

人 GFP-AWP1 融合基因载体的构建及其在 293 细胞中的表达

曹永宽^{1,2}, 莫永炎¹, 田伏洲², 刘亚伟¹, 邓鹏¹, 秦清和¹, 姜勇¹ (¹南方医科大学病理生理学教研室和全军休克微循环重点实验室, 广东广州 510515; ²成都军区总医院全军普外中心, 四川成都 610083)

摘要:目的 克隆、构建绿色荧光蛋白(GFP)-AWP1(associated with protein kinase C related kinase 1, AWP1)表达载体, 观察 AWP1 在 293 细胞中表达和定位。方法 采用逆转录 PCR(RT-PCR)法从人 ECV304 内皮细胞中扩增 AWP1 cDNA 编码区, 并将其重组于 GFP 表达载体 pEGFP-C2 中。经酶切、序列鉴定分析后, 将该重组质粒通过 DOTAP 脂质体介导, 转染 293 细胞。荧光显微镜观察 AWP1 在细胞内的表达和分布。结果 GFP-AWP1 融合基因表达载体经酶切鉴定和测序分析确认构建成功, 并在 293 细胞中获得了高效表达。荧光显微镜下, 在不携带外源基因的空载体 pEGFP-C2 转染的对照组 293 细胞, 绿色荧光均匀分布于整个细胞中; 在重组质粒 pEGFP-C2/AWP1 转染的 293 细胞, 绿色荧光弥散分布于细胞质内。结论 成功构建 GFP-AWP1 融合基因表达载体并表达于 293 细胞胞质中。

关键词: AWP1; 绿色荧光蛋白; 293 细胞

中图分类号: R329.4 文献标准码: A 文章编号: 1000-2588(2005)02-0174-03

Construction of GFP-AWP1 fusion gene vector and its expression in 293 cells

CAO Yong-kuan^{1,2}, MO Yong-yan¹, TIAN Fu-zhou², LIU Ya-wei¹, DENG Peng¹, QIN Qing-he¹, JIANG Yong¹

¹Department of Pathophysiology and Key Laboratory of Shock and Microcirculation of PLA, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²General Surgery Center of PLA, Chengdu General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, China

Abstract: **Objective** To construct green fluorescent protein (GFP)-AWP1 (a novel human protein associated with protein kinase C-related kinase 1) fusion gene vector for observing the expression and localization of AWP1 in 293 cells. **Methods** The coding region in AWP1 cDNA was amplified by RT-PCR from human endothelial cell line ECV304 and recombined into pEGFP-C2 plasmid expressing GFP. After identification with restriction endonucleases and sequence analysis, the recombinant plasmid was transfected into 293 cells with the cationic liposome DOTAP as the transfection reagent. The expression and localization of AWP1 were observed under a fluorescence microscope. **Results** Restriction endonuclease assay and sequence analysis verified the successful construction of the recombinant vector pEGFP-C2/AWP1, and GFP-AWP1 fusion protein was highly efficiently expressed in 293 cells. Under fluorescent microscope, green fluorescence was seen homogeneously distributed in the entire cell body of the cells transfected by the empty vector pEGFP-C2, but diffusely in the cytoplasm of the cells transfected by the recombinant vector pEGFP-C2/AWP1. **Conclusion** GFP-AWP1 fusion gene vector is successfully constructed and the fusion protein expressed in the cytoplasm of 293 cells.

Key words: AWP1; green fluorescent protein; 293 cells

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。

收稿日期: 2004-09-28

基金项目: 国家杰出青年科学基金(39925014); 国家自然科学基金重点
项目(39830400); 973 计划项目(2002CB513000)

Supported by National Foundation for Outstanding Young Scientists
(39925014), Key Project of National Natural Science Foundation of China
(39830400) and by National 973 Program (2002CB513000)

作者简介: 曹永宽(1965-), 男, 博士研究生, 副主任医师

通讯作者: 姜勇, 电话: 020-61648231; E-mail: yjiang@fimmu.com

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 α 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、*Bam*H 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 *Bam*H I 位点)。PCR 反应体积为 50 μ l,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 /*Bam*H I 消化,3/10 体积 10 mol/L NH₄Ac 与 2.5 倍体积无水乙醇沉淀回收,将其克隆在经酶切 (*EcoR* I /*Bam*H I) 的 pEGFP-C2 表达质粒(以 Sigma 公司的 Glassmilk 试剂盒对酶切载体片段进行纯化)中。

1.2.4 感受态细胞制备及重组质粒的转化 将 100 μ l 冻存于 -70 $^{\circ}$ C 的 DH5 α 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 $^{\circ}$ C 轻摇 45 min;接种到含有卡拉霉素(Kan⁺)的 LB 培养皿中,37 $^{\circ}$ 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⁺)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 /*Bam*H 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 $^{\circ}$ C 条件下 13 000 r/min 高速离心 20 min,取上清备用。以 5 \times 10⁴/ml 293 细胞传代至 Petri 培养皿。待细胞长至 40%~50%融合时,按罗氏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 片段的扩增

