维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0257-04

酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-PML-V 的构建、表达及鉴定

钟 梁,王 翀,刘北忠,王东生,郝 坡,刘 畅,金丹婷,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:构建早幼粒细胞白血病基因变异蛋白(Promyelocytic leukemia,PML-V)的诱饵表达载体,为应用酵母双杂交系统(Yeast two-hybrid system)筛选与 PML-V 相互作用的蛋白建立实验基础。方法:PCR 扩增 PML-V,克隆入诱饵载体 pGBKT7 中,经测序鉴定后,将构建好的诱饵载体 pGBKT7- PML-V 转化到酵母细胞 AH109 中,并利用蛋白印迹法(Western Blotting)分析诱饵蛋白的表达情况。同时检测诱饵蛋白有无毒性、渗漏和自激活作用。结果:成功扩增了 PML-V 基因片断,并克隆入 pGBKT7 中,测序结果正确。诱饵载体成功转化到酵母细胞 AH109 中,诱饵蛋白无毒性、渗漏和自激活作用,Western Blotting 分析证实酵母细胞表达诱饵蛋白。结论:成功构建了 PML-V 结合域的酵母诱饵表达载体,为进一步运用酵母双杂交技术筛选与之相互作用的蛋白奠定了基础。

【关键词】PML 变异蛋白;质粒构建;诱饵蛋白

【中国图书分类法分类号】R733.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-23

Construction, expression and identification of yeast two-hybrid bait vector pGBKT7-PML-V

ZHONG Liang,et al

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

【Abstract】*Objective*:To construct the bait expression vector pGBKT7-PML-V of retinoic acid receptor variant protein,for screening the target proteins interacting with the bait protein through the yeast two-hybrid system. *Methods*:The fragments of PML-V binding domain was amplified by PCR,and then was cloned into the bait expression vector pGBKT7. After being verified by sequencing,the bait vector pGBKT7-PML-V was transformed into AH109 yeast cells. Then the expression of the bait protein was analyzed by Western Blotting. Toxicity,leakage and self-activation of the bait protein were detected. *Results*: PML-V was amplified and cloned into pGBKT7 successfully. The bait vector was transformed into AH109 as well and no toxicity and self-activation were found. The expression of the bait protein was confirmed by Western Blotting. *Conclusion*:The bait expression vector of PML-V was constructed successfully,which layed the foundations for screening target proteins interacting with the bait protein using the yeast two-hybrid technique.

【Key words】PML-V;Vector construction;Bait protein

PML 和维甲酸受体(RARα)融合形成 PML-RARα或 RARα-PML 融合基因,在急性早幼粒细胞性白血病的发生发展中起重要作用。近来有研究表明[1]PML-RARα 在早期骨髓细胞的活性依赖于中性白细胞弹性蛋白酶 (Neutrophil elastase,NE),NE 可将此蛋白切割成 53ku 和 69ku 大小的 2 种蛋白,而影响其功能。其酶切产物的具体作用机制不详,2 种蛋白的功能目前国内外还没有研究。

本实验利用特异性引物扩增 PML-RARα 融合基因中含 PML 基因序列的一段,不同于野生型 PML 蛋白,命名为 PML-V,构建酵母双杂交诱饵表达载体 pGBKT7-PML-V,使其在酵母细胞中表达,为利用酵母双杂交系统进一步寻找与其相互作用的蛋白,为探讨其作用机制奠定基础。

