DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.07.022
第25卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 7
614 2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)07-0614-03

AF-2结构域突变的SF1酵母表达质粒的构建及其与PNRC相互作用分析

陈 彬,陈 敏,李渝萍,陈 健,周度金 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨激活功能-2(AF-2)结构域在孤儿核受体辅活化富含脯氨酸的受体辅调节蛋白(PNRC)相互作用的意义。方法 采用PCR和DNA重组技术构建了野生型SF1和AF-2结构域突变的SF1的酵母表达质粒pGBT9-SF1/HBDD和pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del并采用酵母双杂合分析比较了它们与PNRC的相互作用强弱。结果 SF1/HBD能与野生型PNRC及其N-末端缺失突变体PNRC270-327,PNRC278-300产生较强的相互作用,而AF-2缺失的SF1/HBD不与这些PNRC片段发生相互作用。结论 功能性的AF-2结构域是SF1与PNRC相互作用所必须的。

关键词:类固醇生成因子1;富含脯氨酸的核受体辅调节蛋白;辅活化子;激活功能-2
中图法分类号:Q591.2;Q782 文献标识码:A

Construction of yeast expression plasmids of SF1 with or without AF-2 domain and assays for its interaction with PNRC

CHEN Bin, CHEN Min, LI Yu-ping, CHEN Jian, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of AF-2(Activation function 2)domain in the interaction between SF1 (Steroidogenic factor 1) and nuclear receptor coactivator PNRC (Proline-rich nuclear receptor coregulatory protein). Methods The yeast expression plasmids of SF1/HBD and AF-2 domain deleted SF1/HBD were constructed and tested for interaction with PNRC. Results SF1/HBD interacted strongly with wild type of PNRC and its N-terminus deletion mutants(PNRC 278-300 and PNRC 270-327), but SF1/HBD with deleted AF-2 domain could not. Conclusion The results suggest that functional AF-2 domain is required for the interaction between PNRC and SF1.

Key words: proline-rich nuclear receptor coregulatory protein; steroidogenic factor 1; activation function 2 domain; coactivator

孤儿核受体SF1在正常内分泌控制的发育和功能中具有重要的作用[1]。与其他的核受体相似,SF1的C-末端也存在一个潜在的AF-2结构域。有文献表明SF1 AF-2结构域的突变严重影响SF1的反式激活功能[2,3],其机制目前尚不十分清楚。最近研究发现SF1可通过与核受体辅活化子SRC-1相互作用,组成型诱导其控制基因的转录[4];我们以牛SF1为诱饵,用酵母双杂合筛选也从人乳腺cDNA表达文库中鉴定出了富含脯氨酸的辅活化子PNRC,它可通过其SH3结合模体(PNRC 278-300区域)以配体非依赖方式与SF1相互作用[5,6]。为探讨AF-2结构域在SF1与PNRC相互作用中的意义,我们构建了野生型SF1和AF-2结构域突变的SF1的酵母表达质粒pGBT9-SF1/HBD和pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del并比较了它们与PNRC的相互作用强弱。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 真核表达质粒pCMV5、牛SF1野生型和C-末端AF-2结构域缺失突变的SF1真核表达质粒pCMV5-SF1和pCMV5-SF1/AF-2 del由Dr Lund(Bergen大学,挪威)惠赠。酵母表达质粒pGBT9(Gal4/DBD空表达质粒),pGBT9-hLC(Gal4/DBD阴性对照质粒),pACT2(Gal4/AD空表达质粒),野生型PNRC及其N-末端缺失突变体酵母表达质粒pACT2-PNRC,pACT2-PNRC270-327,pACT2-PNRC278-300质粒,酵母Y187菌株,大肠杆菌JM109菌株均为本室保存。

