



## 人GFP-AWP1融合基因载体的构建及其在293细胞中的表达

从能生物发光的水母Aequorea victoria分离出的绿色荧光蛋白(GFP)已被广泛的应用于示踪活细胞内基因表达、蛋白转运与移位及蛋白与蛋白相互作用,并通过改造获得了能激发黄、蓝绿、蓝色荧光的改进型荧光蛋白,已经成为细胞与分子生物学研究中一种流行的实验工具[1]。Duan等[2]先前利用酵母双杂交系统和免疫共沉淀技术发现了一种新的PRK1结合蛋白,暂命名为蛋白激酶C相关激酶1相关蛋白(AWP1)。该蛋白编码208个氨基酸,在人组织中广泛的表达,但它的结构、功能特征及在细胞内的定位与移位并不清楚。为研究AWP1的生物学功能,鉴定与其相互作用的蛋白质,我们先前已构建了His-AWP1原核表达载体,在大肠杆菌表达并获得相对分子质量约38 000的AWP1纯化蛋白[3]。为此,本实验利用GFP这种新型分子探针的活细胞内示踪作用,将一个外源靶基因AWP1插入到pEGFP-C2的多克隆位点MCS,与后者形成融合蛋白,用来对靶蛋白在细胞内的分布进行定位[4]。本实验不仅首次报道了AWP1蛋白在293细胞内的表达与分布,而且为下一步研究AWP1蛋白的移位、AWP1蛋白与其他蛋白质的相互作用及其在不同细胞类型中的表达和亚细胞定位异同奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要材料

克隆载体pEGFP-C2(Clontech公司),大肠杆菌DH5 $\alpha$ 及人ECV304、293细胞系均为本室保存,Glassmilk(Sigma公司),DOTAP脂质体(Roche公司),小牛血清(Hyclone公司),DMEM(Gibco公司),Qiagen Plasmid Mini Kit(Qiagen公司),MMuLV RT/PCR Kit、3S Plasmid Miniprep Kit (Version 3.1)(上海博彩生物科技有限公司),DNA聚合酶Taq、T4 DNA连接酶、限制性内切酶EcoR I、BamH I(大连宝生物公司),1 kb和1 kb (plus) DNA Marker (Gibco公司),琼脂糖和LB培养基(Life Technology公司),引物由大连宝生物公司合成。其他试剂为国产分析纯。

#### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人ECV 304细胞和293细胞按常规在含10%小牛血清的DMEM培养基中培养。

1.2.2 AWP1的RT-PCR克隆 取约107个ECV304细胞,按RT-PCR试剂盒说明书进行AWP1 cDNA扩增。PCR扩增的上游引物为:5'-C GAATTC GCT CAA GAA ACT AAT CAC AGC-3'(含EcoR I位点),下游引物为:5'-CT GGATCC GCA ATC TTT TGG ATC TTT TCA CCA AC-3'(含BamH I位点)。PCR反应体积为50 ml,引物浓度为25 pmol/ml,扩增参数为94  $^{\circ}$ C 5 min、94  $^{\circ}$ C 20 s、57  $^{\circ}$ C 20 s、72  $^{\circ}$ C 60 s,35个循环后72  $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物行1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 pEGFP-C2/AWP1重组质粒的构建 获得相应的AWP1 cDNA片段后,将该片段分别用EcoR I/BamH I消化,3/10体积10 mol/L NH<sub>4</sub>Ac与2.5倍体积无水乙醇沉淀回收,将其克隆在经酶切(EcoR I/BamH I)的pEGFP-C2表达质粒(以Sigma公司的Glassmilk试剂盒对酶切载体片断进行纯化)中。

1.2.4 感受态细胞制备及重组质粒的转化 将100  $\mu$ l冻存于-70  $^{\circ}$ C的DH5 $\alpha$ 感受态菌解冻后,将50 ng重组质粒pEGFP-C2/AWP1与之充分混合,置冰上30 min;转入42  $^{\circ}$ C水浴90 s,加入37  $^{\circ}$ C预温的LB 0.8

ml, 37 °C轻摇45 min; 接种到含有卡拉霉素(Kan<sup>+</sup>)的LB培养皿中, 37 °C过夜。

1.2.5 阳性重组克隆的筛选与鉴定 分别挑取克隆于5 ml LB(Kan<sup>+</sup>)液中培养过夜, 用3S Plasmid Miniprep Kit (Version 3.1)小量制备质粒。pEGFP-C2/AWP1重组质粒用EcoR I /BamH I双酶切鉴定。正确克隆的酶切片断大小为640 bp。以AWP1上游引物在本室以ABI公司的自动测序仪对克隆的片段进行测序分析。

