维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0394-05

人 HL-60 细胞 GRα-LBD 诱饵表达载体的构建和鉴定

钟 梁,郝 坡,刘北忠,王东生,刘 畅,金丹婷,王 翀,王春光

(重庆医科大学临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建糖皮质激素(Glucocorticoid,GC)受体 α 配体结合域(GRα-LBD)的诱饵表达载体,为小分子配体酵母三杂交系统的建立奠定基础。方法:RT-PCR 扩增 HL-60 细胞的 GRα-LBD,克隆入诱饵载体 pGBKT7 中,测序正确后,再把构建好的诱饵载体 pGBKT7-GRα-LBD 转化到酵母 AH109 细胞中,提取酵母蛋白,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 GRα-LBD,并成功亚克隆到 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 分析也证实了酵母细胞高表达诱饵蛋白。结论:成功构建了 GRα-LBD 酵母诱饵表达载体,为建立小分子配体酵母三杂交系统奠定了基础。

【关键词】HL-60;GRα-LBD;诱饵载体;诱饵蛋白

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-05

Construction and identification of the bait expression vector of GRα-LBD of human HL-60 cell

ZHONG Liang,et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics,Ministry of Education,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To construct the bait expression plasmid pGBKT7-GRα-LBD of glucocorticoid receptor ligand binding domain in order to lay the foundation for constructing small molecule ligand yeast three-hybrid system. *Methods*:A fragment of GRα-LBD of human HL-60 cell was amplified by RT-PCR,and then was subcloned into the bait expression vector pGBKT7. After verified by sequencing, the bait vector pGBKT7-GRα-LBD was transfected into AH109 yeast cells. And the expression of the bait protein was analyzed by Western-blotting. Toxicity and self-activation of the bait protein were detected simultaneously. *Results*:GRα-LBD was amplified and cloned into pGBKT7 successfully. The bait vector was transformed into AH109 yeast cells successfully, and no toxicity and self-activation were found. The expression of the bait protein was confirmed by western blot. *Conclusion*:The bait expression vector pGBKT7-GRα-LBD was constructed successfully,which lays the foundation for constructing small molecule ligand yeast three-hybrid system.

【Key words】 Human HL-60 cell;GRα binding domain;Bait vector;Bait protein

GC 是具有抗炎和免疫抑制作用的甾体激素,在控制某些慢性炎症和免疫性疾病方面具有较好疗效。GC 是通过与其受体作用来发挥其生物活性。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。它与配基结合后,由胞浆进入胞核,从而发挥它的转录调控作用。GR 基因片断由转录调节域、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]。GRα 是经典的糖皮质激素的配体结合蛋白,与激素结合后调节糖皮质激素应答基因的表达,而 GRβ 不能结合糖皮质激素,也没有转录激活作用。GRα 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

作者介绍:钟 梁(1972-),女,硕士,实验师,研究方向:白血病分子机制研究。

通讯作者:刘北忠,男,副教授,E-mail: liubeizhong@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目(No.30300449),国家中医药管理局基金项目(No.02-03ZP52),重庆医科大学校级课题(No.XBYB2007104,No.XBYB2007108)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

相互作用[2]。本研究就是通过构建 GR 受体的 LBD 的诱饵表达载体,使其在酵母细胞中表达相应蛋白,从而通过糖皮质激素受体与糖皮质激素的结合,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。

1 材料和方法

1.1 材料

HL-60 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;PrimeScript™ 1st Strand CDNA Synthesis Kit、构建载体所需要的 T4 连接酶、Taq 酶、各种 PCR 试剂和 DNA Marker 购自 Takara 公司;限制性内切酶购自 Promega 公司;Trizol 购自 invitrogen;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;硫酸腺嘌呤、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 Marker 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-LBD 的构建

1.2.1.1 RT-PCR 扩增糖皮质激素受体(GRα)结合功能片断 首先在 GeneBank 中找到 GRα 的 mRNA 序列,全长 4 788 个 bp,其 ORF 为 2 334 个 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 HL-60 细胞、提取总 RNA 后,进行 RT-PCR,RT-PCR 的引物设计如下:

上游引物:5'-CATGCCATGGTTACCACAACTCACCCCTAC-3';

下游引物:5'-CGCGGATCCCGACTTTCTTTAAGGCAACC-3';

其中在上游引物 5'端加了 *Nco* Ⅰ酶切位点,下游引物 5' 端加了 *BamH* Ⅰ酶切位点。逆转录反应参照宝生物 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书:首先 70℃保温 10min,然后 42℃ 60min,最后 70℃ 15min。PCR 反应体系:10×buffer 2μl,dNTP Mixture(各 2.5mmol/L) 2μl,Mg^{2+} 2μl,上下游引物(10pmol/μl)各 1μl,cDNA 2μl,rTaq 酶 0.3μl,ddH_2O 补充到 20μl。PCR 扩增参数:预变性 94℃ 5min,94℃ 30s、58℃ 30s、72℃ 1min,35 个循环,最后 72℃延伸 10min。用 2%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。

1.2.1.2 重组载体 pGBKT7-GRα-LBD 的构建和鉴定 转化 pGBKT7 到 DH5α 中,然后铺板 LB(卡那霉素,50μg/ml),37℃ 24h 后挑取单个菌落进行摇菌,37℃ 250r/min 摇 12~16h 后提质粒。紫外分光光度计测浓度后用 *Nco* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ对 pGBKT7 进行双酶切,同时对 GRα-LBD 扩增产物进行双酶切,37℃酶切 4h 后,取 5μl 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。37℃孵育 18~24h 后,挑取直径在 2~3mm 的菌落进行菌落 PCR,同时加阴性对照。对 PCR 阳性的菌落进行摇菌、提取质粒,然后进行酶切分析。酶切分析正确后,送阳性质粒去测序。

1.2.1.3 重组载体 pGBKT7-GRα-LBD 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 system 3 User Manual 和 Yeast Protocols Handbook(Clontech)。简述如下,先用 TE/LiAC 方法制备酵母 AH109 感受态细胞,然后用 PEG/LiAC 法将 pGBKT7-GRα-LBD 转化到酵母 AH109 感受态细胞中。将转化有 pGBKT7-GRα-LBD 的感受态细胞铺 SD/-Trp 平板,30℃培养 3~5d,挑取直径在 2~3mm 大小的菌落做菌落 PCR 来验证载体 pGBKT7-GRα-LBD 是否已转化进 AH109 细胞中。

1.2.2 Western blot 分析诱饵质粒 pGBKT7-GRα-LBD 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。然后将提到的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,同时加预染的蛋白 marker 来标示目的蛋白的位置,电泳结束后,通过和预染蛋白 marker 进行比较,在相应的位置切胶,100V 转膜 1h,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 2h,接着用 HRP 标记的羊抗鼠抗体在 37℃孵育 1h,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-GRα-LBD 的 AH109 菌落与转化有空质粒 pGBKT7 的 AH109 菌落分别接种于 50ml 的 SD/-Trp/kan 液体培养基,30℃培养 24h,用 722 分光光度计检测 A_{600} 值。通过比较两者的 A 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-GRα-LBD 的 AH109 菌液铺 SD/-Trp,SD/-Trp/X-α-gal,SD/-Trp/-His/X-α-gal,30℃培养 3~5d 后观察平板的生长情况来检测诱饵蛋白的毒性、渗漏和有无自激活作用。