1.1.2 引物及主要试剂 PCR引物(上海生工生物工程公司),*Taq* DNA聚合酶、限制性内切酶(New England公司),T4 DNA连接酶(Promega公司)。DNA纯化试剂盒(Qiagen公司),酵母转化试剂盒(Bio101公司),MATCHMAKER酵母双杂合系统及各种酵母培养基(Clontech公司)。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增SF1/HBD和SF1HBD/AF-2 del cDNA

基金项目:国家自然科学基金委"两个基地建设"专项资助项目(9910761946);国家自然科学基金资助项目(300070359)
作者简介:陈 彬(1968-),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事核受体基因表达调控方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752261
通信作者:周度金,电话:(023)68752261;E-mail:dujin_zhou@yahoo.com
收稿日期:2002-01-20;修回日期:2002-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

扩增两端带 *Eco*RⅠ 和 *Sal*Ⅰ 位点的牛 SF1/HBD 和 SF1HBD/AF-2 del cDNA 的 PCR 引物为:

正向引物: 5′-GCCGAATTCATGCTGCTGCAGGGGAGCCA-3′

反向引物: 5′-CGCGTCGACTCAAGTCTGCTGGGCCTGCAGCAT-3′

分别以 SF1 真核表达质粒 pCMV5-SF1 和 pCMV5- SF1/AF-2 del 为模板, 用上述两条引物进行 PCR 反应。扩增条件为: 94 ℃, 1 min; 58 ℃, 1 min; 72 ℃, 2 min; 循环 25 次; 94 ℃, 1 min; 58 ℃, 1 min; 72 ℃, 8 min; 循环 1 次。反应体积 100 μl。两种 PCR 产物分别进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化并回收所需 DNA 片段, 纯化的 DNA 溶解在 75 μl 的 TE 缓冲液中。

1.2.2　酵母表达质粒 pGBT9-SF1/HBD 和 pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del 的构建　　用 *Eco*RⅠ 和 *Sal*Ⅰ 双酶切两种 PCR 产物, Qiagen PCR 纯化试剂盒回收纯化两种 DNA, 分别加入经相同双酶切处理、Qiagen 凝胶纯化回收的 pGBT9 载体, 经过连接反应, 构建成 pGBT9-SF1/HBD 和 pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del 质粒。反应体系为: pGBT9 2 μl (100 ng), SF1/HBD 或 SF1/HBD/AF-2 del 6 μl (60 ng), 10× 连接缓冲液 1 μl, T4 DNA 连接酶 1 μl (3 U), 室温 4 h。分别将 1 μl 连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆。小量提取质粒, 双酶切消化, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定阳性重组质粒并测定序列。

1.2.3　SF1/HBD 和 SF1/HBD/AF-2 del 与 PNRC 的相互作用分析

1.2.3.1　双质粒共转化酵母 Y187 菌株　　挑取新鲜培养的酵母 Y187 菌株单菌落, 在 100 ml YPD 培养基中 30 ℃震荡培养到对数生长期, 400× *g* 离心 5 min 沉淀细胞, 悬浮于 5 ml TE (pH 7.5) 中, 离心沉淀细胞。轻轻悬浮于 5 ml 氯化锂/乙酸铯溶液, 30 ℃轻轻振荡培养 30 min, 400× *g* 离心 5 min, 沉淀细胞, 轻柔悬浮细胞于 1 ml TEB (pH 7.5), 此酵母感受态细胞用于转化。转化反应体系为: 100 μl 酵母感受态细胞, 5 μl 担体 DNA, 5 μl 组氨酸溶液, 一种 pGBT9 与一种 pACT2 质粒各 100 ng, 轻轻混匀并在室温孵育 15 min, 42 ℃热休克 10 min, 冷至 30 ℃, 高速离心 1 min 沉淀细胞, 重悬于 200 μl SOS 中, 铺于 SD/-Leu/-Trp 平板上。30 ℃培养 48~72 h 至菌落长出。

