DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.032

论著

文章编号:1000-5404(2002)12-1446-03

糖皮质激素受体配体结合区的克隆及酵母双杂交诱饵载体的构建和表达

李淑蓉,粟永萍,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 用糖皮质激素受体配体结合区(GR-LBD)片段构建酵母双杂合系统中的诱饵载体。方法 根据GenBank GR-LBD序列设计引物,以人胎肝cDNA文库为模板,PCR扩增GR-LBD片段,该片段与pGEM®-T Vector Systems连接,*Sma*Ⅰ/*Sal*Ⅰ双酶切鉴定。回收相应连接片段,与酵母表达载体pGBKT7连接,重组质粒命名为pGBKT7-GR LBD,送大连宝生物公司测序。用醋酸锂法转化酶母菌AH109,在选择性培养基上观察pGBKT7-GR LBD在AH109中的表达情况,酵母双杂交检测GR与已知阳性蛋白SRC-1的结合,鉴定转化酵母株表型及表达。结果 PCR扩增出的DNA片段约893 bp,大小正确,并成功连接到T-载体,释放出所需片段893 bp。构建与Gal4-BD融合表达载体pGBKT7-GR LBD,测序结果表明序列完全正确,融合区域的读码框正确。pGBKT7-GR LBD转化感受态AH109,在SD/-Trp板上生长良好,AH109[pGBKT7-GR LBD]与Y187[pTD1-1]杂交后在SD/-Trp、/-Leu、/-Trp-Leu板上生长而不能在/-His-Leu-Trp、/-Ade-His-Leu-Trp板上生长,说明AH109[pGBKT7-GR LBD]转化成功但并未自主激活报告基因,酵母双杂交测定GR LBD与SRC-1有结合作用。结论 获得了在酵母细胞中正确表达且未自主激活报告基因的融合表达载体pGBKT7—GR LBD,可作为酵母双杂合系统中的"诱饵"。

关键词:糖皮质激素受体;酵母双杂合;诱饵质粒
中图法分类号:R379;R392.11;R394.2 文献标识码:A

Expression and construction of "bait plasmid" containing human GR ligand-binding domain in yeast two-hybrid system

LI Shu-rong, SU Yong-ping, CHENG Tian-min (Research Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a bait vector containing human glucocorticoid receptor(GR) ligand-binding domain (LBD) in yeast two-hybrid system in order to screen its cDNA library. Methods PCR was used to amplify GR-LBD fragment from the fetal liver cDNA library with the primers designed in accordance with the sequence in GenBank GR-LBD. The product was inserted into pGEM(r)-T Vector Systems. After verified with restriction endonuclease digestion of SmaⅠ/SalⅡ, the vector was inserted into the "bait plasmid" pGBKT7 (named as pGBKT7-GR LBD). After confirmation with restricted endonuclease digestion and sequence analysis, the plasmid was transformed into the yeast cell AH109, and the transformants were selected on SD/-Trp plates. The interaction between GR and SRC-1 was tested by β-gal activity with yeast two-hybrid system. Results The amplified product of 893 bp was inserted into pGEM(r)-T Vector and proven to be successful with double restriction enzyme digestion. Sequence analysis revealed that the sequence was correctly inserted into pGBKT7 with a right reading frame. AH109 [pGBKT7-GR LBD] grew on SD/-Trp plates, but not on the other selective media. GR could interact with SRC-1. Conclusion The bait plasmid pGBKT7-GR LBD constructed expresses GR LBD correctly, and can't activate the transcription of reporter gene alone in yeast two hybrid system.

Key words: glucocorticoid receptor; yeast two hybrid; bait plasmid

糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)在生物进化中是十分保守的基础核转录因子,对维持生命活动至关重要,若将GR基因敲除,个体则不能存活[1];同时GR在调节机体生理功能和在损伤或疾病发生发展过程中起重要作用,如低GR动物对任何不良刺激易感性明显增高,若增加GR表达,则可使动物提高抗内毒素损伤的能力。严重创伤后早期虽然血清中糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)显著升高,但是多种组织细胞的GR表达和结合活性却显著降低[2],反映出机体处于应激紊乱状态,该状态与严重创伤后早期全身性损害密切相关[3]。要改善应激紊乱,调节GR的功能状态是关键环节。

糖皮质激素受体作为核受体超家族的成员之一,近年来发现,核受体除了直接与转录起始复合物中的转录因子作用外,还通过与一类桥梁分子即核受体调节蛋白(如转录辅活化子和辅阻遏子,多种信号转导通路中的整合子)的相互作用而实现它对靶基因转录的调节[4,5]。本研究以糖皮质激素受体的激素结合区为诱饵蛋白,构建了诱饵载体pGBKT7-GR LBD,为利用酵母双杂交技术筛选cDNA文库,寻找与GR相互作用蛋白打下基础,从而为针对性调节GR功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母表达载体pGBKT7、酵母株AH109、阳性对照株AH109[pGBKT7-53]和Y187[pTD1-1]、酵母用培养基YPD、YPDA、SD/-

