DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.020
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0051-03

论著

hERR1/HBD酵母表达质粒的构建及初步鉴定

陈 敏,李渝萍,陈 健,陈 彬,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 构建酵母双杂合系统诱饵蛋白表达质粒pGBT9-hERR1/HBD。方法 PCR扩增hERR1/HBD(激素激活域)cDNA,与酵母Gal4/DBD(DNA结合域)表达质粒pGBT9重组构建融合蛋白表达质粒,酶切、测序鉴定后,用于酵母双杂合分析,检查其自主转录激活作用及与已知hERR1辅活化子PNRC的相互作用。结果 该质粒有正确的阅读框,其表达蛋白不具有自主转录激活作用,与已知核受体辅活化子PNRC有明显的相互作用。结论 成功构建了表达质粒pGBT9-hERR1/HBD,并证实该质粒可作为酵母双杂合系统的诱饵蛋白质粒,用于乳腺组织中与hERR1有相互作用的蛋白质基因的筛选。

关键词:乳腺癌;雌激素受体相关受体-1;酵母双杂合系统
中图法分类号:R379;R392.11;R394-33 文献标识码:A

Construction of yeast expression plasmid hERR1/HBD and preliminary identification of its function

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

Abstract: Objective To construct the expression plasmid pGBT9-hERR1/HBD as a bait in yeast two-hybrid system. Methods A cDNA fragment encoding for hERR1/HBD was amplified by PCR and inserted into Gal4/DBD of yeast expression plasmid pGBT9. After identification of the positive clone by digestion of restriction endonuclease and sequencing, its transcriptional activation and the interaction with a known coactivator PNRC were tested in yeast two-hybrid assays. Results The protein expressed by the plasmid which had a correct reading frame, had no transcriptional activation and could interact with a known coactivator PNRC. Conclusion Plasmid pGBT9-hERR1/HBD, which encodes fusion protein of Gal4DBD and hERR1/HBD, is successfully constructed. This fusion protein is demonstrated to be suitable as a bait in yeast two-hybrid screening of the protein interacting with ERR1 from breast tissue library.

Key words: breast cancer; estrogen receptor related receptor 1; yeast two-hybrid system

乳腺癌在妇女恶性肿瘤中有很高的发病率,雌激素及其受体(Estrogen receptor, ER)在维持正常乳腺发育和促进乳腺癌生长方面的广泛作用早已被人们所认识[1]。人雌激素受体相关受体1(Human estrogen receptor related receptor 1, hERR1)是核受体超家族中的一员,其作用机制目前还不是很清楚,有研究资料表明,除了与转录起始复合物中的转录因子如TFⅡB直接作用增加转录速率外,ERR1还通过与ER竞争结合靶基因上的DNA调节序列,或与ER直接相互作用而调节着受ER调控的靶基因的表[2,3]。由于hERR1在核苷酸及氨基酸序列上与ER均有较高的同源性,功能上与ER也密切相关[4],提示hERR1亦可能对维持和促进乳腺癌细胞生长方面起作用,因此,我们推测hERR1可能是继ERα和ERβ外,又一与乳腺癌细胞增殖密切相关的重要核受体。

为进一步研究hERR1在乳腺癌发生、发展中的作用及其重要意义,我们拟以hERR1为诱饵,采用酵母双杂合系统技术克隆在人乳腺组织中与之相互作用的蛋白质基因。为此,我们构建了诱饵蛋白表达质粒Gal4/DBD-hERR1/HBD,并用酵母双杂合分析检查其自主转录激活作用及与已知hERR1辅活化子(Coactivator)PNRC(Proline-rich nuclear receptor coregulatory protein)的相互作用,以确定该质粒是否适于用作酵母双杂合系统的诱饵蛋白,用于乳腺组织中与hERR1有相互作用的蛋白质基因的筛查。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 酵母表达质粒pGBT9(Gal4/DBD表达质