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)。

1 材料和方法

1.1 材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

PML-RARα 融合蛋白质粒 pCDNA3.1-PML-RARα 由美国华盛顿大学 Andrew A. Lane 教授惠赠；大肠杆菌 DH5α 菌株(本室冻存)；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；限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ，*Sal* Ⅰ、T4 连接酶、高保真酶 Primerstar、PCR 试剂及 DNA marker 购自 TaKaRa 公司；胰蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖购自美国 Oxide 公司；pGBKT7-BD 克隆载体、酵母转化试剂盒、BD 单克隆抗体、酵母菌株 AH109、SD 基础培养基、完全极限培养基、X-α-gal 等购自美国 Clontech 公司；硫酸腺嘌呤、TE、LiAC、玻璃珠、蛋白酶抑制剂 Pepstatin A、Leupeptin、Benzamidine、Aprotinin 及 PMSF 为美国 Sigma 公司产品；HRP- 羊抗鼠多克隆抗体为美国 Santa 公司产品；化学发光试剂盒中国 Viagene 公司生产；预染蛋白 Marker 北京赛百胜公司生产；所需引物交由上海生工生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 的构建

1.2.1.1 重组质粒 pGBKT7-PML-V 的构建和转化 DH5α 在 pCDNA3.1-PML-RARα 质粒中，将其上游 PML-V 序列作为目的基因设计引物：

上游引物：5'-CCGAATTCCCCACCATGC-3'

下游引物：5'-ACTGTCGACACCACAGCCATAGG-3'。

分别在上游引物 5'端，下游引物 5'端引入限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切位点，预期扩增产物长度为 1 285bp。PCR 反应体系及参数为：5×buffer 4μl、dNTP 2.5μm、上下游引物各 10pmol、高保真酶 Primerstar0.6U、模板 DNA100ng、ddH_2O 补至 20μl；预变性 98℃5min；98℃15s，58℃40s，72℃ 1.5min，35 个循环；72℃10min。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳，电泳后胶回收试剂盒回收目的条带，并测定浓度。

用 *EcoR* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶对 PCR 产物双酶切 4h，酶切体系：PCR 产物 1μg，*EcoR* Ⅰ酶 1μl，*Sal* Ⅰ酶 1μl，H buffer 2μl，ddH_2O 补至 20μl。1.5%琼脂糖凝胶电泳进行胶回收，该片段与同样双酶切回收后的 pGBKT-7 载体测浓度后按 1:15 的比例于 16℃过夜连接，转化至大肠杆菌(DH5α)感受态细胞。铺含卡那霉素(30μg/ml)的 LB 平板培养，37℃培养 24h 后挑取单克隆进行摇菌，提质粒进行酶切鉴定，阳性克隆测序鉴定。

1.2.1.2 重组质粒 pGBKT7-PML-V 转化酵母 AH109 菌株及鉴定 制备酵母 AH109 感受态细胞 (TE/LiAC 法)，用 PEG/LiAC 法将 pGBKT7-PML-V 转化入酵母感受态细胞 AH109。将转化有 pGBKT7-PML-V 的感受态细胞铺色氨酸缺陷平板(SD/-Trp)，30℃培养 3~5d，挑取直径在 2~3mm 大小的菌落进行菌落 PCR、质粒提取以验证重组载体是否已转化进 AH109 细胞。

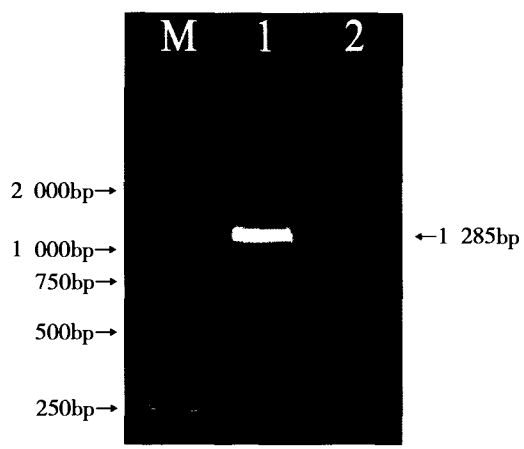
1.2.2 诱饵蛋白的毒性、渗漏和自激活的检测 分别挑取转化了空质粒 pGBKT7 和转化了诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 的单克隆，于 5ml SD/-Trp 液体培养基中 30℃振摇培养 15h；次日取 2ml 过夜菌移至 20ml 相同培养基中继续振摇培养 3h，测 600nm 的吸光度值 A_{600}，以了解诱饵蛋白是否有毒性作用。将转化有质粒 pGBKT7-PML-V 的菌液分别铺 SD/-Trp/X-α-gal，SD/-His/-Trp/X-α-gal，SD/-Ade/-Trp/X-α-gal，SD/-Trp/-Leu 培养基平板，30℃培养 3~5d 后观察平板上菌落的生长情况来检测诱饵蛋白有无毒性、渗漏和自激活作用。