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
作者简介:李淑蓉(1965—),女,四川省广汉市人,博士,副教授,主要从事分子病理方面的研究。电话:(023)68752283
收稿日期:2002-03-10;修回日期:2002-06-18

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

Trp、/-Leu、/-Trp-Leu、/-His-Leu-Trp、/-Ade-His-Leu-Trp、YEASTMAKER Yeast Transformation System 等均为 Clontech 产品。树脂、pGEM®-T Vector Systems 购自 Promega。限制性内切酶 *Sma*Ⅰ、*Sal*Ⅰ、*Taq* DNA 聚合酶为 Takara 产品。pACT2-SRC-1 为周度金教授惠赠。

1.2　引物设计及 GR 片段的扩增

根据 GenBank 糖皮质激素受体配体结合区 GR LBD(氨基酸序列 485-777)序列、ORF 分析和酶切图谱, 结合酵母表达载体 pGBKT7 的读框、多克隆位点, 设计引物序列为: GR LBD-Up(*Sma* Ⅰ): 5′-CCCGGGTGGAATGAACCTGGAAGCTCGAA-3′; GR LBD-Down(*Sal*Ⅰ): 5′-GTCGACACTTTTGATGAAACAGAAGTT-3′。以人胎肝 cDNA 文库为模板, PCR 扩增条件为 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 3 min, 30 个循环, 最后 72℃延伸 7 min。

1.3　质粒的构建

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, Wizard® PCR Preps DNA Purification Resin 回收纯化, pGEM®-T Vector Systems 连接, 4℃过夜。连接产物转化大肠杆菌 JM109, 37℃培养过夜, 挑取菌落, 摇菌提取质粒, *Sma*Ⅰ/*Sal*Ⅰ双酶切鉴定。回收相应连接片段, 用 T_4 DNA 连接酶与酵母表达载体 pGBKT7 连接, 16℃过夜, 转化感受态 JM109, 挑取菌落提质粒, 双酶切鉴定为相应大小片段, 重组质粒命名为 pGBKT7-GR LBD, 送大连宝生物公司测序。

1.4　酵母株感受态的制备及转化

诱饵载体转化的酵母株是 AH109, 酵母感受态的制备用醋酸锂法, 按试剂盒(Clontech)说明书操作。100 μl 感受态加 0.5 μg pGBKT7-GR LBD, 转化产物 1∶100、1∶1 000 稀释后铺于 SD/-Trp/Kana 板, 30℃ 2~4 d, 待单克隆生长达 2~3 mm, 封板于 4℃备用。

1.5　转化酵母株表型的鉴定及对照实验

分别挑取 2~3 mm 的新鲜单克隆一个用于杂交, AH109[pGBKT7-53]和 Y187[pTD1-1]、AH109[pGBKT7-GR LBD]和 Y187[pTD1-1], 将两个克隆放于 0.5 ml 2× YPDA, 振荡重悬; 同时挑取 AH109[pGBKT7-53]、Y187[pTD1-1]单克隆分别放于 0.5 ml 2×YPDA 中, 检测杂交效率和转化标记。30℃过夜, 200 r/min。1∶10, 1∶100 稀释后分别铺于 SD/-Trp、/-Leu、/-Trp-Leu、/-His-Leu-Trp、/-Ade-His-Leu-Trp 板。30℃ 3~5 d。

1.6　酵母双杂交检测(蛋白质相互作用)

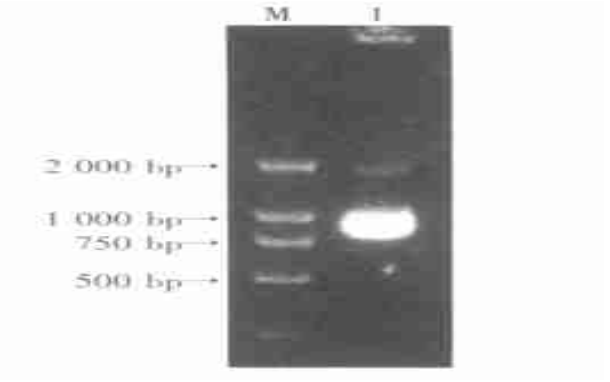
pGBKT7-GR LBD 和 pACT2-SRC-1 共转化酵母 AH109, 长出的菌落转入相互作用培养基 SD/-Leu-Trp-His(培养基中加 50 μm 地塞米松 Dex), 同时以试剂盒中所带菌株作阴性和阳性对照, ONPG 法检测β-gal 活性。