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30007059)
作者简介:陈 敏(1963-),女,江苏省常熟市人,实验师,主要从事核受体基因表达调控方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752261
通信作者:周度金,E-mail:dujinzhou@yahoo.com
收稿日期:2001-10-21;修回日期:2002-07-12

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

粒), pACT2(Gal4/AD 表达质粒), 酵母 Y187 菌株购自 Clontech 公司。pACT2-hERR1 质粒: 以芳香化酶基因沉默子 S1 为探针, 采用酵母单杂合技术筛选人乳腺组织 cDNA 表达文库获得; pACT2-PNRC 质粒: 以类固醇生成因子 1(Steroidogenic factor 1, SF1)为诱饵蛋白, 用酵母双杂合技术筛选人乳腺组织 cDNA 表达文库获得)。大肠杆菌 JM109 菌株为本室保存。

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), T4 DNA 连接酶(Promega)。DNA 纯化试剂盒(Qiagen), 酵母转化试剂盒(Bio101), MATCHMAKER 酵母双杂合系统及各种酵母培养基(Clontech), 其它生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 hERR1/HBD cDNA 参照文献[6]报道的 hERR1/HBD cDNA 序列设计引物, 在 5′端引入一个 *Eco* RⅠ的酶切位点, 在 3′端引入一个 *Sal*Ⅰ的酶切位点。

正向引物 5′-CCG GAA TTC CTC AAG GAG GGA GTG CGC CTG G-3′

反向引物 5′-GTC GTC GAC GTC CAT CAT GGC CTC GAG CAT CTG-3′

以 pACT2-hERR1 全长 cDNA 质粒为模板进行 PCR 反应。反应程序为: 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。PCR 产物进行 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-hERR1/HBD 的构建 用 *Eco* RⅠ和 *Sal*Ⅰ双酶切 PCR 产物, Qiagen PCR 纯化试剂盒回收纯化 DNA, 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-hERR1/HBD 质粒。反应体系为: pGBT9 2 μl(100 ng), hERRⅠ/HBD 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; 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 pGBT9-hERR1/HBD 的功能检查[5]

1.2.3.1 双质粒共转化酵母菌株 Y187 挑取新鲜培养酵母 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 ℃轻轻震荡培养 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, pGBT9 与 pACT2-PNRC、pGBT9-hERR1/HBD 分别与 pACT2、pACT2-PNRC 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 LacZ 报告基因活性分析 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 A_{420}, 计算报告基因的β-半乳糖苷酶活性单位。1 个β-半乳糖苷酶活性单位定义为每分钟分解 1 μmol ONPG 生成硝基苯酚的酶活性。

β-半乳糖苷酶活性单位(U)= 1 000× A_{420}/(t× v× A_{600})

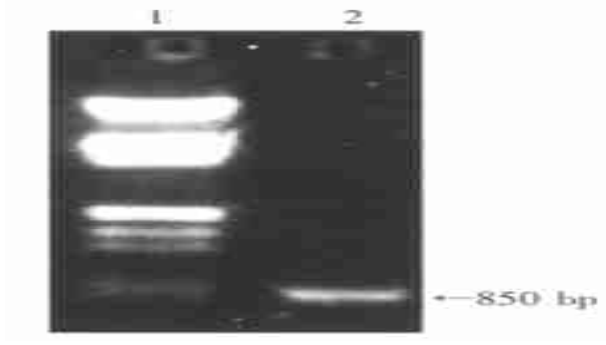
t: 反应时间(min); v: 0.1 ml× 浓缩系数

A_{600}: A_{600}/ml 菌液

2 结果

2.1 PCR 产物电泳分析

取 PCR 产物 10 μl 于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 在分子量约 850 bp 处有一条与 hERR1/HBD cDNA 大小一致, 见图 1。