1.2.6 脂质体真核细胞转染 按Qiagen Plasmid Mini Kit说明书提取重组体AWP1/pEGFP-C2后, 用无水乙醇沉淀1次。4 °C条件下13 000 r/min高速离心20 min, 取上清备用。以5×10<sup>4</sup>/ml 293细胞传代至Petri培养皿。待细胞长至40%~50%融合时, 按罗式诊断公司的转染试剂说明方法, 取0.5 mg重组质粒稀释作为A液, 取3 ml DOTAP脂质体入10 ml 0.2 mol/L Hepes(pH 7.4)混匀后作为B液, 然后将A液加至B液充分混匀, 室温放置10~15 min。加180 ml 无血清DMEM培养基, 混匀, 将此混合液加至用无血清DMEM培养基轻洗过的培养有细胞的Petri培养皿中央孔中4 h。吸去质粒-脂质体混合物, 换上含10%血清DMEM培养基。次日再换1次培养基。24 h后每隔12 h置于荧光显微镜下观察、拍照。

## 2 结果

### 2.1 AWP1 cDNA片断的扩增

RT-PCR产物进行1%琼脂糖电泳, 在约600 bp处为单一条带(图1), 跟目的片段大小位置相符。

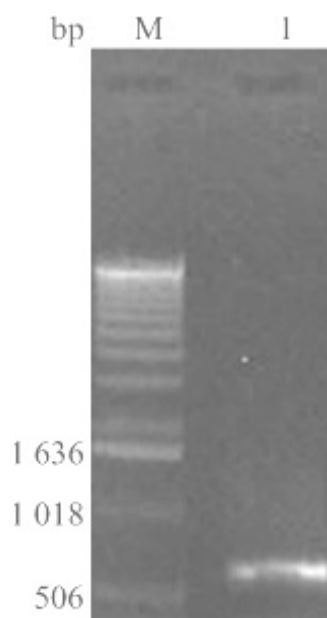


图1 RT-PCR 扩增AWP1 cDNA  
Fig.1 RT-PCR amplification of AWP1 cDNA  
M: 1 kb Marker; Lane 1: AWP1 cDNA

### 2.2 重组质粒的鉴定

酶切结果如图2。pEGFP-C2/AWP1重组质粒经EcoR I /BamH I双酶切鉴定后, 有约600 bp的酶切片断, 跟扩增的AWP1目的片断大小相符。测序结果与人的AWP1 cDNA阅读框序列(GenBank XM\_044548)一致。

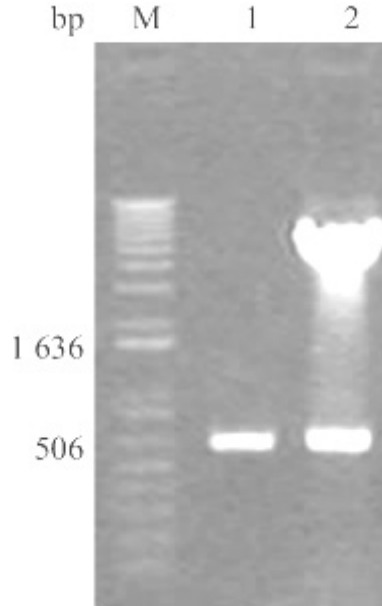


图2 pEGFP-C2/AWP1表达载体的鉴定

Fig.2 Identification of pEGFP- C2/AWP1 recombinant vector

M: 1 kb plus marker; Lane 1: AWP1 cDNA cut by EcoR I /BamH I ; Lane 2: pEGFP-C2/AWP1 cut by EcoR I /BamH I

