

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0068 - 4

3 个 HDAC1 的保守氨基酸定点突变的获得

陈 坚¹, 张晓琴², 傅继梁³(¹ 第二军医大学海军卫生教研室, ² 第二军医大学长海医院感染科, ³ 第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所 上海 200433)

摘要:目的:为了研究 HDAC1 保守氨基酸的定点突变对其功能的影响,需要建立 HDAC1 保守氨基酸定点突变的突变子。方法:在克隆 HDAC1 cDNA 的基础上,利用 Altered Site 体外突变系统对 HDAC1 保守氨基酸中的三个氨基酸位点进行突变,经 DNA 测序鉴定。结果与结论:结果分别获得了 HDAC1 的 C151A, Y188F, S197A 的定点突变子,为进一步研究 HDAC1 保守氨基酸的定点突变对其功能的影响打下了基础。

关键词:组蛋白脱乙酰化酶 1;组蛋白脱乙酰化;定点突变

中图分类号:Q784

文献标识码:A

CONSTRUCTION OF THREE CONSERVED AMINO ACID RESIDUE MUTATIONS OF HDAC1

CHEN jian¹ Xiao-qin ZHANG² Ji-liang FU³

(1. Department of navy hygiene, 2. Infection department Changhai hospital, 3. Institute of

Trail 的原核表达在国内外还不曾有报道,我们克隆了该基因并建立了原核的表达系统,正在进行产物的纯化和活性测定,这将为肿瘤生物治疗研究和临床应用奠定基础。

参考文献

- 1 Robert MP, Scot AM, Siehfried R, et al. Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies J. *Br J heamatol*, 1997, 99:618 - 624.
- 2 Henning W, Mariapia AD, Richard SJ, et al. TRAIL-R2:anovel apoptosismediating receptor for TRAIL J. *EMBO J*, 1997, 16 (17):5385 - 5391.
- 3 Pascal S, Jean-Luc B, Margot T, et al. Characterization of two receptors for TRAIL J. *FEBS Letters*, 1997 (416):329 - 334.
- 4 Wayne DH, Perter H. TNF-related apoptosis-inducing liand (TRAIL) inducess apoptosis in Fas liang-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell Killing of target cells J. *J Immunol*, 1998, 161:2195 - 2200.
- 5 Sara MM, Berd M, Elena AA, et al. Interleukin 1 -converting enzyme related proteases/ caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells J. *J Cell Biol*, 1997, 137(1):221 - 229.
- 6 klaus S, Davide F, Marck L, et al. Apoptosis signaling by death receptorsJ. *Europe J Biochem*. 1998,254:439 - 459.
- 7 Arjun S, Jian N, Bharat BA, et al. Death domain receptors and their role in cell demise J. *J Interferon Cytokine Res*, 1998, 427:124 - 128.
- 8 Preet MC, Michael E, Alan J, et al. Death receptor 5, a new member at the TNFR family, and DR4 inducing FADD-dependent apoptosis and active the NF- κ B pathway J. *Immunity*, 1997, 7:831 - 836.
- 9 Pierre G. Cell death: TRAIL and its receptorsJ. *Current Biol*, 1997,7:R750 - R753.
- 10 Sara MM, Peter HK. Differential regulation of TRAIL and CD95 liand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage J. *Europe J Immunol*, 1998,28:973 - 982.

收稿日期:1999 - 11 - 14; 修订日期:2000 - 01 - 13

作者简介:陈坚(1966 -)男,浙江绍兴人,讲师,博士,从事基因表达调控研究。

基金项目:国家自然科学基金资助(39800082)

Abstract: Purpose and Methods: It's necessary to construct the conserved amino acid residue mutations of HDAC1 for studying the functions of the conserved amino acid residues of HDAC1. On the base of cloning of HDAC1 cDNA, Three mutants of HDAC1, which contain the conserved three amino acid residue mutations respectively were made by the Altered Site in-vitro mutation system, and confirmed by DNA sequencing. **Results and Conclusion:** The results were that C151A, Y188F, S197A mutants of HDAC1 were obtained, and made the base for further studying the function affection of conserved amino acid residue mutations.