2 结 果

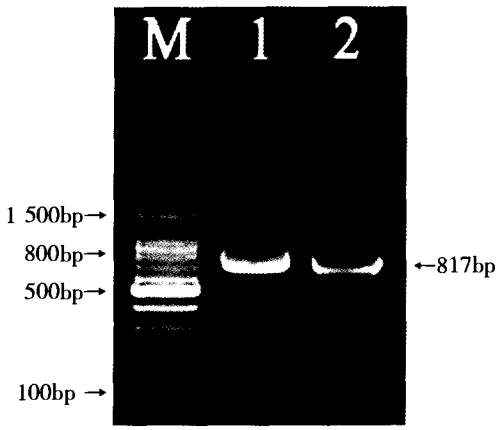
2.1 GRα-LBD 的 PCR 扩增与电泳分析

成功扩增了 GRα-LBD,所扩增的条带大小和预期一致,结果见图 1。

2.2 重组载体 pGBKT7-GRα-LBD 的 PCR 鉴定和双酶切分析

从转化了重组载体 pGBKT7-GR-LBD 的 LB 平

维普资讯 http://www.cqvip.com



M. 分子量标准;1~2. PCR 产物

图 1 GRα -LBD 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

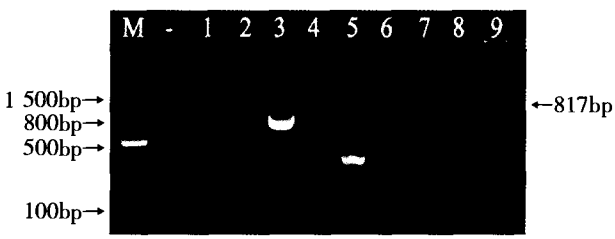
板上挑取 9 个菌落进行菌落 PCR (条件和体系如前),仅编号为 3 的菌落是阳性,结果见图 2。然后提取菌落 3 的质粒,并进行酶切分析,酶切结果见图 3。酶切分析正确后,送阳性质粒测序,测序结果见图 4。

2.3 诱饵质粒 pGBKT7-GRα-LBD 转化酵母 AH109 细胞的菌落 PCR 鉴定

酵母菌落 PCR 结果表明诱饵质粒 pGBKT7-GRα-LBD 已成功转化到酵母 AH109 细胞中,见图 5。

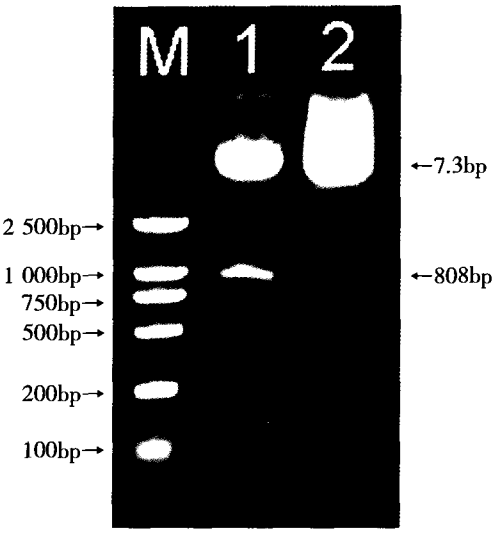
2.4 诱饵质粒 pGKBT7-GRα-LBD 融合蛋白的表达情况分析

通过 Western blot 分析,诱饵质粒 pGKBT7-GRα-LBD 融合蛋白的表达情况,见图 6。可见,条



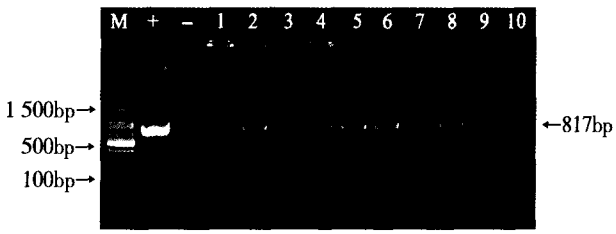
M. 分子量标准;(-). 阴性对照;1~9. 菌落

图 2 重组载体 pGBKT7-GRα-LBD 的菌落 PCR 分析



M.分子量标准;1. pGBKT7-GRα-LBD 质粒双酶切产物;2. pGBKT7-GRα-LBD 质粒

图 3 pGBKT7-GRα-LBD 双酶切(*Nco* Ⅰ & *BamH* Ⅰ)图谱



M. 分子量标准;(+). 阳性对照;(-). 阴性对照;1~10. 菌落 PCR 产物

图 5 诱饵质粒 pGBKT7-GRα-LBD 转化酵母 AH109 细胞后的菌落 PCR 分析

带大小约在 48ku 左右,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,可用于下一步的试验。

2.5 诱饵蛋白的毒性、渗漏和自激活检测

将转化有重组载体 pGBKT7-GRα-LBD 的 AH109 克隆与转化有空 pGBKT7 的 AH109 克隆分别接种于 50ml 的 SD/-Trp/kan 液体培养基,30℃培养 24h,用 722 分光光度计检测 A_{600} 值。发现两者 A_{600} 值接近:转入空载体 AH109 的 A_{600} 为 0.878,转