1.2.3.2　β-半乳糖苷酶活性分析　　以 ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactosidase) 为底物定量分析报告基因的β-半乳糖苷酶活性。取完整的(直径 1~3 mm)酵母菌落在 SD/-Leu/-Trp 液体培养基中 30 ℃振荡培养过夜, 过夜培养物转接至 YPD 培养基中, 30 ℃振荡培养至对数生长期, 精确记录 A_{600} 值。1.5 ml 菌液高速离心, Z 缓冲液洗涤后, 沉淀悬浮在 100 μl 新的 Z 缓冲液中, 经液氮反复冻融后, 以 100 μl Z 缓冲液为空白管, 分别加 0.7 ml Z 缓冲液/β-巯基乙醇至反应管和空白管。记录时间, 立即加 160 μl 4 mg/ml 的 ONPG/Z 缓冲液至反应管和空白管。30 ℃保温至出现黄色后, 加 0.4 ml 1 mol/L Na_2CO_3 至反应管和空白管, 终止反应, 记录经过的时间。反应管高速离心后, 以空白管调零, 测上清的 D_{420}, 计算报告基因的β-半乳糖苷酶活性单位。

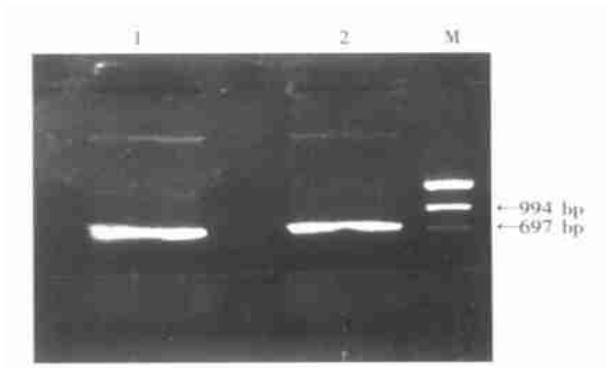
1.3　统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 平均值为 3 次独立实验结果的平均值, 并且每次每个反应组中有 3 个反应。

2　结果

2.1　酵母表达质粒 pGBT9-SF1/HBD 和 pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del 的构建

2.1.1　SF1/HBD 和 SF1/HBD/AF-2 del cDNA 的 PCR 产物电泳分析　　分别取两种 PCR 产物 100 μl 于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 在分子量约 696 bp 和 654 bp 处各有 1 条带, 与 SF1/HBD cDNA 和 SF1/HBD/AF-2 del cDNA 大小一致, 见图 1。

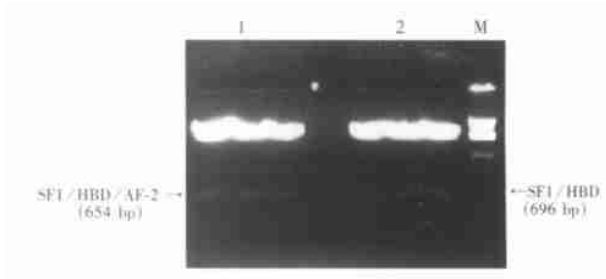


1: SF1/HBD/AF-2; 2: SF1/HBD; M: Marker

图 1　SF1/HBD and SF1/HBD/AF-2 del cDNA 的 PCR 产物

Fig 1　PCR products of cDNA fragments coding for SF1/HBD and SF1/HBD/AF-2 del

2.1.2　重组子 pGBT9-SF1/HBD 和 pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del 的鉴定　　从氨苄抗性 LB 平板上挑取两种质粒的阳性克隆, 小量抽提质粒, *Eco*RⅠ 和 *Sal*Ⅰ 双酶切, 分别可切出约 696 bp 和 654 bp 的片段, 可初步确定为两种阳性重组质粒, 见图 2。



1: pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del digested with *Sal*Ⅰ + *Eco*RⅠ; 2: pGBT9-SF1/HBD digested with *Sal*Ⅰ + *Eco*RⅠ; M: Marker

图 2　pGBT9-SF1/HBD 和 pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del 的酶切鉴定