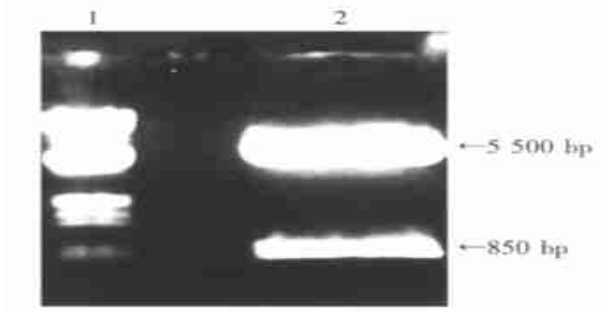
1: Marker: λ/*Hind* Ⅲ+ *Bam* HⅠ; 2: PCR product

图 1 hERRR1/HBD cDNA PCR 产物

Fig 1 PCR product of cDNA fragment coding for hERR1/HBD

2.2 重组子 pGBT9-hERR1/HBD 的鉴定

从氨苄抗性 LB 平板上挑取阳性克隆, 小量抽提质粒, *Eco* RⅠ和 *Sal*Ⅰ双酶切, 可切出约 850 bp 的片段, 可初步确定为阳性重组质粒, 见图 2。



1: Marker: λ/*Hind* Ⅲ+ *Bam* HⅠ; 2: Product of pGBT9-hERR1/HBD digested by *Sal*Ⅰ and *EcoR*Ⅰ

图 2 重组子 pGBT9-hERR1/HBD 的酶切鉴定

Fig 2 Identification of pGBT9-hERR1/HBD by restriction enzyme digestion

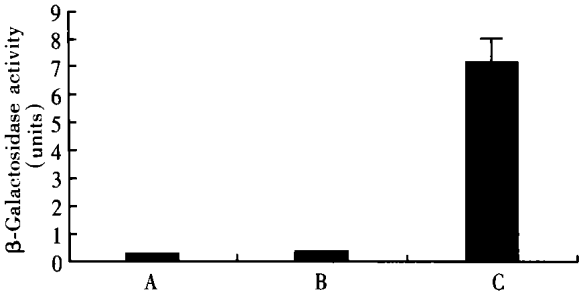
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　PCR 产物测序结果

从测序结果可知, 所得质粒正确克隆了 hERR1 的 HBD 结构域, 插入方向及阅读框正确。

2.4　pGBT9-hERR1/HBD 功能的检查

将 pGBT9 与 pACT2-PNRC、pGBT9-hERR1/HBD 与 pACT2、pGBT9-hERR1/HBD 与 pACT2-PNRC 用醋酸锂法共转化酵母菌株 Y187, 3 d 后在 SD/-Leu/-Trp 平板上均长出直径 2 mm 的白色菌落。蛋白质间相互作用越强, 所激活报告基因(Lac Z)活性越强, 即β-半乳糖苷酶活性越强。经液态底物 ONPG 分解显色, 测定光吸收, 得知 Gal4/DBD 部分与 PNRC 无明显相互作用, hERR1/HBD 与 Gal4AD 无相互作用, 即无自主转录激活作用, 但 hERR1/HBD 与已知阳性相互作用蛋白 PNRC 有明显的相互作用, 见图 3。因此, pGBT9-hERR1/HBD 适于用作酵母双杂合系统的诱饵蛋白表达质粒。



A: pGBT9+ pACT2-PNRC; B: pGBT9-hERR1/HBD+ pACT2; C: pGBT9-hERR1/HBD+ pACT2-PNRC

图 3　酵母双杂合分析 **Gal4DBD/hERR1HBD** 自主转录激活作用及与已知辅活化子 **PNRC** 的相互作用

Fig 3　Test Gal4DBD/hERR1HBD bait protein for autonomous transcriptional activation and interaction with a known coactivator PNRC in yeast two-hybrid assays