### 2.3 GFP-AWP1融合基因在293细胞内的表达

用0.5 mg重组DNA转染293细胞后24 h, 荧光显微镜下发现细胞带有绿色荧光, 并且随时间的延长, 绿色荧光增强。在用不携带外源基因的空载体pEGFP-C2转染的对照组293细胞, 绿色荧光均匀分布于整个细胞中; 而用重组质粒pEGFP-C2/AWP1转染, 绿色荧光弥散分布于细胞质内(图3)。

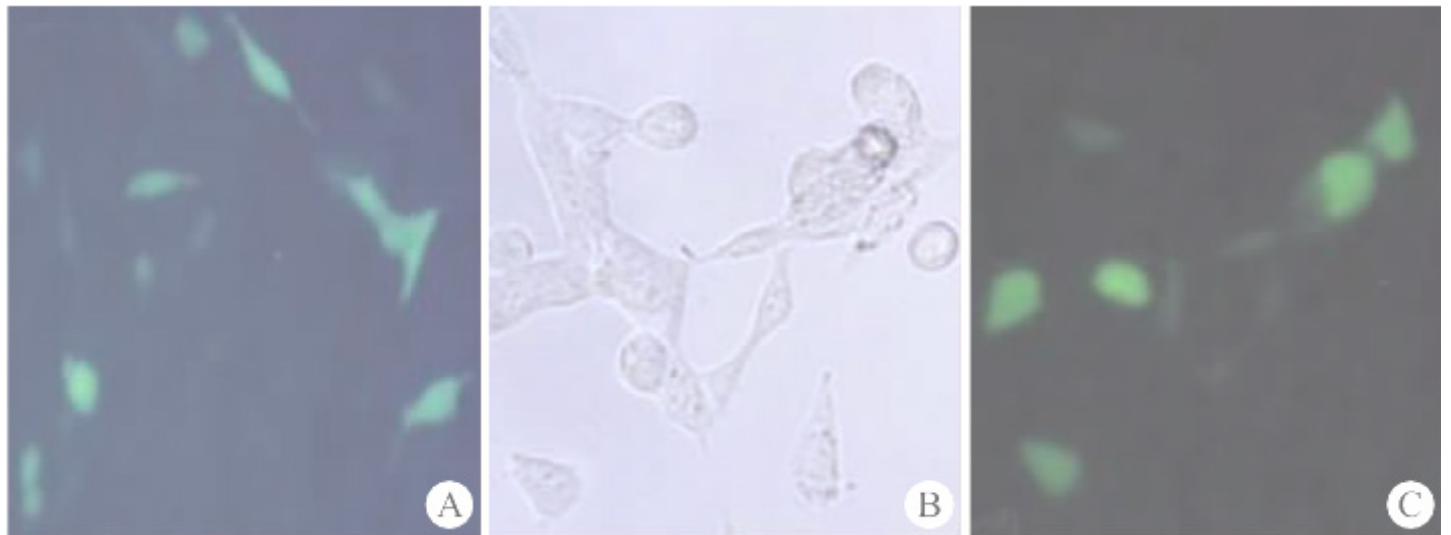


图3 GFP-AWP1融合蛋白在293细胞中的表达

Fig.3 Expression of GFP-AWP1 fusion protein in 293 cells

A: Cells transfected by pEGFP-C2 (Fluorescent microscopy, ×200); B: Cells transfected by pEGFP-C2/AWP1 (Optical microscopy, ×400); C: Fluorescent microscopic observation of the same 293 cells as shown in B for GFP-AWP1 expression (×400)