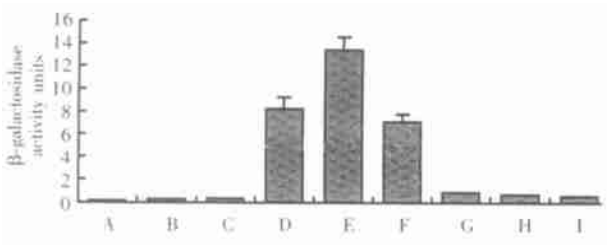
Fig 2　Identification of pGBT9-SF1/HBD and pGBT9-SF1/HBD/AF-2 del digested with restriction enzymes

2.1.3　阳性重组质粒的测序鉴定　　两种阳性重组质粒的测序结果进一步证实上述所得的两种质粒正确克隆了 SF1/HBD 和 SF1/HBD/AF-2 del 的 cDNA, 插入方向及阅读框均正确。

2.2　SF1/HBD 和 SF1/HBD/AF-2 del 与 PNRC 的相互作用分析

酵母双杂合分析结果发现 SF1/HBD 能与野生型 PNRC 及其 N-末端缺失突变体 PNRC270-327, PNRC278-300 (后两个片段含有与 SF1 相互作用的位点)[10] 产生较强的相互作用, 而 AF-2 缺失的 SF1/HBD 不与这些 PNRC 片段发生相互作用, 见图 3。这一结果与 AF-2 结构域对 SF1 的反式激活功能的影响相一致, 表明功能性的 AF-2 结构域是 SF1 与 PNRC 相互作用所必须的, AF-2 结构域突变的 SF1 其反式激活功能的缺陷反映了它对辅活化子, 包括 PNRC 的无效募集。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: DBD+Gal4AD; B: DBD/hLC+AD/PNRC; C: DBD/SF1+AD; D: DBD/SF1+AD/PNRC; E: DBD/SF1+AD/PNRC270-327; F: DBD/SF1+AD/PNRC278-300; G: DBD/SF1m+AD/PNRC; H: DBD/SF1m+AD/PNRC270-327; I: DBD/SF1m+AD/PNRC278-300; DBD: Gal4 DNA-binding domain; AD: Gal4 activation domain; hLC: Human lamin C protein

图3 SF1/HBD 和 SF1/HBD/AF-2 del 与 PNRC 的相互作用

Fig 3 Interaction between SF1/HBD or SF1/HBD/AF-2 del and PNRC

3 讨论

孤儿核受体 SF-1 最初作为肾上腺和性腺中的 P450 羟化酶必需的调节子而被鉴定，在类固醇组织、垂体和下丘脑腹内侧核(VMH)均有表达，基因敲除实验证实 SF-1 是肾上腺类固醇合成和性别分化中的一个关键调节因子，最近的研究表明 25-羟胆固醇(25-OHC)在 CV-1 细胞中可显著增强 SF-1 转录激活活性[1]。与其他核受体相似，SF1 的 N-末端包含了一个由两个锌指结构(用于特异 DNA 元件的识别)组成的 DNA 结合结构域(DBD)，C-末端包含了一个相当于配体结合域(LBD)的结构，与其他核受体在 LBD 处以单体或同源或异源二聚体激活转录不同，SF-1 仅以单体的形式激活基因表达。核受体至少有两个 AF 结构域均可独立地发挥反式激活功能：位于氨基末端 A/B 区的 AF-1 和位于羧基末端 D/E 区的配体诱导的 AF-2 结构域。AF-2 结构域区域位于 LBD C-末端保守的 α-螺旋(螺旋 12)。SF-1 缺乏 AF-1 结构域，却在 C-末端包含了一个 AF-2 结构域相似的区域，该区域含有 AF-2 结构域中常见的疏水区和固有的谷氨酸残基。许多研究表明 C-末端完整的 AF-2 结构域是 SF1 基因激活所必需的[2~4]。