Key words: histone deacetylation; histone deacetylase 1 (HDAC1); in-vitro site mutation

核心组蛋白的乙酰化和脱乙酰化,与基因转录的调控有密切的关系^{1,2}。

但是,有关基因表达调节过程中乙酰化的具体过程及其所起的作用,是在催化组蛋白乙酰化的组蛋白乙酰转移酶(HAT)和催化组蛋白脱乙酰化的组蛋白脱乙酰化酶(HDAC)的发现后,才有了较深入的理解,同时,也相应地发现这两种酶与某些重要的生物学效应有关:与基因转录、DNA甲基化、细胞周期调控和肿瘤的发生等有着密切的关系³⁻⁵。HDAC1是组蛋白脱乙酰化酶家族中的一员。1996年, Taunton等⁶利用经过改造的组蛋白脱乙酰化抑制剂 Trapoxin 作亲和基质,分离了两个核蛋白,其中的一个就是 HDAC1,全长 cDNA 读框为 1449bp,从中推导出其蛋白质含 482 个氨基酸。有关 HDAC1 功能域的研究, Hassig 等⁷发现, HDAC1 和其它脱乙酰化酶有关的蛋白质有一些保守的氨基酸残基,并确定其中的一些氨基酸与组蛋白脱乙酰化酶活性有关。而其他氨基酸对 HDAC1 活性有否作用,仍有待进一步研究。本文利用 Altered Site 体外突变系统对 HDAC1 的三个保守氨基酸位点进行突变,并经 DNA 测序鉴定。结果分别获得了 HDAC1 的 C151A、Y188F、S197A 的定点突变子。

材料与方法

1 质粒和菌株

含有 HDAC1cDNA 的质粒 pGEM - T Easy - HDAC1 先前已经构建完成⁸, pBluscript SK+ 为本室保存,突变用载体 pALTER 购自 Promega 公司;大肠杆菌 DH10B 为本室保存, ES1301、JM109 购自 Promega 公司。

2 常用酶类及试剂

BamHI、EcoRI、碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶、T4 多聚核苷酸激酶、X - gal、IPTG 分别购自

Boehringer Mannheim 公司和 Promega 公司;其他生化试剂均为国产分析纯。突变引物由上海生工生物工程公司合成。

3 试剂盒

Altered Site in vitro mutagenesis System 购自 Promega 公司;测序试剂盒 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 为 Perkin Almer 公司产品。

4 构建 pALTER - HDAC1 并制备其单链 DNA

从已经构建的 pGEM - T Easy - HDAC1 上用 EcoRI 切下 HDAC1cDNA,经与 pBluscript SK+ 连接,两端获得 BamHI 切点,再与 pALTER 连接构建 pALTER - HDAC1;载体经单酶切后,加入碱性磷酸酶,使载体 5'端去磷酸化,减少自身环化。将 HDAC1 外源片断与载体以摩尔数 2:1 - 3:1 混匀, 16 ℃,连接过夜,常规转化 JM109 感受态细菌,涂布于含 10μg/ml 四环素的 LB 平皿上,倒置培养,酶切、PCR 鉴定获得阳性重组子。挑取经鉴定的含 pALTER - HDAC1 的单菌落,用 PEG8000 沉淀法,抽提 pALTER - HDAC1 单链。

5 突变反应及产物转化细菌及鉴定点突变

突变引物经 T4 多聚核苷酸激酶磷酸化后,与氨苄青霉素抗性引物和四环素敏感引物以 25:1 的比例共同加入 pALTER - HDAC1 单链模板中,同时加入 dNTP、T4 DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶,作突变反应;10μl 突变反应产物加入 100μl ES1301 感受态中,置冰浴 20min,42 ℃,50sec,冰浴 2min,加入 LB900μl, 37 ℃,190r/min 振荡 30min,加入 4.5ml 含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基,振摇过夜,少量提取 DNA,常规方法转化 JM109 感受态细菌,涂布于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板培养过夜,挑单菌落于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养过夜,少量提取 DNA,酶切鉴定后,行自动测序鉴定突变位点。

结 果

1 突变引物的设计

根据 Hassig 等分析的保守氨基酸,分别选定了保守氨基酸中的 C151、Y188、S197 作定点突变,即分别建立 C151A、Y188F、S197A 的点突变,其对应的密码子分别由 TGT 突变成 GCT,由 TAC 突变成 TTC,由 TCC 突变成 GCC,三条突变引物组成如下: P_{C151A}: 5' GCA TCTGGCTTCGCTTACGTCAATGA 3'; P_{Y188F}: 5' GGCCTTCTTCACCACGGA 3'; P_{S197A}: 5' TGACTGTGGCCTTTTCATA3'。

