)值来判断诱饵蛋白是否具有毒性作用。同时将转化有质粒 pGBKT7-GR 的 AH109 菌液铺于 SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-gal、SD/-Trp/-His/X-α-gal 平板中,30 ℃培养 3 ~ 5 d 后观察平板的生长情况,检测诱饵蛋白的毒性、渗漏和有无自激活作用。

2　结果

2.1　GR 结合功能域的 PCR 扩增结果

我们成功扩增了 GR 的结合功能区,所扩增的条带大小和预期一致,结果见图 1。

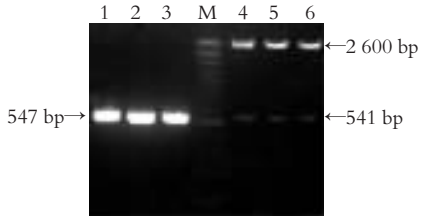


M:标准;1,2:GR 结合功能区片段

图 1　GR 结合域 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

2.2 重组载体 pMD18-T-GR 的双酶切鉴定

重组 pMD18-T-GR 载体经 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切可切出 541 bp 和 2 600 bp 的 2 个预期大小片段。将酶切鉴定阳性的重组质粒作为 PCR 模板，进行扩增，能扩增出 547 bp 的目的基因片段。见图 2。对重组载体 pMD18-T-GR 进行测序，采用 DNAsist 软件分析，结果显示 所克隆的基因片段无碱基错配现象，结果完全符合。

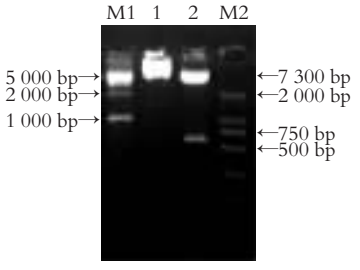


1－3 阳性克隆 PCR 结果；4－6 阳性克隆双酶切 *Bam*H Ⅰ&*Sal* Ⅰ；M 标准

图 2 重组质粒 pMD18-T-GR 的 PCR 及双酶切鉴定

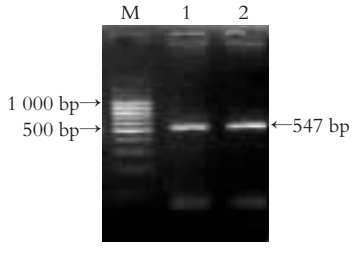
2.3 重组载体 pGBKT7-GR 双酶切分析和 PCR 鉴定

经 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切可切出 541、7 300 bp 2 个预期大小的片段。见图 3。将酶切鉴定阳性的重组质粒作为 PCR 模板，进行 PCR 扩增，能扩增出 547 bp 的目的基因片段，电泳结果见图 4。



1：pGBKT7-GR；2：pGBKT7-GR 双酶切 *Bam*H Ⅰ&*Sal* Ⅰ；M1，M2 标准

图 3 pGBKT7-GR 双酶切鉴定



1，2：PCR 片段；M 标准

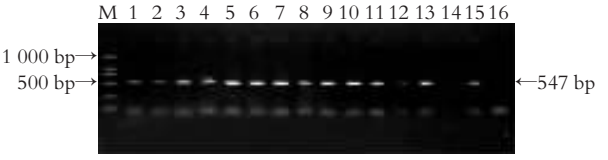
图 4 重组质粒 pGBKT7-GR PCR 鉴定

2.4 诱饵质粒 pGBKT7-GR 转化酵母细胞的菌落 PCR 鉴定

菌落 PCR 结果表明，诱饵质粒 pGBKT7-GR 已成功转化到酵母 AH109 细胞中（图 5）。

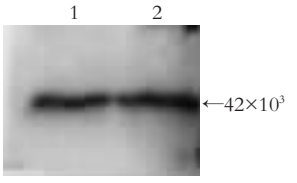
2.5 诱饵质粒 pGKBT7-GR 融合蛋白的表达情况分析

通过 Western blot 分析，诱饵质粒 pGKBT7-GR 融合蛋白的表达情况见图 6。我们可见条带相对分子质量为 42×10^3，与预期结果相一致，说明诱饵质粒在 AH109 酵母细胞中已成功表达，可用于下一步的实验。