1.2.3 蛋白质印迹技术分析诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 的蛋白表达情况 参照酵母操作手册(Yeast Protocols Handbook，Clontech) 中酵母蛋白提取部分来提取诱饵蛋白。然后进行 SDS-PAGE 电泳，湿转 100V 1.5h，封闭过夜后依次加入一抗(抗 BD 单克隆抗体，37℃ 2h)，二抗(羊抗鼠，37℃ 1h)，充分洗涤后化学发光法检测目的条带。

2 结 果

2.1 PML-V 基因的扩增

成功扩增出 PML-V 片段。图 1 为 PCR 扩增产物，电泳可见 1 285bp 左右的扩增条带，与预计大小吻合。



1~2. PCR 产物；M. DL-2000 marker

图 1 PML-V 基因片段 PCR 电泳结果

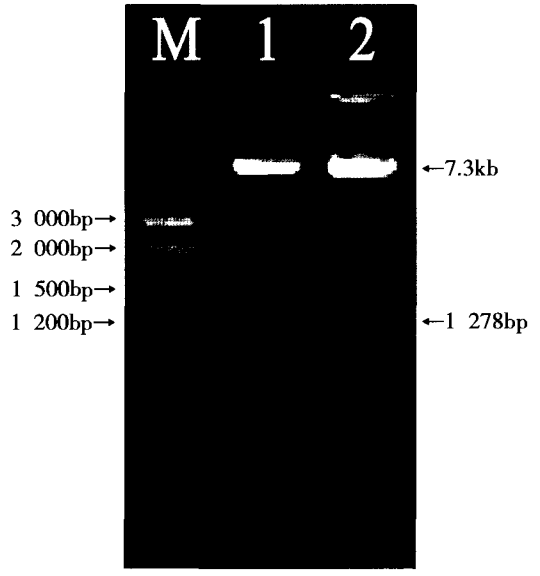
2.2 诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 的酶切分析和鉴定

经 *EcoR* Ⅰ和 *sal* Ⅰ双酶切得到 1 278bp 与 7.3kbp 预期大小的 2 个片段。电泳结果见图 2。测序结果显示扩增的基因片段与预期完全相符。

2.3 诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 转化 AH109 的菌落 PCR 鉴定

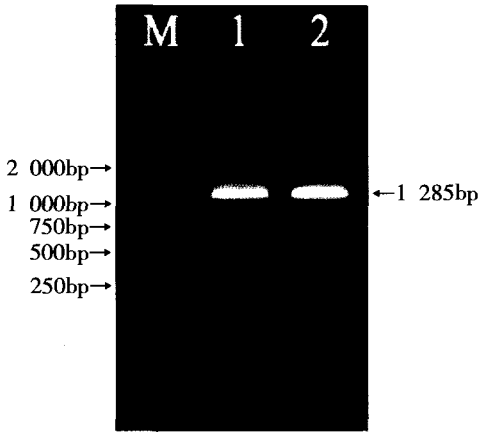
将 SD/-Trp 平板上生长的阳性克隆作为 PCR 模板，进行 PCR 扩增，扩增出 1 285bp 的目的基因片段，电泳结果见图 3。菌落 PCR 结果表明与目的片段大小一致，诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 已成功转化到酵母 AH109 细胞中。