2 pAL TER - HDAC1 的鉴定

构建成 pAL TER - HDAC1 后,用 BamHT 和 EcoRI 分别酶切鉴定重组子: BamHI 可切出约 1449bp,而 EcoRI 不能切出者为阳性重组子,并且是 HDAC1 cDNA 的 5' 端靠近 T7 启动子的正向连接的 pAL TER - HDAC1 (见图 1),可作为点突变反应的模板。

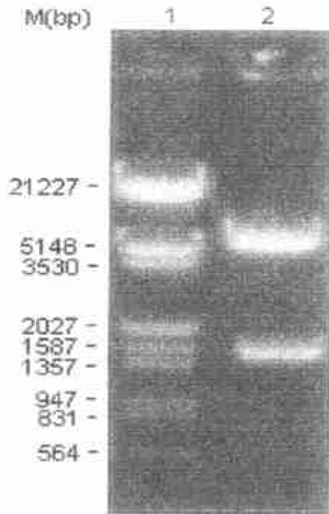


Figure 1 Determination of pAL TER - HDAC1

Lane 1: DNA EcoRI/ HindIII marker;

Lane 2: pAL TER - HDAC1 digested by BamHI

3 pAL TER - HDAC1 单链的鉴定

挑取经鉴定的含 pAL TER - HDAC1 的单菌落,用 PEG8000 沉淀法,抽提 pAL TER - HDAC1 单链,经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定并初步定量: pAL TER - HDAC1 单链比双链泳动的快,浓度约为 50ng/μl。



Figure 2 Electrophoresis of single strand

and double strand of pAL TER - HDAC1

Lane 1: single strand of pAL TER - HDAC1

Lane 2: double strand of pAL TER - HDAC1

4 HDAC1 点突变的确定

以经酶切初步鉴定的 pAL TER - HDAC1_{Ms} 为模板,选择离预设突变位置最近的序列为引物,作荧光物标记的全自动测序,确定预设的突变:以 p T7 为引物测序,判读到 HDAC1 cDNA 的第 451 位的 T 突变成 G,第 452 位的 G 突变成 C,使 HDAC1 的第 140 位的 Cys 突变成 Ala 即获得了 C151A 的定点突变 (见图 3A)

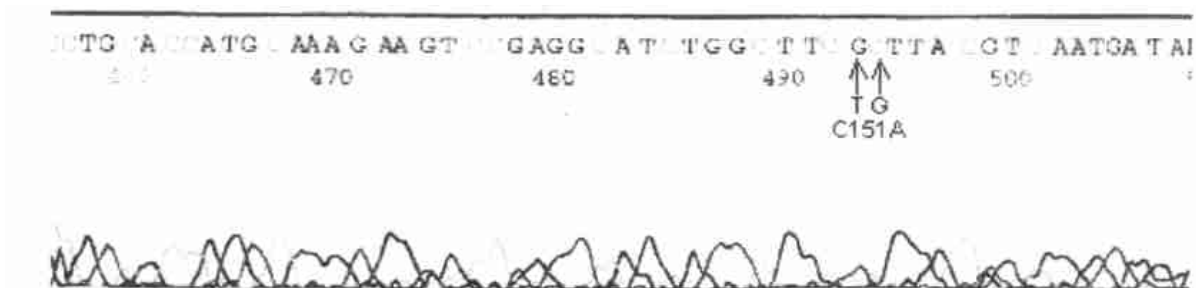


Figure 3A Correspondence nucleotide mutation with C151A

以 HDAC1 的中间序列 pHD1mid 为引物测序,判读到 HDAC1 cDNA 的第 563 位的 A 突变成 T,使 HDAC1 的第 188 位的 Tyx 突变成 Phe,即获得了 Y188F 的定点突变 (见图 3B)