2　结果

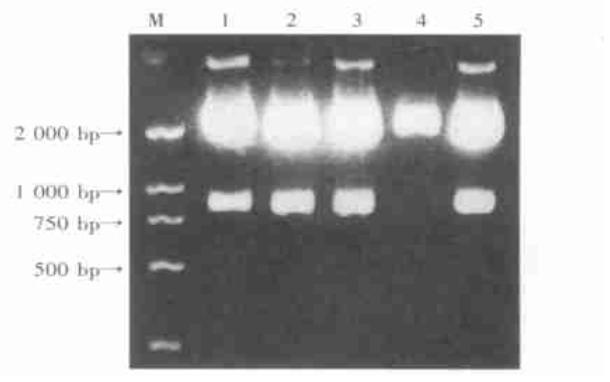
2.1　GRHBD 的 PCR 扩增及诱饵蛋白的构建及表达

以人胎肝 cDNA 文库为模板, 用所设计的引物扩增出的 DNA 片段约 893 bp, 见图 1, 片段大小与预期值一致, 电泳回收纯化片段后, 将其插入 T 载体, 经酶切验证, 证实已成功连接到 T-载体, 并释放出所需片段 893 bp, 见图 2。片段再经电泳回收纯化, 与相同酶切线性化的酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7 连接, 构建与 Gal4-BD 融合表达载体 pGBKT7-GR LBD, *Sma*Ⅰ/*Sal*Ⅰ双酶切鉴定插入片段大小正确, 测序结果表明序列完全正确, 融合区域的读码框正确, 并有正确的方向。序列如下:

GAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGA
ATTCCCGGGTGGAATGAACCTGGAAGCTCGAAAAACAAAGAAAAAAATAA
AAGGAATTCAGCAGGCCACTACAGGAGTCTCACAAGAAACCTCTGAAAAT
CCTGGTAACAAAACAATAGTTCCTGCAACGTTACCACAACTCACCCCTAC
CCTGGTGTCACTGTTGGAGGTTATTGAACCTGAAGTGTTATATGCAGGAT
ATGATAGCTCTGTTCCAGACTCAACTTGGAGGATCATGACTACGCTCAAC
ATGTTAGGAGGGCGCAAGTGATTGCAGCAGTGAAATGGGCAAAGGCAAT
ACCAGGTTTCAGGAACTTACACCTGGATGACCAAATGACCCTACTGCAGT
ACTCCTGGATGTTTCTTATGGCATTTGCTCTGGGGTGGAGATCATATAGA
CAATCAAGTGCAAACCTGCTGTGTTTTGCTCCTGATCTGATTATTAATGA
GCAGAGAATGACTCTACCCTGCATGTACGACCAATGTAAACACATGCTGT
ATGTTTCCTCTGAGTTACACAGGCTTCAGGTATCTTATGAAGAGTATCTC
TGTATGAAAACCTTACTGCTTCTCTCTTCAGTTCCTAAGGACGGTCTGAA
GAGCCAAGAGCTATTTGATGAAATTAGAATGACCTACATCAAAGAGCTAG
GAAAAGCCATTGTCAAGAGGGAAGGAAACTCCAGCCAGAACTGGCAGCGG
TTTTATCAACTGACAAAACTCTTGGATTCTATGCATGAAGTGGTTGAAAA
TCTCCTTAACTATTGCTTCCAAACATTTTTGGATAAGACCATGAGTATTG
AATTCCCCGAGATGTTAGCTGAAATCACCACCAATCAGATACCAAAATAT
TCAAATGGAAATATCAAAAAACTTCTGTTTCATCAAAAGTGTCGACCTGC
AGCGGCCGCATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGA
GGGGTTTTTTGCCGCGCTTGCAGCCAAGCTAATTCCGGGCGAATTTCTTAT
GATTTATGATTTTTATTATTAAATAAGTTATAAAAAAAATAAG



M: Standard marker; 1: PCR product
图 1　GR LBD 的 PCR 扩增
Fig 1 PCR amplification of GR LBD



M: Marker; 1, 2, 3, and 5: Positive clones; 4: Negative clone
图 2　重组质粒 pGEM-GR LBD 的双酶切鉴定
Fig 2　Identification of recombinant plasmid pGEM-GR LBD with double restriction endonucleases digestion