1－15：15 个菌落的 PCR 产物；16：阴性对照；M 标准

图 5 诱饵质粒 pGBKT7-GR 转化酵母细胞后的菌落 PCR 分析



1，2：诱饵质粒 pGKBT7-GR 表达的融合蛋白

图 6 诱饵蛋白表达的 Western blot 分析

2.6 诱饵蛋白的毒性、渗漏和自激活检测结果

将转化有重组载体 pGBKT7-GR 的 AH109 克隆与转化有空 pGBKT7 的 AH109 克隆分别接种于 50 ml 的 SD/-Trp/kan 液体培养基，30 ℃培养 24 h，用 722 分光光度计检测 *D*（600）值。发现两者 *D*（600）值接近：转入空载体 AH109 的 *D*（600）为 0.845，转入重组载体 pGBKT7 的 AH109 的 *D*（600）为 0.823。根据 Clontech 的操作说明书，吸光度值大于 0.8 认为重组质粒没有毒性作用。将已转化好诱饵质粒 pGBKT7-GR 的 AH109 细胞接种于 SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-gal 和 SD/-Trp/-His/X-α-gal 的固体培养基上，30 ℃培养 3 d，观察结果，我们发现仅在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/X-α-gal 平板上长有菌落，菌落数大致相等，菌落形态基本一致，认为重组的 pGBKT7-GR 对酵母细胞无毒性作用。在 SD/-Trp/-His/X-α-gal 平板上没有菌落生长，认为重组质粒 pGBKT7-GR 无渗漏现象。同时 SD/-Trp/X-α-gal 平板中没有出现蓝色菌落，说明重组质粒 pGBKT7-GR 没有自激活作用。

3 讨论

蛋白与蛋白的相互作用是许多生命现象的基础。酵母双杂交系统（yeast two-hybrid system）是 1989 年 Fields 和 Song[3] 建立的，是近年来新发展起来的一种研究真核细胞中蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法。它是以酿酒酵母（*S. cerevisiae*）为宿主细胞。酵母的遗传能力及易操作性使得它可以低成本、高通量地评估蛋白与蛋白的相互作用。因此，酵母双杂交已成为探索活细胞内蛋白质相互作用最常用和最有力的工具。

传统酵母双杂交技术因其固有的局限性，不能检测蛋白质与非蛋白质物质的相互作用。酵母三杂交技术是在酵母双杂交技术基础上发展起来的一种筛选靶蛋白的新技术[4]。其基本原理就是通过转录因子 2 个

部分 DNA 结合域(简称 BD)和转录激活域(简称 AD),借助小分子杂合配体(A-B)与诱饵蛋白和靶蛋白特异的结合而重新组成具有转录活性的完整转录因子,从而启动报告基因的表达。Seay 等[5] 利用酵母三杂交技术筛选与 RNA 调节蛋白酿酒酵母 PUF 蛋白即 Mptsp 蛋白相互作用的 mRNA,共筛选到 10 种不同的 mRNA 分子,同样利用逆三杂交技术验证了每种 mRNA分子都和 Mptsp 蛋白发生相互作用。因此,本研究就是构建酵母三杂交技术中的诱饵表达载体,通过小分子配体和诱饵蛋白的作用,来筛选能与小分子配体发生作用的靶蛋白。

GC 是一种脂溶性小分子化合物,容易穿过细胞膜、核膜,与核内 GR 结合,启动靶基因转录。同时 GC 易与其他小分子化合物形成小分子配体,国外已经用此类似方法用于酵母三杂交系统[6]。GR 属细胞内核受体超家族中的一员,是一种配基依赖型转录因子。GR 几乎在机体的所有有核细胞中表达,在很多生理以及病理过程中发挥重要作用,包括维持内环境的稳定、细胞分化、糖的吸收、脂质代谢、抗应激、调节神经系统的功能等。另外,GC 的抗炎、抗自身免疫和抗肿瘤的作用也是由 GR 介导的。因此,GR 也是重要的免疫系统调节因子。通过调节 GR,可以对机体和细胞的生理、病理状态产生重要影响[7-10]。