在来自人类8~9周胎儿和鼠细胞期胚胎的mRNA中发现AWP1, 这一事实表明AWP1基因在哺乳动物形成的早期被表达, 可能在人类发育早期扮演重要的角色。但在人类GenBank的EST branch搜索可见, AWP1 mRNA存在于结肠、子宫、卵巢、黑色素细胞、耳、大动脉和胚胎中心区B细胞。Northern分析亦发现, AWP1在人类心脏、肝、肾、骨骼肌和胎盘中有较高水平的表达[2]。由此推测, AWP1可能参与哺乳动物细胞的生长、分裂和分化。已经发现AWP1能与信号分子蛋白丝/苏氨酸激酶PRK1相互作用[2], 提示AWP1蛋白可能参与了信号的传导过程[5][6]; 并且在AWP1蛋白中还有很多重要的结构功能域, 如其N-, C-末端分别拥有一个保守的 zf-A20(11~35)和zf-AN1(149~189)锌指模体。锌指结构可参与转录因子与DNA结合, 调控基因表达[7], 并参与同其他许多调节蛋白分子相互作用[8]。在其蛋白30~40区(CSVCYKEHLQR)有一个磷酸化酪氨酸作用功能区, 可能参与受体酪氨酸激酶介导的细胞信号传导。还有4个糖基化位点、7个酪蛋白激酶II磷酸化位点等, 但没发现N端的信号肽序列、跨膜区、内质网及膜锚定区[2]。因此, AWP1可能是一种重要的信号蛋白分子。信号蛋白分子如蛋白激酶和蛋白磷酸化酶等往往受时空精细控制, 有着自己的精确亚细胞定位, 并会发生移位现象[9][10]。因此, 对AWP1在293细胞中的定位和移位的观察是研究AWP1生物功能的重要步骤。本实验采用RT-PCR从人ECV304细胞中克隆AWP1 cDNA 重组于GFP表达载体pEGFP-C2, 经酶切、测序鉴定后转染至293细胞, 以观察AWP1蛋白在293细胞中的表达和亚细胞定位。荧光显微镜下发现, 在不携带外源基因的空载体pEGFP-C2转染的对照组293细胞, 绿色荧光弥散分布于整个细胞中; 在重组质粒AWP1/pEGFP-C2转染的293细胞, 可见绿色荧光弥散分布于细胞质内。

近年来, 越来越多的学者认为蛋白质通过核膜的调节性转运是关键步骤之一[11][12][13]。因为在真核细胞中, 由于核膜将遗传物质的隔离, 通过蛋白在细胞核和细胞质之间的选择性移位, 为基因的表达和其他细胞反应过程提供了一个很好的调控机制。蛋白在核膜移位的最重要特征就是蛋白的入核, 它依赖一个保守的序列——核定位信号[14]。这种信号序列能由importin  $\alpha$ 和importin  $\beta$ 组成的异二聚体内移受体复合物所识别[15]。importin  $\alpha$ 由一小的N-端importin  $\beta$ 结合区和大的C-末端NLS结合区的适配蛋白组成。由importin  $\alpha$ 直接作用于核定位信号, 而importin  $\beta$ 只起调节importin  $\alpha$ 与NLS作用。以类似的方式, importin  $\alpha$ 与importin  $\beta$ 的相互作用是受小G蛋白Ran调节[16][17]。通过对AWP1氨基酸序列分析发现, 在其蛋白氨基酸序列中也发现有一个核定位信号(142~148, PKQKKNR)。可以预见, AWP1生物学功能的发挥可能会通过细胞亚细胞器间的移位, 而实现与其他蛋白如PRK1结合或通过其锌指模体经转录因子与DNA的结合进行信号的传导。因此, pEGFP-C2/AWP1重组表达载体构建和表达的成功为下一步实验提供了一个有力的工具。

#### 参考文献:

- [1] Tsien RY. The green fluorescent protein[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67, 509-44.
- [2] Duan W, Sun B, Li TW, et al. Cloning and characterization of AWP1, a novel protein that associates with serine/threonine kinase PRK1 in vivo[J]. Gene, 2000, 256(1-2): 113-21.
- [3] 莫永炎, 曹永宽, 刘亚伟, 等. 人His-AWP1融合蛋白表达载体的构建及其在原核生物的表达[J]. 中华神经医学杂志, 2003, 2(2): 123-5.  
Mo YY, Cao YK, Liu YW, et al. Construction of His-tag human AWP1 fusion protein expression vector and its expression in prokaryotic cells[J]. Chin J Neuromed, 2003, 2(2): 123-5.
- [4] Jiang Y, Liu AH, Huang QB, et al. p38 MAPK signal is necessary for TNF- $\alpha$  gene expression in RAW cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 1999, 31(1): 9-15.
- [5] Amano M, Mukai H, Ono Y, et al. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N[J]. Science, 1996, 271(5249): 648-50.
- [6] Watanabe G, Saito Y, Madaule P, et al. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho[J]. Science, 1996, 271(5249): 645-48.
- [7] Klug A, Schwabe JW. Protein motifs 5. Zinc fingers[J]. FASEB J, 1995, 9(8): 597-604.