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。

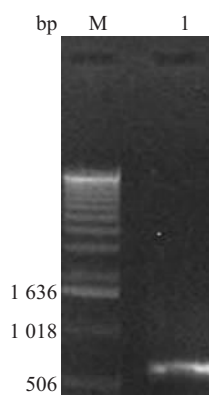


图 1 RT-PCR 扩增 AWP1 cDNA
Fig.1 RT-PCR amplification of AWP1 cDNA

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 /*Bam*H I 双酶切鉴定后,有约 600 bp 的酶切片断,跟扩增的 AWP1 目的片段大小相符。测序结果与人的 AWP1 cDNA 阅读框序列 (GenBank XM_044548)一致。

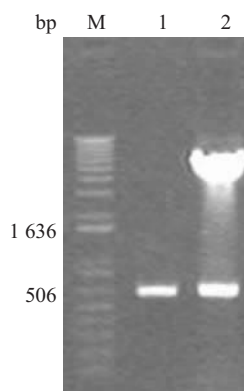


图 2 pEGFP-C2/AWP1 表达载体的鉴定

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

M: 1 kb plus marker; Lane 1: AWP1 cDNA cut by *EcoR* I /*Bam*H I; Lane 2: pEGFP-C2/AWP1 cut by *EcoR* I /*Bam*H 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, 并且随着时间的延长, 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)。

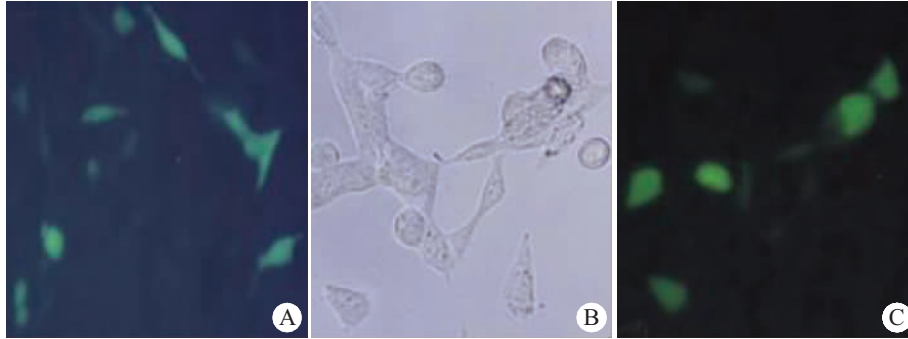


图 3 GFP-AWP1 融合蛋白在 293 细胞中的表达

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

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

3 讨论

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、骨骼肌和胎盘中具有较高水平的表达^[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 个酪氨酸激酶 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^[11-13]。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 α 和 importin β 组成的异二聚体内移受体复合物所识别^[15]。importin α 由一小的 N- 端 importin β 结合区和大的 C- 末端 NLS 结合区的适配蛋白组成。由 importin α 直接作用于核定位信号, 而 importin β 只起调节 importin α 与 NLS 作用。以类似的方式, importin α 与 importin β 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。

(下转 180 页)

参考文献:

- [1] Deb TB, Coticchia CM, Dickson RB, *et al.* Calmodulin-mediated activation of Akt (PKB) regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 38903-11.
- [2] Ji QS, Winnier GE, Niswender KD, *et al.* Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C gamma1 in mammalian growth and development[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(7): 2999-3003.
- [3] Liao HJ, Kume T, McKay C, *et al.* Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in phospholipase c gamma1 deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11): 9335-41.
- [4] Lee YH, Kim S, Kim J, *et al.* Overexpression of phospholipase C-gamma1 suppresses UVC-induced apoptosis through inhibition of c-fos accumulation and c-Jun N-terminal kinase activation in PC12 cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1440(2-3): 235-43.
- [5] Bai XC, Liu AL, Deng F, *et al.* Phospholipase C-gamma1 is required for survival in heat stress: involvement of protein kinase C-dependent Bcl-2 phosphorylation[J]. *J Biochem*, 2002, 131(2): 207-12.
- [6] Park DI, Choi HY, Kam CW, *et al.* Wikyungtang inhibits proliferation of A549 human lung cancer cells *via* inducing apoptosis and suppressing cyclooxygenase-2 activity[J]. *Oncol Rep*, 2004, 11(4): 853-6.
- [7] Woo JH, Kim YH, Choi YJ, *et al.* Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(7): 1199-208.
- [8] Yeo JK, Cha SD, Cho CH, *et al.* Se-methylselenocysteine induces apoptosis through caspase activation and Bax cleavage mediated by calpain in SKOV-3 ovarian cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2002, 182(1): 83-92.
- [9] Noh DY, Lee YH, Kim SS, *et al.* Elevated content of phospholipase C-gamma 1 in colorectal cancer[J]. *Cancer*, 1994, 73(1): 36-41.
- [10] Smith MR, Lin YL, Kim H, *et al.* Inhibition of serum- and ras-stimulated DNA synthesis by antibodies to phospholipase C [J]. *Science*, 1990, 247(4946): 1074-7.
- [11] Mario J, Rebecchi BP, Srinivas N, *et al.* Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C [J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(4): 1291-335.
- [12] Stephane M, Alexandra C, Isabelle P, [J]. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma1: implication in stem cell factor radioprotective effect [J]. *Blood*, 2002, 100(4): 1294-301.
- [13] Mai HQ, May WS, Gao FQ, *et al.* A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(3): 1886-91.

(上接 176 页)

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- α 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.