我们通过 GenBank 未检索出酵母细胞有 GR 基因,因此可以构建 GR 结合域功能片段的诱饵表达载体,从而通过酵母三杂交技术筛选与小分子配体相互作用的靶蛋白。我们通过 RT-PCR 方法扩增了 GR 结合域功能片段,并通过和 pMD18-T 连接成 pMD18-T-GR 重组载体,对重组载体进行酶切、测序和比对,证实了 GR 已经被正确地克隆入 pMD18-T 中。我们进一步又构建了酵母诱饵表达载体 pGBKT7-GR,酶切和 PCR 结果都证明重组载体 pGBKT7-GR 已经构建成功。将诱饵载体成功转化到酵母 AH109 细胞中,在 SD/-Trp 的平板上生长良好,说明诱饵载体对 AH109 细胞无细胞毒性作用。和其他蛋白表达系统一样,酵母杂交系统表达也存在一定的不确定性,其主要一个原因是诱饵蛋白对于报告基因的自激活作用。为了检测诱饵蛋白有无自激活作用,我们把转化有重组载体 pGBKT7-GR 的 AH109 细胞,铺到 SD/-Trp/X-α-gal 的平板上,发现有菌落生长,但是并没有蓝色的菌落出现,这说明诱饵蛋白并没有自激活作用,不能激活报告基因的表达,可以用于下一步的筛选实验。另外,我们还要检测诱饵蛋白的渗漏,转化有诱饵载体的酵母细胞不应该在 SD/-Trp/-His 的平板上生长,一旦有生长就说明诱饵蛋白有渗漏现象,这种现象可以被 3-AT 抑制,3-AT 是 His3 蛋白的竞争性抑制剂,可以抑制 His3 蛋白的表达。我们同样把转化有诱饵载体的酵母细胞铺于 SD/-Trp/-His/X-α-gal 的平板上,发现没有细菌生长,说明我们构建的诱饵载体没有渗漏现象。载体 pGBKT7 上有 BD(DNA 结合域),我们通过 BD 区和目的基因 GR 连接起来,共同表达 BD 融合蛋白,其相对分子质量大约为 42×10^3,通过 Western blot 分析证实 BD 融合蛋白在酵母细胞中高表达,表明酵母诱饵表达载体 pGBKT7-GR 可以用于酵母交配实验。

综上所述,我们已成功构建了 GR 结合域诱饵载体。GR 结合域诱饵表达载体的成功构建,为进一步建立酵母三杂交系统,用于在活细胞内筛选与小分子配体相互作用的靶蛋白奠定了基础。

参考文献:

[1] Xu Q, Leung D Y, Kisieh K O. Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils[J]. J Biol Chem, 2003, 278(29):27112-27118.

[2] Bledson R K, Stewart E L, Pearce K H. Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain[J]. Vitam Horm, 2004, 68:49-91.

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

[4] Licitra E J, Liu J O. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(23):12817-12821.

[5] Seay D, Hook B, Evans K, *et al*. A three-hybrid screen identifies mRNAs controlled by a regulatory protein[J]. RNA, 2006, 12(8):1594-1600.

[6] Baker K, Bleczinski C, Lin H, *et al*. Chemical complementation: a reaction-independent genetic assay for enzyme catalysis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(26):16537-16542.

[7] Charmandari E, Kino T, Chrousos G P, *et al*. Familial/sporadic glucocorticoid resistance: clinical phenotype and molecular mechanisms[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1024:168-181.

[8] Chrousos G P, Charmandari E, Kino T, *et al*. Glucocorticoid action networks--an introduction to systems biology[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(2):563-564.

[9] 张　方,钱桂生,吴学玲,等. 人糖皮质激素受体变异体 cDNA 序列克隆和表达及其活性研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(1):50-52.

[10] 李月白,胡新永,王义生. 辛伐他汀对糖皮质激素性骨质疏松大鼠骨代谢的影响[J]. 郑州大学学报 医学版, 2006, 41(2):269-272.

(编辑　郭建秀)