维普资讯 http://www.cqvip.com



M. marker; 1. pGBKT7 空载体;
2. pGBKT7-PML-V 的酶切分析

图 2 诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 的双酶切分析图谱



M. marker; 1、2. PCR 产物

图 3 pGBKT7-PML-V 重组质粒转入酵母细胞菌落的 PCR 鉴定

2.4 诱饵蛋白的毒性、渗漏和自激活检测

A_{600} 值:转入空载体 AH109 的 A_{600} 为 0.818,转入诱饵质粒的 AH109 的 A_{600} 为 0.812,根据 Clontech 的操作说明书,A 值大于 0.8 认为诱饵质粒没有毒性作用。

仅在 SD/-Trp/X-α-gal 平板上生长白色克隆,在 SD/-Trp/-His/X-α-gal 平板上没有克隆生长,认为诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 无渗漏。

同时 SD/-Trp/X-α-gal 平板中没有出现蓝色克隆,在 SD/-Ade/-Trp/X-α-gal 平板上没有克隆生长,说明诱饵质粒 pGBKT7-PML-V 没有自激活作用。

2.5 蛋白质印迹分析 PGKBT7-PML-V 融合蛋白的表达

通过 Western Blotting 分析,诱饵质粒 PGKBT7-PML-V 融合蛋白的表达情况见图 4。可见,条带大小在 68ku 左右,与预期结果相一致,说明诱饵质粒在 AH109 酵母细胞中能稳定表达。

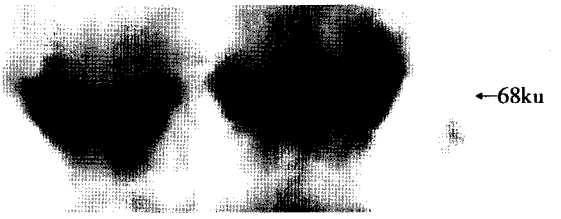


图 4 诱饵蛋白的 Western Blotting 分析

3 讨 论

急性早幼粒细胞白血病中,常发生特征性的染色体易位 $t(15:17)(q22\sim23;q12\sim21)$,该易位使 15q22 中的 PML 基因与 17q12~21 中的 RARα 基因融合,产生 2 个融合基因:PML/RARα 或 RARα/PML,二者分别见于 $t(15:17)$阳性患者的 100%和 67%[2]。正常 PML 是一种磷酸化蛋白,其氨基端具有一个锌指结物,和丝氨酸以磷酸化形式存在。PML 具有生长抑制作用,是一个启动子特异性的转录抑制因子,PML 可使细胞周期 G_1 期延长进而延长细胞周期。可上调 P53 和 P21 的表达,使 Rb 蛋白磷酸化,Rb 蛋白可启动细胞由 G_1 期进入到 S 期;所以很显然 PML 是通过调控几种细胞周期的关键蛋白的表达来控制细胞生长。PML-RARα 融合蛋白可显性失活野生型 PML 的功能和干扰正常 RARα 信号传导。细胞内定位与正常的 PML 不同,它以一种小的多颗粒方式分布于细胞核周的胞浆中,这种异常定位也许与 M3 的发生有关[3]。

PML-RARα 在急性早幼粒细胞白血病的发病中起着关键性的作用。在其相关研究结果中 Lane 等发现[1],在不同的白血病细胞系中,PML-RARα 蛋白的命运是完全不一样的。在急性单核细胞白血病细胞系来源的 U937 细胞中,它被切割成 53ku 和 69ku 大小的 2 种蛋白质,而在慢性粒细胞来源的人红白血病体外细胞系 K562 细胞中,却保持了PML-