3　讨论

hERR1 属于孤儿核受体, 是核受体超家族成员之一, 能与靶基因上特定的激素效应元件结合从而调控多种基因转录的转录因子。研究资料表明: ERR1 能促进雌激素生物合成并能通过直接与雌激素受体相互作用或与雌激素受体竞争结合效应基因上的激素效应要素从而调节由雌激素及其受体介导的转录激活作用。此外, ERR1 本身的表达又受雌激素的调节。雌激素及其受体在乳腺癌的发展中的重要作用目前已经得到公认。ERR1 在结构与功能上与 ER 密切相关, 因此, 它可能是除 ER 之外又一个对乳腺癌发展起关键作用的受体[4]。深入研究 ERR1 影响乳腺癌的可能作用途径与机制, 有助于进一步了解 hERR1 在乳腺癌中的作用, 为开发乳腺癌内分泌治疗新的药物和方法提供实验依据。

近年来, 有关核受体的作用机制的研究发现, 核受体除了直接与转录起始复合物中的转录因子结合从而稳定转录起始复合物增强转录外, 还能与一类桥梁分子即辅活化子结合从而调节靶基因的转录。相关领域研究中, 常应用 20 世纪 90 年代发展起来的酵母双杂合技术来筛选新的真核调控蛋白和研究蛋白间相互作用[5]。我们采用该技术克隆得到了一种全新的核受体辅活化子 PNRC, 它能与包括 ERR1 在内的几乎所有的核受体相互作用, 从而辅助核受体的转录调节功能[5], PNRC 与另一类孤儿核受体 SF1 的相互作用位点目前也得以鉴定[8]。因此 PNRC 作为一种已经明确功能的核受体辅活化子用来证实与核受体在酵母细胞中的相互作用是合适的。我们目前的研究在阐明 ERR1 与乳腺癌关系的基础上, 为进一步研究 ERR1 对乳腺癌相关基因的调控作用及其机制, 拟以 hERR1 为诱饵, 采用酵母双杂合系统技术克隆在人乳腺组织中与之相互作用的蛋白质基因。为此, 我们首先要构建并鉴定酵母双杂合系统诱饵蛋白表达质粒 pGBT9-hERR1/DBD。本实验将 hERR1/HBD 克隆入酵母 Gal4 DBD 表达质粒 pGBT9 中, 使 hERR1/HBD 与 Gal4/DBD 连接成融合蛋白。将 pGBT9-hERR1/HBD 分别与酵母 Gal4 AD 表达质粒 pACT2 和已知的 hERR1 辅活化子 PNRC 表达质粒, pACT2-PNRC, 共转化酵母菌株 Y187, β-半乳糖苷酶活性分析表明, pGBT9-hERR1/HBD 不具有自主激活报告基因的活性, 而与已知阳性相互作用蛋白有明确作用, 见图 3。因此, pGBT9-hERR1/HBD 质粒可以用作酵母双杂合系统的诱饵蛋白质粒, 用于从人乳腺组织中寻找与 hERR1 有相互作用的蛋白质, 为后续进行的 ERR1 对乳腺癌相关基因的调控作用及其机制的研究提供了实验基础。

参考文献:

[1] Sladek R, Bader J A, Giguere V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(9): 5400—5409.

[2] Williams W L Jr, Powers M, Wagman L D. Cancer of the male breast: a review[J]. J Natl Med Assoc, 1996, 88(7): 439—443.

[3] Yang N, Shigeta H, Shi H, *et al*. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter[J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5795—5804.

[4] Yang C, Zhou D, Chen S. Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERR alpha-1 orphan receptor[J]. Cancer Res, 1998, 58(14): 5695—5700.

[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 factors 1) and ERR alpha1(estrogen related receptor alpha-1)[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(7): 986—998.

[6] Giguere V, Yang N, Segui P, *et al*. Identification of a new class of steroid hormone receptors[J]. Nature, 1988, 331(6151): 91—94.

[7] 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): 149—151.

[8] 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.

(编辑　薛国文)

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