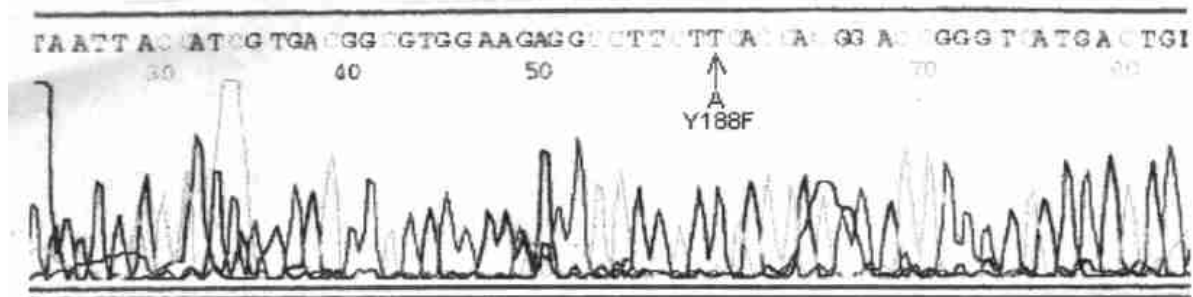


Figure 3B Correspondence nucleotide mutation with Y188F

以 pHD1mid 为引物测序,判读到 HDAC1 cDNA Ser 突变成 Ala,即获得了 S197A 的定点突变(见图 3C) 的第 589 位的 T 突变成 G,使 HDAC1 的第 197 位的

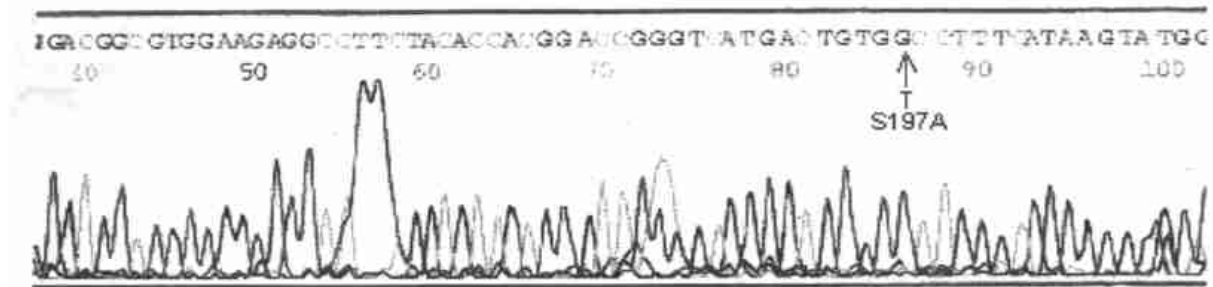


Figure 3C Correspondence nucleotide mutation with S197A

因此,我们分别获得了 HDAC1 的 C151A、Y188F、S197A 的突变。

讨 论

定点突变研究是研究蛋白质结构和功能关系的重要方面,我们在本研究所选择的 HDAC1 的突变位点是参考了 Hassig 等⁷ 所提供的线索。他们通过分析发现:(1) HDAC1 可能是金属蛋白,他们发现,有一个锌整合剂可抑制 HDAC1 活性;与 HDAC 相关的乙酰精胺脱乙酰化酶等也是金属蛋白。(2) HDAC1、HDAC2、HDAC3、酵母 RPD3 和乙酰精胺脱乙酰化酶及原核 AUP(Prokaryotic acetoin utilization protein) 序列同线性分析发现有一些完全保守的氨基酸残基。基于上述分析,他们对 HDAC1 中完全保守的氨基酸残基中可能与催化活性或金属酶有关的 H141、H199、D174、D176 作了定点突变研究,结果发现所有突变都降低了 HDAC1 的脱乙酰化酶活性。我们的研究选择了 HDAC1 保守氨基酸残基中被推测可能与 HDAC1 催化活性有关,但还没有被证实的另外的 3 个位点(C151, Y188, S197),结果分别成功地建立了 C151A, Y188F, S197A 的定点突变,下一步将比较野生型和突变型 HDAC1 的组蛋白脱乙酰化活性。

克隆化 DNA 片断的定点突变主要是利用寡聚核苷酸介导的诱变。或通过 PCR 方法获得突变体;或按照传统的方法,将诱变寡聚核苷酸与靶 DNA 退火杂交,在体外利用 DNA 聚合酶延伸已杂交的寡聚核苷酸,杂交双链转化易感细菌,筛选出带目的突变的噬菌体,测序确证。用传统的定点突变技术,筛出突变的效率很低。我们在对 HDAC1 进行定点突变时,应用了对后一种传统方法进行改良的 Altered Site 体外突变系统。该系统引入了 2 个抗生素抗性筛选,提高了检出突变的效率,通常可大于 90%: 该系统在同一个制备杂交体的反应管中加入了 3 种突变引物:一对药物抗性相反的寡聚核苷酸引物(Amp^r/Ter^s 或 Amp^s/Ter^r)和浓度大大高于药物抗性引物的含目的突变的寡聚核苷酸引物,缓慢退火时,抗性引物可与 pALTER - HDAC1 单链模板杂交,含目的突变的寡聚核苷酸引物因其浓度较高,更易与 pALTER - HDAC1 单链模板杂交,键延伸时,DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶同时加入同一反应管中,因此,含目的突变的寡聚核苷酸引物的延伸链可与药物抗性的寡聚核苷酸引物的延伸链连接,转化细菌后,可在适当的抗性培养基作初步筛选。因此,检出突变子的效率大大升高。在我们利用该系统对