最近的研究表明核受体除直接与基础转录因子作用外，还与一系列有效转录所必需的辅活化子和辅抑制子蛋白相互作用[7, 8]。辅活化子作为核受体和基础转录复合物之间的桥梁分子发挥作用且调节了不同靶基因的表达，参与了核受体的受体、启动子和细胞特异性调节，并与其他信号途径“串话”(Cross-talk)[9]。迄今已分离鉴定出大量的核受体辅活化子，如辅整合子 CBP/P300、SRC-1 家族、PNRC 等。PNRC 以配体非依赖方式与孤儿核受体 SF1 相互作用并增强了 SF1 的转录激活[5]，我们近期的研究显示 PNRC 与 SF1 相互作用部位存在于 PNRC 含 SH3 结合模体(PNRC 278-300)的区域[6]。由于核受体与基础转录因子间的结合不受配体结合和 AF-2 结构域突变的影响，因此，AF-2 结构域的转录激活功能可能是通过与辅活化子的相互作用产生的。对 TR、RAR 晶体结构的研究，证实它们的 AF-2 结构域和其他邻近的暴露表面结构域共同组成了与辅活化子的相互作用表面[8, 10]。对 ER 的研究显示各种 ER AF-2 结构域突变体的反式激活效应与它们同核受体辅活化子 GRIP，SRC-1 和 PNRC 的相互作用的能力相一致。因此，AF-2 结构域的突变严重影响 SF1 的反式激活功能，其机制可能是由于这些突变破坏了 SF1 与辅活化子的相互作用。我们目前的实验初步证实，AF-2 结构域的突变严重影响了 PNRC 与 SF1 的相互作用，这一观点也得到其他相关研究结果的支持，如：SF1 的 AF-2 结构域是它与 SRC-1 相互作用所必须的，并且 SRC-1 可与 CBP/P300 协同增强 SF1 的转录活性，SRC-1、CBP/P30 和 SF1 可组成辅活化子复合物调节 SF1 的转录[4]。我们后面的工作将进一步阐明 AF-2 功能结构域对 PNRC 与 SF1 有效相互作用这一影响的可能生理意义。

参考文献：

[1] Sladek R, Giguere V. Orphan nuclear receptors: an emerging family of metabolic regulators[J]. Adv Pharmacol, 2000, 47: 23-87.

[2] Jacob A L, Lund J. Mutations in the activation function-2 core domain of steroidogenic factor-1 dominantly suppresses PKA-dependent transactivation of the bovine CYP17 gene[J]. J Biol Chem, 1998, 273(22): 13391-13394.

[3] Li L A, Chiang E F, Chen J C, *et al*. Function of steroidogenic factor 1 domains in nuclear localization, transactivation, and interaction with transcription factor TFIIB and c-Jun[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(9): 1588-1598.

[4] Ito M, Yu R N, Jameson J L. Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1[J]. Mol Endocrinol, 1998, 12(2): 290-301.

[5] Zhou D, Quach K M, Yang C, *et al*. PNRC: a proline-rich nuclear receptor coregulatory protein that modulates transcriptional activation of multiple nuclear receptors including orphan receptors SF1(steroidogenic factors1) and ERR1(estrogen related receptor-1)[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(7): 986-998.

[6] 陈 彬，陈 敏，陈 健，等. 核受体辅活化子 PNRC 与孤儿核受体 SF1 相互作用位点的鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2002, 18(1): 39-44.

[7] Lee J W, Lee Y C, Na S Y, *et al*. Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(2): 289-297.

[8] 陈 彬，陈 敏，周度金. 核受体辅调节子：结构与功能[J]. 第三军医大学学报，2001, 23(8): S149-S151.

[9] Kato S S. Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways[J]. Breast Cancer, 2001, 8(1): 3-9.

[10] Ribeiro R C, Apriletti J W, Wagner R L, *et al*. X-way crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor[J]. J Steroid Biochem Molec Biol, 1998, 65(1-6): 133-141.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net