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

2.2 饵蛋白的转化及酵母株表型鉴定及表达

pGBKT7-GR LBD转化感受态AH109，在SD/-Trp板上生长良好，AH109缺失TRP(即为Trp-)，只有导入有功能的Trp1基因，才能在SD/-Trp极限培养基上生长。pGBKT7为Trp+，说明转化成功。将AH109[pGBKT7-GR LBD]、AH109[pGBKT7-53]与Y187[pTD1-1] 杂交混合物以及AH109[pGBKT7-GR LBD]与Y187[pTD1-1]杂交混合物铺于各种缺陷板，AH109[pGBKT7-GR LBD]只能在-Trp板上生长。AH109[pGBKT7-GR LBD]与Y187[pTD1-1]杂交后在SD/-Trp、/-Leu、/-Trp-Leu板上生长而不能在/-His-Leu-Trp、/-Ade-His-Leu-Trp板上生长，说明AH109[pGBKT7-GR LBD]转化成功但并未自主激活报告基因。AH109[pGBKT7-53]与Y187[pTD1-1]杂交后在所有缺陷板上生长，为蛋白相互作用提供了阳性对照。SRC-1为已知的与GR相互作用的阳性蛋白，pACT2-SRC-1与pGBKT7-GR LBD共转化酵母AH109，在SD/-Leu-Trp-His培养基上生长，β-gal活性检测结果表明GR-LBD与SRC-1有结合作用。

3 讨论

酵母双杂交系统是近年来发展起来的、用于蛋白质相互作用研究的有效方法之一，既可以研究两种已知蛋白质之间的作用，又可用以钓取与某一已知蛋白质相互作用的新蛋白质[6]。用酵母双杂合系统筛选相互作用蛋白是基于酵母转录因子GAL蛋白的结构特征，其由两个可分离、相对独立的功能结构域组成：N-端的DNA结合结构域(BD)和C-端的转录激活结构域(AD)。当与Gal4-BD融合的诱饵蛋白和与Gal4-AD融合的蛋白相互作用时，形成可活化报告基因表达的转录复合体，可筛选与诱饵蛋白相互作用的蛋白。筛选文库时，将编码靶蛋白基因的cDNA克隆到DNA-BD载体(如pGBKT7)以产生靶蛋白和DNA-BD的融合蛋白即诱饵。同样，cDNA文库构建在AD载体(如pACT2)上，以产生文库cDNAs编码的不同蛋白和Gal4-AD的融合蛋白，通过“饵”蛋白直接从文库中筛选到能与其相作用蛋白的DNA序列。

近几年有关核受体作用机制的研究，尤其核受体与核受体辅助激活因子的相互作用的研究，是极为活跃的研究领域之一。固醇类激素受体属于结构和功能上相关的一类蛋白，属核受体超家族成员。作为配体激活的转录调节者，固醇类受体主要由三部分组成：N-端转录活化区、中心DNA结合区、C-端激素结合区(LBD)。LBD含有与配体结合、核转位、二聚体形成、反式激活作用及结合HSP90的重叠功能域。激素结合区对受体的功能至关重要，已有不少研究者以不同核受体的激素结合区为诱饵筛选到大量与核受体相互作用的辅活化子和辅阻遏子[7]，加深了我们对激素及核受体对靶基因转录调节分子事件的认识。

GR是基础转录因子之一，参与调节许多基本的生命活动及抗损伤应激、抗炎症反应等作用，但其作用的分子机制尚不清楚，作者以GR LBD为诱饵，筛选与其相互作用蛋白，以期了解参与GR调节功能的重要分子及其功能。本实验以GenBank中GR LBD读框序列设计引物，PCR扩增出的DNA片段约893 bp，大小正确，并成功连接到T-载体。构建与Gal4-BD融合表达载体pGBKT7-GR LBD，测序结果表明序列完全正确，GR LBD的DNA片段从第1 584位开始至第2 463位，包括整个激素激活区。融合区域的读码框正确。pGBKT7-GR LBD转化感受态AH109，在SD/-Trp板上生长良好，AH109[pGBKT7-GR LBD]转化成功但并未自主激活报告基因且能正确表达。因此，获得了在酵母细胞中正确表达且未自主激活报告基因的融合表达载体pGBKT7-GR LBD，可作为酵母双杂合系统中的“诱饵”。为进一步研究与GR结合的功能分子的生物学意义奠定基础。

(致谢：本实验得到军事医学科学院二所张成岗博士的大力协助和指导，在此表示衷心的感谢！)

参考文献：

[1] Reichardt H M, Kaestner K H, Wessely O, *et al*. Analysis of glucocorticoid signalling by gene targeting[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998, 65(1—6): 111—115.

[2] 刘都户，粟永萍，楼淑芬，等. 烫伤大鼠肝组织糖皮质激素受体的变化及α-MSH、合成肽KPV的调节作用[J]. 第三军医大学学报，2001，23(5)：550—552.

[3] 王军平，赵景宏，粟永萍. 糖皮质激素受体调控与创伤应激紊乱关系的研究进展[J]. 中华创伤杂志，2001，17(6)：508—510.

[4] 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.

[5] 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(1)：149—151.

[6] Fields S, Song O K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340(6 230): 245—246.

[7] Jenkins B D, Pullen C B, Darimont B D. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms[J]. Trends Endocrinol Metab, 2001, 12(3): 122—126.

(编辑 王 红)

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