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0072 - 04

镉金属硫蛋白对小鼠脾淋巴细胞 DNA 链损伤和修复的体外实验研究

林忠宁,董胜璋,蔡颖,董书芸,余贵英,任铁玲

(中山医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室,广东 广州 510089)

摘要:目的:为研究外源性镉金属硫蛋白(CdMT)对淋巴细胞 DNA 的损伤和修复作用。方法:采用单细胞电泳法(SCGE)检测 DNA 单链断裂(SSBs),观察在脱金属硫蛋白(Apo - MT)和不同终浓度 CdMT(0.1 μ mol Cd²⁺/L、1.0 μ mol Cd²⁺/L、10.0 μ mol Cd²⁺/L、20.0 μ mol Cd²⁺/L)染毒作用 30 分钟和 60 分钟时 DNA 链损伤,和去除受试物后 30 分钟、60 分钟、120 分钟时 DNA 链损伤的修复。结果:DNA - SSBs 尾长在 Apo - MT 作用未见增加;在中、高剂量 CdMT 染毒 30 和 60 分钟时都明显增长。损伤后链修复 DNA 迁移尾长,在中、高剂量 CdMT 组都显著低于细胞染毒时,但明显高于对照和 Apo - MT 组。结论:提示 CdMT 直接作用可致脾淋巴细胞 DNA 链的损伤,同时细胞存在对单链断裂的修复机制。

关键词:金属硫蛋白;镉;DNA 损伤和修复;单细胞电泳

中图分类号:R730.3;X591 文献标识码:A

IN VITRO STUDY ON THE DNA INJURIES AND REPAIR OF SPLENIC LYMPHOCYTE INDUCED BY CADMIUM - METALLOTHIONEIN

HDAC1 进行定点突变时,注意了以下几点:(1)单链模板的获得:虽然用双链 DNA 经碱变性后作模板比较快速,但我们发现抽提噬菌体单链作模板对于突变反应更加有效。(2)含目的突变的寡聚核苷酸引物的设计:在对 HDAC1 的 3 个突变中,有 2 个突变是单核苷酸突变,我们在突变点的上下游各加了 8 - 9 个单核苷酸;另一个突变中有 2 个单核苷酸突变,则在突变点的上下游各加了 12 个单核苷酸,这样,在退火时,含目的突变的寡聚核苷酸和模板的杂交物比较稳定,有利于链的延伸。引物合成后,需要对其 5' 端磷酸化,以利于突变链的连接环化。(3)过渡宿主细胞 ES1301 的选择和高效感受态的制备是重要的。例如,采用氯化铷方法制备 ES1301 感受态细菌,对于提高极少量突变反应产物的转化效率是有用的。

参考文献

1 Hebbes TR, Thorne AW and Crane - Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptional active chromatin

J. *EMBO J*, 1988, 7:1395 - 1402.

2 Turner BM. Histone acetylation of control of gene expression J. *J Cell Sci*, 1991, 99:13 - 20.

3 Pazin MJ and Kadonaga JT. What 's up and down with histone deacetylation and transcription? *J Cell*, 1997, 89:325 - 328.

4 Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re - expression of genes silenced in cancer J. *Nature Genetics*, 1999, 21:103 - 107.

5 Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, et al. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A J. *Cell*, 1999, 96(3):405 - 413.

6 Taunton J, Hassig CA, and Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p J. *Science*, 1996, 272:408 - 411.

7 Hassig CA, Tong Jk, Fleischer TC, et al. A role for histone deacetylase activity in HDAC1 - mediated transcription repression J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:3519 - 3524.

8 陈坚,傅继梁. 组蛋白脱乙酰化酶 HDAC1 cDNA 的克隆及其酵母表达质粒的构建 J. *第二军医大学学报*, 1999, 20(4):205 - 208.

收稿日期:1999 - 08 - 04; 修订日期:1999 - 11 - 20
基金项目:国家自然科学基金资助课题(39770636)

作者简介:林忠宁(1968 -)男,福建惠安人,讲师,硕士,从事重金属免疫毒理学研究。