- [8] Kuroda S, Tokunaga C, Kiyohara Y, et al. Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(49): 31029-32.
- [9] Zhang L, Jiang Y. The intracellular localization of p38 MAP kinase in different primary cultured cells[J]. *Acta Biophys Sin*, 2000, 16(3): 481-8.
- [10] Jiang Y, Gong XW. Regulation of inflammatory responses by MAPK signal transduction pathways[J]. *Acta Physiol Sin*, 2000, 52(4): 267-71.
- [11] Hood JK, Silver PA. In or out? Regulating nuclear transport[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2): 241-7.
- [12] Hood JK, Silver PA. Diverse nuclear transport pathways regulate cell proliferation and oncogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1471(1): M31-41.
- [13] Jans DA, Xiao CY, Lam MH. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport[J]? *Bioessays*, 2000, 22(6): 532-44.
- [14] Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences—a consensus[J]? *Trends Biochem Sci*, 1991, 16(12): 478-81.
- [15] Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, et al. A short amino acid sequence able to specify nuclear location[J]. *Cell*, 1984, 39(3 Pt 2): 499-509.
- [16] Cingolani G, Petosa C, Weis K, et al. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha[J]. *Nature*, 1999, 399(6733): 221-9.
- [17] Izaurralde E, Kutay U, von Kobbe C, et al. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus[J]. *EMBO J*, 1997, 16(21): 6535-47.

#### 参考文献:

- [1] Tsien RY. The green fluorescent protein[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67, 509-44.
- [2] Duan W, Sun B, Li TW, et al. Cloning and characterization of AWP1, a novel protein that associates with serine/threonine kinase PRK1 in vivo[J]. *Gene*, 2000, 256(1-2): 113-21.
- [3] 莫永炎, 曹永宽, 刘亚伟, 等. 人His-AWP1融合蛋白表达载体的构建及其在原核生物的表达[J]. *中华神经医学杂志*, 2003, 2(2): 123-5.
- Mo YY, Cao YK, Liu YW, et al. Construction of His-tag human AWP1 fusion protein expression vector and its expression in prokaryotic cells[J]. *Chin J Neuromed*, 2003, 2(2): 123-5.
- [4] Jiang Y, Liu AH, Huang QB, et al. p38 MAPK signal is necessary for TNF- $\alpha$  gene expression in RAW cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1999, 31(1): 9-15.
- [5] Amano M, Mukai H, Ono Y, et al. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N[J]. *Science*, 1996, 271(5249): 648-50.
- [6] Watanabe G, Saito Y, Madaule P, et al. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho[J]. *Science*, 1996, 271(5249): 645-48.
- [7] Klug A, Schwabe JW. Protein motifs 5. Zinc fingers[J]. *FASEB J*, 1995, 9(8): 597-604.
- [8] Kuroda S, Tokunaga C, Kiyohara Y, et al. Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(49): 31029-32.
- [9] Zhang L, Jiang Y. The intracellular localization of p38 MAP kinase in different primary cultured cells[J]. *Acta Biophys Sin*, 2000, 16(3): 481-8.

- [10] Jiang Y, Gong XW. Regulation of inflammatory responses by MAPK signal transduction pathways[J]. *Acta Physiol Sin*, 2000, 52(4): 267-71.
- [11] Hood JK, Silver PA. In or out? Regulating nuclear transport[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2): 241-7.
- [12] Hood JK, Silver PA. Diverse nuclear transport pathways regulate cell proliferation and oncogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1471(1): M31-41.
- [13] Jans DA, Xiao CY, Lam MH. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport[J]? *Bioessays*, 2000, 22(6): 532-44.
- [14] Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences—a consensus[J]? *Trends Biochem Sci*, 1991, 16(12): 478-81.
- [15] Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, et al. A short amino acid sequence able to specify nuclear location[J]. *Cell*, 1984, 39(3 Pt 2): 499-509.
- [16] Cingolani G, Petosa C, Weis K, et al. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha[J]. *Nature*, 1999, 399(6733): 221-9.
- [17] Izaurralde E, Kutay U, von Kobbe C, et al. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus[J]. *EMBO J*, 1997, 16(21): 6535-47.

---

[回结果列表](#)