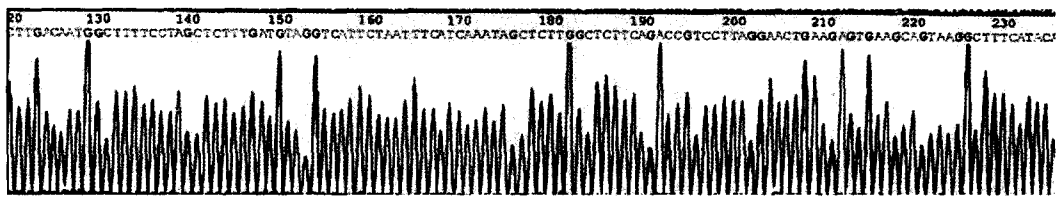
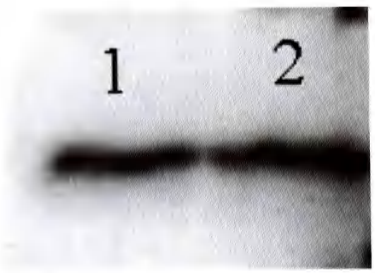


图 4 重组载体 pGBKT7-GRα LBD 的部分测序结果

维普资讯 http://www.cqvip.com



1~2. 诱饵质粒 pGKBT7- GRα-LBD 表达的融合蛋白

图 6 诱饵蛋白表达的 Western Blot 分析

入重组载体 pGBKT7 的 AH109 的 A_{600} 为 0.817，根据 Clontech 的操作说明书，A 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-GRα-LBD 的 AH109 细胞接种于的 SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-gal 和SD/-Trp/-His/X-α-gal 的固体培养基上，30℃倒置培养 3d，观察结果，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-GRα-LBD 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-GRα-LBD 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-GRα-LBD 没有自激活作用(见图 7)。

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 等[3]人建立的，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相互作用。因此，酵母双杂交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[4]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。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 D 等[5]利用酵母三杂交技术筛选与 RNA 调节蛋白 S. cerevisiaePUF 蛋白即 Mptsp 蛋白相互作用的 mRNA，共筛选到 10 种不同 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。

糖皮质激素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。同时糖皮质激素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[7]。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，糖皮质激素的抗炎、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[8,9]。

我们通过 GeneBank 未检索出酵母细胞有 GR



图 7 诱饵载体 pGBKT7- GRα -LBD 在SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-gal、SD/-Trp/-His/X-α-gal 平板上的生长情况

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因,因此可以构建 GRα-LBD 功能片断的诱饵表达载体,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 GRα-LBD 功能片断,并通过对重组载体进行酶切、测序和比对,证实了 GRα-LBD 已经被正确的克隆入 pGBKT7 中,表明重组载体 pGBKT7-GRα-LBD 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-GRα-LBD 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,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 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,其分子量大约为 48ku 左右,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-GRα-LBD 可以用于酵母交配实验。

上述实验表明,本实验已成功构建了 pGBKT7-GRα-LBD 诱饵表达载体。pGBKT7-GRα-LBD 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 DY,Kisich KO. 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] Bledsoe RK,Stewart EL,Pearce KH. 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 EJ,Liu JO. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 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 USA,2002;99(26):16537-16542.

[7] 周进明,梁后杰,边志衡,等.糖皮质激素受体 αsiRNA 真核表达载体的构建与鉴定[J]. 重庆医学,2007;36(19):1932-1934.

[8] Charmandari E,Kino T,Chrousos GP. Familial/sporadic glucocorticoid resistance:clinical phenotype and molecular mechanisms[J]. Ann N Y Acad Sci,2004;1024:168-181.

[9] Chrousos GP,Charmandari E,Kino T. Glucocorticoid action networks-an introduction to systems biology[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004;89(2):563-564.

(责任编辑:关蕴良)