维普资讯 http://www.cqvip.com

RARα 蛋白的完整性，这一主要差别由 NE 引起，U937 细胞中含有 NE，而 K562 细胞中却没有。

NE 为骨髓来源的丝氨酸蛋白酶，白细胞、巨噬细胞、肥大细胞内都存在着这种酶，中性粒细胞中其含量很高，早幼粒细胞中高表达，NE 与 bcr-1 型 PML-RARα 在早期骨髓细胞中的许多活性有关[4,5]。可通过 PML 羧基端结构域识别融合蛋白中的切割位点，而将其裂解为两部分而产生广泛影响。PML-RARα 在 U937 细胞中作为 NE 的作用底物，被裂解成 2 段约为 53ku 和 69ku 大小的蛋白，而裂解产物的作用机制不明[6]，因此研究此裂解产物的相互作用蛋白对探讨其分子作用机制有积极意义。含 PML 端蛋白质比正常的 PML 短，与正常的PML 蛋白的作用不同，而影响正常信号途径。这两种蛋白作用的下游分子不同可能解释 PML-RARα 在 APL 的发生发展中的具体作用机制。

酵母双杂交系统是近年来广泛应用的一种研究蛋白质间相互作用的强有力方法[7]。它是在 1989 年由 Fields 和 Song 等[8]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。酵母双杂交技术研究蛋白质的相互作用是在酵母细胞体内实现的，蛋白表达后有一定的修饰，比交联、免疫共沉淀和亲和层析等体外实验更有说服力。而且它还具有高灵敏度，可以检测出蛋白之间具有很弱的相互作用。因此，尽管酵母双杂交还具有诸如假阳性高等缺点，但它还是成为目前探索活细胞内蛋白质相互作用最常用和最有力的工具。

NE 将 PML-RARα 切割为两段不同大小的蛋白质，拟构建含 PML 的前半段基因序列的诱饵质粒，再通过文库质粒表达蛋白和诱饵蛋白的作用，来筛选与诱饵蛋白发生作用的靶蛋白。通过 PCR 的方法从 NE 的切割位点处开始扩增，通过酶切，测序，已成功构建 PML-V 的诱饵表达载体 pGBKT7-PML-V，并成功转化进入 AH109 酵母细胞中。挑取在 SD/-Trp 平板上单个菌落接种于SD/-Trp 液体培养基中，次日测定 A_{600} 为 0.812，说明诱饵质粒对酵母AH109 细胞没有毒性。再将转化了诱饵质粒的菌落分别接种在铺有 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，同时在 SD/-Ade/-Trp/X-α-gal 平板上没有克隆生长，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。SD/-Trp/-His/X-α-gal，SD/-Trp/-Ade/X-α-gal 平板上均没有菌落生长，证明它没有渗漏现象，而且在 SD/-Trp/-Leu 平板上也没有生长。诱饵蛋白与 BD 结构域一起融合表达的，预期融合蛋白大小约为 80ku，经 Western Blotting 验证，在80ku 处检测到明显的蛋白条带，表明 PML-V 已成功表达。

经过上述实验，表明 PML-V 诱饵载体成功构建并在 AH109 酵母细胞中成功表达，为进一步运用酵母双杂交系统在活细胞内筛选与之相互作用的靶蛋白奠定了实验基础，有助于从分子水平探讨急性早幼粒细胞的发病机制。

参 考 文 献

[1] Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase is important for PML-retinoic acid receptor α activities in early myeloid cells[J]. Mol Cell Biol, 2005; 25(1): 23-33.

[2] Lo Coco F, Diverio D, Falini B, et al. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1999; 94(1): 12-22.

[3] Daniel M, Koken M, Romangne O, et al. PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells[J]. Blood, 1993; 82(6): 1858-1863.

[4] Horwitz M, Benson KF, Duan Z, et al. Role of neutrophil elastase in bone marrow failure syndromes: molecular genetic revival of the chalone hypothesis[J]. Current Opinion in Hematology, 2003; 10(1): 49-54.

[5] Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase cleaves PML-RARα and is important for the development of acute promyelocytic leukemia in mice[J]. Cell, 2003; 115(3): 305-318.

[6] Gilliland DG. Proteolytic Processing in Development and Leukemogenesis[J]. Cell, 2003; 115(3): 248-250.

[7] Coates PJ, Hall PA. The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions[J]. Pathol, 2003; 199(1): 4-7.

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

(责任编辑：谭乐勤)